

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie mit Blutbank
(Direktor: Prof. Dr.med. M.U. Heim)
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Klinische Parameter und Laborprofile
bei der Abklärung des Verdachts auf eine
Heparin- induzierte Thrombozytopenie (HIT) Typ II
bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen**

INAUGURAL- DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Egon Klatt

aus Tübingen

Magdeburg 2011

DOKUMENTATIONSBLATT

Bibliographische Beschreibung

Klatt, Egon:

Klinische Parameter und Laborprofile bei der Abklärung des Verdachts auf eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) Typ II bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen.

(22.11.2011)

Kurzreferat:

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II) ist eine teils lebensbedrohliche Nebenwirkung der Heparinbehandlung und zeigt als erstes und wichtigstes klinisches Zeichen einen Thrombozytenabfall, der aber auch bei anderen Krankheitsbildern als ein Hauptsymptom gilt, wie z.B. die Verbrauchskoagulopathie (DIC). Aber auch bei Operationen mit der Herz-Lungen-Maschine (HML) kommt es sehr häufig zum Thrombozytenabfall, so dass sich bei diesen Patienten oft die Frage nach dessen Ursache stellt, und zwar, ob dieser Abfall allein HLM-bedingt oder zusätzlich durch die Gabe von Heparin zur Antikoagulation ausgelöst ist. Um die verschiedenen Testverfahren zur Abklärung einer HIT II nach herzchirurgischen Eingriffen zu validieren, wurden die klinischen und labormäßigen Daten von 193 Patienten mit klinischem V.a. HIT II ausgewertet. Bei 25 Patienten ließ sich zumindest mit einem der eingesetzten Tests ein Antikörper gegen den Heparin-PF4-Komplex nachweisen, wobei nur bei wenigen Patienten in mehreren Tests dieser AK-Nachweis gelang, d.h. bestätigt wurde. Alle Tests zeigten abweichende Ergebnisse, wobei bezeichnenderweise für diese Tests bis dato keine Ringversuche angeboten wurden, was für den Laborbereich ungewöhnlich ist, so dass dringend für jedes Labor interne Validierungen erforderlich sind.

Schlüsselwörter:

Heparin-induzierte Thrombozytopenie, HIT Typ II, Antikoagulation, Heparin-Plättchenfaktor4-Komplex (H/PF4-Komplex), Thrombembolien

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	6
1.1.	Die Heparin-Therapie – eine Übersicht.....	7
1.1.1.	Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT Typ I).....	9
1.1.2.	Die immunologische Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT Typ II).....	10
1.2.	Labordiagnostik der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT Typ II).....	14
1.2.1.	Funktionelle Testverfahren.....	14
	- PAT nach Kelton	
	- C 14-SRA nach Sheredan	
	- HIPA-Test nach Greinacher	
1.2.2.	Immundiagnostische Testverfahren.....	15
	- Heparin- PF4 – ELISA Test nach Amiral	
	- ID-PaGIA – Partikel Gel Immunoassay nach Eichler	
	- AESKULISA HiT ELISA	
1.3.	Therapie der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT Typ II).....	16
2.	Problemstellung und Fragestellung	18
3.	Patienten und Testverfahren	19
3.1.	Patientenkollektive.....	19
3.2.	Methoden.....	20
3.2.1.	Heparin/PF4 ENHANCED Festphasen-Enzymimmunoassay (H/PF4-ELISA).....	20
3.2.2.	AESKULISA HiT II.....	21
3.2.3.	ID-PaGIA Heparin/PF4-Antikörper Test.....	23
3.2.4.	Heparin-induzierter Plättchen-Aktivierungstest / HIPA-Test.....	23
3.3.	Statistische Methoden.....	25
4.	Ergebnisse	26
4.1.	Klinische Charakteristika der Gruppe I.....	29
4.2.	Klinische Charakteristika der Gruppe II.....	32
4.3.	Klinische Charakteristika der Gruppe III.....	35
4.4.	Klinische Charakteristika der Gruppe IV.....	37
4.5.	Vergleich der labordiagnostischen Testergebnissen der 4 Gruppen.....	41

5. Diskussion	46
5.1. Schlussfolgerungen	51
6. Zusammenfassung	53
7. Literaturverzeichnis	54
8. Eidesstattliche Erklärung	63
9. Danksagung	64
10. Lebenslauf	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACVB	Aorto-Coronarer-Venen-Bypass
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP/ ATP	Adenosindiphosphat /- triphosphat
AK	Antikörper
AKE/ AKI	Aortenklappenersatz / Aortenklappeninsuffizienz
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AT	Antithrombin
ATE	Arterielle Thromboembolie
COPD	Chronisch Obstruktiven Lungenerkrankung
DIC	Disseminierte Intravasale Koagulopathie
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
GF	Gerinnungsfaktor
GOT / GPT	Glutamat-Oxalat-Transaminase / Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GP	Glykoprotein
HIPA	Heparin-induzierter Plättchenaktivierungstest
HIT	Heparin- induzierte Thrombozytopenie
HLM	Herz- Lungen- Maschine
H/PF4	Heparin/ Plättchenfaktor 4- Antigenkomplex
HSMI	Herzschrittmacher Implantat
ID-PaGIA	Polymerpartikel-Gel-Immunoassay
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunoglobulin
ITP	Idiopathische Autoimmunthrombozytopenie
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
kDa	Kilodalton
MKE / MKI	Mitralklappenersatz / Mitralklappeninsuffizienz
MW	Mittelwert
NAP-2	Neutrophile aktivierendes Peptid
NI / ANV	Niereninsuffizienz / akutes Nierenversagen
NMH / UFH	Niedermolekulares Heparin / Unfraktioniertes Heparin
OD	Optische Dichte
p	Signifikanz
PAT	Plättchenaktivierungstest
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PF4	Plättchenfaktor 4
PLT	Blutplättchen/Thrombozyten
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
RES/RHS	Retikuloendotheliales/ Retikulohistiozytäres System
SD	Standardabweichung
SRA	Serotonin- Release- Assay
TEK	Thromboembolische Komplikationen
TEP	Totale Endoprothese
TF	Tissue Faktor
TKE / TKI	Trikuspidalklappenersatz / Trikuspidalklappeninsuffizienz
TP	Thrombozytenproteine
VHF	Vorhofflimmern

Patient heißt in dieser Arbeit auch Patientin. Das trifft auch alle in dieser Arbeit benutzten Bezeichnungen, die aus Gründen der einfacheren Lesbarkeit nur in der maskulinen Form verwendet sind.

1. EINLEITUNG

Heparin ist wegen seiner gerinnungshemmenden Eigenschaften ein weitverbreitetes Medikament in der Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Komplikationen. Eine seiner unerwünschten Nebenwirkungen, die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) äußert sich in einem Abfall der Thrombozyten in den ersten beiden Wochen nach Therapiebeginn. Dabei lassen sich hinsichtlich Pathomechanismus und Klinik zwei verschiedene Formen der HIT unterscheiden: eine nicht-immunologische HIT und eine immunologische HIT - früher HIT Typ I und HIT Typ II genannt.

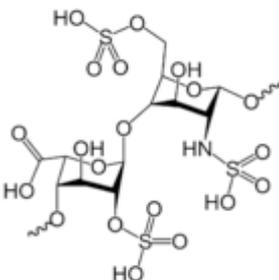
Die nicht-immunologische HIT weist nur eine milde Thrombozytopenie von ca. 30% des Ausgangswertes in den ersten 3 bis 5 Tagen nach Therapiebeginn ohne weitere bedeutsame Komplikationen auf, während der Thrombozytenabfall bei der selteneren immunologischen HIT mehr als 50% vom Ausgangswert beträgt verbunden mit lebensbedrohlichen thromboembolischen Komplikationen und damit von größerer klinischer Relevanz.

Die Thrombozytopenie bei HIT Typ II tritt in der Regel mit einer zeitlichen Verschiebung von 5 bis 20 Tagen nach Therapiebeginn auf und kann von der applizierten Heparindosis abhängig sein. Dieser Abfall ist allerdings reversibel nach Absetzen des Heparins. Deswegen ist die wichtigste therapeutische Maßnahme bei einem dringenden Verdacht auf eine HIT Typ II der sofortige Abbruch der Heparin-gabe. Aber gerade diese Patienten leiden oft an einer antikoagulationsbedürftigen, da thrombosegefährdeten Grunderkrankung und benötigen eine zuverlässige Diagnosesicherung durch qualifizierte Testverfahren, um die notwendige Antikoagulationstherapie anzupassen und thromboembolische Komplikationen vermeiden zu können.

In den letzten Jahren wurde für die HIT-Diagnostik eine Reihe von Testsystemen entwickelt, die eine unterschiedliche Sensitivität und Spezifität aufweisen. An erster Stelle stehen die funktionellen Testsysteme, die auf einem indirekten Nachweis von HIT-Antikörpern durch eine Aktivierung von Spenderthrombozyten basieren und über eine gute Aussagekraft verfügen. An zweiter Stelle befinden sich die immunologischen Testsysteme, die mögliche HIT-Antikörper direkt nachweisen. Jedes Verfahren hat für die Entscheidungsfindung der klinisch tätigen Ärzte Vor- und Nachteile.

1.1 Die Heparin-Therapie – eine Übersicht

McLean entdeckte 1916 den antikoagulierenden Effekt eines aus der Hundeleber gewonnenen Extraktes, der später von Howell und Holt „Heparin“ (lat.: Hepar = Leber) genannt wurde und weitere 20 Jahre später durch Crafoord und Murray für die therapeutische Anwendung eingesetzt wurde. In der Anfangsphase kam es zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, insbesondere Blutungskomplikationen, welche auf Dosisfindungsschwierigkeiten und einer unzureichenden Reinheit des gewonnen Heparins zurückzuführen waren. Heparin wird auch in den Mastzellen als körpereigene Substanz gebildet, findet sich jedoch nur in sehr geringeren Konzentrationen im zirkulierenden Blut (Schwartz et al. 1990).

Chemische Eigenschaften	
	
IUPAC-Name: Glucuronsäure-O-sulfatmucopolysaccharid	
Summenformel	unspezifisch
Molare Masse	6000-30000 g/mol

Die handelsüblichen Heparin-Präparate variieren im Molekulargewicht zwischen 4.000 und 40.000 Dalton - das mittlere Gewicht des unfraktionierten Heparins (UFH) liegt bei etwa 15.000 Dalton (Nilsen et al. 1988). Therapeutisch verwendetes Heparin wird vor allem aus Lunge, Leber und Darmmukosa von Rindern und Schweinen gewonnen. Niedermolekulare Heparine werden aus unfraktioniertem Heparin durch Polymerisation hergestellt, verfügen über ein niedrigeres Molekulargewicht (4.000 – 6.000 Dalton) und weisen eine längere Wirkdauer, bessere Bioverfügbarkeit und eine geringere Nebenwirkungsrate auf (Breddin et al. 1989).

Rosenberg et al. 1973 verteidigten ihre Theorie, dass Heparin nur indirekt über das körpereigene Antithrombin (AT) seine gerinnungshemmende Wirkung aufweisen kann, wobei am bedeutendsten der hemmende Einfluss auf die aktivierten Gerinnungsfaktoren IIa und Xa ist. Durch Heparin wird die Inhibitionskinetik von AT um ein Tausendfaches beschleunigt. Als eine Bedingung für die Verbindung an Antithrombin muss ein Heparinfragment eine genau determinierte Pentasaccharidsequenz enthalten. Aber nicht alle Heparine verfügen über diese Sequenz und das teilt alle Heparine in die Gruppen mit hoher bzw. niedriger AT- Affinität ein (Schwartz et al. 1990; Choay et al. 1989; Haas 1996). Nach der Bindung des „Heparin-AT-Komplex“ an Thrombin oder an den Gerinnungsfaktor (GF)-Xa dissoziiert Heparin aus dem Komplex ab und kann neue Komplexe mit AT bilden. Der inaktivierte „Proteasen-AT-Komplex“ wird über das retikuloendotheliale System (RES) eliminiert (Glusa et al. 1997). Durch die Hemmung des Thrombins kommt es zu einer Inaktivierung der Fibrinpolymerisation, die die Bildung von Fibrinmonomeren sowie eine Desaktivierung des aktivierten GF-Va und die Thrombozytenaggregation verhindert (Weitz et al. 1990).

Indikationen für die Heparin-gabe: Im Jahr 1986 wurde auf der NIH-Konsensus Konferenz das UFH in niedriger Dosis (low-dose) weltweit zur Prophylaxe tiefer Venenthrombosen anerkannt. In der Europäischen Konsensus-Erklärung von 1991 wurden auch die niedermolekularen Heparine für die Prophylaxe thromboembolischer Komplikationen im sogenannten Hochrisikobereich (peri- und postoperative Prophylaxe) eingesetzt und später auch für die Therapie der tiefen Beinvenenthrombose und Lungenembolie.

Die wesentlichen Anwendungsgebiete von **UFH** sind die Thromboembolieprophylaxe in der operativen Medizin, die Behandlung von venösen und arteriellen Thrombosierungen (z.B. Lungenembolie), Antikoagulation bei der Behandlung mit extrakorporalem Kreislauf (z.B. Herz-Lungen-Maschine und Hämodialyse) u.a.m. **NMH** sind unter anderem angezeigt zur perioperativen Prophylaxe von venösen Thrombosen, wobei über viele Jahre weitere Einsatzgebiete ohne arzneimittelrechtliche Zulassung zur Anwendung kamen (z.B. Therapie von Venenthrombosen und Lungenembolien).

Nebenwirkungen der Heparintherapie: Die allgemeinen Nebenwirkungen bestehen aus allergischen Reaktionen, wie z.B. Urtikaria, der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ I und Typ II, aus Blutungen, besonders bei einer Überdosierung (z.B. bei Niereninsuffizienz), Anstieg von Serumtransaminasen (GOT, GPT), γ -GT, LDH, Lipase, reversible Haarausfälle und Osteoporose. Eine besondere klinische Bedeutung spielen die heparinbedingten Thrombozytopenien, wobei dieser Effekt nach einer Heparininjektion bei gesunden Menschen schon im Jahre 1962 von Gollub et al. beobachtet worden war. Von Rhodes et al. wurde im Jahre 1973 die Heparin-induzierte Thrombozytopenie als eine auf einem immunologischen Mechanismus basierende Krankheit beschrieben. Nach heutigem Wissensstand wird zwischen den beiden Formen einer nicht-immunologischen Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT Typ I) und einer immunologischen Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT Typ II) differenziert.

1.1.1 Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT Typ I)

Die nicht-immunologische Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT Typ I) tritt bei ca. 10 % der Patienten nach Beginn einer Heparintherapie auf und führt zu einem mäßigen Thrombozytenabfall (selten $< 100.000/\mu\text{l}$ - selten $> 30\%$ des Ausgangswertes) innerhalb der ersten zwei bis fünf Tage nach Beginn einer Antikoagulationstherapie. Trotz weiterer Heparingabe normalisiert sich die Thrombozytenzahl vorwiegend innerhalb von drei Tagen (Chong et al. 1990).

Die Pathogenese der HIT Typ I ist nicht ausreichend geklärt. Dieses Phänomen, die verstärkte Plättchenaggregation durch Heparin, wurde nach der Beobachtung von Gao (Gao.C. et al., 2011) durch eine Bindung an das $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin beschrieben, obwohl die genaue Bindungsstelle von Heparin am $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin noch nicht bekannt ist. Weiterhin ist das Ausmaß der Thrombozytopenie vom Supplementierungsgrad, vom Molekulargewicht und von der Dosierung des Heparins abhängig, wobei auch die Komorbidität (Horne et al. 1990) und der Einsatz von Herz- Lungen- Maschinen (extrakorporale Blutkreislauf-System / EKZ) bei den kardiochirurgischen Patienten eine große Rolle spielen (Bleese N. 1990). Während der EKZ fällt die Thrombozytenzahl in der Regel um ca. 40% ab und es kommt zu einer Thrombozytenfunktionsstörung (Cullmann et al., 1980; Weber C.F. et al. 2011).

Die Labordiagnostik zur Feststellung der HIT Typ I ist nicht ausreichend abgesichert und wäre aufgrund der geringen klinischen Bedeutung dieses HIT Typs nur differenzialdiagnostisch bedeutsam (Greinacher 1995).

1.1.2 Die immunologische Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT Typ II)

Die Inzidenz der HIT Typ II wurde aufgrund der Unkenntnis der unterschiedlichen Formen (Typ I / II) lange Zeit mit bis zu 30% fälschlicherweise erhöht eingeschätzt (Nelson et al. 1978). Eine Metaanalyse aus 14 prospektiven Studien (Warkentin et al. 1994), die insgesamt 1336 Patienten einschloss, erreichte eine Inzidenz von 3,4% für die HIT Typ II ohne thromboembolische Komplikationen (TEK) und von 1% für die HIT Typ II mit TEK. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer prospektiven Studie von Warkentin et al. (1995), in der insgesamt 665 hüftoperierte Patienten auf die Inzidenz einer HIT unter UFH und NMH untersucht wurden. Von 332 mit UFH behandelten Patienten entwickelten 2,7% eine labordiagnostisch gesicherte HIT Typ II. Unter den Patienten mit NMH trat kein einziger Fall einer HIT Typ II auf.

Eine serologisch gesicherte HIT-Inzidenz (Kappers-Klune et al. 1997) lag mit 0,3% bei konservativ behandelten kardiologischen und neurologischen Patienten mit UFH-Behandlung. Eine Studie von Greinacher et al. (1996) identifizierte keinen Patienten mit HIT Typ II-typischer Klinik unter 165 chronisch niereninsuffizienten Patienten während der Dialysebehandlung mit UFH-Gabe. Aufgrund dieser Daten lässt sich die Inzidenz einer HIT Typ II auf 0,1 – 3% einschätzen, abhängig von verschiedenen Risikofaktoren, wie Heparinart und Therapiedauer, von der Grunderkrankung und Komorbidität sowie von einer konservativen oder operativen Behandlung beeinflusst.

Pathogenese der HIT Typ II: Die Plättchenaktivierung mit Plättchenaggregation werden als eine Ursache für die typischen Symptome einer immunologischen HIT und als ein Grund für die thromboembolischen Komplikationen unter einer Heparintherapie anerkannt. Rhodes et al. (1973) zeigten, dass das Serum von Patienten mit einer HIT Typ II in vitro die Blutplättchen von Spendern in Anwesenheit von Heparin aktiviert. Eine allgemeine Thrombozytenaktivierung in vivo ist durch erhöhte Plasma-Spiegel von ADP, Serotonin, Thromboxan A₂ oder PF₄, P-Selektin (CD 62P), β -Thromboglobulin, Fibronektin, Metalloproteinase MMP-2 nachweisbar (Jurk et al. 2005).

Heparin bildet mit Thrombozytenproteinen (TP: β -Thromboglobulin, P-Selektin, PF4 u.a.) auf der Thrombozytenoberfläche oder auf zirkulierenden TP multimolekulare Komplexe. Diese „Heparin/PF4-Komplexe“ sind von größerer Bedeutung, weil sie bei der Heparininaktivierung als physiologische Reaktion und bei der HIT-Antigenen Bildung (als Zielantigen der HIT Typ II-Antikörper) eine Schlüsselrolle spielen (Amiral et al. 1992, Kelton et al. 1994).

Plättchenfaktor 4 (PF4) aus den α -Granula der Plättchen steht als hauptsächliche Komponente bei der Entstehung und Bildung von HIT-(Neo-)Antigenen an erster Stelle (Amiral et al. 1992). Es wird vermutet, dass PF4 auf die Hämostase und Angiogenese Einfluss nimmt und auf das Immunsystem modellierend wirkt. Auch andere Proteine, wie NAP-2 und IL- 8 können an der Bildung von Neoantigenen beteiligt sein. Bei der Bildung dieser Komplexe (Heparin/PF4) ist eine optimale Konzentration von Heparin und PF4 erforderlich (Horne et al. 1996) und auch die Kettenlänge des Heparins könnte die HIT-Neo-Antigen-Bildung beeinflussen. Gegen diese immunologisch aktiven Neoantigene können dann HIT-auslösende Antikörper gebildet werden, die zum überwiegenden Teil zur Immunglobulinklasse IgG gehören, seltener IgM oder IgA (Chong et al. 1995).

Durch die Immunkomplexe aus Heparin/PF4 und IgG wird der plättchenaktivierende Effekt mit Hilfe des **thrombozytären Fc γ IIA- Rezeptors** vermittelt, der nur auf der Oberfläche der Blutplättchen zu finden ist (Anderson et al. 1995; Gao.C. et al., 2011). Die Rezeptor-Dichte ist während der Plättchenaktivierung massiv erhöht, wodurch die Thrombozytenaktivierung unkontrollierbar und eine Kaskade weiterer Aktivierungsprozesse ausgelöst werden:

- a) Die aktivierten Thrombozyten setzen aus ihren Granula Thrombozytenproteine (TP) frei, die weitere prokoagulatorisch aktive Antigen-Komplexe bilden.
- b) die antikoagulatorische Wirkung von Heparin wird durch die vermehrten TP/Heparin-Komplexe gehemmt, so dass das Risiko von thromboembolischen Komplikationen steigt (Greinacher et al. 1999);
- c) Die aktivierten Thrombozyten binden sich mit dem aktivierten GP IIB/IIIa-Rezeptor an Thrombin, so dass die Thrombozytenaggregation mit Bildung eines Primärthrombus gefördert wird (Greinacher et al. 1999);
- d) Die TP binden sich auch an das Heparansulfat auf den Endothelzellen und bilden so Antigenkomplexe/Neoantigene, an die sich auch die HIT-Antikörper binden (Greinacher et al. 1994). Dadurch wird durch ungeklärte Mechanismen eine gesteigerte Freisetzung des Tissue Faktors / Gewebsthromboplastin und der Inhibitoren des Plasminogenaktivators aus den

aktivierten Endothelzellen ausgelöst mit der Folge einer erhöhten lokalen prokoagulatorischen Aktivität mit vermehrter Thromboseneigung (Cines et al. 1987).

Thromboembolische Komplikationen bei einer HIT Typ II werden vor allem bei hochdosierten Gaben von Heparin (UFH) beobachtet, z.B. im Rahmen einer Bypass-Operation sowie bei den Patienten nach Hüftgelenk- TEP (Warkentin et al. 1995) oder bei Dialyse-Patienten. Als eine weitere mögliche Ursache wird auch ein genetischer Aspekt diskutiert, z.B. der Polymorphismus des thrombozytären Fc γ -IIA- Rezeptors. Heparin/PF4-Immunkomplexe gehören häufiger der Subklasse IgG1, seltener IgG2 an (Arepally et al.1997). Die Patienten mit Fc γ -IIa- Rezeptor homozygoten Arg/Arg 131 Phänotyp zeigen z.B. eine verminderte Affinität zu den Immunkomplexen/IgG1. Die Bedeutung des Polymorphismus des Fc γ -IIa- Rezeptors bei der Entwicklung die HIT-assoziierten Komplikationen ist allerdings umstritten (Brandt et al. 1995, Bachelot- Loza et al. 1998).

Bei den häufigsten genetisch bedingten Erkrankungen mit erhöhten Thromboserisiko, wie Protein-C-, Protein-S-Mutationen, Thrombinmangel, Faktor-V-Leiden und aktiviertes Protein- C (APC) -Resistenz, konnte keine erhöhte Assoziation mit der HIT Typ II nachgewiesen werden (Lee et al. 1996). Unklar ist die Bedeutung des Nachweises von IgM und IgA Antikörpern (Amiral et al. 1996). Oberflächengebundenes IgM könnte über eine Komplementfixation und dann durch eine Komplementaktivierung die Plättchenlyse auslösen, wobei der PF4-Rezeptor eine weitere Plättchenstimulation induziert. Insgesamt ist die HIT Typ II ein multifaktorielles Geschehen und es könnten eine Vielzahl noch nicht erfasster weiterer Faktoren für die klinische Manifestation thromboembolischer Komplikationen beim Vorliegen von HIT-Antikörper prädisponieren (Greinacher et al. 1999).

Klinische Manifestation der HIT Typ II: Die HIT ist hauptsächlich ein klinisches Syndrom, das das Gleichgewicht des Gerinnungssystems durch eine Immunreaktion beeinträchtigt. Die Thrombozytopenie tritt charakteristischerweise zwischen dem Tag 5 und 20 nach Beginn der Heparintherapie auf (Warkentin et al. 1995). Die niedrigsten Plättchenzahlen liegen bei einer serologisch bestätigten HIT Typ II meistens zwischen 50.000 bis 70.000/ μ l, in wenigen Fällen niedriger als 30.000/ μ l (Warkentin et al.1998), wobei eine solche Thrombozytopenie selten durch eine hämorrhagische Diathese kompliziert wird (Chong et al.1989).

Eine Ausnahme besteht bei einer Reexposition mit Heparin durch den sogenannten Boostereffekt, bei dem schon nach wenigen Stunden nach der Heparinreapplikation eine Antikörperbildung nachweisbar wird und es bereits am ersten Tag zu schweren klinischen, thromboembolischen Störungen kommt. Die Thrombozytenzahlen normalisieren sich erst nach dem Absetzen der Heparintherapie innerhalb von 5 bis 7 Tagen und die HIT-Antikörper sind in der Regel nach 2 – 3 Monaten nicht mehr nachweisbar (Warkentin et al. 1998).

Thromboembolische Komplikationen treten im Verlauf einer HIT Typ II bei 20 – 50 % aller Patienten auf, wobei die venösen Thrombosen mit 4:1 häufiger sind als die arteriellen Verschlüsse (Warkentin et al. 1995). Die arteriellen Thromben bestehen hauptsächlich aus Thrombozytenaggregaten und haben ein helles Aussehen. Aus diesem Grunde wurde die HIT Typ II auch als „white clot Syndrom“ bezeichnet (Kelton et al 1986). Die arterielle Thrombose ist oft mit einer ausgeprägten Atherosklerose oder operativen Eingriffen in dem betreffenden arteriellen System assoziiert, hauptsächlich in den großen Becken- oder/und Beinarterienbereichen, aber auch in den Koronarien und in den zerebrovaskulären Regionen. Die Inzidenz der akuten arteriellen Verschlüsse in den Extremitäten ist häufiger als ein Myokardinfarkt oder eine cerebrovaskuläre Apoplexie. Die Gefahr von Lungenembolien wird besonders hoch eingeschätzt (Warkentin et al. 1996). In einigen Fällen kommt es auch zu thromboembolischen Komplikationen ohne einen deutlichen Thrombozytenabfall (PLT-Zahl über 100.000/ μ l), wobei dies vor allem bei einer Heparinreexposition auftreten soll (Traska et al. 2004).

Im Zusammenhang mit einer HIT Typ II sind auch andere heparinbedingte, klinische Manifestationen bekannt geworden, insbesondere lokal begrenzte Hautläsionen an den Injektionsstellen mit schmerzhaften erythematösen Plaques oder Hautnekrosen. Diese verlaufen in vielen Fällen ohne Thrombozytopenie, jedoch mit HIT-spezifischem Antikörpernachweis und können zu den ersten klinischen Symptomen der HIT Typ II gehören. Ein weiteres untypisches Phänomen ist eine akute systemische Reaktion nach einem i.v. Heparin-Bolus, meist 10 min nach Injektion mit Symptomen, wie Schüttelfrost, arterielle Hypotonie, Tachykardie und als Folge auch eine anterograde und retrograde Amnesie (s.g. amnestisches Syndrom). Als Ursache wird einer vorbestehenden Sensibilisierung durch frühere Heparinexpositionen angenommen (Warkentin et al. 1994).

1.2. Labordiagnostik der HIT Typ II

Die klinische Diagnose der HIT ist oft nicht eindeutig, so dass eine verlässliche Labordiagnostik für eine rasche Entscheidung zum Abbruch der Heparintherapie und Wechsel zu „kompatiblen Antikoagulanzen“ erwünscht ist. Außerdem müssen die häufigsten Differenzialdiagnosen ausgeschlossen werden, wie z.B. eine Autoimmunthrombozytopenie (ITP), eine DIC/Verbrauchs-koagulopathie (z.B. bei Sepsis), eine Medikamenten- assoziierte Thrombozytopenie (z.B. durch Chinidin o.a.) sowie eine EDTA-Proben bedingte Pseudothrombozytopenie (cave: Kontrolle der Thrombozytenzählung im Citrat-Blut).

1.2.1. Funktionelle Testverfahren

Das Prinzip aller funktionellen Tests ist ein indirekter Nachweis von HIT-Antikörperaktivitäten durch eine Messung der Plättchenaktivierung / -aggregation nach einer Stimulation und Freisetzung von Plättchenproteinen aus frischen Spenderthrombozyten. Zu den funktionellen Tests gehören der Plättchenaggregationstest (PAT nach Kelton et al. 1984), der Serotonin-Release-Assay (SRA nach Sheredan et al. 1986) sowie der Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (HIPA nach Greinacher et al. 1991).

Beim **PAT nach Kelton** wird plättchenreiches Plasma (PRP von Spenderthrombozyten) mit dem Patientenserum und Heparin in einem Aggregometer inkubiert. Eine HIT liegt vor, wenn die optische Dichte des Plasmas in dem Einsatz mit niedriger Heparinkonzentration im Vergleich mit dem Puffer (Kontrolle) um 25% angestiegen ist und mit höherer Heparinkonzentration keine Aggregatbildung registriert wird. Der Test ist einfach und schnell, aber seine Sensitivität variiert zwischen 39 und 81 % (Spezifität 90 – 100%). Die Ergebnisse sind abhängig von der Plättchenzahl und der Beimengung von Erythrozyten (Breddin et al. 1975, Kelton et al. 1984, Chong et al. 1993).

Im **C 14-SRA nach Sheredan** wird radioaktiv markiertes Serotonin im Patientenserum nach seiner Freisetzung aus den thrombozyteren α -Granula durch Heparinzugabe gemessen. Die Zunahme der Radioaktivität um mehr als 20 % in der Probe mit einer Heparinkonzentration von 0,1 – 1,0 U/ml bestätigt die ausgeprägte Plättchenaktivierung durch HIT-Antikörper.

Trotz hoher Sensitivität und Spezifität (Arepally et al. 1995; Greinacher et al. 1994) hat dieser zeitaufwendige Test insbesondere wegen der Verwendung von radioaktivem Serotonin in der Routinediagnostik keine Bedeutung (Sheredan et al. 1986, Chong et al. 1998, Greinacher et al. 1991).

Der **HIPA- Test nach Greinacher** untersucht das Ausmaß von Thrombozytenaggregaten nach Plättchenaktivierung durch Heparin/PF4-Antikörperkomplexe in einer Mikrotiterplatte. Spender-Blutplättchen / Plättchenreiches Plasma (PRP) werden in einer Mikrotiterplatte mit dem Patientenserum und mit Heparin in niedriger und in hoher Konzentration mit zwei Stahlkügelchen auf einem Magnetrührer inkubiert. Die Plättchenaktivierung führt zur Aggregation und damit zur Sedimentation der Blutplättchen. Bei ausbleibender Aktivierung bleibt die Plättchensuspension trüb. Der Zeitpunkt der Zunahme der Transparenz wird dokumentiert. Eine Aggregation der Thrombozyten bei niedriger, nicht jedoch bei hoher Heparin- Konzentration und bei den anderen Heparinoiden (Orgaran, NMH) gilt als Nachweis einer HIT mit einer Kreuzreaktion.

1.2.2. Immundiagnostische Testverfahren

Heparin-PF4 – ELISA Test nach Amiral (1992) ermöglicht einen direkten Nachweis von Heparin/PF4-Antikörpern (IgG, IgM, IgA). Die Heparin/PF4-Antikörperkomplexe im Patientenserum werden an einer Festphase (Mikrotiterplatten mit einer Beschichtung von H/PF4-Antigenkomplex) durch eine Immunkonjugation (Antigen/Antikörper Reaktion) adsorbiert. Die Intensität der entstehenden Farbe ist dem Gehalt des H/PF4- Komplex in der Probe proportional.

ID-PaGIA–Partikel Gel Immunoassay nach Eichler (2001) beruht auf dem Nachweis von Antikörpern gegen Heparin-Plättchenfaktor-4-Komplexe durch Agglutination roter Polystyren-Beads, die mit Heparin-Plättchenfaktor-4-Komplexen beschichtet sind. Diese Beads werden mit dem Patientenserum in die Reaktionskammer einer mit einer Sephacryl-Matrix und einem Anti-Human-Globulin gefüllten ID-Karte (DiaMed AG, Bensheim) gefüllt und inkubiert. Im positiven Falle agglutinieren die Beads je nach Stärke der Antikörper oberhalb oder in der Gel- Matrix. Der Test ist schnell und leicht durchführbar und es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse sehr gut mit denen eines ELISA-Tests übereinstimmen (Eichler et al. 2001).

AESKULISA HiT II ELISA (2007) ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von IgG Antikörpern / Immunkomplexen aus PF4 und Heparin, die eine HIT II verursachen. Das Testprinzip ist die Bildung eines Antigen (Neoepitope H/PF4) – Antikörper (IgG) - Komplex in den Microtiter-Kavitäten mit einer spezifischen Antigenbeschichtung. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgt mit einer enzymatischen Farbreaktion, die direkt proportional zur Antikörperkonzentration im Plasma ist.

1.3. Therapie der HIT Typ II

Wenn bei den Patienten die klinischen Symptome einer HIT Typ II entsprechen (Abnahme der Thrombozyten > 50 % bei einer Heparintherapie ab Tag 5 und/oder neu auftretende thromboembolische Komplikationen), muss die Heparintherapie abgesetzt werden. Nach prospektiven Daten ist das Absetzen von Heparin eine nicht ausreichende Maßnahme, um ein erhöhtes Thromboserisiko bei einer HIT zu vermeiden. Dies gelingt nur, wenn eine alternative Antikoagulationstherapie weitergeführt wird (Greinacher et al. 1999).

Zu den effizienten Antikoagulantien als Alternative zu Heparin gehören z.B. Heparinoide, rekombinantes Hirudin, Fondaparinux und Argatroban.

Das Heparinoid / Danaparoid-Natrium (**Orgaran®**) wirkt antikoagulatorisch durch die Hemmung des Faktor Xa und durch die Erhöhung der Antithrombin-Aktivität mit hoher Wirksamkeit bei Patienten mit HIT (Mangani et al. 1993, Warkentin et al. 1996). Ein Nachteil ist die Entwicklung einer Kreuzreaktivität mit HIT-Antikörpern bei ca. 10 % der HIT-Patienten, wobei nicht alle diese Patienten thromboembolische Komplikationen entwickeln.

Alternativ werden auch **r-Hirudine** verwendet, welche Thrombin spezifisch inhibieren und keine Kreuzreaktion mit HIT-Antikörpern zeigen. Hirudin wird von den Speicheldrüsen des medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis*) produziert. Die rekombinanten Hirudine Lepirudin (**Refludan®**) und Desirudin (**Revasc®**) inaktivieren auch thrombusgebundenes und zudem an Fibrinabbauprodukten verbliebenes Thrombin, so dass eine effektive Auflösung von wandständigen Thromben ohne eine stimulierende Wirkung auf die Thrombozyten ermöglicht wird (Weitz et al. 1990, Weitz et al. 1998, Meyer et al. 1998). Die Halbwertszeit beträgt 1 – 2 Stunden und ist von der Nierenfunktion abhängig. Die Hirudin-Therapie wird durch die aPTT, besser durch die Ecarinzeit (ECT) überwacht (Nowak et al. 1993). Eine umstrittene Nebenwirkung bei Patienten mit HIT ist eine Bildung von Hirudin-Antikörpern bei ca. 45 %,

jedoch ohne Zunahme neuer thromboembolischer Komplikationen oder Hämorrhagien und ohne neutralisierenden Effekt auf das Hirudin (Eichler P. et al. 1997).

Seit 2005 ist zudem **Argatroban (Argatra®)** zur Antikoagulation bei Erwachsenen mit HIT Typ II zugelassen mit einer reversiblen Hemmung sämtlicher Wirkungen des Thrombins (Lewis et al. 2003). Argatroban interagiert nicht mit HIT-Antikörpern und induziert auch nach mehrfacher Gabe keine Antikörperbildung (Lewis et al. 2003).

Mit dem Pentasaccharid **Fondaparinux (Arixtra®)** steht auch ein Heparinanalogen mit selektiver Faktor-Xa-Hemmung zur Verfügung. Durch die selektive und reversible Bindung an AT-III verstärkt Fondaparinux nahezu 300-fach die AT-vermittelte Hemmung von Faktor Xa (Savi P. 2005, Schwabe U. 2003).

Vitamin-K-Antagonisten allein sind zur Antikoagulation bei der HIT nicht geeignet, da sie wegen des frühzeitigen Abfalls von Protein C die Thromboseneigung bei HIT- Patienten noch verstärken können, bis am Tag 3-4 auch die Gerinnungsfaktoren drastisch abgesenkt sind. Deswegen darf diese Therapie erst nach Normalisierung der Thrombozytenzahlen und unter überlappender Gabe eines parenteralen Antikoagulans begonnen werden (Kelton J.G. 2005). Die HIT-Antikörper sind nach Absetzen des Heparins in der Regel nach 90 Tagen nicht mehr nachweisbar, so dass eine kurzzeitige Reexposition mit Heparin (z.B. während einer Operation an der Herz- Lungen- Maschine) möglich ist.

2. PROBLEMSTELLUNG UND FRAGESTELLUNG

Wie bei vielen anderen Laboratorien werden auch durch das Institut für Transfusionsmedizin die Ergebnisse der häufig notfallmäßig angeforderten und durchgeführten Untersuchungen auf HIT-Antikörper telefonisch an die behandelnden Ärzte durchgegeben. Da bei uns zudem die positiven Ergebnisse (= Nachweis von HIT-Antikörpern) durch einen Arzt mitgeteilt werden, erfolgen meist konsiliarische Erörterungen über die daraus zu folgernden Maßnahmen für eine ggf. notwendige Umstellung der Antikoagulationstherapie. Zur Unterstützung der Entscheidungswege erschien es daher dringlich, im Sinne einer laborinternen Evaluation die Untersuchungsergebnisse mit den klinischen Daten der untersuchten Patienten abzugleichen, um die Daten der einzelnen Laborergebnisse zukünftig besser einordnen zu können.

Hierzu sollten wegen der besseren Vergleichbarkeit hinsichtlich der klinischen Parameter die Daten von den Patienten einer Klinik näher untersucht werden, wobei sich dies zahlenmäßig am besten mit der Patientengruppe verwirklichen ließ, die sich in der Klinik für Herz-Thoraxchirurgie einer vergleichbaren Operation an der Herz-Lungen-Maschine mit Vollheparinisierung unterzogen hatte, wobei in den postoperativen Tagen überwiegend weiterhin Heparin verabreicht wurde.

Anhand der Thrombozytenverläufe vor und nach dem Absetzen der Heparintherapie und anderer klinischer Daten, die laut Literatur vordringlich für die Diagnosesicherung der HIT Typ II herangezogen werden, sollte im Vergleich mit den Ergebnissen der verschiedenen Tests herausgearbeitet werden, ob einer der Tests allein oder nur die Kombination von Ergebnissen mehrerer Tests die Diagnose einer HIT Typ II sichern helfen. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob man mit Hilfe des weitverbreiteten Schnelltests ID-PaGIA allein irgendeine verwertbare Information zur Erhärtung oder Abschwächung des klinischen Verdachts auf eine HIT Typ II erhält.

3. PATIENTEN UND TESTVERFAHREN

3.1 Patientenkollektive

Im Zeitraum vom März 2003 bis August 2005 wurden dem Institut für Transfusionsmedizin von insgesamt 193 Patienten der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Blutproben mit der Anforderung für eine HIT-Diagnostik zugeschickt, da klinisch der Verdacht auf eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II bestand. Um die Verdachtdiagnose näher zu analysieren und charakterisieren zu können, wurden bei jedem Patienten die anamnestischen, klinischen und labordiagnostischen Daten sowie das medikamentöse Profil aufbereitet und dann mit den Ergebnissen der HIT-Diagnostik zusammengefasst. In allen Kollektiven wurden die folgenden Patienteninformationen erfasst:

Alter und Geschlecht, Hauptdiagnose, Komorbidität und Operationenart sowie die Heparintherapie (Formen, Dosierung, Dauer, Erst- oder Reexposition); dazu die Thrombozyten-Werte und deren Verlauf einschließlich HIT-Score nach Lo et al. 2006 (Tab. 1) sowie die thromboembolischen Komplikationen mit dem Zeitpunkt des Auftretens und ihren Folgen. Bei der Labordiagnostik wurden erfasst der Tag der HIT-Diagnosestellung, resp. Zeitpunkt des HIT-Antikörpernachweises sowie die Art der HIT-Diagnostik (H/PF4-ELISA, ID-PaGIA, *AESKULISA HiT II* und HIPA).

Merkmal	2 Punkte	1 Punkt	0 Punkte
Thrombozytopenie	>50% relativer Thrombozytenabfall oder Nadir 20-100x10 ⁹ /μl	30-50% relativer Thrombozytenabfall oder Nadir 10-19x10 ⁹ /μl	<30% relativer Thrombozytenabfall < 10x 10 ⁹ /μl
Timing des Thrombozytenabfalls	Während Tag 5-10 nach Beginn Heparin-gabe oder < 1 Tag, wenn Heparinexposition während der vergangenen 30 Tage.	>10 Tage nach Beginn Heparin-gabe oder unklare Dauer der Heparinexposition oder < 1 Tag, wenn Heparinexposition während der vergangenen 30-100 Tage.	<1 Tag nach Beginn einer Heparin-gabe ohne frühere Heparinexposition Thrombose oder andere Folgekomplikationen.
Thrombose oder andere Folgekomplikationen	Nachgewiesene thromboembolische Erkrankung, Hautnekrose oder akute Systemische Reaktion	Progressive, Rekurrende oder klinisch stumme Thromboembolische Erkrankung; Erythematöse Hautläsionen an den Einstichstellen	K eine
Alternative Ursache für eine Thrombozytopenie	Keine vorhanden	Möglich	Definitiv vorhanden

Tabelle 1: HIT-Score für die klinische Diagnose (4T-Score)(nach Lo et al. 2006).

4T- Score (Tab. 1) ist ein standardisiertes Punktsystem zur Beurteilung der klinischen Wahrscheinlichkeit der Heparin-induzierten Thrombozytopenie. Durch die Anwendung des 4T-Punktsystems (Thrombozytopenie, Thrombosis, Timing und Other Causes) können Patienten in Gruppen mit niedriger (< 4 Punkte), mittlerer (4-5 Punkte) und hoher (6-8 Punkte) klinischer Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines HIT Syndromes eingeteilt werden (Aslan T. et al. 2009).

3.2 Methoden

Die venöse Blutentnahme erfolgte in zwei Röhrchen (Nativ-Blut). Nach dem Eintreffen des Untersuchungsmaterials wurden diese zuerst bei Raumtemperatur für ca. 60 min. zur Nachgerinnung stehen gelassen und dann 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert (Lagerung bei 4-8°C für maximal 48 h). Der Überstand (Serum) wurde abpipettiert und für den ID-PaGIA Heparin/PF4 Antikörpertest und den H/PF4-ELISA eingesetzt. Anschließend wurden 2 Rückstellproben (Eppendorfgefäße à 1500 µl Serum) bei -30°C tiefgefroren, woraus alle nachträglichen Untersuchungen durchgeführt wurden. Für den HIPA wurde das zu untersuchende Patientenserum zusätzlich durch Hitze inaktiviert (56°C, max. 45 min), dann 2-mal bei 10.000 g für 3 min. zentrifugiert und der Überstand verwendet.

3.2.1 Heparin/PF4 ENHANCED Festphasen-Enzymimmunoassay (H/PF4-ELISA)

Testprinzip: Die Mikrotiterplatte dieses ELISA Tests (H/PF4 ENHANCED Festphasen-Enzymimmunoassay) ist mit einem Komplex aus Polyvinyl Sulfat (PVS) und hochgereinigtem PF4 beschichtet. Die Patientenproben werden verdünnt und auf die Mikrotiterplatten inkubiert. Befinden sich im Patientenserum Antikörper gegen den H/PF4-Komplex, binden sich diese Immunkomplexe an das auf der Festphase der M-Platte präsentierende Antigen. Die übrigen Serumbestandteile und nicht gebundenen Antikörper werden durch intensives Spülen entfernt. Anschließend wird ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Anti-Human IgG-/ IgM-/ IgA-Gemisch zugeführt. In einem weiteren Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe von einem chromogenen Substrats PNPP (p-Nitrophenylphosphat) entsteht eine Farbreaktion, die nach 30 min. mit einer 3M NaOH-Lösung abgestoppt und photometrisch ausgewertet wird. Zur isolierten Bestimmung der IgG- oder IgM-Klasse wurde Anti-Human Ig-Konjugat benutzt, gerichtet gegen die jeweiligen Immunglobulinklassen.

Reagenzien und Verbrauchsmaterial: Der H/PF4-ENHANCED Solid Phase ELISA (Waukesha, USA) enthält folgende Reagenzien: Teststreifen (X-HAT45), PF4 Waschlösungskonzentrat, Probenverdünnungspuffer und Substratpuffer. Dazu Anti-Human IgG-/IgA-/IgM- Konjugat und PNPP Substrat sowie Stopplösung, positives und negatives Kontrollserum; zur Differenzierung Anti- Human IgG-Konjugat und Anti- Human IgM-Konjugat (Diagast, Aachen); die Auswertung erfolgte mit dem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm.

Interpretation der Ergebnisse: Ein Ergebnis ist positiv, wenn die Extinktion (OD-Wert) der Probe gleich oder größer ist als der Cutoff (=0,43 OD). Eine Inhibition von mehr als 50% (Cutoff=0,8) nach Zugabe von Heparin bestätigt eine klassische HIT-Typ II. Auch die positive Kontrolle soll eine Inhibition zeigen.

Nachfolgend ein Auszug (Kriterien für einen validen Test) aus der aktuellen Gebrauchsanweisung des Testansatzes:

<u>Probe</u>	<u>Durchschnittl. OD- Wert</u>
Negativ.....	Cutoff \leq 0.43
Schwach Positiv.....	Cutoff \geq 0.56
Positiv	Cutoff \geq 1.61
Hoch Positiv	Cutoff \geq 2.70

Berechnung des Inhibition- Prozent- Faktors:

$$\left[(1) - \left\{ \frac{\text{Probe mit Heparin (OD-Wert)} - \text{Positiv- Kontrolle (OD- Wert)}}{\text{Probe ohne Heparin (OD-Wert)} - \text{Negativ- Kontrolle (OD-Wert)}} \right\} \right] \times 100 = \% \text{ Inhibition}$$

Eine Inhibition unter 50% ist ein zweifelhaftes Ergebnis und weist auf einen PF4 und /oder HIT II- Antikörper hin. Keine Inhibition spricht für einen isolierten PF4-Antikörper.

3.2.2 AESKULISA HiT II

Testprinzip: Der *AESKULISA HiT* ist auch ein Festphasen-Enzymimmunoassay aber nur zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern. Die 1:101 verdünnten Serumproben werden in den Kavitäten, welche mit spezifischen Antigenen beschichtet sind, inkubiert. Dabei binden spezifische Antikörper (AK) aus dem Patientenserum, wenn vorhanden, an das Antigen auf der Platte, ungebundene AK werden im folgenden Waschschritt ausgewaschen.

Anschließend werden markierte anti-Human Immunglobuline (Konjugat) zugegeben. Während der Inkubation binden diese an den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgt mit enzymatischer Farbreaktion (blau) des Substrats, die mit verdünnter Säure abgestoppt wird (Farbumschlag nach gelb). Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der an den Immunkomplex gebundenen Konjugatmenge / proportional zur Antikörperkonzentration im Serum.

Verbrauchsmaterial und Reagenzien: AESKULISA HiT II-KIT, (AESKU.DIAGNOSTICS, Wendelsheim) enthält folgende Reagenzien: Probenpuffer und Waschpuffer, Negativ- und Positiv-Kontrollen, Cutoff Kalibrator, Konjugat, TMB Substrat und Stopp-Lösung.

Die Auswertung erfolgt mit dem Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm; ELISA Reader 2001 Typ 10550 (Biotest).

Testdurchführung: Verdünnung der Reagenzien, z.B. Probenpuffer 1:5 und Waschpuffer 1:50 mit destilliertem Wasser. Verdünnung der Patientenproben 1:101 mit Probenpuffer verdünnen und mischen. Für das Waschen werden 20 ml verdünnter Waschpuffer pro 8 Kavitäten oder 200ml pro 96 Kavitäten benötigt. Manuelles Waschen: Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte auf Filterpapier entfernen. 300 µl verdünnten Waschpuffer in jede Kavität pipettieren, 20 sec warten. Den Vorgang noch zweimal wiederholen. Dann je 100 µl der verdünnten Proben in die Kavitäten pipettieren und je 100 µl Kalibratoren beziehungsweise des Cutoff Kalibrators und der Negativ- und Positiv- Kontrolle dazu (Inkubation 30 min bei 20-32°C). 3-mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünnte Waschpuffer waschen und 100 µl Enzymkonjugatlösung zugeben Inkubation 30 min bei 20 – 32°C). 3-mal mit jeweils 300µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen und 100 µl TMB- Substratlösung in jede Kavität pipettieren (Inkubation 30 min bei 20 – 32°C) und vor intensiver Lichtstrahlung schützen. Dann 100 µl Stopplösung pro Kavität pipettieren und mindestens 5 Minuten inkubieren. Platte schütteln 5 Sekunden vorsichtig und die optische Dichte bei 450 nm innerhalb von 30 min messen.

Interpretation der Ergebnisse: Die qualitative Auswertung erfolgt anhand des Vergleiches der optischen Dichte (OD) der Patientenprobe mit der optischen Dichte des Cutoff Kalibrators. Liegt die OD der Patientenprobe im Bereich von $\pm 20\%$ des Cutoff Kalibrators, so ist diese als grenzwertig zu bewerten. Bei einer höheren OD ist die Patientenprobe als positiv, bei einer niedrigeren OD als negativ einzustufen (jeweils durchschnittlich OD-Wert $\sim <$ Cutoff).

Kriterien für einen validen Test:

Negativ: < 0,8; **grenzwertig:** ≤ 1,2; **positiv:** > 1,61; (+++ > 2,70)

Die Sensitivität des *AESKULISA HiT II* wurde mit einem Wert von 100% und eine Spezifität von 96% angegeben.

3.2.3 ID-PaGIA Heparin/PF4- Antikörper Test (ID-PaGIA/DiaMed)

Testprinzip: Der ID-PaGIA ist ein Polymerpartikel-Gel-Immunoassay in Mikroröhrchen. Synthetische Polymerpartikel mit hoher Dichte sind mit Heparin/PF4-Komplex beschichtet. Werden diese Partikeln mit Serum des Patienten vermischt, reagieren spezifische Antikörper aller Ig-Klassen mit dem HPF4 auf der Partikeloberfläche und lösen die Agglutination der Partikel aus. Um eine räumliche Trennung von agglutinierten und nicht agglutinierten Partikeln zu erreichen, wird das Reaktionsgemisch durch eine Gelfiltrationsmatrix 10 min zentrifugiert und dann die Ergebnisse interpretiert. Der Test wurde nach bekannter Gebrauchsanweisung / Testprinzip durchgeführt und am Ende unter der Lichtquelle abgelesen.

Verbrauchsmaterial und Reagenzien: ID-PaGIA/Heparin/PF4 Antibody Test ID-Karte mit Anti-Human-Globulin innerhalb der Gelmatrix (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Schweiz); ID-Zentrifuge 6S / Micro Typing System (DiaMed AG).

Interpretation der Ergebnisse:

Eine positive Reaktion entspricht einer vollständigen/starken Agglutination, die als rote Linie oben auf dem Gel oder direkt unter der Gel-Oberfläche zu erkennen ist oder einer partiellen Agglutination, bei der einige Partikel den Boden des Mikroröhrchen erreicht haben, aber immer noch Agglutinate im oberen Teil des Gels oder im gesamten Gel zu sehen sind.

Eine negative Reaktion zeigt eine vollständige Sedimentation der Partikel als Plättchen am Boden des Mikroröhrchens; auf und innerhalb des Gels sind keine agglutinierten Partikel zu sehen.

3.2.4 Heparin- induzierter Plättchen-Aktivierungstest (HIPA)

Testprinzip: Nach einer Inkubation der Patientenseren mit gewaschenen humanen Blutplättchen in Gegenwart von Heparin auf Mikrotiterplatten mit zwei Stahlkugelchen auf einem Magnetrührer entwickelt sich eine prokoagulatorische Thrombozytenaktivierung, so dass durch

die Bindung der H/PF4-Immunkomplexe an Fc-Rezeptoren der Plättchen entsteht und stimuliert dadurch die aktivierungsabhängige Thrombozytenaggregation. Die Aktivierung von Thrombozyten wird bei zwei verschiedenen Heparinkonzentrationen (2,1 U/ml und 1050 U/ml) untersucht und zusätzlich mit Clexane, Orgaran (Endkonzentration 0,2 U/ml) und Hirudin (500 U/ml), um die Kreuzreaktivität der AK mit den anderen Antikoagulantien zu überprüfen.

Die Thrombozytenaktivierung durch H/PF4-Antikörper findet nur bei niedriger Heparinkonzentration (0,2 U/ml) statt. Das induziert die Ausbildung von multimolekularen H/PF4-Immunkomplexen und die Bindung der Antikörper an die Thrombozyten mit einer Thrombozytenaktivierung und Aggregation. Der Reaktionsansatz wird klar bzw. transparent. Bei der höheren Heparinkonzentration kommt es zu einem Heparin-Überschuss und zu einer Blockade der Immunkomplex-Bildung (Blockade-Phänomen) ohne weitere Thrombozytenaktivierung der und die Plättchensuspension bleibt trüb.

Die Transparenz der Thrombozytensuspension wird in ca. 5-minütigem Abstand gegen eine indirekte Lichtquelle abgelesen und der Zeitpunkt der Zunahme der Transparenz wird auf dem Auswertungsprotokoll dokumentiert. Ein positiver Reaktionsansatz mit der Plättchenaggregation bei niedriger, nicht jedoch bei hoher Heparinkonzentration gilt als Nachweis einer HIT.

Verbrauchsmaterial und Reagenzien: Magnetrührer (IKAMAG REO), pH-Meter (Fa. WTW), Mikrotiterplatte (Fa. Roth), Stahlkügelchen (Fa. Leib), Apyrase 2000 U (Fa. Sigma), ACDA (Fa. Fresenius), pH-Pufferlsg. pH- 6,865 (Fa. Mettler-Toledo) und pH- Pufferlsg. pH- 9,184 (Fa. Mettler-Toledo) sowie KCL 3 mmol/l (Fa. Mettler-Toledo), Kollagenreagenz Horm (Fa. Nycomed), Albumin bovine Fraction V pH 7,0 (Fa. Serva), Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Fa. Merck), Heparin- Natrium 5000 IU (Ratiopharm), Clexane (Avensis), Orgaran (Organon), r-Hirudin 200 ATU (Pentapharm).

Testdurchführung: In jede Vertiefung der Mikrotiterplatten werden 2 Stahlkügelchen vorgelegt und dann die Reagenzien nach Gebrauchsanweisung pipettiert mit nachfolgender Gabe der hitzeinaktivierten Patientenprobe (Inkubation 5 min. bei Raumtemperatur) und Zugabe der Thrombozytensuspension ($300 \times 10^3/\mu\text{l}$) in allen Positionen; dann 45 min Inkubation auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur (500U/min); die Reaktionen werden alle 5 min optisch im Durchlicht anhand der Transparenz der Suspension im Vergleich mit den Kontrolle abgelesen und im Auswertungsprotokoll dokumentiert.

Interpretation der Ergebnisse: Die Plättchenaktivierung führt zur Aggregation und damit zur Sedimentation der Blutplättchen. Der Reaktionsansatz wird klar. Bei ausbleibender Aktivierung bleibt die Plättchensuspension trübe. Der Zeitpunkt der Zunahme der Transparenz wird dokumentiert. Eine Aggregation der Thrombozyten bei niedriger, nicht jedoch bei hoher Heparinkonzentration gilt als Nachweis einer HIT.

Die Voraussetzungen für aussagekräftige Ergebnissen liegen bei den „positiven“ Reaktionen in allen Ansätzen mit Kollagen (Kontrolle der Aktivierbarkeit der Spenderthrombozyten) und bei den fehlenden („negative“) Reaktionen mit Suspensionspuffer (Negativ-Kontrolle).

3.3 Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden in einer Datenbank mit der Software Excel 2000 erfasst und so aufbereitet, dass die statistischen Berechnungen mit den Statistikprogrammen SPSS- Version 18 durchgeführt werden konnten.

Zuerst erfolgte eine deskriptive Auswertung der allgemeinen Daten (z.B. Alter, BMI, Thrombozytenwerte, HIT-Score, IgM- und IgG- Werte,...) mit Angabe der wichtigsten Parameter (Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum). Danach wurden die 4 Patientengruppen miteinander verglichen (ONEWAY ANOVA). Die signifikanten Parameter wurden weiter mit dem post hoc Test nach Tukey beurteilt. Um darüber hinaus Hinweise auf sich andeutende Gruppenunterschiede zu finden wurden für paarweise Gruppenvergleiche auch der t-Tests (Welch) benutzt.

Für die bei der Kontrolle ermittelten IgG- und IgM- Werte wurden anhand der vorgegeben Cutoffs für die Anzahl der positiven Ergebnisse Konfidenzintervalle unter Verwendung der Binomialverteilung ausgerechnet und die ermittelten Häufigkeiten für die Patienten mit V.a. HIT und mit HIT Typ II zur Gesamtanzahl der untersuchten Patienten in Relation gebracht.

Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ angesehen und die kritischen Wahrscheinlichkeiten p angegeben.

Die statistischen Auswertungen wurden mit Unterstützung des Institutes für Biometrie und Medizinische Informatik durchgeführt.

Insgesamt erwiesen sich die untersuchten Gruppen aber für eine abschließende und umfassende statistische Auswertung als zu klein, so dass die Validierungsdaten vorwiegend deskriptiv beurteilt werden müssen.

4. ERGEBNISSE

Es wurde von 03/2003 bis 08/2005 bei 193 Patienten aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Verdacht auf eine HIT Typ II (30-50%iger Thrombozyten-Abfall unter Heparintherapie) gestellt und eine komplexe HIT-Diagnostik durchgeführt. Die gesamte Zahl der Patienten mit Heparintherapie in der Klinik in diesem Zeitraum betrug 1225 Personen (193/1225 – 16 %). Unter den 193 Patienten konnte bei 88 % (n = 168) in keiner der labordiagnostischen Untersuchungen diese klinische Verdachtsdiagnose bestätigt werden. Bei 25 Patienten (12 %) konnte nach dem klinischen Verdacht, zumindest in einem der 4 durchgeführten Tests, auch eine labordiagnostische HIT-Diagnostik positiv ausgewertet werden; in der Tabelle 2 sind die Inzidenz und die absolute Häufigkeit eines V.a. HIT Typ II bei HTC-Patienten dargestellt.

HTC-Patienten	Patientenzahl	Inzidenz %	Relation
nach Heparintherapie insgesamt	1225		
ohne V.a. HIT	1032	84	
mit V.a. HIT	193	16	1 von 6
ohne V.a. HIT und HIT-Diag. negativ	1200	98	
HIT-Diagnostik positiv	25	2	1 von 49

Tabelle 2: Inzidenz und absolute Häufigkeit eines V.a. HIT Typ II bei HTC-Patienten unter einer Heparintherapie.

Da bei diesen 25 Patienten nicht alle Labortests ein positives Ergebnis auf eine HIT Typ II ergaben, ließen sich auf Grund der labordiagnostischen Konstellationen vier unterschiedliche Gruppen bilden: H/PF4-ELISA (+/-), ID-PaGIA (+/-), AESKULISA (+/-) und/oder HIPA (+/-):

Gruppe I: H/PF4-ELISA (+); ID-PaGIA (-); AESKULISA (-); HIPA (-)

Gruppe II: H/PF4-ELISA (+); ID-PaGIA (+); AESKULISA (-); HIPA (-)

Gruppe III: H/PF4-ELISA (+); ID-PaGIA (-); AESKULISA (-); HIPA (+)

Gruppe IV: H/PF4-ELISA (+); ID-PaGIA (+); AESKULISA (+); HIPA (+)

Alle Patienten hatten ihren maximalen Thrombozyten-Abfall von mehr als 30 - 50 % innerhalb der ersten 3 Wochen ab Beginn der Heparintherapie, wobei die jeweiligen Ausgangswerte bei 5 Patienten nicht als Vorwert (= individueller Normwert) bestimmt worden waren. Ersatzweise wurde bei diesen 5 Patienten der nach Absetzen der Heparintherapie (wieder) erreichte höchste Thrombozytenwert als Normwert genommen.

Der Mittelwert des Tages des maximalen Thrombozyten-Abfalls (Abb. 1) lag in der Gruppe I bei Tag 4 in der Gruppe II und in der Gruppe III bei Tag 9 und in der Gruppe IV bei Tag 8.

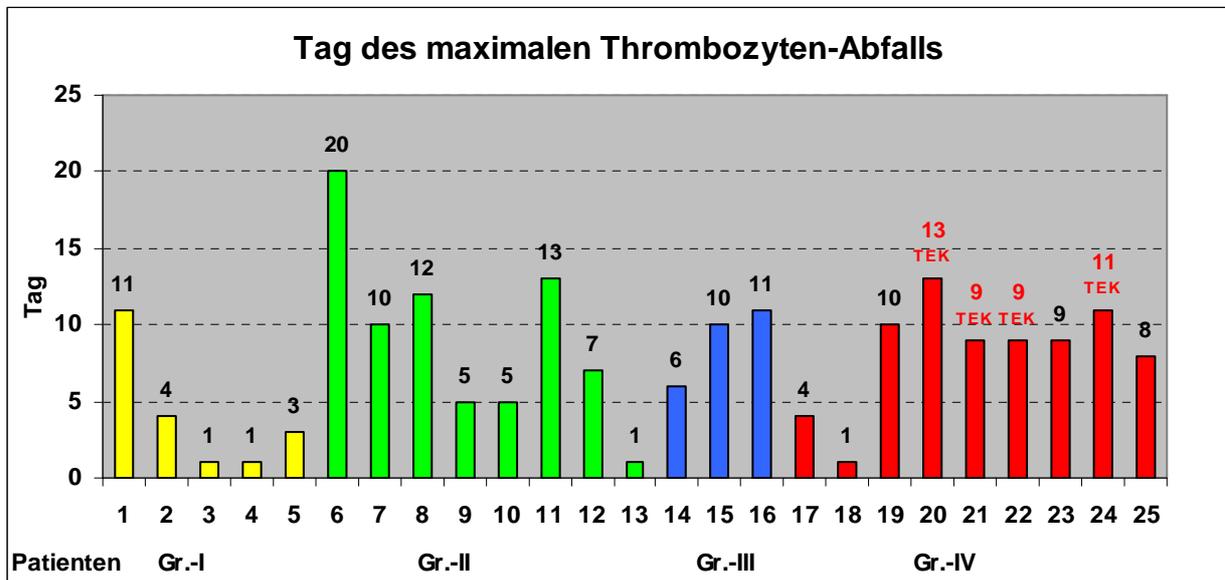


Abb. 1: Tag des max. Thrombozyten- Abfalls bei den Patienten mit V.a. HIT Typ II (4 Patienten hatten schwere thromboembolische Komplikationen [TEK])

Der Tag des maximalen Abfalls der Thrombozytenwerte zwischen den Gruppen unterscheidet sich mit keiner Signifikanz ($p=0,1$) obwohl die Mittelwerte in den Gruppen II, III und IV höher sind als in der Gruppe I (Abb. 2).

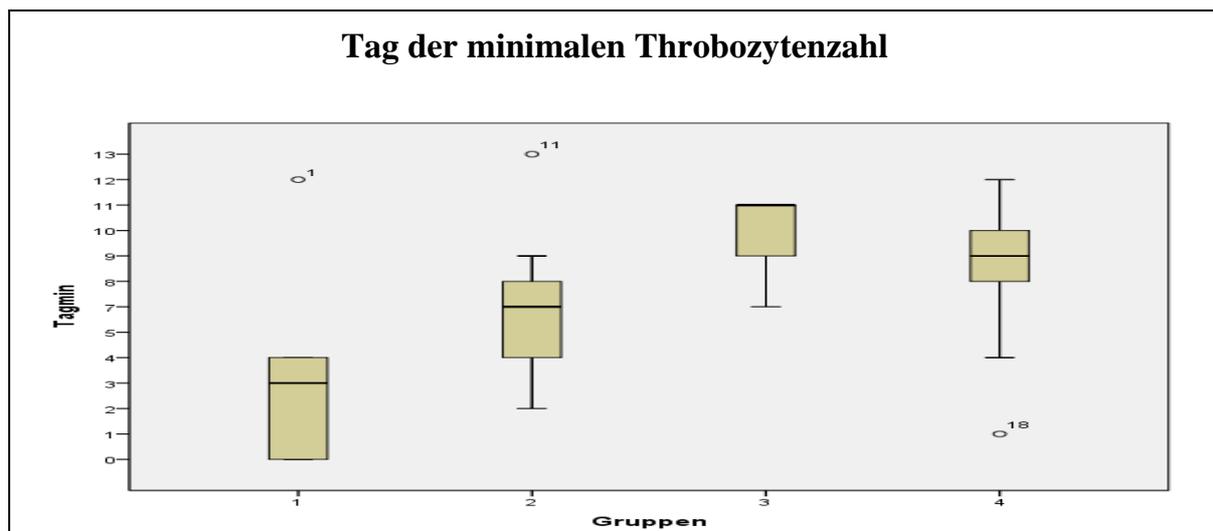


Abb. 2: Boxplotdarstellung des Zeitpunkts (= Tag) des maximalen Abfalls (= minimalste Thrombozytenzahl) der Thrombozytenwert im Vergleich der 4 Patientengruppen.

Alle getesteten Patienten, die zumindest in einem der 4 Tests ein positives Ergebnis zeigten, waren zumindest im H/PF4-ELISA-IgG/-M reaktiv (Tab. 3).

HIT- Diagnostik	Test- positiv n (%)	Test- negativ (n) n	TEK n (%)
H/PF4-ELISA-IgG/-M (n=25)	25 (100)	0	4 (16)
ID-Pa IGA/DiaMed (n=25)	17 (68)	8	4 (24)
H/PF4- ELISA IgM (n=21)	11 (52)	10	2 (18,2)
H/PF4- ELISA IgG (n=21)	18 (86)	2	4 (21)
AESKULISA HiT II- ELISA- IgG (n=21)	5 (24)	16	4 (80)
HIPA (n=25)	12 (48)	13	4 (33)

Tabelle 3: Darstellung der Absolutwerte / prozentualer Anteil der Ergebnisse des labordiagnostischen Tests bei Patienten mit V.a. HIT-II und deren thromboembolische Komplikationen (TEK).

Bei 21 Patienten konnten die H/PF4-Antikörper nach der IgG- und IgM-Klasse im ELISA separat untersucht werden (Tab. 4) um die klinische Relevanz zwischen HIT-Antikörper der Klasse IgM und IgG bei symptomatischen HIT-Patienten zu finden.

	<i>Gruppe - I (n=5)</i>	<i>Gruppe - II (n=8)</i>	<i>Gruppe - III (n=3)</i>	<i>Gruppe - IV (n=9)</i>	<i>Insgesamt</i>
H/PF4-ELISA- IgG/-IgM (n=25)	5	8	3	9	25
nur IgM (n=21)	0	1	0	2	3
nur IgG (n=21)	0	2	3	5	10
IgG und IgM (n=21)	3	3	0	2	8
AESKULISA HiT II -IgG (n=21)	0	0	0	5	5

Tabelle 4: Ergebnisse H/PF4-ELISA- Tests der Absolutwerte der Immunglobulinklasse IgG und IgM bei Patienten mit V.a. HIT Typ II

Zur Verdeutlichung der Aussagekraft der verschiedenen Testverfahren, haben wir 4 Patienten-Gruppen zusammengestellt je nach Reaktivität in den Tests: H/PF4-ELISA (+/-), ID-Pa GIA (+/-), AESKULISA (+/-) und/oder HIPA (+/-).

4.1. Klinische Charakteristika der Gruppe I

[H/PF4-ELISA(+); ID- Pa GIA (-); AESKULISA (-); HIPA (-)]

Zu dieser Gruppe konnten insgesamt 5 Patienten (m:w ~ 4:1) zugeordnet werden. Das Durchschnittsalter lag bei 67 Jahren (56 bis 80 J.). Weitere allgemeine Daten wie Begleiterkrankung und HIT-Risikofaktoren wurden zusammengefasst (Tab. 5). Die Patienten-Anamnese zeigt uns eine Heparin- Reexposition, respektive Vorsensibilisierung (NMH/UFH) bei allen 5 Patienten. Davon bekamen 2 Patienten eine Heparintherapie (NMH) wegen Z.n. Myokardinfarkt (bei einem Patient mit der Dg: HIT Typ II) weitere zwei Patienten wegen VHF. 1 Patient war nach ACVB-5-fach -Operation (5 Jahre vorher) mit UFH versorgt worden.

Haupt-Diagnose (n=5)	
• KHK	2
- mit Mitralklappeninsuffizienz	1
- mit Aortenklappenvitium	1
- mit Trikuspidalklappeninsuffizienz	1
Komorbidität	
a. Vorhofflimmern	2
b. pAVK	1
c. art. Hypertonie	5
d. Diabetes mellitus Typ II	1
HIT- Risikofaktoren präoperativ	
a. Heparin- Vorsensibilisierung	5
- Z.n. AMI	2
- VHF	2
- Z.n. ACVB-Op	1
b. Antithrombose Prophylaxe vor OP (NMH)	2
c. Patienten mit HLM- Einsatz	5

Tabelle 5: Klinische Patienten-Charakteristika und ihre Thromboserisikofaktoren (Gruppe I).

Bei allen Patienten wurde aufgrund ihrer kardiovaskulären Erkrankung unter Anwendung der Herz-Lungen-Maschine (Antikoagulation mit Heparin) eine ACVB-Operation durchgeführt. 3 Patienten bekamen außerdem noch künstliche Klappenprothesen (MKE, AKE, TKE).

Die Thrombozytenwerte (Tab. 6) betragen vor Therapiebeginn durchschnittlich 175 (SD±69) G/L , dann fielen die Werte um mehr als 50% bei 4 Patienten und bei einem Patient nur um mehr als 30% (Pat. Nr.: 5). Patient Nr.: 5 hatte eine HIT Typ II und schon eine Thrombozytopenie bei der Aufnahme.

Die minimale, mittlere Thrombozytenzahl war 68 (SD±23) G/L (mit einem klinisch relevanten Abfall von 61%). Die Thrombozytenwerte wurden nach dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei 4 Patienten mit einem mittleren Thrombozyten-Abfall von 33 % ausgewertet und 1 Patient zeigte einen Anstieg im Vergleich mit dem Aufnahmewert.

Thrombozyten- Wert vor UFH- Therapie (MW±SD)	175 ± 69 G/L
Niedrigste Thrombozyten- Wert (MW ± SD)	68 ± 23 G/L
Tag des Thrombozyten- Abfalls (MW)	4d
Thrombozyten- Abfall % (MW)	61
* Thrombozyten- Wert vor HLM- Einsatz (MW±SD)	175 ± 69 G/L
*Thrombozyten- Wert nach HLM- Einsatz (MW±SD)	117 ± 47 G/L
· Thrombozyten- Differenz (MW)	58 G/L
· Thrombozyten- Abfall % (MW)	33
UFH- Therapiedauer (MW±SD)	4,2 ± 3,8d
HIT Score Punkte (MW)	6
HIT Typ II / TEK	0 / 0 Pat.

Tabelle 6: Statistische Daten der Patientengruppe I.
(Thrombozyten- Werte; Tag des max. Thrombozyten- Abfalls; Dauer der Heparintherapie; HIT-Score- Werte; Patientenzahl mit HIT Typ II und TEK).
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

Das Thrombozyten- Diagramm (Abb. 3) zeigt uns, dass bei den Patienten Nr.: 2, 3 und 4 nach einer Sensibilisierung mit NMH (mind. 2 - 5 Tage vor Operation) und nach Einsatz der HLM die PLT- Zahl um > 50% abgefallen war.

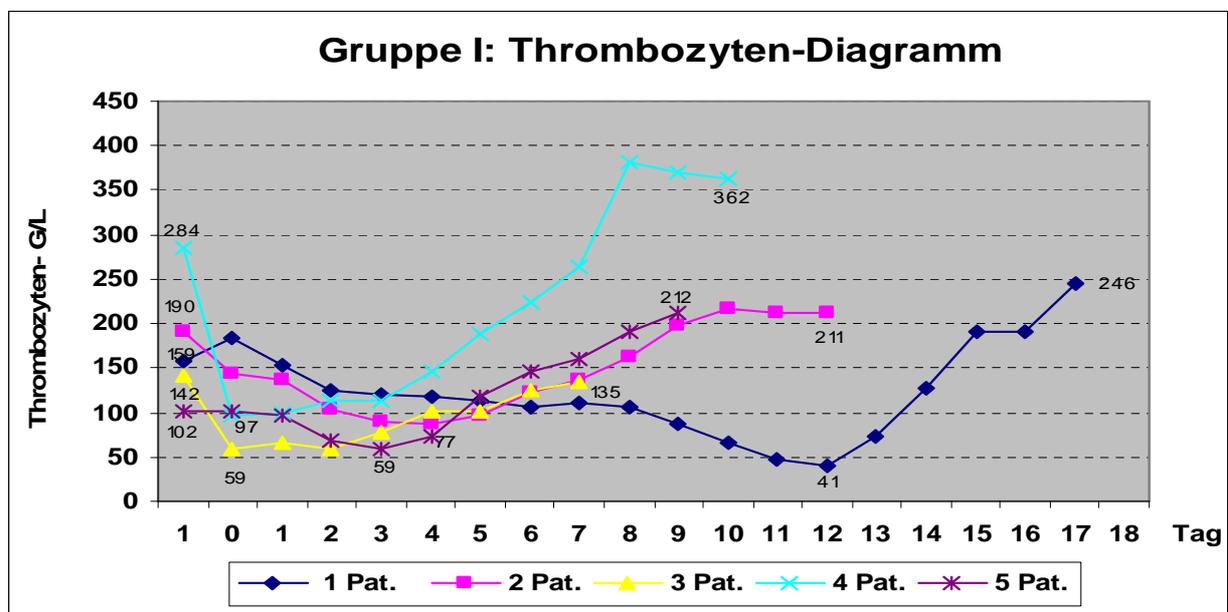


Abb. 3: Thrombozyten-Diagramm der Patientengruppe I.
(Thrombozyten- Werte bei der Aufnahme, nach HLM- Einsatz, max. Abfall und bei der Entlassung).

Die Heparintherapie wurde bei allen Patienten sofort beim V.a. eine HIT Typ II abgesetzt und auf eine adäquate Antikoagulationstherapie (Revasc, Refludan plus Falithrom bei 4 Patienten

und ausschließlich Falithrom bei 1 Patienten) umgestellt. Patient Nr.: 5 hatte in der Anamnese eine HIT Typ II und eine Thrombozytopenie, so dass bei ihm kein Heparin sondern Hirudin (Refludan) angewendet wurde. Eine Erhöhung/Normalisierung der Thrombozytenzahl wurde dann innerhalb von 3 – 5 Tagen konstatiert (Abb. 3).

Die HIT-Score Auswertung (Abb. 4) zeigte einen untypischen Verlauf für HIT bei den Patienten Nr.: 3 und 4 mit 6 Punkten am 1. -3. Tag, bei dem Patienten Nr.: 2 ab 5. Tag mit 5 Punkten und bei Patient Nr.: 1 nach 10 Tagen mit 6 Punkten. Patient Nr.: 5 (keine Heparintherapie, da in der Anamnese HIT Typ II) wurde nicht in diese Gesamt-Auswertung einbezogen.

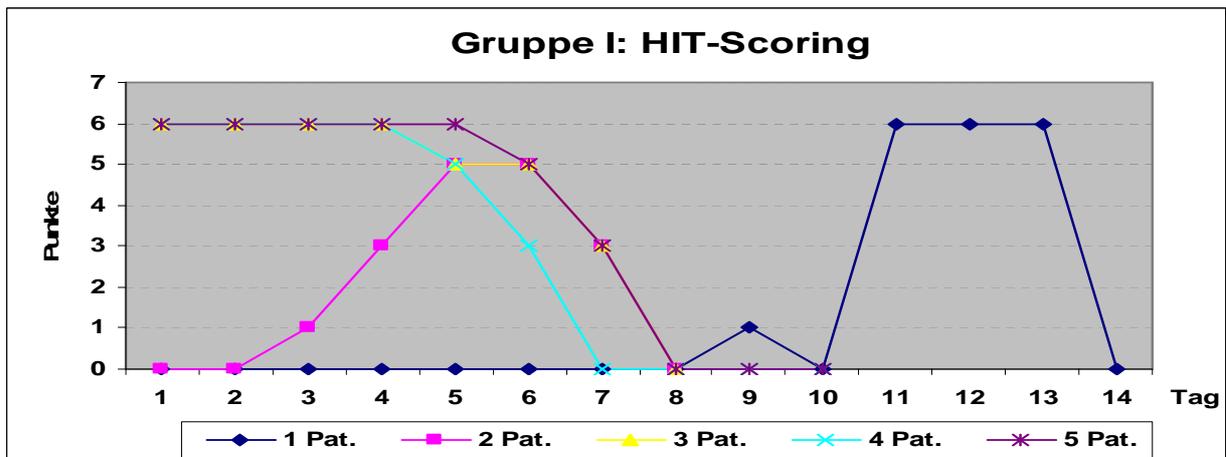


Abb. 4: HIT-Score (nach Lo et al. 2006) Auswertung (postfactum) bei der Patientengruppe I.

Die HIT-Score Interpretation gibt uns die Möglichkeit, nur die Patienten Nr.: 1 und 2 als potenziell gefährdet für eine HIT Typ II einzustufen.

Was die thromboembolischen Komplikationen bei dieser Gruppe betrifft, so trat bei Patient Nr.:1 eine akute Atemnotsituation (V.a. Lungenembolie röntgenologisch nicht bestätigt) nach Heparin-gabe in therapeutischer Dosierung über 9 Tage (Thrombozytopenie mit Abfall von 58%) auf, die sich nach Absetzen des Heparins und Falithrom Gabe nach 5 Tagen besserte. Bei dem Patient Nr.: 2 kam es vor der HIT-Diagnostik am Tag 5 zu einem ausgeprägten Unruhezustand ohne weitere Komplikationen. Dieser Zustand normalisierte sich nach Absetzen des Heparins.

Die mittlere Dauer einer Heparintherapie mit UFH nach der Operation betrug 4,2 Tage (SD±3,8) bis zum PLT-Abfall. Bei 4 Patienten passierte dies schon am 1. bis 4. Tag und bei einem erst nach 10 Tagen.

Bei allen Patienten fand eine Antikoagulation mit UFH statt; bei 3 Patienten in therapeutischer Dosierung, bei einem Patient als Thromboseprophylaxe und bei dem Patient Nr.: 5 nur bei der Operation mit HLM.

Alle Patienten wurden nach einem Krankenhausaufenthalt von 9 bis 18 Tage in ein Rehabilitationszentrum im kompensierten und stabilen Zustand ohne thromboembolische Komplikationen überwiesen.

4.2. Klinische Charakteristika der Gruppe II

[H/PPF4-ELISA(+); ID- Pa GIA (+); AESKULISA (-); HIPA (-)]

Diese Gruppe umfasste insgesamt 8 untersuchte Patienten (m:w ~ 7:1) mit einem Durchschnittsalter von 63 (38 – 75 J.). Alle Patienten wurden wegen schwerer kardiovaskulärer Erkrankungen für weitere operative Behandlungen aufgenommen. Unter Einsatz der HLM wurde bei 5 Patienten ein ACVB- mehrfach in der Kombination mit dem Ersatz einer Aortenklappe (2 Patienten) oder Mitralklappe (3 Patienten) durchgeführt. Bei 1 Patient erfolgte nur ein Aortenklappenersatz. Ein Patient hatte eine Implantation eines HSMI- Systems. Ein Patient wurde zum Wechsel einer Perikard-Drainage nach ACVB- Operation wieder aufgenommen. Aus den Anamnesedaten wurden bei allen Patienten, um das komplexe Krankheitsbild aufzuzeigen, zuerst die wichtigen Begleiterkrankungen zusammengefasst (Tab. 7).

Haupt-Diagnose (n=8)	
• KHK	2
- mit Mitralklappeninsuffizienz	3
- mit Aortenklappeninsuffizienz	2
• Aortenklappeninsuffizienz	1
Komorbidität	
a. pAVK	1
b. Sepsis / candida Sepsis	3 / 1
c. art. Hypertonie	6
d. NI- / ANV- Dialyse	1 / 1
e. Thrombozytopenie	2
HIT- Risikofaktoren präoperativ	
a. Heparin- Vorsensibilisierung	6
- Z.n. AMI	2
- Z.n. Lungenembolie	1
- NI- / ANV- Dialysel	2
- Z.n. HIT Typ-II	1
b. Antithrombose Prophylaxe vor OP (UFH / NMH)	2 / 4
c. Patienten mit HLM- Einsatz	6

Tabelle 7: Klinische Patienten-Charakteristika und ihre Thromboserisikofaktoren (Gruppe II).

Zudem wurden die präoperativen HIT-Risikofaktoren zusammengestellt:

- Z.n. AMI vor 2 Monaten bei 2 Patienten;
- Z.n. Lungenembolie bei 1 Patient;
- Dialysepflichtig waren 2 Patienten
- 1 Patient mit V.a. HIT Typ II in der Anamnese (begleitende Thrombozytopenie, HIT-Diagnostik- negativ);
- Antikoagulationstherapie mit UFH/NMH vor der Stationsaufnahme bei 6 Patienten (2 / 4);
- 3 Patienten hatten eine bakterielle- und 1 Patient candida- Sepsis.

Die Heparintherapie erfolgte bei 7 Patienten in therapeutischer Dosierung (nach aPTT-Kontrolle), bei einem Patient nur während der Operation/HLM (Patient Nr.: 13 Z.n. HIT-II in der Anamnese). Die Heparinabgabe erfolgte durchschnittlich 9,3 (SD± 6) Tage (Tab.8).

Thrombozyten - Wert vor UFH- Therapie (MW±SD)	194 ± 113 G/L
Niedrigste Thrombozyten - Wert (MW±SD)	67 ± 24 G/L
Tag des Thrombozyten - Abfalls (MW)	9 d
Thrombozyten - Abfall % (MW)	65
* Thrombozyten - Wert vor HLM- Einsatz (MW±SD)	194 ± 111 G/L
* Thrombozyten - Wert nach HLM- Einsatz (MW±SD)	154 ± 60 G/L
* Thrombozyten - Differenz (MW)	40 G/L
* Thrombozyten - Abfall % (MW)	21
UFH- Therapiedauer (MW±SD)	9,3 ± 6 d
HIT Score Punkte (MW)	5,6
HIT Typ II / TEK	2 / 0 Pat.

Tabelle 8: Statistische Daten der Patientengruppe II.
(Thrombozyten - Werte; Tag des max. Thrombozyten- Abfalls; Dauer der Heparintherapie; HIT-Score-
Werte; Patientenzahl mit HIT Typ II und TEK). (MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

Der Thrombozyten-Mittelwert (siehe Tab. 8) lag zu Therapiebeginn bei 194 (SD±113) G/L mit maximalem Plättchenabfall bis zu 67 (SD±24) G/L nach 9 Tagen (MW). Der Thrombozyten-Abfall war mit 65 % klinisch relevant.

Im Thrombozyten-Diagramm (Abb. 5) zeigt sich bei 7 Patienten ein HIT II-typischer PLT-Abfall (ab Tag 5 bis 20), jedoch bei den Patienten Nr.: 6, 8, 10 und 11 wurde bei der Abklärung die Diagnose einer bakteriellen, resp. candida Sepsis festgestellt mit dem dringenden V.a. einen

Verbrauchskoagulopathie (DIC) bedingten PLT-Abfall. Patient Nr.: 13 hatte keine postoperative Heparintherapie (nur intraoperativ) bekommen, weil in der Anamnese eine HIT II bekannt war.

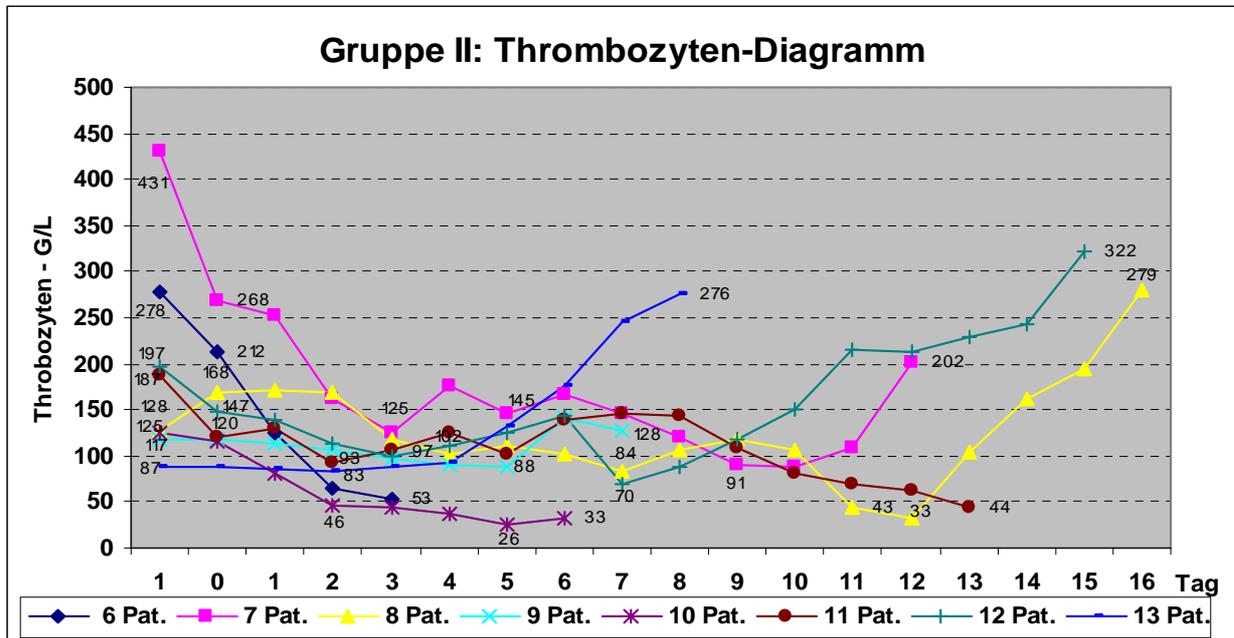


Abb. 5: Thrombozyten-Diagramm der Patientengruppe II.
(Thrombozyten- Werte bei der Aufnahme, nach HLM- Einsatz, max. Abfall und bei der Entlassung).

Zudem bekräftigt die HIT-Score Auswertung (Abb. 6) bei 3 Patienten (Nr.: 7, 9 und 12), deren PLT-Abfall sicherlich nicht durch eine Sepsis bedingt war, die Verdachtsdiagnose auf eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT II).

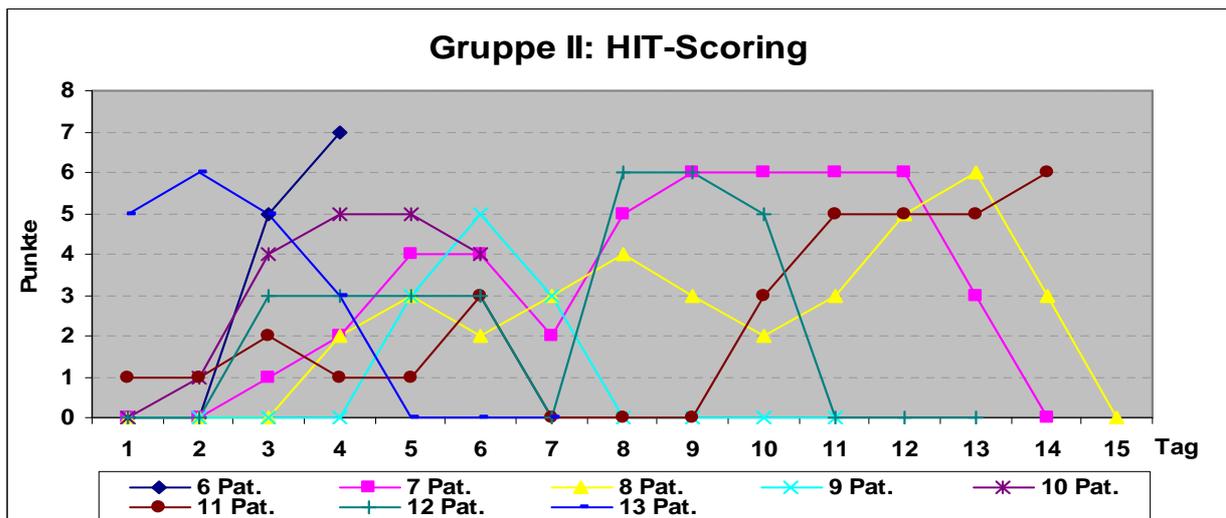


Abb. 6: HIT-Score (nach Lo et al. 2006) Auswertung (postfactum) bei der Patientengruppe II.

Nach Stellung der Verdachtdiagnose HIT Typ II wurde bei 7 Patienten die Heparintherapie mit UFH sofort beendet und die Antikoagulationstherapie bei 6 Patienten durch Hirudin und durch Falithrom bei 1 Patienten weitergeführt. Ein stabiler Anstieg der Plättchenzahl wurde bei 5 Patienten (3-5 Tage nach Ende der Heparingabe) bis zum Ausgangswert beobachtet.

6 Patienten wurden nach dem stationären Aufenthalt von 7 bis 19 Tagen ins Rehabilitationszentrum im stabilen Allgemeinzustand ohne thromboembolische Komplikationen überwiesen. 2 Patienten (Patient Nr.: 6 und 11) waren nach einer fulminant verlaufenden Sepsis verstorben.

4.3 Klinische Charakteristika der Gruppe III

[H/PPF4-ELISA(+); ID- Pa GIA (-); AESKULISA (-); HIPA (+)]

Dies ist die kleinste Gruppe mit nur 3 Patienten, die die gleiche HIT-Diagnostik-Kombination aufwiesen. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 63 J. (57 – 68; m:w ~ 1:2). Bei allen Patienten (Tab.9) wurde aufgrund ihrer kardiovaskulären Erkrankung (1 Pat. mit KHK und MKI, 1 Pat. mit KHK und MKI + AKI und 1 Pat. mit KHK und AKI) eine operative Behandlung (mehrfach ACVB bei 2 Patienten, bei einem Patient AK-Ersatz) mit HLM durchgeführt.

Präoperative HIT-Risikofaktoren (Tab. 9) wurden nur beim Patient Nr.: 14 mit Z.n. AMI mit Heparintherapie vor der Operation festgestellt, so dass diese Heparinisierung als ein Risikofaktor durch Vorsensibilisierung für die Entwicklung der thromboembolischen Komplikation angesehen werden kann.

Haupt-Diagnose (n=3)	
• KHK	
- mit Mitralklappeninsuffizienz	1
- mit Mitralklappeninsuffizienz + Aortenklappeninsuffizienz	1
- Aortenklappeninsuffizienz	1
Komorbidität	
a. art. Hypertonie	1
b. COPD / pulmonale Hypertonie	1
c. Diabetes mellitus Typ II	1
HIT- Risikofaktoren präoperativ	
a. Heparin- Vorsensibilisierung	1
- Z.n. AMI	1
b. Patienten mit HLM- Einsatz.	3

Tabelle 9: Patienten klinische Charakteristika und ihren Thromboserisikofaktoren (Gruppe III).

Die durchschnittlichen Thrombozytenwerte (Tab. 10) betragen bei Aufnahme 253 (SD±69) G/L und es wurde ein maximaler Plättchenabfall mit 66 % registriert, entsprechend einer Thrombozytenzahl von 85 (SD±51) G/L.

Zur Vermeidung postoperativer TEK wurde eine therapeutische Heparinisierung durchgeführt. Es dauerte 9 (SD±2,6) Tage, bis die Heparinapplikationen (UFH) aufgrund der klinisch-labordiagnostischen Konstellation bei allen Patienten abgesetzt wurde. Die weitere Antikoagulation wurde bei 2 Patienten mit Hirudin und bei einem mit Falithrom durchgeführt.

Thrombozyten - Wert vor UFH- Therapie (MW±SD)	253 ± 69 G/L
Niedrigste Thrombozyten - Wert (MW±SD)	85 ± 51 G/L
Tag des Thrombozyten - Abfalls (MW)	9d
Thrombozyten - Abfall % (MW)	66
* Thrombozyten - Wert vor HLM- Einsatz (MW±SD)	253 ± 69 G/L
* Thrombozyten - Wert nach HLM- Einsatz (MW±SD)	211 ± 64 G/L
· Thrombozyten - Differenz (MW)	42 G/L
· Thrombozyten - Abfall % (MW)	17
UFH- Therapiedauer (MW±SD)	9 ± 2,6 d
HIT Score (Punkte MW)	6,6
HIT Typ II / TEK	2 / 0 Pat.

Tabelle 10: Statistische Daten der Patientengruppe III.

(Thrombozyten – Werte; Tag des max. Thrombozyten- Abfalls; Dauer der Heparintherapie; HIT-Score- Werte; Patientenzahl mit HIT Typ II und TEK).
(MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

Das Thrombozyten-Diagramm (Abb. 7) und die HIT-Score Auswertung (Abb. 8) zeigen uns bei den Patienten Nr.: 14 und 15 den typischen Verlauf für eine HIT Typ II: am Tag 9 und 13 trat ein PLT-Abfall von mehr als 50 % und ein maximaler HIT-Score mit 6 Punkten auf.

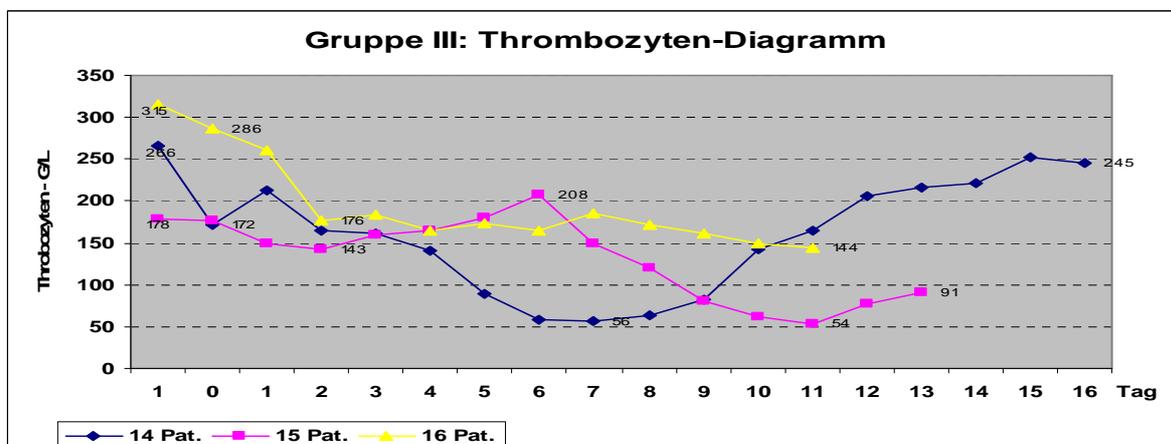


Abb. 7: Thrombozyten-Diagramm der Patientengruppe III.

(Thrombozyten- Werte bei der Aufnahme, nach HLM- Einsatz, max. Abfall und bei der Entlassung).

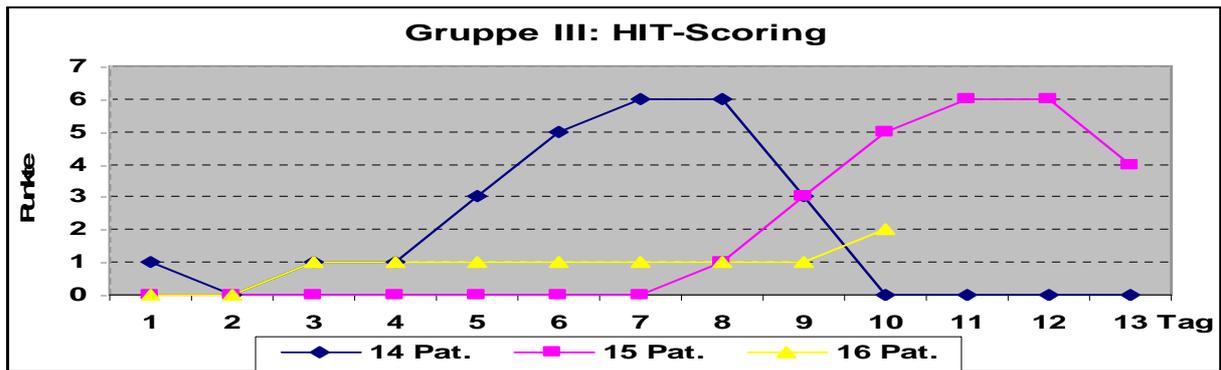


Abb. 8: HIT-Score (nach Lo et al. 2006) Auswertung (postfactum) bei der Patientengruppe III.

Die Daten vom Patient Nr.: 16 bestätigen die Verdachtsdiagnose auf HIT II nicht vollständig (PLT–Abfall von 315 G/L auf 176 G/L und HIT-Scoring nur bis zu 2 Punkten).

Alle Patienten wurden nach einem Krankenhausaufenthalt von 9 bis 18 Tagen in ein Rehabilitationszentrum im stabilen Zustand ohne thromboembolische Komplikationen überwiesen.

4.4 Klinische Charakteristika der Gruppe IV

[H/PPF4-ELISA(+); ID- Pa GIA (+); AESKULISA (+); HIPA (+)]

Das IV. Patientenkollektiv stellt eine besondere labordiagnostische Konstellation mit 9 Patienten (m:w ~ 5:4) dar. Das mittlere Patientenalter wurde mit 65 (52 - 75) Jahren ausgewertet. 7 Patienten in dieser Gruppe (Tab.11) hatten eine schwere KHK mit arterieller Hypertonie und zusätzlich hatte ein Patient Nr.: 20 eine AMI, COPD und Sepsis. 2 weitere Patienten wurden mit einer kombinierten Aortenklappen- und Mitralklappeninsuffizienz stationär aufgenommen.

Haupt-Diagnose (n=9)	
• KHK	7
• Mitralklappeninsuffizienz + Aortenklappeninsuffizienz	2
Komorbidität	
a. AMI + COPD + Sepsis	1
b. Vorhofflimmern	2
c. art. Hypertonie	9
d. Diabetes mellitus Typ II	3
e. . NI- / ANV- Dialyse	1
HIT- Risikofaktoren präoperativ	
a. Heparin- Vorsensibilisierung	6
- Z.n. AMI	5
- Z.n. Apoplex	1
b. Antithrombose Prophylaxe vor OP (UFH / NMH)	3 / 3
c. Patienten mit HLM- Einsatz	9

Tabelle 11: Klinische Patienten-Charakteristika und ihre Thromboserisikofaktoren (Gruppe IV).

In der Folge erhielten 7 Patienten mehrfache ACVB und 2 Patienten einen Aorten- und einen Mitralklappenersatz. Alle Eingriffe verliefen unter HLM-Einsatz. Aus den Anamnesedaten wurden folgende Risikofaktoren für die Entwicklung von Thrombozytopenie und thromboembolischen Komplikationen (TEK) nach einer Heparintherapie zusammengestellt:

- Z.n. AMI bei 5 Patienten;
- Z.n. Apoplex bei 1 Patient;
- Heparin- Sensibilisierung vor der Stationsaufnahme fand bei 6 Patienten (bei 3 Patienten mit UFH und 3 mit NMH) statt.

Die Heparintherapie dauerte in dieser Gruppe 9 (SD±3) Tage und bei dem Verdacht auf eine HIT II wurde die Antikoagulation bei 7 Patienten mit Hirudin und bei einem Patienten mit Falithrom weitergeführt.

Thrombozyten - Wert vor UFH- Therapie (MW±SD)	237 ± 52 G/L
Niedrigste Thrombozyten - Wert (MW±SD)	81 ± 37 G/L
Tag des Thrombozyten - Abfalls (MW)	8d
Thrombozyten - Abfall % (MW)	66
* Thrombozyten - Wert vor HLM- Einsatz MW±SD	237 ± 52 G/L
* Thrombozyten - Wert nach HLM- Einsatz MW±SD	232 ± 51 G/L
· Thrombozyten - Differenz (MW)	5 G/L
· Thrombozyten - Abfall % (MW)	2
UFH- Therapiedauer (MW±SD)	9 ± 3 d
HIT Score (Punkte MW)	6,8
HIT Typ II / TEK	7 / 4 Pat.

Tabelle 12: Statistische Daten der Patientengruppe IV.
(Thrombozyten- Werte; Tag des max. Thrombozyten- Abfalls; Dauer der Heparintherapie; HIT-Score- Werte; Patientenzahl mit HIT Typ II und TEK). (MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

Die Thrombozyten-Mittelwerte (Tab. 12) lagen vor der Operation bei 237 (SD±52) G/L. Nach HLM- Einsatz zeigte sich bei 6 Patienten nur ein 10 %-iger Thrombozyten- Abfall und bei 3 Patienten kommt es zur atypischen PLT- Erhöhung. Zum maximalen PLT-Abfall kam es erst nach 8 Tagen und dieser betrug 81 (SD±37) G/L (66 %). Diese Daten sind klinisch relevant. Das führte bei allen Patienten zum Absetzen der Heparintherapie und zur HIT- Diagnostik.

Das Thrombozyten-Diagramm (Abb. 9) zeigt uns bei den Patienten ohne TEK Nr.: 17, 18, 19 einen Thrombozyten- Abfall von 30 bis 50 % am Tag 1-3-9 der Heparintherapie und bei Patienten Nr.: 23 und 25 mit mehr als 50% am Tag 8-10.

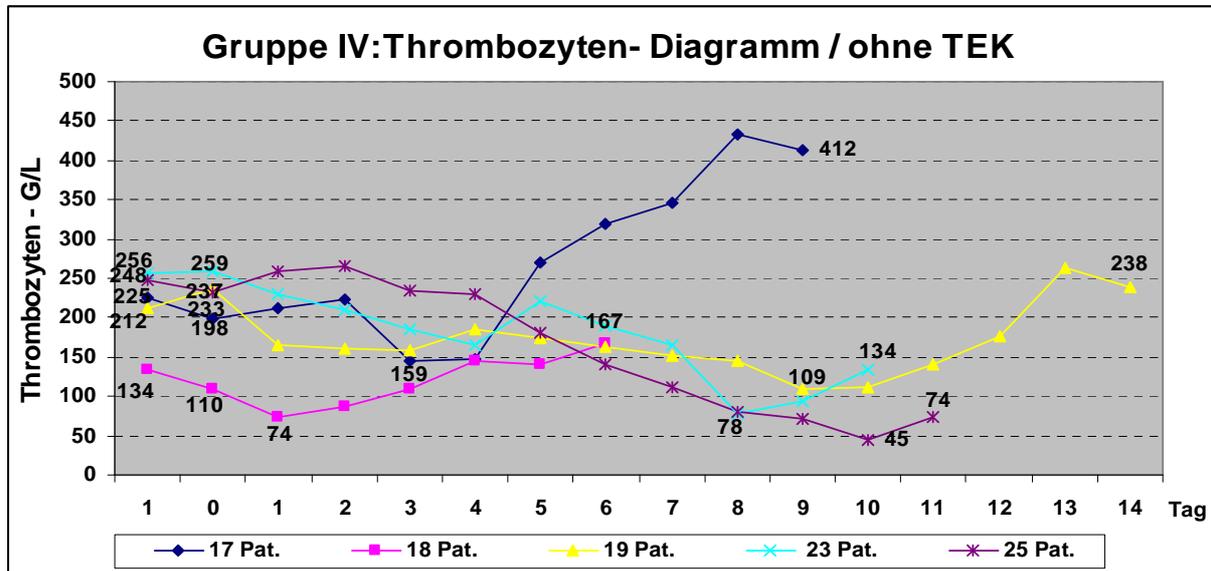


Abb. 9: Thrombozyten-Diagramm der Patientengruppe IV ohne TEK.
(Thrombozyten- Werte bei der Aufnahme, nach HLM- Einsatz, max. Abfall und bei der Entlassung)

Nachfolgend im Vergleich zeigt sich im Thrombozyten-Diagramm (Abb. 10). bei allen Patienten mit schwerer TEK (Nr.: 20, 21, 22 und 24) der Thrombozyten-Abfall um mehr als 50% am 9. bis 12. Tag.

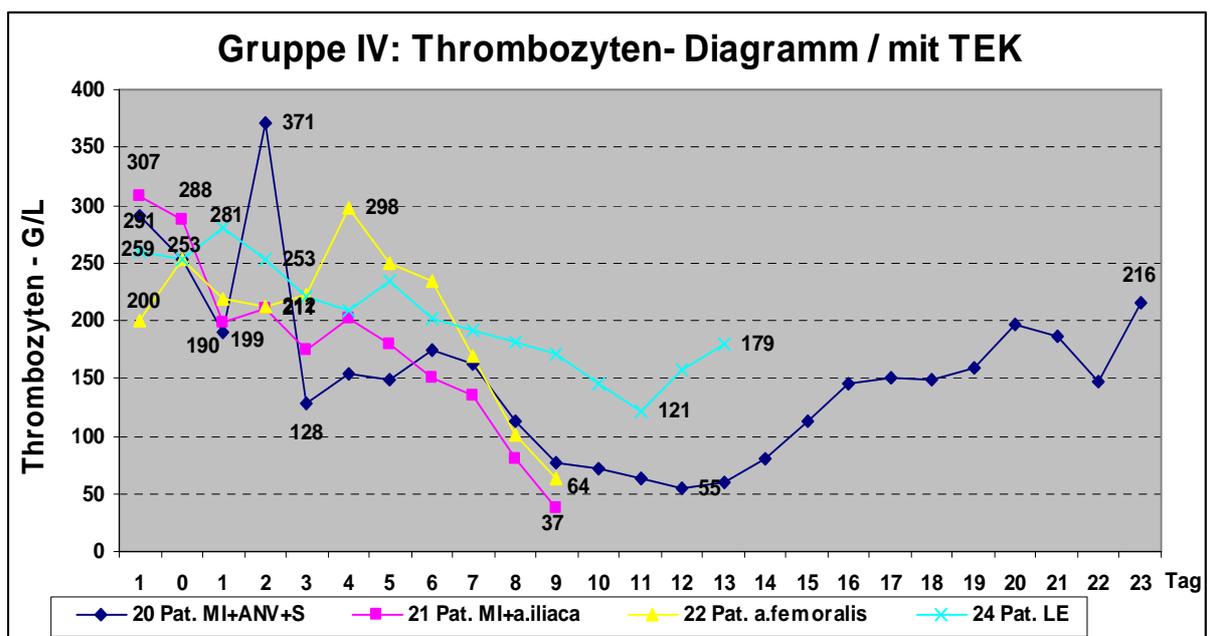


Abb. 10: Thrombozyten-Diagramm der Patientengruppe IV mit TEK.
(Thrombozyten- Werte bei der Aufnahme, nach HLM- Einsatz, max. Abfall und bei der Entlassung).

In der HIT- Scoring Abbildung bei den Patienten ohne TEK (Abb. 11) erreichen 4 Patienten (Nr.: 17, 18, 19, 23) maximal 5 Punkte und Patient Nr.: 25 hat 6 Punkte.

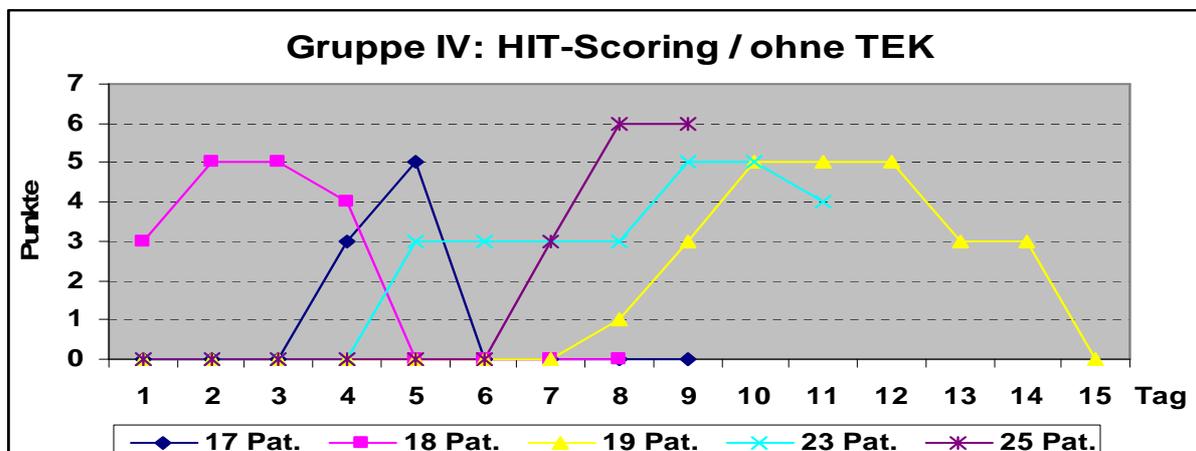


Abb. 11: HIT-Score (nach Lo et al. 2006) Auswertung (postfactum) bei der Patientengruppe IV ohne TEK.

Zum Vergleich bei den Patienten mit TEK (Abb. 12) zeigt sich eindeutig eine hohe, klinische Wahrscheinlichkeit (maximal 7 – 8 Punkte) für eine HIT Typ II bei allen Patienten aus.

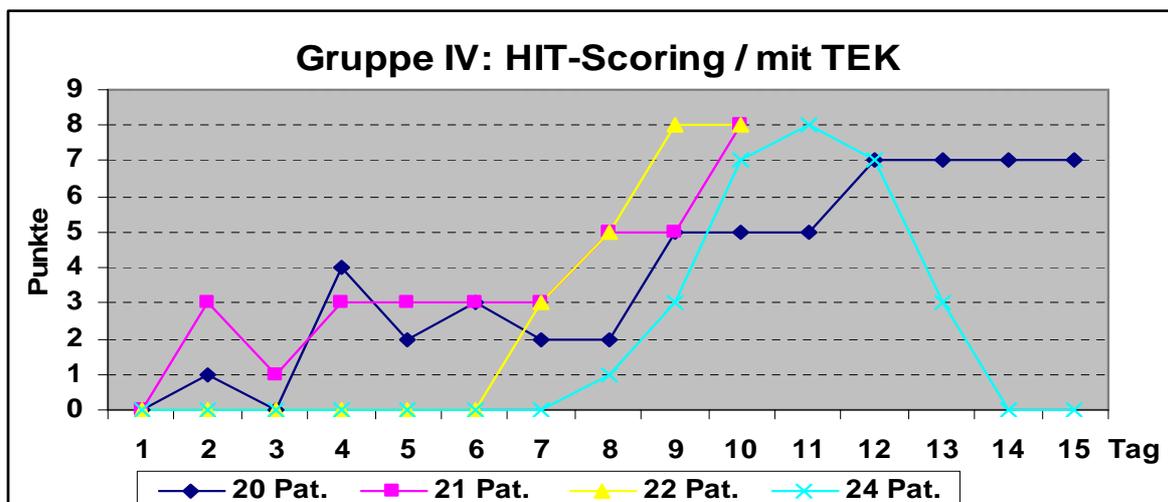


Abb. 12: HIT-Score (nach Lo et al. 2006) Auswertung (postfactum) bei der Patientengruppe IV mit TEK.

Vier Patienten erlitten schwere, thromboembolische Komplikationen: Patient Nr.: 20 hatte eine AMI und akutes Nierenversagen, Patient Nr.: 21 eine AMI und eine Embolie der a. iliaca communis bds., Patient Nr.: 22 hatte eine Embolie der a. femoralis communis li. (Embolektomie in den beiden Fällen) und Patient Nr.: 24 hatte eine Lungenembolie. Die Patienten Nr.: 20 und 21 verstarben an den Folgen der Thromboembolie; bei Patient Nr.: 22 wurde eine Embolektomie erfolgreich durchgeführt. Die Thrombozytenzahl normalisiert sich nach Heparintherapie-Abbruch bei allen 7 Patienten nach ca. 4 Tagen.

Alle 7 Patienten wurden nach dem Krankenhausaufenthalt von 9-16 Tagen in ein Rehabilitationszentrum im stabilen Zustand ohne weitere thromboembolische Komplikationen überwiesen.

4.5 Vergleich labordiagnostischen Testergebnissen der 4 Gruppen

Die HIT-Diagnostik war in der **Gruppe I** bei allen 5 Patienten nur im H/PF4- ELISA Test nach Amiral positiv. Der HIPA-, ID- Pa GIA- und AESKULISA HIT II-Test (IgG-AK-Nachweis) waren in dieser Gruppe negativ. Bei 3 Patienten wurde separat der IgG-AK- und der IgM-AK-Status, als Differential-diagnostisches Kriterium bei der HIT-Diagnostik, bestimmt (Abb.13). Die Ergebnisse zeigen deutlich höhere IgM-AK Werte bei allen 3 Patienten gegenüber den IgG-AK Werten.

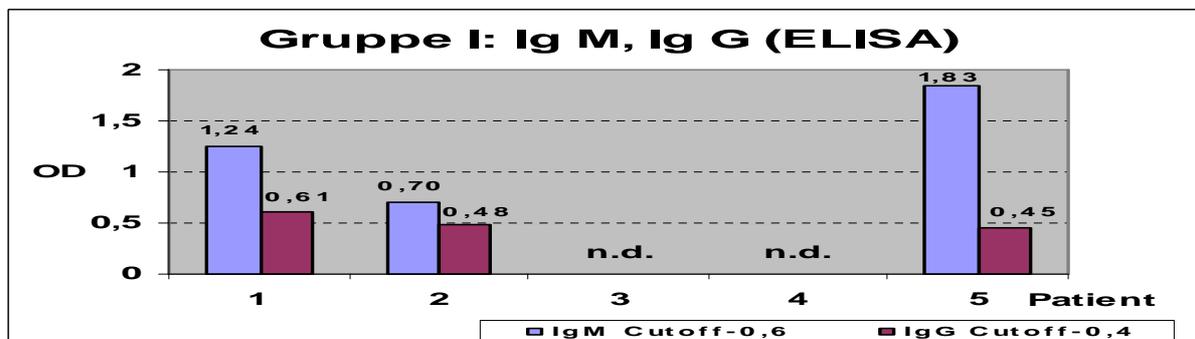


Abb. 13: Ergebnisse der einzelnen Immunglobulinklasse IgM und IgG der Gruppe I (D-E+H-).
H/PF4-ELISA-Test / IgM- Cutoff: 0,6; IgG- Cutoff: 0,4. (Pat. 3 und 4 nicht angesetzt = n.d.)

Die HIT-Diagnostik war in der **Gruppe II** (Abb. 14). zwar bei allen 8 Patienten positiv im H/PF4-ELISA nach Amiral, jedoch bei der Testung im Einzelansatz auf IgG- und IgM-AK wurde in dieser Gruppe mit 6 Patienten bei 4 Patienten IgG-AK (von 0,67 bis 2,9 OD) und bei 3 Patienten IgM-AK (von 1,3 bis 1,7 OD) als schwach positiv bis positiv (reaktiv) ausgewertet.

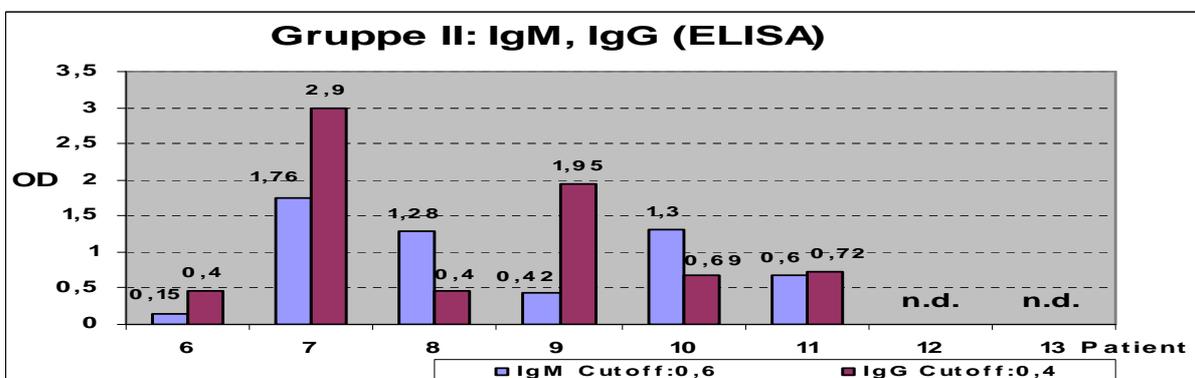


Abb. 14: Ergebnisse der einzelnen Immunglobulinklasse IgM und IgG der Patientengruppe II (D+E+H-).
H/PF4-ELISA-Test / IgM- Cutoff: 0,6; IgG- Cutoff: 0,4. (Pat. 12 und 13 nicht angesetzt = n.d.)

Auch im ID-Pa GIA / DiaMed waren alle Patienten positiv, während die Ansätze im AESKULISA (IgG-AK Nachweis) und im HIPA-Test bei allen Patienten dieser Gruppe negativ ausfielen.

Die HIT-Diagnostik war in der **Gruppe III** bei allen 3 Patienten im HIPA und H/PF4-ELISA nach Amiral positiv. Der separate AK-Ansatz für IgG- oder IgM-AK zeigte bei allen Patienten, besonders aber bei den Patienten Nr.: 15 und 16, ein positives Ergebnis (Abb. 15).

Der ID-Pa GIA /DiaMed und der AESKULISA (IgG-AK Nachweis) waren negativ.

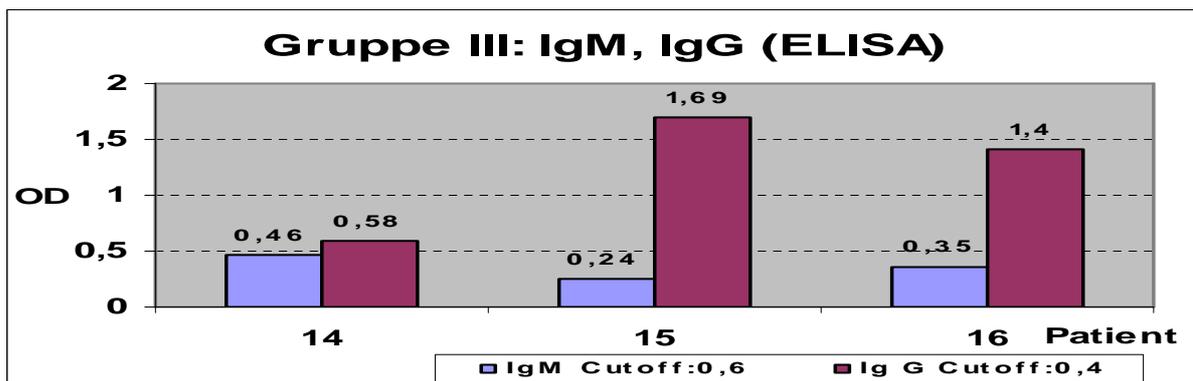


Abb. 15: Ergebnisse der einzelnen Immunglobulinklasse IgM und IgG der Patientengruppe III (D-E+H+). H/PF4-ELISA-Test / IgM- Cutoff: 0,6; IgG- Cutoff: 0,4.

Die HIT-Diagnostik zeigte in der **Gruppe IV** (Abb. 16) bei allen 9 Patienten deutlich positive Werte in allen Testverfahren, besonders in den Fällen mit TEK, wobei vor allem der monospezifische Immunoassay (IgG-AK-Nachweis) eine HIT Typ II bestätigt: 6 Patienten sind positiv und 1 Patient schwach positiv im H/PF4-ELISA-IgG, jedoch nur 5 im AESKULISA, vier davon mit schweren TEK.

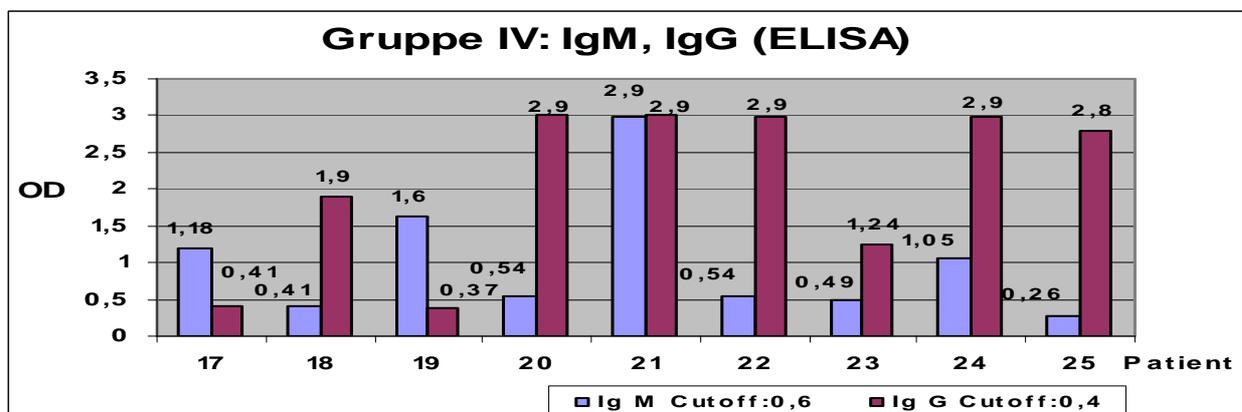


Abb. 16: Ergebnisse der einzelnen Immunglobulinklasse IgM und IgG der Patientengruppe IV (D+E+H+). H/PF4-ELISA-Test / IgM- Cutoff: 0,6; IgG- Cutoff: 0,4. (Pat. 20, 21, 22 und 24 mit TEK)

Nachfolgend werden die ELISA-Werte der Patienten mit positivem IgG-AK-Nachweis bei negativem IgM-AK-Nachweis dargestellt (Abb. 17). Interessanterweise befinden sich bei diesen Patienten zwei (Patient Nr.: 20 und 22) von den 4 Patienten mit schweren TEK, wobei die beiden anderen Patienten mit TEK (Patient Nr.: 21 und 24) auch erhöhte IgM-AK-Werte aufwiesen (Abb.18).

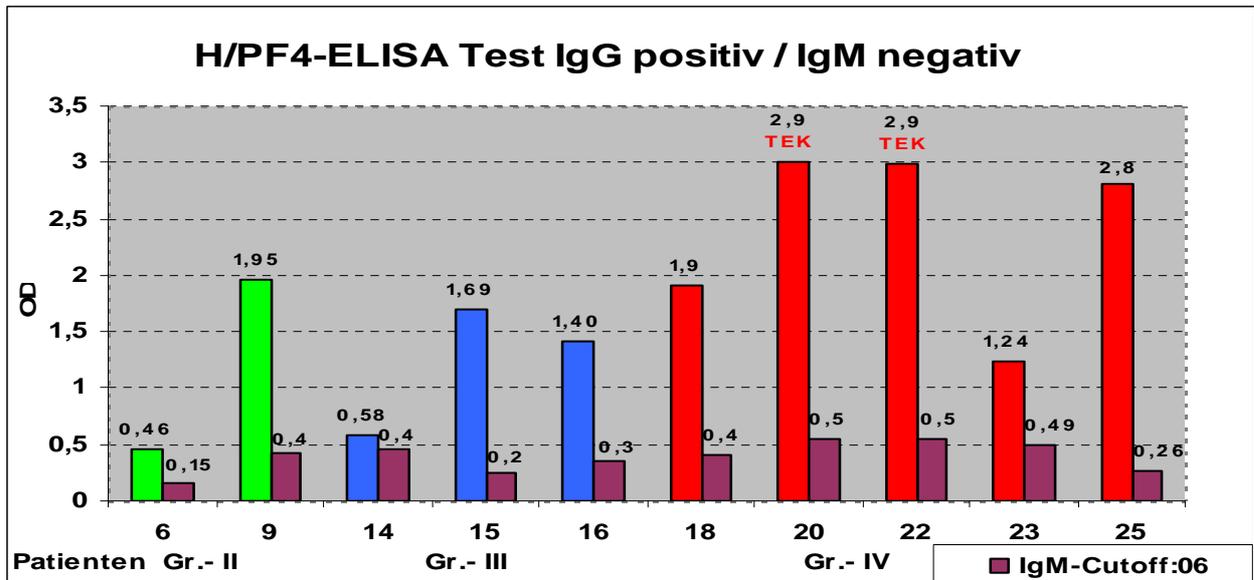


Abb. 17: Ergebnisse H/PF4- ELISA Tests mit positiven IgG- und negativen IgM- Werten bei den Patienten allen Gruppen. (TEK- thromboembolische Komplikationen). IgM- Cutoff: 0,6; IgG- Cutoff: 0,4

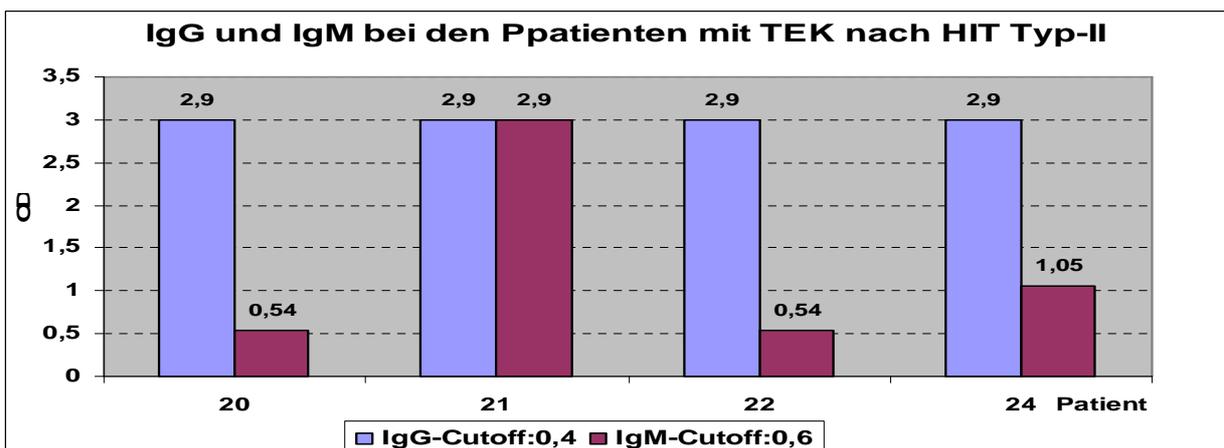


Abb. 18: Ergebnisse H/PF4- ELISA Tests mit IgG- und IgM-Werten bei den Patienten mit TEK. IgM- Cutoff: 0,6; IgG- Cutoff: 0,4

In der Abbildung Nr.: 19 und Nr.: 20 sind die Absolutwerte der Absorption im Heparin/PF4-ELISA entsprechend IgG- und IgM- Klasse in allen Gruppen dargestellt.

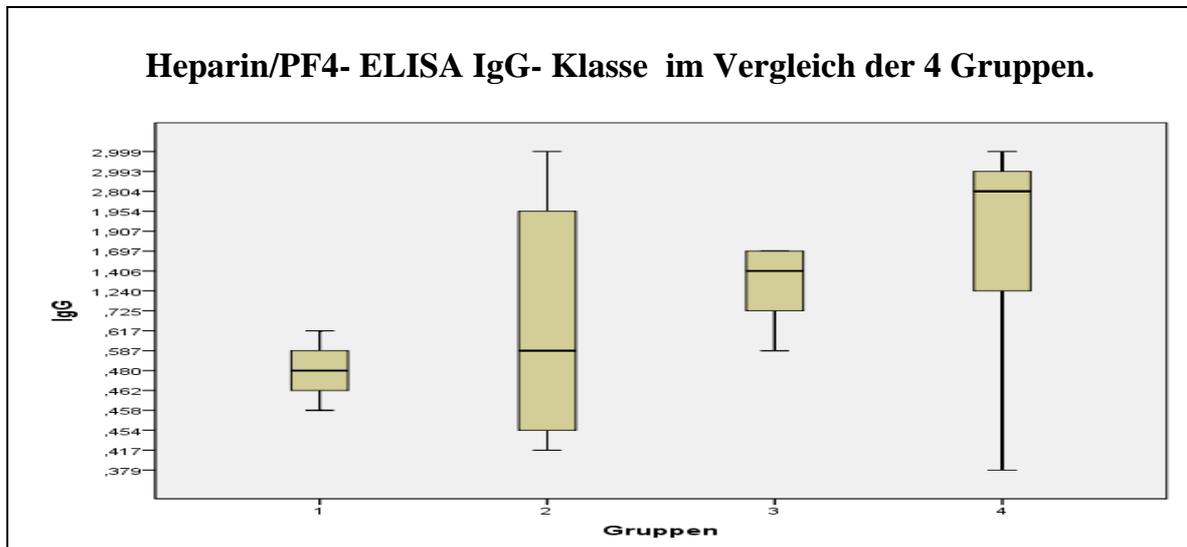


Abb. 19: Boxplotdarstellung der absoluten Absorptionswerte in der Heparin/PF4-ELISA IgG- Klasse im Vergleich der 4 Patientengruppen.
(Cutoff für IgG: negativ- 0.4; schwach positiv ≥ 0.56 ; positiv ≥ 1.61)

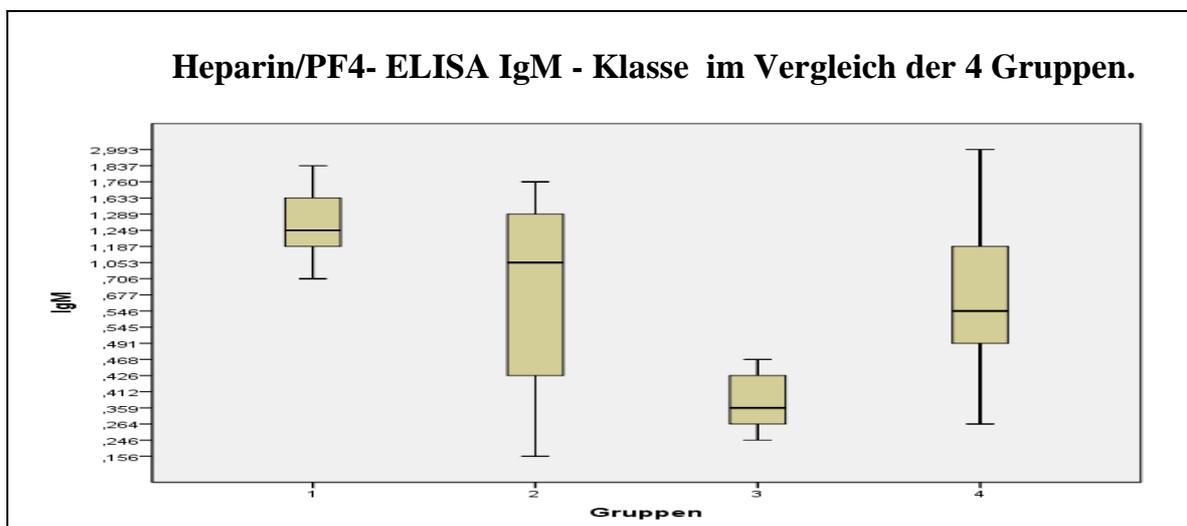


Abb. 20: Boxplotdarstellung der absoluten Absorptionswerte in der Heparin/PF4- ELISA IgM-Klasse im Vergleich der 4 Patientengruppen.
(Cutoff für IgM: negativ ≤ 0.6 ; positiv ≥ 1.61)

In der Abbildung Nr.: 19 ist zu sehen, dass die Gruppe IV mit 2,8 den höchsten Median für die IgG Adsorptionswerte hatte, gefolgt von Gruppe III (1,4) und Gruppe II (0,58). Der Median der Gruppe I (0,48) liegt zwischen dem vorgegebenen Cutoff von 0,4 für negativ und 0,56 für schwach positiv.

Der paarweise Mittelwertsvergleich mit dem t-Test (Welch) für die IgG Adsorptionswerte zeigt einen signifikanten ($p < 0,003$) Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe IV. Zwischen den Gruppen II, III und IV ließ sich keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,10$) feststellen.

In Abbildung Nr.: 20 ist zu sehen, dass die Gruppe I mit 1,24 den höchsten Median für die IgM Adsorptionswerte hatte, gefolgt von Gruppe II (1,05). Die Mediane der Gruppen III und IV liegen mit 0,4 bis 0,6 in der Höhe des für diese Methoden angegebenen Cutoff -Werts ($\leq 0,6$).

Der paarweise Mittelwertsvergleich mit dem t-Test (Welch) für die IgM Adsorptionswerte ließ zwischen den Gruppen I, II, III und IV keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,44$) erkennen.

5. DISKUSSION

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II) ist eine seit vielen Jahren bekannte und sehr schwerwiegende Komplikation bei der Antikoagulation mit Heparin. Für deren Auftreten wird als erster Hinweis ein klinisch nicht anders erklärbarer Thrombozyten-Abfall angesehen. Daher wurde seit den späten 80er Jahren durch unterschiedliche Fachgesellschaften eine regelmäßige Kontrolle der Thrombozytenwerte im Verlauf einer Heparintherapie vorgeschrieben (Chong et al. 1989). Als eine für die HIT II dringend verdächtige Thrombozytopenie wird ein Abfall der Blutplättchen auf mindestens 50 % des „prätherapeutischen“ Ausgangswertes gewertet (Warkentin et al. 1998). Diese Definition berücksichtigt die individuellen Thrombozytenverläufe besser als das Heranziehen eines absoluten Grenzwertes von z.B. 100000/ μ l als ein weiteres in der Literatur sehr häufig diskutiertes Kriterium.

In der Praxis lässt sich allerdings nicht zuletzt wegen der normalerweise relativ häufigen stärkeren Schwankungen der Plättchenzahlen ein solcher optimaler Ausgangswert oft nur retrospektiv klar definieren. Zum Teil kann es notwendig werden, dass man als „normalen“ Vorwert den Wert zu Hilfe ziehen muss, der nach dem Absetzen der Heparinabgaben wieder erreicht wird, da die Bestimmung des Ausgangswertes nicht selten unterlassen wird oder aus den Vorakten nicht ermittelbar ist. Wegen eines meist übernormalen Reboundeffekts beim Wiederanstieg der Thrombozyten nach Absetzen des Heparins sollte man nicht den zunächst als erstes erreichten Höchstwert als (Vor-)Normalwert nehmen, sondern 3 – 5 Tage später eine Kontrollbestimmung durchführen (Greinacher A. 1999). Vergleichbare Verläufe der Thrombozytenwerte zeigen sich auch in den vorliegenden Untersuchungen (Abb. 3, 7 und 9), insbesondere bei den Patienten in den Gruppen 2 und 4 (Abb. 5 und 10).

Die Bestimmung und Berechnung des HIT-Scores wird durch die oft nur retrospektiv zu ermittelnden individuellen Normalwerte der Patienten stark beeinträchtigt, da durch die Art und Weise des Thrombozyten-Abfalls (< oder > 30 % oder > 50 %) die Diagnosestellung und dann auch die Interpretation und Vergabe der Scorepunkte nicht unerheblich beeinflusst werden. Wie man in den Gruppen II und III (Abb. 6 und 8) deutlich erkennen kann, schwankt bei den Patienten zum Teil die Punktzahl des HIT-Scores von Tag zu Tag sehr stark und lässt nur in wenigen Fällen eine eindeutig stetig zunehmende Tendenz erkennen, so wie man es bei einer

sehr verstärkenden klinischen Symptomatik im Rahmen einer HIT II unter fortwährenden Heparinabgaben erwarten würde.

Unabhängig davon ist allerdings der Wiederanstieg der Thrombozyten auf annähernd normale (Ausgangs-)Werte innerhalb von wenigen Tagen nach dem Absetzen einer Heparintherapie ein weiteres sehr wichtiges Kriterium für die klinische Diagnose einer HIT II und gilt als nahezu beweisend. Natürlich ist der Plättchenanstieg kein Kriterium für den HIT-Scor, da dieser zwangsläufig erst nach „Abschluss“ der HIT II auftritt. In der Praxis erfüllt sich diese Normalisierung der Thrombozytenwerte i.d.R. bei allen „echten“ HIT-Patienten mit oder ohne thromboembolische Komplikationen (TEK), wobei sich dies in der vorliegenden Untersuchung ganz besonders bei den Patienten der Gruppe 4 zeigt (Abb. 9 und 10).

Während es im klinischen Alltag sehr viele verschiedene Gründe für einen Thrombozytenabfall auch ohne das Vorliegen einer HIT gibt, wie z.B. eine Autoimmunthrombozytopenie (ITP), eine DIC/Verbrauchskoagulopathie (z.B. bei Sepsis), eine Medikamentenassoziierte Thrombozytopenie (z.B. durch Chinidin o.a.) oder eine thrombotisch- thrombozytopenische Purpura (TTP) sowie eine EDTA-Proben bedingte Pseudothrombozytopenie, so lässt sich bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen ein Thrombozytenabfall i.d.R. auf eine massive Beeinträchtigung der Blutplättchen durch die Shearkräfte und Fremdoberflächenkontakte beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine zurückführen (Cullmann et al. 1980). Insbesondere auch nach Herzklappenersatz lässt sich bei einigen Patienten in der Folge eine weitere Beeinträchtigung der Plättchenfunktion selbst, als auch der Plättchenzahl feststellen, wobei hinsichtlich der primären Hämostase auch das erworbene von-Willebrand-Jürgens-Syndrom bei Herzklappenpatienten eine gewichtige Rolle zu spielen scheint (Heilmann et al. 2010). Eine weitere durch Shearkräfte und / oder Fremdoberflächen Kontakt ausgelöste Thrombozytopathie und auch Thrombozytopenie tritt auch bei der kontinuierliche Hämofiltration bei niereninsuffizienten Intensivpatienten auf, wobei hier auch eine Abgrenzung zur HIT II erfolgen muss, da diese Patienten i.d.R. auch im Verlauf der Hämofiltration heparinisiert werden.

Da zum überwiegenden Teil die Herzoperationen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine zur Vermeidung einer Gerinnselbildung im Blut unter einer therapeutischen Antikoagulation mit Heparin erfolgen, wäre beim Feststellen eines Thrombozyten-Abfalls eine exakte HIT-Diagnostik sehr wünschenswert. Insbesondere wird ein großer Teil dieser Patienten auch in den Tagen danach insbesondere nach Herzklappenersatz vor der Umstellung auf eine orale Atikoagulation mit hochdosiertem Heparin behandelt, so dass die Gefahr des Auftretens einer HIT II

deutlich steigt. Vor allem können die meisten dieser Patienten bereits schon vor der Herzoperation auch als potentiell Heparin-sensibilisiert gelten, da diese bei diversen invasiven diagnostischen Eingriffen, z.B. bei radiologischen Gefäßdarstellungen, sehr häufig mit Hilfe von Heparin antikoaguliert worden waren, so dass auch ein sehr früher und starker Abfall der Thrombozyten schon zu Beginn der ersten Therapiewoche auftreten kann.

Da bis zum Erreichen der vollen therapeutischen Antikoagulation mit den derzeit noch üblichen Vitamin-K-Antagonisten überlappend eine PTT-gesteuerte i.v. Antikoagulation mit Heparin durchgeführt wird und bei einer klinisch wirksamen HIT II zur Vermeidung thromboembolischer Komplikationen schnellstmöglich auf eine alternative Antikoagulation umgestellt werden müsste, ist eine sichere HIT-Diagnostik unerlässlich. Diese Dringlichkeit wird dadurch noch verstärkt, da sehr viele alternative Antikoagulanzen für eine therapeutische Antikoagulation noch nicht zugelassen oder zum Teil auch nur schwer steuerbar sind, was die Gefahr von Blutungskomplikationen drastisch erhöht (Bauer K.A. et al. 2001, Breddin H. et al. 2002, Chew D. et al. 2002, Chong B.H. et al. 1992, Eriksson B.I. et al. 2001, Lewis B.E. et al. 2003, Savi P. et al. 2005, Shah A.C. et al. 2000).

Die Datenlage zur Wertigkeit der unterschiedlichen Nachweisverfahren für HIT-Antikörper in Verbindung mit den unterschiedlichsten klinischen Verläufen der Patienten mit nachgewiesenem Abfall der Thrombozytenwerte ist bis heute immer noch uneinheitlich und sehr viele Tests zum HIT-Antikörper-Nachweis wurden und werden propagiert und sind teilweise auch wieder verworfen worden. Nicht zuletzt besteht bei den Klinikern der dringende Wunsch nach verlässlichen Schnelltests, deren Wertigkeit sehr häufig an der fehlenden Chargenkonstanz scheiterte.

Insbesondere der nahezu regelhaft nach Herzoperationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine auftretende Thrombozyten-Abfall, der bei vielen anderen operativen Fächern sehr viel seltener vorkommt, macht es für die Herzchirurgie sehr wichtig, durch Testverfahren mit schnell verfügbaren Messergebnissen sicher zu erkennen, inwieweit das Heparin beim Einsatz der HLM für den Plättchenabfall (mit-)verantwortlich ist, um durch eine sehr rasche und gezielte Umstellung der postoperativ notwendigen Antikoagulation thromboembolische Komplikationen vermeiden zu können.

Da der Thrombozyten-Abfall meist erst im Verlauf des Klinikalltags nach Erhalt und Bewertung des Blutbildes zu dem V.a. eine HIT führt, ist i.d.R. am selben Tag kein aufwendiger immunologischer Test mehr durchführbar, so dass zunächst die Heparinabgaben auf Verdacht abzusetzen und auf eine andere Antikoagulation umzustellen sind. Der dringliche Wunsch der Kliniker, die Notwendigkeit zur Umstellung der Antikoagulation mit Hilfe von schnellen Testergebnissen zu unterstützen, führte zur weiten Verbreitung des leicht und schnell durchzuführenden ID-PaGIA, der auch in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt worden war und bei 17 der untersuchten Patienten (n=25) positiv ausfiel.

Im Gegensatz dazu waren alle 25 Patienten mit dem H/PF4-ELISA-IgG/-M Routinetest positiv. Beide Tests führen sowohl mit IgG-, wie auch IgM-Antikörpern gegen den Heparin-Plättchenfaktor 4-Komplex zu einer positiven Reaktion, so dass zur weiteren Abklärung zusätzliche Tests angesetzt werden müssen, da viele Untersuchungen nur dem Nachweis von IgG-Antikörpern eine klinische Relevanz zusprechen (Kelton J.G. et al. 1994; Arepally G. et al. 1997; Juhl D. et al. 2006).

Doch auch beim spezifischen IgG-Antikörpernachweis zeigen sich je nach Testverfahren sehr unterschiedliche Ergebnisse, denn von den 25 klinisch dringend HIT-verdächtigen Patienten ließen sich zwar im H/PF4-ELISA-IgG Routinetest bei 15 von 21 Patienten IgG-Antikörper nachweisen, mit dem AESKULISA jedoch nur bei 5 von 21 Patienten. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass sich unter diesen 5 Patienten die einzigen 4 befanden, bei denen schwere thromboembolische Komplikation auftraten.

Bezieht man nun auch noch den funktionellen Antikörpernachweis mit dem HIPA-Test mit ein, so machte dieser zwar bei 9 Patienten das Vorliegen von HIT-AK wahrscheinlich, wobei jedoch nur bei 7 dieser Patienten eindeutig positive IgG-AK Nachweisreaktionen im H/PF4-ELISA-IgG und nur bei 5 auch im AESKULISA auftraten. Im Schnelltest ID-PaGIA waren jedoch 17 von 25 reaktiv, wobei bei 8 von diesen sowohl der HIPA-Test, wie auch bei 5 der AESKULISA-Ansatz negativ ausgefallen waren. Besonders hervorzuheben ist, dass die Patienten mit negativem Schnelltest (ID-PaGIA) zwar vereinzelt in anderen Tests positive Reaktionen zeigten, jedoch auch in der Rückschau, wie in der HIT-Score Bewertung keine klinisch eindeutigen Hinweise auf eine HIT II aufwiesen, so dass man mit diesem weit verbreiteten Schnelltest zumindest keine Patienten mit dem dringenden V.a. eine HIT II zu übersehen scheint. Allerdings erscheint der Anteil der falsch-positiv getesteten Patienten nicht unerheblich, da man hier auch sehr dringlich

berücksichtigen muss, dass es bei diesen Patienten absolut notwendig erschien, z.T. als alternative Antikoagulation, nichtzugelassene Medikamente einsetzen zu müssen. Insbesondere bei schweren Blutungskomplikationen kann der Einsatz von Medikamenten im „off-label-use“ für die Ärzte schwerwiegende forensische Folgen haben.

Von den 25 Patienten, die zumindest in einem oder mehreren Testansätzen positive Reaktionen zeigten, waren aber letztendlich nur 5, die in allen hier durchgeführten Testverfahren einen HIT-AK-Nachweis aufwiesen. 4 von diesen HIT-Patienten hatten zudem schwere klinische TEK. Wie eingangs aufgeführt, wurden von insgesamt 193 Patienten der Herzchirurgie (16 % von 1225 Patienten mit Heparin-Exposition in der HTC) unter dem V.a. auf eine HIT II wegen eines peri- und postoperativen Thrombozyten-Abfalls Blutproben zum Nachweis von HIT-AK eingeschickt, wobei bei 168 Patienten (87 % von 193) keine AK nachgewiesen werden konnten. Bei 25 Patienten (Risiko 1 : 49 ~ 25 : 1225 HTC-Patienten) fanden sich z.T. sowohl klinisch (s. HIT-Score), wie teils auch labormäßig eindeutige Hinweise auf das Vorliegen einer HIT II.

Nach den Daten im HIT-Score und in den Labor-Analysen (ID-PaGIA Schnelltest, IgG-Nachweis und HIPA-Test deutlich positiv) kann jedoch nur bei 11 Patienten die Diagnose HIT II als gesichert gelten. Dies entspricht einer Inzidenz von 0,89 % (1 / 111 HTC-Patienten) für die Entwicklung einer HIT II nach einer Heparintherapie, wobei in größeren Übersichtsarbeiten von Inzidenzen um 0,1-3 % berichtet wird (Greinacher et al. 1996). 4 von den 1225 HTC-Patienten hatten unter der Heparintherapie schwere thromboembolische Komplikationen (0,32 %), entsprechend einem Risiko von 1 / 306 Patienten.

Im Vergleich dazu erreichte eine Metaanalyse aus 14 prospektiven Studien (Warkentin et al. 1994), die insgesamt 1336 Patienten einschloss, eine Inzidenz von 3,4% für die HIT II ohne thromboembolische Komplikationen (TEK) und von 1% für die HIT II mit TEK. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer prospektiven Studie von Warkentin (1995), in der insgesamt 665 hüftoperierte Patienten auf die Inzidenz einer HIT unter UFH und NMH untersucht worden waren.

5.1. Schlussfolgerungen

Betrachtet man die Ergebnisse der unterschiedlichen Untersuchungen auf HIT-Antikörper in Ergänzung zu den klinischen Verläufen in den Krankenakten bei 193 Patienten der HTC, bei denen es unter Heparin zu einem Thrombozyten-Abfall gekommen war und wegen V.a. HIT II entsprechende Labortests durchgeführt worden waren, zeigen sich nur wenige valide und übereinstimmende Ergebnisse für die Wertigkeit von Laboruntersuchungen auf HIT-AK. Auch ein sicherer sog. „Goldstandard“-Test ist anhand der Ergebnisse nicht erkennbar.

Nach allen Empfehlungen muss bei den ersten gravierenden Anzeichen für das Vorliegen einer HIT II die Heparintherapie unverzüglich unterbrochen werden und bei fortbestehender Indikation für eine Antikoagulation ein alternatives und nach Möglichkeit ein für diese Indikation zugelassenes Medikament angesetzt werden. Je nach den örtlichen Gegebenheiten kann man dann anhand einer Blutprobe einen Test auf HIT-Antikörper durchführen lassen, wobei in der Regel für eine therapeutische Entscheidung zur alternativen Antikoagulation das Testergebnis nicht abgewartet werden kann. Je nach Begleiterkrankungen (z.B. Niereninsuffizienz) wird man ein entsprechendes Alternativpräparat auswählen. Nach Erhalt der Ergebnisse ist es dann oftmals gar nicht so einfach möglich, erneut die Antikoagulation umzustellen, da immer wieder anhand wiederholter Testverfahren ein bestimmter Wirkspiegel erreicht werden muss. Oft ist es dann besser, das alternative Medikament zu belassen, zumal wenn nur für wenige Tage eine Antikoagulation nötig ist.

Zumindest erscheint es nach unseren Daten möglich, die Heparinabgaben fortzuführen, wenn sich im Schnelltest ID-PaGIA keine Antikörper nachweisen lassen. Da aber dann doch zu viele Patienten mit einem anderen Medikament, welches nicht so breit anwendbar ist, versorgt werden müssten, ohne dass eine wirkliche Indikation dafür gegeben ist, sollten zusätzliche Tests angesetzt werden.

Insbesondere muss man bedenken, dass eine HIT II in der Anamnese alle Ärzte dazu zwingt, bei diesen Patienten ein Leben lang auf die altbewährte Heparinisierung zu verzichten. Für diesen Antikörpernachweis eignet sich der kombinierte Nachweis von IgM-IgG-Antikörpern nicht, so dass der alleinige Nachweis auf IgG-AK spezifischer erscheint. Allerdings zeigt sich in unserer Auswertung, dass ggf. der Cutoff, ab dem der Test als positiv zu werten ist, gegenüber den Firmenangaben angehoben werden sollte. Allerdings muss man für diese im Rahmen einer

Validierung des Tests zu erhebenden Daten noch viele weitere Parallelbewertungen zwischen den klinischen Angaben und Testergebnissen durchführen.

In der Rückschau der letzten Jahre ist der Umgang mit diesen Patienten allerdings deutlich einfacher geworden, da es mittlerweile doch immer mehr alternative Medikamente zur prophylaktischen und therapeutischen Antikoagulation gibt, die zum Teil aufgrund ihrer größeren therapeutischen Breite weniger blutungsgefährdend sind als die Heparintherapie. Solange diese Medikamente nicht zur Verfügung standen, war es dringlicher, für die Umstellung auf alternative, meist noch nicht zugelassene Medikamente einen Test als Grundlage für diese Entscheidung zu haben. Zumindest für die Ausstellung von Notfallausweisen mit dem Hinweis auf allergische Reaktionen mit Heparin, ggf. HIT II erscheint es unerlässlich, sehr sorgsam diese Art von Diagnose zu stellen. Allein aufgrund von einzelnen Laborergebnissen die Diagnose HIT Typ II zu stellen und dahingehend einen entsprechenden Notfallausweis auszustellen, erscheint ohne eindeutige klinische Verlaufparameter oft sehr zweifelhaft und sollte entsprechend verwertet werden. Leider ist es für die Diagnosestellung nicht immer so einfach wie in den Fällen, wo es nach dem Absetzen des Heparins zu einem raschen (Wieder-) Anstieg der Thrombozytenwerte bis zum individuellen Norm Wert kommt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II) stellt eine gravierende, teils lebensbedrohliche Nebenwirkung der Heparinbehandlung dar. Das erste und wichtigste klinische Zeichen für deren Auftreten ist der Thrombozytenabfall, der allerdings auch bei einigen anderen Krankheitsbildern als eines der Hauptsymptome gilt, wie z.B. die Verbrauchskoagulopathie (DIC) bei septischen Zuständen. Aber auch bei invasiven Eingriffen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HML) kommt es sehr häufig zum Thrombozytenabfall, so dass sich bei Patienten in der Herzchirurgie sehr häufig die Frage nach dessen Ursache stellt, und zwar allein HLM-bedingt (z.B. durch den Fremdoberflächenkontakt oder Shearkräfte) oder zusätzlich durch die Gabe von Heparin zur Antikoagulation.

Um das generelle Vorgehen beim Einsatz der verschiedenen Testverfahren zur Abklärung einer HIT II beim Thrombozytenabfall nach herzchirurgischen Eingriffen zu validieren und ggf. effizienter zu machen, wurden die klinischen und labormäßigen Daten von 193 Patienten der Herzchirurgie ausgewertet, bei denen eine Blutprobe unter dem V.a. HIT II zum Heparin-PF4-Komplex-Antikörpernachweis ins Institut für Transfusionsmedizin eingeschendet worden war. Bei 25 Patienten ließ sich zumindest mit einem der eingesetzten Tests ein Antikörper nachweisen, wobei nur bei wenigen Patienten in mehreren Tests dieser AK-Nachweis gelang.

Erfreulicherweise zeigte sich, dass der derzeit auf dem Markt befindliche und breit angewendete Gelkarten-Schnelltest (ID-PaGIA) zumindest in der vorliegenden Untersuchung keine falsch negativen Reaktionen aufwies. Allerdings waren wegen der falsch positiven Reaktionen bei 6 von 17 Patienten die Heparinabgaben „unnötigerweise“ abgesetzt, resp. umgestellt worden. Inwieweit der ausschließlich nur bei 5 Patienten reaktive AESKULISA-Test oder der bei 7 Patienten reaktive H/PF4-ELISA-IgG-Ansatz bei zu wenigen Patienten Anlass zum Umstellen der Antikoagulation gegeben hätte, lässt sich anhand der hier kleinen Fallzahlen nicht eindeutig beantworten. Unter den 5 AESKULISA-positiven Patienten befanden sich jedenfalls in der Nachuntersuchung auch alle 4 Patienten mit schweren thromboembolischen Komplikationen. Bei diesen war auch der HIPA-Test positiv, der von einigen als aussagekräftiger (Gold-)Standardtest angesehen wird, jedoch zeigten sich hier sogar insgesamt 9 Patienten reaktiv. Als Vorteil beim HIPA-Test kann gewertet werden, dass mit diesem Test Kreuzreaktionen der AK mit anderen Antikoagulantien bestimmt werden können, wobei für die genannten Tests derzeit keine Ringversuche angeboten werden, was für den Laborbereich ungewöhnlich ist, so dass dringend interne Validierungen erforderlich sind.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Amiral J., Bridey F., Dreyfus M., et al: Plateletfactor 4 complexed to heparin is the target for Antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1992; 68:95–96
2. Amiral J., Marfaing-Koka A., Wolf M., et al: Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients' with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood* 1996; 88: 410–416
3. Amiral J., Wolf M., Fischer A., Boyer Neumann C., Vissac A., Meyer D.: Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 1996; 92: 954–959
4. Anderson C.L., Chako G.M., Osborne J.M., Brandt J.T.: The Fc Receptor for immunoglobulin G (Fc γ IIA) on human platelets. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1995; 21:1-9
5. Arepally G., McKenzie S.E., Jiang X.M., Poncz M., Cines D.B.: Fc gamma RIIA H/R 131 polymorphism, subclass-specific IgG anti-heparin/platelet factor 4 antibodies and clinical course in patients with heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Blood* 1997; 89: 370–375
6. Arepally G., Reynolds C., Tomaski A., et al: Comparison of PF4/heparin ELISA assay with the ¹⁴C-serotonin release assay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 648–654.
7. Aslan T., Greinacher A.: Diagnostik der Heparin-induzierten Thrombozytopenie-Update 2009. *bioscientia / Labor aktuell* 2009; 5: 1-7
8. Bachelot-Loza C., Saffroy R., Lasne D., Chatellier G., Aiach M., Rendu F.: Importance of the Fc γ RIIa-Arg/His- 131 polymorphism in HIT. *Thrombosis Haemostasis* 1998; 79: 523- 528
9. Bauer K. A., et al.: Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after elective major knee surgery. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345:1305 - 1310.
10. Bleese N.: Myokardprotektion. "Kardiovaskuläre Chirurgie, Kardiologie Band 3", Hombach, V. (Hrsg.), Schattauer Verlag, Stuttgart- New- York, 1990, 27- 45
11. Brandt E., Flad H.D.:Structure and function of platelet-cytokines of the β -thromboglobulin/interleukin 8 family. *Platelets* 1992; 3: 295- 305
12. Brandt J.T., Isenhardt C.E., Osborne J.M., Ahmed A., Anderson C.L.: On the role of platelet Fc γ RIIa phenotype in HIT. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74: 1564-1572
13. Breddin K.H., Grun H.J, Krzywanek W.P., Schremmer: platelet aggregation- time-dependent changes. *Journal of Molecular Medicine* 1975; 53

14. Bredin K.H.: Thromboseprophylaxe mit unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin. Wiener Medizinische Wochenschrift 1989; 28: 555-558
15. Breddin K.H.: Experimentelle und klinische Befunde mit dem Thrombinhemmer Argatroban. Hämostaseologie 2002; 22: 137- 41
16. Budde U.: Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. Journal Lab Med 2002; 26: 564-571
17. Capitanio A.M., Niewiarowski S., Rucinski, Tuszyński G.P., Cierniewski C.S.: Interaktion of platelet factor 4 with human platelets. Biochimica Biophysica Acta 1985; 859: 161
18. Chew D.P.: Bivalirudin, a bivalent, thrombin specific anticoagulant as an alternative to heparin in interventional procedures. Hämostaseologie 2002; 22: 142- 8
19. Choay J.: Structure and activity of heparin and its fragments: an overview. Seminars of Thrombosis and Haemostasis 1989; 15: 4
20. Chong B.H., Pitney W.R., Castaldi P.A.: HIT: association of thrombotic complications with heparin-dependent IgG antibodies that induce thromboxane synthesis in platelet aggregation. Lancet 1982; 2(8310): 1246- 1249
21. Chong B.H., Fawaz I., Chesterman C.N., Berndt M.C.: Heparin-induced thrombocytopenia: mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets. British Journal of Haematology 1989; 73: 235–240
22. Chong B.H., Castaldi P.A.: Platelet proaggregating effect of Heparin: possible mechanism for the non-immune HIT. Australien and New Zealand Journal of Medicine 1990; 16: 715- 716
23. Chong B.H., Magnani H.N.: Danaparoid for the Treatment of Heparin-Induced Thrombocytopenia. Haemostasis 1992; 22: 73-84.
24. Chong B.H., Burgess J., Ismail F.: The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of HIT. Thrombosis Haemostasis 1993; 69: 344- 350
25. Chong B.H.: HIT. British Journal of Haematology 1995; 89: 431- 439
26. Chong B.H., Eisbacher M.: Pathophysiology and laboratory testing of heparin-induced thrombocytopenia. Semin Hematol 1998; 35: 3–8
27. Chong B.H.: Heparin-induced thrombocytopenia. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2003; 1: 1471-1478
28. Cines D.B., Tomaski A., Tannenbaum S.: Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. N Engl J Med 1987; 316: 581–589
29. Crafoord C.: Preliminary report on postoperative treatment with heparin as a prevention of thrombosis. Acta Chirurgica Scandinavica 1937; 79: 407- 426

30. Cullmann, N., Müller, T.B. Lie, R.G. Kladetzky and P. Jürgens : Coagulation parameters and heparin levels in open-heart surgery. *Research in Experimental Medicine* 1980; 177: 111- 117
31. Dahse K., Köster S., Meyer M., Petershofe EK., Zimmermann B.: Retrospective analyse of HIT-II-diagnostic in the Institut of Bremen during a 2-years period. *Thrombosis and Haemostasis* 2010; P-0964: 441
32. Dyke C.M., Smedira N.G., Koster A., Aronson S.: A comparison of bivalirudin to heparin with protamine reversal in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: the evolution study. *Journal Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 131: 533- 539
33. Eichler P., Olbrich K., Pötzsch B., Greinecher A.: Anti-hirudin antibodies in patients treated with recombinant hirudin for more than five days, a prospective study (abstract). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1997; Supplement: PS 2014
34. Eichler P., Raschke R., Lubenow N., Meyer O., Schwind P., Greinacher A.: The ID-Micro-Typing system for detection of heparin-induced antibodies in comparison with functional and antigenic assays. *Ann Hematol* 2001; 80 Suppl. 1: A15
35. Eikelboom J.W., Hirsh J.: Monitoring unfractionated heparin with the aPTT: time for a fresh look. *Thrombosis and Haemostasis* 2006; 96: 547- 552
36. Eriksson B. I., et al.: Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after hip-fracture surgery. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 1298 -1304.
37. Farner B., Eichler P., Kroll H., Greinacher A.: A Comparison of Danaparoid and Lepirudin in Heparin-induced Thrombocytopenia. *Journal of Thromb. and Haemost.* 2001; 85: 950- 957
38. Gao C., Boylan B., Fang J., Wilcox D. A., Newman D.K., Newman P.J.: Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating α IIB β 3- mediated outside-in signalling. *Blood* 2011;117: 4946-4952
39. Gawaz M., Bigalke B., Fateh-Moghadam S., Geisler T., Langer H., May A.E.: *Blood Platelets- Clinical Relevance.* Georg Thieme Verlag 2010
40. Glusa E., Bretschneider E., Daum J., and Noeske-Jungblut C.: Inhibition of thrombin-mediated cellular effects by triabin, a highly potent anion-binding exosite thrombin inhibitor. *Thromb. Haemostasis* 1997; 77: 1196–1200.
41. Gollub S., Ulin A.W.: HIT in man. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1962; 91: 430-435
42. Greinacher A., Michels I., Kiefel V., Mueller-Eckhardt C.A.: Rapid and sensitive test for diagnosing Heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1991;66:734-736

43. Greinacher A., Amiral J., Dummel V., Vissac A., Kiefel V., Mueller-Eckhardt C.: Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion* 1994; 34: 381–385
44. Greinacher A.: Antigen generation in heparin-associated thrombocytopenia: the non-immunologic type and the immunologic type are closely linked in their pathogenesis. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* 1995; 21: 82- 92
45. Greinacher A., Zinn S., Wizemann, Birk U.W.: Heparin-induced antibodies as a risk factor for thromboembolism and haemorrhage in patients undergoing chronic haemodialysis. *Lancet* 1996; 348 (9029): 764
46. Greinacher A.: Heparin-induzierte Thrombozytopenie: Pathogenese und Behandlung. *Hämostaseologie* 1999; 19: 1-12
47. Greinacher A.: Rekombinantes Hirudin zur weiteren Antikoagulation bei Patienten mit Heparin- induzierter Thrombozytopenie. *Hämostaseologie* 1999; 19: 19-29
48. Greinacher A., Eichler P., Lubenow N., Kwasny H., Luz M.: Heparin-induced thrombocytopenia with thromboembolic complications: meta-analysis of 2 prospective trials to assess the value of parenteral treatment with lepirudin and its therapeutic aPTT range. *Blood* 2000; 96: 846–851
49. Greinacher A., Lubenow N., Hinz P., Ekkernkamp A.: Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Dtsch Ärztebl* 2003; 100: 2220- 2229
50. Greinacher A., Althaus K., Krauel K., Selleng S.: Heparin-induced thrombocytopenia. *Hämostaseologie* 2010; 30: 17-28
51. Greinacher A., Krauel K., Pötschke C., Weber C., Kessler W.: Platelet factor 4 binds to bacteria-inducing antibodies cross-reacting with the mayor antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2011; 117: 1370–1378
52. Harenberg J., Huhle G., Giese C., et al: Determination of serotonin release from platelets by enzyme immunoassay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *British Journal of Häematology* 2000; 109: 182–86
53. Haas S., Haas P.: *Niedermolekulare Heparin- Anwendung in Klinik und Praxis*. Zeit- Verlag, Stein, 1996
54. Heilmann C., Geisen U., Beyrsdorf F., Nakamura L., Benk C., Berchtold-Herz M., Trummer G., Schlensak C., Zieger B.: Acquired von Willebrand syndrome in patients with ventricular assist device or total artificial heart. *Thromb Haemost* 2010.03.29; 103: 5

55. Horne M.K., McDonald K., Elizabeth S. Chad.: The effect of molecular weight on heparin binding to platelets. *British Journal of Haematology* 1990; 74: 306- 312
56. Horne M.K., Goad K. E., McDonald K., Gralnick H. R.: Pentosan-induced thrombocytopenia: support for an immune complex mechanism. *British Journal of Haematology* 1994; 88: 803- 808
57. Horne M.K., Hutchinson K.J.: Simultaneous binding of heparin and platelet Factor-4 to platelets: further insights into the mechanism of heparin-induced thrombocytopenia. *Am Journal Haematolgy*1998; 58: 24-30
58. Juhl D., Eichler P., Lubenow N., Strobel U., Greinacher A.: Incidence and clinical significance of anti-PF4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA class in 755 consecutive patient samples referred for diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia. *European Journal of Haematology* 2006; 76: 420- 426
59. Jurk K., Kehrel B.E.: Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. *Hämostaseologie* 2005; 1: 39- 48
60. Kappers-Klunne M.C., Boon D.M., Hop W.C., Michiels J.J., Stibbe J.: HIT and thrombosis: a prospective analysis of the incidence in patients with heart and cerebrovascular diseases. *British Journal of Haematology* 1997; 96: 442-446
61. Keeling D., Davidson S.: The management of heparin- induced thrombocytopenia. *British Society for Haematology*, 2006; 133: 259-269
62. Kelton J.G., Sheridan D., Brain H., Powers P.J., Turpie A.G., Cater C.J.: Clinical usefulness of testing for a heparin-dependent platelet aggregating factor in patients with suspected HAT. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1984; 103: 606- 612
63. Kelton J.G., Smith J.W., Warkentin T.E., Hayward C.P.: Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4. *Blood* 1994; 83: 3232- 3239
64. Kelton J.G.: The Pathophysiology of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Chest* 2005; 127: 9-20
65. Kairy M., Lasne D., Brohard-Bohn B., Aiach M.: A New Approach in the Study of the Molecular and Cellular Events implicated in heparin-induced Thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2001; 85: 1090-1096
66. Koster A.: Antikoagulation bei intensivmedizinischen Patienten mit heparininduzierter Thrombozytopenie. *Vascular Care* 2/2010 Vol. 19: 8-13

67. Kuitunen A., Suojaranta-Ylinen R., Raivo P., Kukkonen S., Lassila R.: Heparin-induced thrombocytopenia following cardiac surgery is associated with poor outcome. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2007; 21: 18-22
68. Lee D.H., Warkentin T.E., Denomme G.A., Hayward C.P., Kelton J.G.: A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry. *Br J Haematology* 1996; 95: 724–31
69. Lee H.D., Warkentin T.E., Denomme G.A., Lagrotteria D.D., Kelton J.G.: Faktor V Leiden and thrombotic complications in HIT. *Thrombosis Haemostasis* 1998; 79: 50- 53
70. Levine R.L., Husting M.J., McColum D.: Argatroban therapy in heparin-induced thrombocytopenia with hepatic dysfunction. *Chest* 2006; 129: 1167-1175
71. Lewis B.E., Wallis D.E., Berkowitz S.D., et al: Argatroban anticoagulant therapy in Patients with heparin- induced thrombocytopenia. *Circulation* 2003; 103: 1838-1843
72. Lewis B.E., Wallis DE, Leya F., et al.: Argatroban anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1849-1856
73. Lipp H.P.: Heparine, Heparinoide und Hirudin-Derivate: Prophylaxe und Therapie venöser Thromboembolien. *Krankenhauspharmazie* 1999; 8: 317-332
74. Lo G.K., Juhl D., Warkentin T.E., Sigouin C.S., Eichler P., Greinacher A. : Evaluation of pretest clinical score (4T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 759- 765
75. Lubenow N., Greinacher A.: Hirudine zur Behandlung der heparininduzierten Thrombozytopenie und zur Thromboseprophylaxe. *Hämostaseologie* 2002; 22:126-136
76. Magnani H.N.: HIT: an overview of 230 patients treated with Orgaran (Org 10172). *Thromb. and Haemostasis* 1993; 70: 554 – 561
77. Magnani H.: Orgaran (danaparoidsodium) use in the syndrome of heparin induced thrombocytopenia. *Proceedings of a Workshop in London, 1996, Nov.1. Platelets* 1997; 8: 74-81
78. McLean J.: The thromboplastic action of cephalin. *Americ. Jour. of Physiology* 1916; 41: 250 - 257
79. Meyer B.J., Badimon J.J., Chesebro J.H., Fallon J.T., Fuster V., Badimon L. : Dissolution of mural thrombus by specific thrombin inhibition with r-hirudin: comparison with heparin and aspirin. *Circulation* 1998; 97: 681-685
80. Meyer O., Salama A., Pittet N., Schwind P.: Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *Lancet* 354 (1999) 1525–1526
81. Meyer O., Koster A., Kiesewetter H., Salama A.: Labordiagnostik der Heparin- Induzierten Thrombozytopenie Typ II. *Vascular Care* 2002; 2: 34-39

82. Meyer O., Agaylau A., Borchert H. H., Aslan T.: A simple and practical assay for the antigen-specific detection of platelet antibodies. *Transfusion* 2006, 46: 1226-1231
83. N. N. Antithrombotikum Fondaparinux (Arixtra[®]), *Arznei-Telegramm* 2002; 33: 36 - 37.
84. Murray D.W.G., Jaques L.B., Perrett T.S., Best C.H.: Heparin and the thrombosis of veins following injury. *Surgery* 1937; 2: 163- 187
85. Nelson J.C., Lerner R.G., Goldstein R., Cagin N.A.: HIT. *Archives of Internal Medicine* 1978; 138: 548- 552
86. Nielsen J.I., Ostergaard P.: Chemistry of heparin and low molecular weight heparin. *Acta Chirurgica Scandinavia*, 1988; Supl 543: 52-6
87. Nowak G., Bucha E.: A new method for the therapeutical monitoring of hirudin (Abstact) *Thromb Haemost* 1993; 69: 1306
88. Nowak G.: Rationale für eine oralen direkten Thrombininhibitor aus pharmakologischer Sicht. *Hämostaseologie* 2002; 22: 92-97
89. Palomo I., Perera J., Alarcon M., Diaz G.: Prevalence of heparin-induced antibodies in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2005; 19: 189-195
90. Poley S., Mempel W.: Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: advantages of a functional flow cytometric test in comparison to the heparin-induced platelet-activation test. *Eur J Haematol* 2001; 66: 253–262
91. Pötzsch B., Madlener K.: Management von Patienten mit heparin- induzierter Thrombozytopenie. *Hämostaseologie* 2006; 1: 22-26
92. Review: Heparin-induced thrombocytopenia: Pathogenesis and Management. *British J of Haematology* 2003; 121: 535- 555
93. Rich J.D., Maraganore J.M., Young E., Lidon R.M., Adelman B.: Heparin resistance in acute coronary syndromes. *Journal Thromb Thrombolysis* 2007; 23: 93- 100
94. Rhodes G.R., Dixon R.H., Silver D.: Heparin-induced thrombocytopenia with thropmbotic and hemorrhagic manifestations. *Surg Gynecol Odstet* 1973; 136: 409- 416
95. Rosenberg R.D., Damus P.S.:The purification and mechanisms of actions of human antithrombin-heparin cofactor. *Journal of Biology and Chemistry* (1973) 248: 6490 – 6505
96. Rugeri L., Bauters A., Trillot N., et al: Hemostasis and Thrombosis: Clinical Usefulness of Combined use of Platelet Aggregation Test and Anti PF4-H. Antibodies ELISA test for the Diagnosis of Heparin Induced Thrombocytopenia. *Haematol* 1999; 14: 367–72

97. Savi P., Chong B.H., Greinacher A. et al.: Effect of fondaparinux on platelet activation in the presence of heparin-dependent antibodies: a blinded comparative multicenter study with unfractionated heparin. *Blood*, 2005; 105: 139-144.
98. Schellong S.M., Schwarz T., Schroder H.E.: Ambulatory therapy for deep leg vein thrombosis? *Dtsch Med Wochenschr* 1999;124: 810–815
99. Schwabe, U., Paffrath, D.: *Arzneiverordnungsreport 2003*, Springer-Verlag 2004
100. Schwartz B.S.: Heparin: what is it? How does it work? *Clinical cardiology* 1990; 13:12-15.
101. Selleng K., Warkentin T.E., Greinacher A.: Heparin-induced thrombocytopenia in intensive care patients. *Crit Care Med.* 2007
102. Selleng K., Warkentin T.E., Sheppard J.I., Greinacher A.: Immune mechanisms in heparin-induced thrombocytopenia: no evidence for immunoglobulin M anti-idiotypic antibodies. *Transfusion* 2009; 49: 1812-1818
103. Shah A.C., Genoni M., Niederhäuser U., Maloigne M., Turina M.: R-Hirudin (Lepirudin, Refludan) als alternatives Antikoagulans bei Heparin- induzierter Thrombozytopenie während des Anschlusses an den extrakorporellen Kreislauf. *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130:896-899
104. Sheridan D., Carter C., Kelton J.G.: A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1986; 67: 27–30
105. Slichter S.J., Davis K., Enright H., Braine H.: Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* 2005; 10: 4106-4114
106. Taimeh Z., Weksler B.: Recent Advances in Argatroban-Warfarin Transition in Patients With Heparin-induced Thrombocytopenia. *Thrombosis/Hemostasis* 2010; 16: 5-12
107. Thoennissen N. H., Baumann C., Kelsch R., Albrecht O., Müller-Tidow C.: Heparin-Induced Thrombocytopenia vs. Plasmapheresis-Induced Platelet Loss in a Case of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura . *Transfus Med Hemother* 2007; 34: 74- 77
108. Tomer A.: A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1997; 98: 648–56
109. Traska T., Berg W., Claeys L., Hohlbach G.: Heparininduzierte Thrombozytopenie(HIT II)-drohende Gefahr auch bei normaler Thrombozytenzahl. *German Medical Science*; 2004.
110. Visentin G.P., Moghaddam M., Collins J.L., McFarland J.G., Aster R.H.: Anti-bodies associated with heparin-induced thrombocytopenia (HIT) report conformational changes in platelet factor 4 (PF4) induced by linear poly-anionic compounds. *Blood* 1997; 90: 460a
111. Warkentin T.E., Hayward C.P.M., Boshkov L.K., Santos A.V., Sheppard J.I., Bode A.P., Kelton J.G.: Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generated platelet-

derived microparticles with procoagulant activity. An explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1994; 84: 3691-3699

112. Warkentin T.E., Levine M.N. Hirsh J. et al.: Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low molecular- weight Heparin or unfractionated heparin. *New England Journal of Medicine* 1995; 332: 1330-1335

113. Warkentin T.E.: Danaparoid for the treatment of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Blood* 1996; 88: 262a (Abstract)

114. Warkentin T.E.: Heparin-induced thrombocytopenia. Pathogenesis, frequency, avoidance and management. *Drug Saf.* 1997; 17: 325- 341

115. Warkentin T.E., Hong A.P.: Frequency of upper limb deep venous thrombosis (UL-DVT) in relation to central venous catheter use in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1998; 92 (Suppl. 1): 500a-501a (Abstract)

116. Warkentin T.E, Kelton J.G.: Temporal Aspects of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1286–1292

117. Warkentin T.E.: Heparin-induced thrombocytopenia and the anesthesiologist. *Canada J. Anaesthesia* 2002; 49: 36-49

118. Warkentin T.E., Roberts R.S., Hirsh J., Kelton J.G.: An Improved Definition of Immune Heparin-Induced Thrombocytopenia in Postoperative Orthopedic Patients. *Arch Intern Med.* 2003; 163: 2518-2524

119. Warkentin T.E., Sheppard J.A.: Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Transfus Med Rev.* 2006; 20: 259- 272

120. Warkentin T.E., Maurer B.T., Aster R.H.: Heparin-induced thrombocytopenia associated with fondaparinux. *N Engl J Med* 2007; 356:2653-2655

121. Weber C.F., Jambor C., Spannagel M., Kozek S., Frietsch T.: Perioperative diagnosis and Therapie of platelet dysfunctions. *Anästhesi Intensivmed* 2011; 52: 3-11

122. Weitz J.I., Hudoba M., Massel D., Marganore J., Hirsh J.: Clot bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J of Clinical Investigation* 1990; 86: 385- 391

123. Weitz J.I., Leslie B., Hudoba M.: Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin – independent inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 544-552

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Klinische Parameter und Laborprofile bei der Abklärung des Verdachts auf eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) Typ II bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen“

im Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie mit Blutbank am Universitätsklinikum Magdeburg mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. M.U. Heim und Fr. Dr. med. Mosebach ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 22.11.2011

Unterschrift

DANKSAGUNG

Nach Abschluss der Arbeit möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. M.U. Heim für die freundliche Vergabe des interessanten Themas sowie für seine Anleitungen und die hilfsbereite Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. med. M. Mosebach für ihre Unterstützung.

Weiterhin bin ich den Mitarbeitern des HLA-Labors am Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Magdeburg für die Einweisung, Hilfe und Unterstützung bei den laborchemischen Untersuchungen verbunden.

Außerdem bedanke ich mich beim Personal der Universitätsbibliothek für die freundliche Unterstützung bei der Literaturbeschaffung und beim Institut für Biometrie und Medizinische Informatik für die statistischen Auswertungen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Egon Klatt
Anschrift: Sindelfinger Straße 54, 72070 Tübingen
Geburtsdatum: 06.12.1958
Geburtsort: Kustanai / Kasachstan
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder (26, 22 Jahre)

Ausbildung

1966 – 1976 Mittelschule in Kasachstan / Kustanai (Abschluss: Abitur)
1976 – 1982 Staatliche Medizinische Hochschule in Kasachstan / Karaganda
Abschluss: **Arzt für Kinderheilkunde**

Berufliche Tätigkeiten

07.08.1981 – 31.07.1982 **Krankenpfleger** in der intensivmedizinischen Abteilung der Kinderklinik in Karaganda / Kasachstan
01.08.1982 – 09.08.1983 **Arzt im Praktikum** für Kinderheilkunde im städtischen Klinikum in Kustanai / Kasachstan
15.08.1983 – 02.09.1985 **Kinderarzt** in der Neugeborenen-Abteilung im Entbindungsheim der Stadt Kustanai / Kasachstan
02.09.1985 – 30.05.1991 **Leiter der Observationsabteilung für Neugeborene** im Entbindungsheim der Stadt Kustanai / Kasachstan
11.06.1991 – 21.11.1992 **Notarzt für Pädiatrie** am Entbindungsheim und der Städtischen Klinikum in Kustanai / Kasachstan
01.09.1993 – 31.03.1995 Anpassungszeit zur Ausübung des ärztl. Berufes in der BRD: Chirurgie, Innere Medizin, Kinderheilkunde je 6 Monate
13.04.1995 **Erteilung der deutschen Approbation als Arzt**
01.12.1995 – 31.12.1996 **Technischer Sterilisationsassistent**, Uniklinikum Tübingen
01.01.1997 – 31.08. 2004 **OP- Pfleger**, Chir. Praxisklinik „Loretto Center“, Tübingen
seit 01.09.2004 **Assistenzarzt in der Weiterbildung**
am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie mit Blutbank des Universitätsklinikums Magdeburg A.ö.R