

Bestimmung thrombozytärer Auto- und Alloantikörper mittels Durchflusszytometrie

Klinische Bedeutung

Auf der Oberfläche von Thrombozyten befinden sich Antigen determinanten, welche die Bildung von Antikörpern (AK) bewirken können. Daraus können spezifische Antigen-Antikörperreaktionen resultieren. Es werden unterschieden 1. **Antigene auf Thrombozyten**, die sich auch auf anderen Körperzellen befinden (z.B. **HLA-Klasse I**, ABH-System) und 2. Antigene, die sich nur auf den Thrombozyten nachweisen lassen (**HPA (Humanes-Plättchen-Antigen)-System**. HPA können die Bildung von **Thrombozyten-AK** induzieren, die sich spezifisch gegen die Epitope der **Glykoprotein (GP)-Rezeptoren** auf der Plättchenoberfläche richten mit dem Ergebnis einer immunologisch ausgelösten Thrombozytopenie.

Auto-AK reagieren mit monomorphen Determinanten auf den autologen Thrombozyten (und auf Thrombozyten gesunder Probanden). Sie verursachen eine **Autoimmunthrombozytopenie (AITP, M. Werlhof)**. Es handelt sich hierbei um eine erworbene Thrombozytopenie, verursacht durch eine Autoimmunreaktion gegen Thrombozyten und Megakaryozyten. Unterschieden wird eine primäre Form, bei welcher keine auslösende Ursache erkennbar ist, von sekundären Formen, ausgelöst z.B. durch Medikamente oder andere Erkrankungen, z.B. beim systemischen Lupus erythematoses oder der chronisch lymphatischen Leukämie. Circa 80 Prozent der ITP-Erkrankungen sind primär, 20 Prozent sekundär bedingt. Es bleibt anzumerken, dass es keine Untersuchungen oder Befunde gibt, welche die Diagnose einer AITP beweisen; der Ausschluss der Differentialdiagnosen steht im Vordergrund. Die Bestimmung von thrombozytären AK (frei im Patientenserum /-plasma und gebunden an den Patiententhrombozyten) wird zur Diagnosesicherung bei Patienten mit persistierender Thrombozytopenie und atypischen Befunden bzw. bei minimalem oder völlig fehlendem Ansprechen auf eine Therapie mit Kortikosteroiden oder i.v. Immunglobulinen in den Leitlinien der DGHO sowie bei unklaren Krankheitsverläufen im Kindesalter empfohlen. Im Rahmen der Akutdiagnostik neuer Patienten ist diese Testung nicht sinnvoll.

Relevant ist nur der Nachweis von an den Thrombozyten gebundenen Antikörpern (= Autoantikörpern) gegen Epitope auf den GP-Rezeptoren Ib/IX und IIb/IIIa. Neuere Daten legen auch eine Relevanz von thrombozytären Autoantikörpern gegen GP V nahe (5). Falsch positive Tests können bei myelodysplastischen Syndromen und Lymphomen vorkommen. Die alleinige Bestimmung freier thrombozytärer Antikörper im Serum ist häufig falsch positiv und sollte primär im Rahmen der Fragestellung AITP unterbleiben.

Allo-AK reagieren mit den genetisch determinierten Varianten thrombozytärer Oberflächen-GP. Sie können eine **fetale / neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)**, eine **post-transfusionelle Purpura (PTP)** oder einen **Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusionen (PTR)** auslösen.

Bei der **FNAIT** handelt es sich um eine isolierte Thrombozytopenie des Feten / Neugeborenen, verursacht durch thrombozytäre AK der Mutter, die diaplazentar übertragen werden und eine Phagozytose der fetalen Thrombozyten induzieren. Hierbei kann es zum petechialen Blutungstyp kommen, wobei intrauterine oder postpartale intrakranielle Blutungen eine gefürchtete Komplikation mit der Folge bleibender Schäden oder des Todes sind.

Bei der **PTP** handelt es sich um eine seltene Transfusionsnebenwirkung, die etwa eine Woche nach Gabe von Blutprodukten (meist von Erythrozytenkonzentraten) zu einer isolierten Thrombozytopenie (Thrombozytensturz) mit Blutungsneigung führt. Betroffen sind hauptsächlich Frauen im mittleren und höheren Lebensalter mit vorausgegangenen Immunisierungsereignissen (Schwangerschaften, Transfusionen).

Bei dem **Refraktärzustand** handelt es sich um eine Transfusionsstörung. Durch Immunisierung des Patienten im Rahmen von Schwangerschaft oder Transfusionen gegen HLA- und / oder HPA-Merkmale zeigt eine Thrombozytenkonzentrat-Gabe eine unzureichende Wirksamkeit des Blutprodukts (ausbleibender oder inadäquater Anstieg der Thrombozytenzahl des Patienten).

HLA-Klasse I-AK sind die häufigste Ursache für einen immunologisch induzierten Refraktärzustand. In 15 - 30 Prozent der Fälle sind diese mit **HPA-AK** assoziiert.

Labordiagnostik Immunthrombozytopenie (ITP)

Indikationen

- chronische Thrombozytopenie
- akute Thrombozytopenie (vor allem bei Kindern bis zum 10. Lebensjahr)
- Differentialdiagnose AITP vs. medikamentös-toxische Knochenmarkschädigung (z.B. bei chronischem Alkoholabusus)
- Differentialdiagnose AITP vs. hereditäre Thrombozytopenie
- Sicherung der Diagnose AITP bei gleichzeitiger Lebererkrankung, Splenomegalie

Analyt

- gebundene Antikörper (Autoantikörper) gegen Thrombozyten-Glykoproteine
- freie Antikörper gegen Thrombozyten-Glykoproteine

Methode

DFZ (durchflusszytometrischer semi-quantitativer Screeningtest zur Abklärung unklarer Thrombozytopenien)

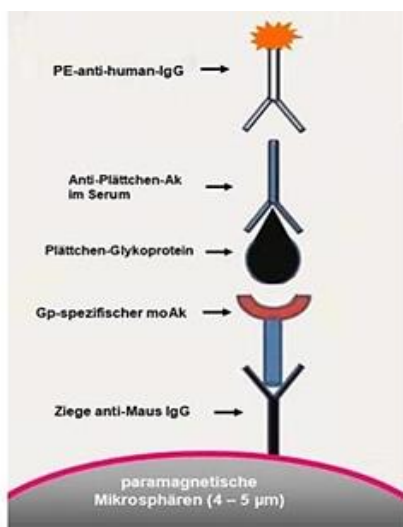


Abb. 1: Testprinzip

Nach wie vor gilt der MAIPA-Test (Monoclonal Antibody specific Immobilization of Platelet Antigens) als Goldstandard zum Nachweis von thrombozytären Auto- und Alloantikörpern (1) in Seren, die ein Gemisch von thrombozytären und HLA-AK enthalten. Dieses Verfahren ist sehr spezifisch, aber zugleich auch sehr zeitintensiv und wird oft nur als Bestätigungstest angeboten.

Das am Standort Leipzig angebotene Testverfahren nutzt das Prinzip des MAIPA, wobei der trimolekulare Komplex (humaner Thrombozyten-AK + GP-Molekül mit dem exprimierten Thrombozyten-Antigen + GP-spezifischer monoklonaler AK) nicht an eine Festphase (Mikrotiterplatte), sondern an paramagnetische Beads gebunden wird (siehe Abb. 1).



Durch die Verwendung von Beads mit Multiplexfähigkeit können in einem Ansatz durchflusszytometrisch gleichzeitig unterschiedliche trimolekulare Komplexe nachgewiesen werden (3), wodurch einerseits die Diagnostikzeit verkürzt und andererseits deutlich weniger Thrombozyten bzw. AK-haltiges Serum als im MAIPA benötigt werden.

Dieses ist ein wichtiger Vorteil bei schweren Thrombopenien oder bei kindlichen Blutproben.

Modifikationen

Indirekter Test

Untersuchung von Patientenserum auf freie thrombozytäre Antikörper.
Bei positivem Screening-Test erfolgt eine entsprechende Spezifizierung der HPA-Antikörper.

Direkter Test

Nachweis gebundener Antikörper auf Patiententhrombozyten.

Referenzbereich

- Beladung der autologen Thrombozyten: negativ
- freie Antikörper gegen Thrombozyten: negativ

Bewertung

Der Nachweis von gebundenen thrombozytären Autoantikörpern an den thrombozytären GP-Komplexen IIb/IIIa und / oder Ib/IX/V gilt als spezifisch für die Diagnose einer ITP. Im typischen Fall werden Autoantikörper der gleichen Spezifität zusätzlich frei im Serum nachgewiesen, ihr Nachweis gelingt etwas seltener als der Nachweis gebundener thrombozytärer Autoantikörper. Bei fehlendem Nachweis von Autoantikörpern ist die Diagnose ITP nicht ausgeschlossen.

Grenzen der Methode

Mit diesem Test können nur immunologisch bedingte Thrombozytopenien abgeklärt werden. Wie bei jedem Antikörpertest können auch hier Vorerkrankungen (wie z.B. Entzündungen, Infekte etc.), hohe IgG-Spiegel, diverse Medikamente oder sog. „natürliche“ Antikörper, die durch kreuzreagierende Epitope auf Mikroorganismen, Proteinen oder Allergenen induziert werden, speziell ein grenzwertiges Testergebnis mit niedrigem Titer verfälschen. In solchen Fällen wird eine Kontrolluntersuchung zu einem späteren Zeitpunkt empfohlen. In diesem Zusammenhang ist die Mitteilung anamnestischer und klinischer Daten an das Diagnostiklabor unerlässlich.

Präanalytik und Abrechnung

Freie Thrombozytenantikörper			
Probenmaterial	2 mL Serum Bei Neugeborenen / Säuglingen / Kleinkindern sind nach telefonischer Rücksprache 0341 6565-725 entsprechend kleinere Probenvolumina möglich.		
Probentransport	ungekühlt, Raumtemperatur, innerhalb von 48 Stunden nach Blutentnahme im Labor		
Methode	DFZ		
	EBM		
Nachweis Allo-AK gegen HPA	4x 32948		114,80 €
Nachweis HLA-AK KL1	1x 32940		47,30 €
Dichtegradient / Immunomagneteische Isolierung von Zellen	1x 32510		10,40 €
	Summe		172,50 €
	GOÄ		
		1-fach	1,15-fach
Phänotypisierung / DFZ	3x 3696	99,66 €	114,61 €
	2x 3697	29,14 €	33,51 €
Dichtegradientenisolierung	1x 4003	23,31 €	26,81 €
Nachweis HLA-AK	1x 4010	46,63 €	53,62 €
	Summe		198,74 €
	Summe		228,55 €

Wenn grenzwertig / positiv: HPA-Spezifizierung			
	EBM		
Spezifizierung HPA-AK	10x 32949		287,00 €
Nachweis HLA-AK KL1 / 2	1x 32940		47,30 €
	Höchstwertregel		114,80 €
	Summe		125,20 €
	GOÄ		
		1-fach	1,15-fach
Phänotypisierung / DFZ	3x 3696	99,66 €	114,61 €
	7x 3697	101,99 €	117,29 €
Dichtegradientenisolierung	1x 4003	23,31 €	26,81 €
	Summe		224,96 €
	Summe		258,70 €

Gebundene Thrombozytenantikörper			
Probenmaterial	2x EDTA 7,5 mL Bei Neugeborenen / Säuglingen / Kleinkindern sind nach telefonischer Rücksprache 0341 6565-725 entsprechend kleinere Probenvolumina möglich.		
Probentransport	ungekühlt, Raumtemperatur, innerhalb von 48 Stunden nach Blutentnahme im Labor		
Methode	DFZ		
	EBM		
Thrombozytenantikörper	4x 32504		114,80 €
Dichtegradient / Immunomagneteische Isolierung von Zellen	1x 32510		10,40 €
	Summe		125,20 €
	GOÄ		
		1-fach	1,15-fach
Phänotypisierung / DFZ	3x 3696	99,66 €	114,61 €
	1x 3697	14,57 €	16,76 €
Dichtegradientenisolierung	1x 4003	23,31 €	26,81 €
	Summe		137,54 €
	Summe		158,18 €

Labordiagnostik fetale / neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)

Indikation

- unklare Thrombozytopenie des Neugeborenen

Analyt

- freie maternale Alloantikörper gegen fetale / neonatale Thrombozyten
- HPA-Genotypisierung von Mutter, Vater und Kind

Referenzbereich

- freie maternale Antikörper gegen fetale / neonatale Thrombozyten: negativ

Bewertung

Der Nachweis eines spezifischen maternalen Alloantikörpers gegen fetale / neonatale Thrombozyten spricht für das Vorliegen einer alloimmun vermittelten Thrombozytopenie, wenn das korrespondierende Merkmal beim Kind nachgewiesen werden kann. Die Mutter selbst muss für das Merkmal negativ sein. Die häufigsten Alloantikörper-Spezifitäten sind Anti-HPA-1a und Anti-HPA-5b.

Differenzialdiagnosen

- Sepsis
- konnatale Infektion
- Hereditäre Thrombozytopenie (diesbezüglich positive Familienanamnese; Blutausstrich; Quantifizierung der Oberflächenmarker GP IIb/IIIa und GPIb/IX/V auf den Thrombozyten des Kindes)
- AITP der Mutter: (Nachweis von Autoantikörpern gegen Thrombozyten aus dem mütterlichen Blut. Die diaplazentar übertragenen mütterlichen Antikörper können eine (vorübergehende) Thrombozytopenie des Kindes verursachen, die klinisch in der Regel blande verläuft)

Hinweise zu Präanalytik und Abrechnung

Probenmaterial	10 mL Nativblut (Serum) und 20 mL EDTA-Blut der Mutter 20 mL EDTA-Blut des Vaters 3-5 mL EDTA-Blut des Kindes
Probentransport	ungekühlt, Raumtemperatur, innerhalb von 48 Stunden nach Blutentnahme im Labor
Methode	DFZ, Genotypisierung
Abrechnung	Preise auf Nachfrage

Ihre Ansprechpartner

Medizinische Fragen

Dr. med. Michael Krause

Facharzt für Transfusionsmedizin / Hämostaseologie

Facharzt für Anästhesiologie

+49 341 6565-757

m.krause@labor-leipzig.de

Fragen zur Labordiagnostik

Dipl. Biol. Mandy Glona

Leiterin Durchflusszytometrie

+49 341 6565-725

m.glon@labor-leipzig.de

Autor

Dr. med. Michael Krause, MVZ Labor Dr. Reising-Ackermann und Kollegen, Zentrum für Blutgerinnungsstörungen

Literatur

- Kiefel V, Santoso S, Weisheit M et al: Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood 1987; 70: 1722-1726
- Wötzel M: Durchflusszytometrische Differenzierung von antithrombozytären Antikörpern mittels Beads, in Sack U, Tarnock A und Rothe G (Hrsg.): Zelluläre Diagnostik, Karger 2007: 466-481
- Metzner K et al: Detection and identification of platelet antibodies using a sensitive multiplex assay system-platelet antibody bead array. Transfusion 2017; 57:1724-1733
- Takahashi D et al: Human leukocyte antigen antibody detection technologies in platelet transfusion refractoriness with special emphasis on functional test. Ann Blood 2018;3:42
- Vollenberg R, Jouni R, Norris PAA, et al.: Glycoprotein V is a relevant immune target in patients with immune thrombocytopenia. Haematologica 2019;104:1237-1243

Stand: 06 | 2020