

Seit > 5 Jahren nicht aktualisiert, Leitlinie wird zur Zeit überarbeitet



***Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH e.V.)***

## **Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen - Thrombozytopathien**

**Diagnose**  
**AWMF-Register Nr. 086-003, Klasse: S2K**  
**ICD10-Code Thrombozytopathie D69.1**

**Update 2018**

### **Mitglieder der Konsensusgruppe**

#### **Autoren**

Gesamtverantwortlich:  
Werner Streif, Ralf Knöfler

Abschnittsverantwortliche:

*Algorithmus:* Werner Streif

*Thrombozyten-abhängige Thrombinbildung:* Beate Kehrel, Kerstin Jurk, Annelie Siegemund

*Aggregometrie:* Ralf Knöfler

*Immunfluoreszenz:* Tamam Bakchoul, Karina Althaus

*Durchflußzytometrie:* Harald Schulze

*Molekulargenetische Methoden:* Harald Schulze

*Probenversand:* Frauke Bergmann, Karina Althaus

#### **Koautoren**

Oliver Andres, Matthias Ballmaier, Karin Beutel, Peter Bugert, Holger Cario, Christof Dame, Wolfgang Eberl, Ute Felbor, Johanna Gebhart, Susanne Holzhauer, Susan Halimeh, Eva Klopocki, Manuela Krause, Michael Krause, Georgi Manukjan, Oliver Meyer, Juliane Najm, Martin Olivieri, Florian Prüller, Hannelore Rott, Markus Schmugge, Clemens Stockklausner, Gabriele Strauss, Oliver Tiebel, Cornelia Wermes, Verena Wiegering, Ivonne Wieland, Barbara Zieger.

#### **Konsensusfindung und Interessenskonflikte**

Die vorliegende Aktualisierung der Leitlinie erfolgte durch die Arbeitsgruppe THROMKIDPlus, im Auftrag der Ständigen Kommission Pädiatrie der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH e.V.). Die Leitlinie wurde in redaktioneller

Unabhängigkeit. wurde von W. Streif und R. Knöfler vorbereitet und in Konsensuskonferenzen mit den TeilnehmerInnen/ KoautorInnen (s.o.) an der Deutschen Klinik für Diagnostik in Wiesbaden am 22. - 23. September 2015, an der Universitätsklinik Würzburg 12. – 13. Oktober 2016, im Kongresszentrum Berlin (ISTH 2017) 10. Juli 2017 und an der Deutschen Klinik für Diagnostik in Wiesbaden 11. – 12. September 2017 weiterentwickelt und im Kongresszentrum Wien (62. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH)) am 20. Februar 2018 verabschiedet. Alle TeilnehmerInnen der Konsensuskonferenzen legten Erklärungen über Verbindungen zu Industrieunternehmen (Darlegung potenzieller Interessenskonflikte) vor. Alle Erklärungen erfolgten anhand des Formblatts der AWMF in der gültigen Fassung. Potenzielle Interessenskonflikte wurden in der Leitliniengruppe diskutiert. Bei keinem der TeilnehmerInnen wurden Interessenskonflikte identifiziert, die eine Stimmenthaltung oder Ausschluss aus der Konsensusfindung notwendig gemacht hätte.

Die Erarbeitung der Leitlinie erfolgte in vorbereiteten Abschnitten: Modulen. Die Module wurden unabhängig moderiert: *Diagnosealgorithmus/ Screening, Aggregometrie, Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz, Molekulargenetik und Probenversand*. Am Ende der jeweiligen Konsensuskonferenz wurden die Module von allen TeilnehmerInnen gemeinsam diskutiert und verabschiedet. Die ModeratorInnen der Module waren nicht stimmberechtigt.

Der Ablauf der Konsensusfindung gestaltete sich wie folgt:

- Vorstellung der Entwürfe und Gelegenheit zu Rückfragen
- Erfassung von begründeten Änderungsvorschlägen durch die Koordinatoren (W. Streif, R. Knöfler) im Einzelumlaufverfahren
- Vorherabstimmung
- Diskussion von Passagen, für die kein Konsens erzielt werden konnte und Erarbeitung von Lösungsvorschlägen
- Diskussion und Dokumentation der Interessenskonflikte
- endgültige Abstimmung.

Der Konsens wurde definiert als Gesamtzustimmung aller KoautorInnen. Eine Offenlegung der Interessenskonflikte nach den Vorgaben der AWMF in der gültigen Fassung (*AWMF-Formular zur Erklärung von Interessenkonflikten im Rahmen von Leitlinienvorhaben; Stand 08.02.2010*) wurde von allen KoautorInnen vollständig ausgefüllt und unterschrieben. Die vorgelegten Interessenskonflikte wurden als unbedenklich bewertet.

Die vorliegende weiterentwickelte Leitlinie wurde bei der 62. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) in Wien am Dienstag, den 20. Februar 2018 verabschiedet.

### **Gültigkeitsdauer und Aktualisierung**

Die Leitlinie wurde erstmalig 2012 erstellt und 2/ 2018 aktualisiert. Die Leitlinie ist bis 02/ 2023 gültig. Zwischenzeitlich erscheinende wissenschaftliche Erkenntnisse werden von der Leitliniengruppe beobachtet. Gegebenenfalls wird von der Leitliniengruppe ein Aktualisierungsverfahren vorzeitig eingeleitet. Verantwortlich für die Aktualisierung sind W. Streif und R. Knöfler.

### **Geltungsbereich**

Die Leitlinie betrifft die Diagnose von angeborenen Störungen der Thrombozyten. Insbesondere die Entscheidungskriterien zur Auswahl geeigneter diagnostischer Maßnahmen und der Einsatz, die Durchführung und Beurteilung diagnostischer Tests sind Gegenstand des Konsensus. Die Leitlinie richtet sich an in Kliniken und Praxen tätige Kinderärzte und alle nicht

pädiatrisch tätigen ÄrztInnen einschließlich Laborverantwortlichen, die in die Versorgung von PatientInnen mit angeborenen Thrombozytenstörungen eingebunden sind.

### **Beteiligte Fachgesellschaften**

Der Entwurf der Leitlinie ist im Auftrag der Ständigen Kommission Pädiatrie der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH e.V.) erstellt worden. Zur Teilnahme eingeladen und VertreterInnen entsendet wurden von u.a. Gesellschaften. Die von den jeweiligen Fachgesellschaften mandatierten VertreterInnen sind mit einem Sternzeichen (\*) versehen. Die Leitlinie wurde den Fachgesellschaften vorgelegt und in der vorliegenden Version 2.1 verabschiedet.

- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO): Kehrel B.\*, Bergmann F.
- Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL): Triebel O\*, Krause Manuela
- Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI): Althaus K.\*, Bakchoul T.\*, Bugert P.\*, Krause Michael, Meyer O.
- Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GfH): Felbor U.\*, Najm J.\*, Klopocki E.\*
- Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ): Knöfler R.\*, Bergmann F., Eberl W., Wieland I., Stockklausner C.
- Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI): Dame Ch.\*, Stockklausner C.
- Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH): Cario H.\*, Eberl W., Holzhauer S.\*, Strauss G., Stockklausner C.
- Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH): Knöfler R.\*, Streif W.\*, Zieger B.\*, Schulze H.\*, Andres O., Bergmann F., Eberl W., Halimeh S., Krause Manuela, Krause Michael, Olivieri M., Strauss G., Rott H., Wermes C., Wieland I.
- Österreichische Gesellschaft für Innere Medizin (ÖGIM): J. Gebhart\*
- Österreichische Gesellschaft für Kinder- und Jugendheilkunde (ÖGKJ): Streif W.\*
- Österreichische Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC): Prüller F.\*
- Kein Mitglied einer involvierten Fachgesellschaft: Ballmaier M., Beutel K., Jurk K., Manukjan G., Wiegering V., Schmutge M., Siegemund A.

Den VertreterInnen aller Fachgesellschaften wurde die Leitlinie zur Beurteilung und Verabschiedung vorgelegt.

### **Andere Beteiligte/ Patientenselbsthilfeorganisationen**

Die Selbsthilfegruppen Deutsche Hämophiliegesellschaft (DHG e.V.), die Österreichische Hämophiliegesellschaft (ÖHG) und Schweizerische Hämophiliegesellschaft (SHG) wurden involviert und die Leitlinie vorgelegt. Die positiven Stellungnahmen der DHG und ÖHG liegen vor. Autoren sind ärztliche Berater der DHG und ÖHG.

### **Problemstellung**

Angeborene Störungen der Thrombozyten stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, die als Teil eines Symptomenkomplexes („Syndrom“) oder auch isoliert als hämorrhagische Diathese auftreten können. Die Erkrankungen sind häufig schwierig zu diagnostizieren und es gelingt oft nicht, sie einem klassifizierten Krankheitsbild zuzuordnen. Angeborene Störungen der Thrombozyten insbesondere ohne Erniedrigung der Thrombozytenzahl unter 110.000/µl bleiben häufig bis zum Eintritt von Blutungssymptomen unentdeckt. Klinische Folge einer thrombozytären Störung ist in den meisten Fällen eine leichte

bis moderate Blutungsneigung. Durch Kofaktoren, wie Medikamente, Operationen oder andere Herausforderungen der Hämostase kann es zu einer klinisch relevanten Blutungsneigung kommen. Typische Symptome von Störungen der Thrombozyten sind Schleimhautblutungen, Epistaxis, Menorrhagien, Hämatome, Petechien und Blutungen bei invasiven Eingriffen und Operationen. Blutungen können auch plötzlich und unvorhergesehen auftreten.

Zur Beurteilung der Thrombozyten empfiehlt sich die Verwendung eines diagnostischen Algorithmus.

Obwohl eine Vielzahl von Mess- und Testmethoden zur Verfügung steht, eignen sich nur einige für die klinische Praxis. Die Auswahl der Untersuchungen hängt ganz wesentlich von den lokalen Gegebenheiten ab. Eine Diagnosestellung gelingt häufig nur in enger Zusammenarbeit mit spezialisierten hämostaseologischen Zentren und molekulargenetischen Laboren.

### **Patientenperspektive**

Ziele dieser Leitlinien sind:

- 1) Die Diagnostik von Störungen der Thrombozyten soll möglichst wohnortnah unterstützt werden.
- 2) Die Diagnostik soll nur so viele Schritte wie unbedingt notwendig umfassen.
- 3) Die Beratung von Betroffenen und deren Familien soll unterstützt werden.
- 4) Der Patient soll von der Diagnosestellung profitieren.

### **Einleitung**

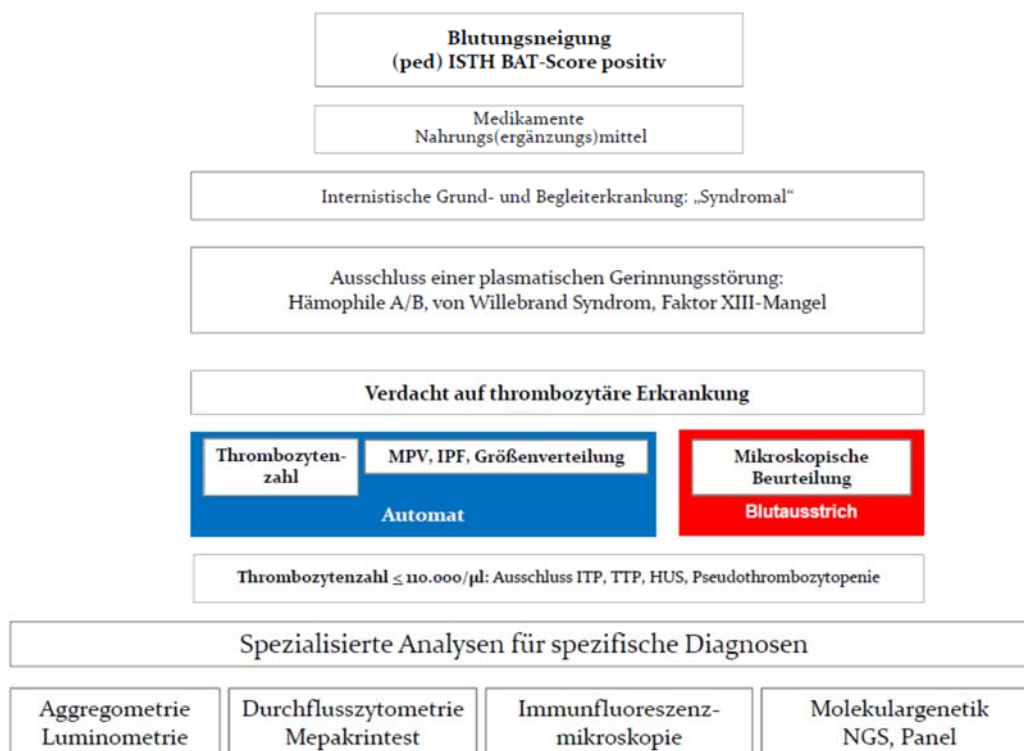
Die vorliegende Leitlinie soll die Diagnose von angeborenen Störungen der Thrombozyten unterstützen. Die diagnostischen Schritte sind individuell anzupassen, abhängig von Familien- und Individualanamnese, vorliegender Grunderkrankung (z.B. einem Symptomenkomplex: Syndrom), Thrombozytenzahl und –morphologie und verfügbaren Laboruntersuchungen.

Für die häufigsten und gut charakterisierten angeborenen Störungen der Thrombozyten werden weiterreichende Informationen gegeben. Die wichtigsten Untersuchungsmethoden sind im Detail beschrieben. Der zunehmenden Bedeutung der Molekularbiologie in der klinischen Praxis zur Diagnose angeborener Störungen der Thrombozyten ist ein Kapitel gewidmet. Die Leitlinie wurde gegenüber um die Kapitel *Thrombozyten-abhängige Thrombinbildung*, *Immunfluoreszenz* und *Probenversand* erweitert. Die AutorInnen sehen darin einen wesentlichen Beitrag zur Erleichterung der Diagnosestellung.

Die Leitlinie ist nicht geeignet für PatientInnen, die plättchenaktive Substanzen erhalten oder an erworbenen Störungen der Thrombozytenfunktion oder/ und -zahl leiden.

## Diagnosealgorithmus

Die Verwendung eines Algorithmus hat sich für die Diagnosestellung bewährt (Abbildung).



Primäre Hämostasestörungen, zu denen auch thrombozytäre Störungen zählen, sind durch eine mukokutane Blutungsneigung gekennzeichnet. Typisch sind die Neigung zu Schleimhautblutungen, Menorrhagien, Epistaxis, kutanen Hämatomen und Petechien. Angaben zur Familien- und Individualanamnese sind wichtig. Zur Beurteilung der Blutungsneigung kann die deutsche Übersetzung des pedISTH-BAT herangezogen werden (1).

Der ISTH-BAT Score wurde zur Diagnose primärer Hämostasestörungen entwickelt und evaluiert (2-4). Der ISTH-BAT Score ist bei Kindern > 2 (pedISTH-BAT), Männern > 4 und Frauen > 6 Punkten als positiv zu bewerten (5). Bei Frauen mit Menorrhagien kann zusätzlich das Pictorial Blood Assessment Chart (PBAC) herangezogen werden (6).

Zahlreiche Medikamente, Nahrungs- und Genussmittel sowie Nahrungsergänzungstoffe beeinflussen in unterschiedlichem Ausmaß Thrombozyten (7).

Bei der klinischen Untersuchung ist insbesondere auf das Vorliegen von Grund- und Begleiterkrankungen zu achten. Störungen der Thrombozyten können auch Teilsymptom eines komplexen Krankheitsbildes sein und für weitere Erkrankungen prädisponieren.

Eine plasmatische Gerinnungsstörung muss immer ausgeschlossen werden (8).

Bei Verdacht auf eine thrombozytäre Erkrankung soll das Blutbild analysiert werden. Neben

der routinemäßigen quantitativen Blutbildbestimmung, einschließlich der Retikulozytenzahl, soll eine an den meisten Analysegeräten verfügbare Thrombozytengrößenverteilungskurve, die Bestimmung des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) und eine Quantifizierung der immaturen Plättchenfraktion (IPF) angefordert und evaluiert werden (9). Die mikroskopische Beurteilung der Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten ist in der Lichtmikroskopie an gefärbten Blutaussstrichen durchzuführen. Wichtige Differenzialdiagnosen bei Vorliegen einer Thrombozytopenie  $\leq 110.000/\mu\text{l}$  sind die Pseudothrombozytopenie, die Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura (TTP), das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS), die Immunthrombozytopenie (ITP), das myelodysplastische Syndrom (MDS) und die Fanconi Anämie.

Primäre Thrombozytosen ( $\geq 450.000/\mu\text{l}$ ) können ebenfalls zu Störungen der Hämostase führen. Angeborene Vasopathien, wie zum Beispiel das Ehlers-Danlos Syndrom, aber auch verschiedene angeborene Stoffwechselerkrankungen, wie zum Beispiel die Glutarazidurie, können ebenfalls zu einer vermehrten Blutungsneigung führen (10). Es handelt sich dabei um unterschiedliche Erkrankungen, die alle außerhalb des Fokus dieser Leitlinie stehen.

Die **Thrombozytenaggregometrie**, **Durchflusszytometrie**, **Immunfluoreszenzmikroskopie** und **Molekulargenetik** sind für die Klassifizierung und Diagnose von thrombozytären Erkrankungen sehr gut geeignet (11). Von den individuell eingesetzten und seltenen Methoden ist die **Elektronenmikroskopie** (ELMI) grundsätzlich als diagnostisches Verfahren anerkannt. Die Methode wird nur an wenigen Zentren durchgeführt. Die Bedeutung der **ultrahochauflösenden konfokalen Lasermikroskopie** als Ersatz oder Ergänzung der ELMI ist in Erforschung. Über die klinische Anwendung der aus der Wissenschaft bekannten **Durchflusssysteme / -kammern** (*Flow Chamber*), die als standardisierte Systeme erworben werden können, kann zurzeit noch keine Aussage getroffen werden.

Die Bestimmung der Verschlusszeiten mit dem **PFA 100/200® (Innovance, Siemens)** ist nur eingeschränkt für die Beurteilung der Thrombozytenfunktion geeignet (12-14). Der PFA 100/200® sollte, wenn überhaupt, nur bei positiver Blutungsanamnese und auffälligem Blutungsscore (ISTH-BAT) eingesetzt werden. Die Verschlusszeiten des PFA 100/200® sind bei schweren Störungen der Thrombozytenfunktion, wie bei der Thrombasthenie Glanzmann und beim Bernard-Soulier Syndrom sowie beim von Willebrand Syndrom verlängert. Dagegen ist bei einem Normalbefund das Vorliegen einer leichten Thrombozytenfunktionsstörung nicht ausgeschlossen. Zu beachten ist, dass der von Willebrand Faktor bei Neugeborenen, Schwangeren und anderen Zuständen (*Akutphasereaktion*) erhöht ist. Bei Kindern mit rezidivierenden Infekten ist mit einer großen Variabilität der Verschlusszeiten zu rechnen. Grundvoraussetzung für die Testdurchführung ist eine Thrombozytenzahl über  $100.000/\mu\text{l}$  und ein Hämatokrit (Hkt) über 30%. Verkürzte Verschlusszeiten werden durch Hämolyse, Hkt  $> 50\%$ , Thrombozyten  $> 500.000/\mu\text{l}$  und verlängerte Verschlusszeiten durch Ikterus, Hämolyse, Anämie (Hkt  $< 35\%$ ) und Thrombozytopenie verursacht. Ein verdächtiger oder pathologischer Befund bedarf einer weiteren Abklärung.

Die **Thrombozyten-abhängige Thrombinbildung** („Thrombin Generation Assay“ (TGA), „Calibrated Automated Thrombography“ (CAT) basiert auf der fluorimetrischen Quantifizierung des Endogenen Thrombin Potenzials (ETP) im plättchen-reichen Plasma, das die Gesamtmenge des gebildeten Thrombins im zeitlichen Verlauf widerspiegelt (15). Angeborene Defekte der Phosphatidylserin - Oberflächenpräsentation (z.B. Scott Syndrom, Stormorken Syndrom) oder andere Störungen, die die Bindung von Gerinnungsfaktoren an aktivierte Thrombozyten betreffen, können durch diese Methode diagnostiziert werden (16, 17).

Die *in-vivo* **Blutungszeit** wird zur Diagnose von Thrombozytenstörungen nicht empfohlen.

Ungeeignete Methoden zur Diagnose von angeborenen Thrombozytenstörungen sind der **Rumpel-Leede-Test**, die **Thrombelastographie** (z.B. ROTEM®), der **Prothrombinverbrauchstest** und der **Thrombusretraktionstest**.

Das für das *drug-monitoring* entwickelte halbautomatische System **VerifyNow®** (Instrumentation Laboratory) und das **Impact-R®** (Matis Medical) sind für die Diagnose und Klassifizierung von angeborenen Thrombozytenstörungen nicht evaluiert und daher nicht geeignet.

## Aggregometrie

Die Aggregometrie ist die Standarduntersuchung der Thrombozytenfunktion (18-20). Um die verschiedenen thrombozytären Funktionen zu testen, ist die Verwendung eines Panels mit mindestens drei bis vier verschiedenen Agonisten – Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen, Arachidonsäure und Ristocetin (und Epinephrin) – zu empfehlen. Die Durchführung der Untersuchung und die Interpretation der Befunde sind nur bedingt standardisierbar und unterliegen daher einer großen Variabilität (21, 22).

### Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)

Die LTA gehört zu den am häufigsten verwendeten Methoden zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion. Fachgruppen und Organisationen haben sich in den letzten Jahren der Standardisierung dieser Methode gewidmet (20, 21, 23).

#### Prinzip

- Kontinuierliche Registrierung der im Verlauf der Aggregation sich ändernden Transmission langwelliger Lichts.
- In einem in Bewegung gehaltenen plättchenreichen Citratplasma oder in einer Suspension gewaschener Thrombozyten kommt es nach Zusatz von Agonisten zur Aggregation.
- Zunehmende Aggregation führt zum Auftreten von Aggregaten und damit zur Zunahme der Lichttransmission, welche fortlaufend photometrisch registriert und in Kurvenform aufgezeichnet wird.

#### Präanalytik

##### Patient

- Patient kurz ruhen lassen\*, kein Fasten\*\*
- Nikotinabstinenz für mindestens 30 min
- Medikamente der letzten Woche dokumentieren; Schmerz- und Grippemittel abfragen
- Medikamente registrieren und nach Möglichkeit absetzen, sofern nicht dringend medizinisch indiziert. Gegebenenfalls bekannte Auswirkungen der Medikation bei Befundung berücksichtigen
  - NSAR mind. 3 Tage (unterschiedliche HWZ beachten)
  - Irreversible Aggregationshemmer (ASS) mind. 10 Tage
  - P2Y<sub>12</sub> Hemmer (z.B. Clopidogrel) mind. 7 Tage
  - GP IIb/IIIa Inhibitor (z.B. Abciximab) mind. 3 Tage

\*Der Einfluss von den Punktionsschmerz lindernden Lokalanästhetika (EMLA®) auf das Testergebnis ist ungeklärt

\*\* Alimentäre Hyperlipidämie vermeiden - interagiert mit Probenanalyse

#### Blutgewinnung

- Plastikröhrchen (Polypropylen) oder silikonisierte Glasröhrchen (DIN/ISO 6710 - Vacutainer möglich)
- Natriumcitrat 109 oder 129 mM resp. 3,2 oder 3,8%
- Citrat : Blut = 1 : 9 Teile
- bei schlechten Venenverhältnissen und kleinen Kindern ggf. abtropfen lassen.
- Nadel mit 19 bis 21 G.



- Nur leicht und nicht zu lange stauen - bei problematischer Punktion erstes Röhrchen unbedingt werfen.
- 3 bis 4 ml Blut abnehmen und für andere Analysen verwenden.
- Folgeabnahmeröhrchen für Thrombozytenanalyse verwenden - unbedingt Schaumbildung vermeiden.
- Füllung der Röhrchen wie vom Hersteller gefordert, über-/unterfüllte Proben ablehnen.
- Proben nicht kühlen, Transport bei Raumtemperatur - keine Rohrpost!
- Angabe der Uhrzeit der Blutentnahme auf der Probe (als auch Analysezeitpunkt) verzeichnen. Thrombozytenzahl unbedingt vor Zentrifugation bestimmen.

### **Probenvorbereitung**

- Zentrifugation bei Raumtemperatur.
- Bei Thrombozytenzahl in Ausgangsprobe  $< 100.000/\mu\text{l}$  Probe spontan sedimentieren lassen oder schonende Zentrifugation nach Laborspezifikation
- Probe (Citratblut) 30 – 60 min bei Raumtemperatur vor Zentrifugation ruhen lassen
- Plättchenreiches Plasma (PRP)
  - 150 - 200 x g für 10 min.
  - Keine Bremse.
  - Für Riesenplättchen: Sedimentation für ca. 45 min,  $45^\circ$  Winkel für Sedimentation, nicht aufrichten und im  $45^\circ$  Winkel belassen für PRP Entnahme
  - Probe 15 – 45 min bei Raumtemperatur vor Analyse ruhen lassen
  - Thrombozytenzahl im PRP messen.
  - Keine Einstellung der Thrombozytenzahl erforderlich, wenn Thrombozytenzahl im PRP zwischen 150.000 und 500.000/ $\mu\text{l}$ .
  - Bei Thrombozytenzahl im PRP  $< 150.000/\mu\text{l}$  Kontrolle mit angepasster Thrombozytenzahl mitmessen. Niedrige Thrombozytenzahl bei z.B. Bernard-Soulier-Syndrom, VWS Typ 2B, *Platelet-Type* VWS!
  - Bei hoher Thrombozytenzahl  $> 500.000/\mu\text{l}$  mit autologem plättchenarmem Plasma (Platelet Poor Plasma - PPP korrigieren und auf 250.000 bis 300.000/ $\mu\text{l}$  einstellen
- PPP
  - 1500 x g für 10 min.
- Qualität der Proben kontrollieren.
- Hämolytische Proben werfen.
- Lipidämie dokumentieren.

### **Methodik**

- Normalkontrolle als Qualitätsstandard mindestens 1 x/Wo mitführen
- Eichung des Gerätes mit plättchenarmem autologem Plasma als Markierung der Lichttransmission von 100%
- Plättchenreiches Plasma bezeichnet den Nullwert der Lichttransmission.
- Rührgeschwindigkeit: 1000 U/min
- Temperatur:  $37^\circ\text{C}$
- Kurve vor Induktorzugabe für mind. 1 min beobachten (stabile Grundlinie, Spontanaggregation registrieren)
- Agonistenmenge (wässrige Lösung) darf 10% des Probenvolumens nicht übersteigen

- Beobachtung der Kurve für mind. 10 min bzw. bis zur maximalen Amplitude
- Abschluss der Untersuchung möglichst nach 2 h, spätestens 4 h nach Blutabnahme (Zeitpunkt dokumentieren!)

#### **Agonisten**

- Agonisten frisch am Tag der Messung zubereiten bzw. auftauen, Herstellerangaben beachten
- *Prinzip*: zunächst niedrige Agonistenkonzentration wählen, da hohe Konzentrationen Defekte verdecken können
- Keine sequentielle Agonistenzugabe! Ausnahme: Ristocetin
- Ristocetin: 0,5 - 1,5 mg/ml (0,5 bis 0,6 mg/ml zur Erfassung des VWS Typ 2B). Bei Neugeborenen sind niedrigere Endkonzentrationen der Agonisten erforderlich
- Agonisten mit Endkonzentrationen:
- Arachidonsäure: 0,5 - 1,5 mM
- ADP: 2 - 3  $\mu$ M (Verdopplung der Konz. falls keine Reaktion mit niedriger Konz.) – Beurteilung der „*second wave*“. Eine Probe sollte bei einer Konzentration von 2-3  $\mu$ M reagieren. Nach Standzeit benötigen Proben höhere Konzentrationen: Erhöhung auf 4  $\mu$ M
- Epinephrin: 5  $\mu$ M (ggf. höhere Dosis, z.B. 10  $\mu$ M)
- Kollagen: 0,5 – 2,0 (bis 4)  $\mu$ g/ml je nach Art des Kollagens!
- TRAP: 10  $\mu$ M und mehr
- U46619: 1  $\mu$ M und mehr (Herstellervorgabe beachten!)

#### **Beurteilung von Aggregationskurven**

- Für jeden Agonisten und jede Konzentration sollen hauseigene Referenzwerte durch mindestens jeweils 20 Analysen erfolgen – besonders wichtig bei Kollagen aufgrund der unterschiedlichen Kollagenarten mit erheblichem Einfluss auf die Testergebnisse. Normalbereiche definieren - bei größeren Fallzahlen dafür auch Verwendung von Perzentilen möglich - als pathologisch sind alle Werte anzusehen, die außerhalb eines Bereiches von  $\pm 2$  SD liegen (Normalverteilung vorausgesetzt).
- Visuelle Beurteilung der Kurven auf Plausibilität.
- Obligatorischer Bericht: Latenzphase (*lag-time*), maximale Aggregationsgeschwindigkeit (Kurvenanstieg), maximale Aggregation, Beurteilung einer Desaggregation (vorhanden, bei  $>10\%$  → Angabe).
- Optionaler Bericht: Formenwandel (*shape change*), Bestimmung der Fläche unter der Aggregationskurve.
- Gesamtbeurteilung: normal, grenzwertig oder pathologisch

### **Impedanzaggregometrie (IA) im Vollblut - Whole Blood Aggregometry (WBA)**

Die Impedanzaggregometrie ist eine Variante der Aggregometrie bei der eine mit isotoner Kochsalzlösung verdünnte und mit Citrat antikoagulierte Vollblutprobe analysiert wird (24). Diese Methode hat in letzter Zeit vermehrt Verwendung als *point-of-care* in semi-automatischen Geräten gefunden. Die Standardisierung ist schwierig.

#### ***Prinzip:***

- Eine Halterung mit zwei Elektroden wird in die mit einem Rührstäbchen versehene, auf 37°C erwärmte Probe eingetaucht.

- Mit Zugabe eines Agonisten kommt es zu einer Impedanzerhöhung infolge der Anlagerung von aggregierten Thrombozyten an den Elektroden, welche als zeitliche Funktion der Impedanzzunahme aufgezeichnet wird.

### **Präanalytik**

#### **Patient**

Analog zur LTA (siehe oben).

#### **Blutgewinnung**

Analog zur LTA (siehe oben).

- Ausnahme: **Multiplate®** ist für Hirudin-antikoagulierte Proben standardisiert. Empfohlenes Abnahmeröhrchen: HIRUDIN 4,5 ml für Multiplate Analyse.

#### **Geräte**

- Chronolog-Aggregometer® (Chronolog Corporation).
- Multiplate® (Roche Diagnostics).

#### **Probenvorbereitung**

- Vor Test, Blut für mindestens 10 - 30 min bei Raumtemperatur ruhen lassen.
- Im Chronolog-Aggregometer® Blut in die mit NaCl 0,9% vorgefüllten Küvetten im Verhältnis von 1:1 überführen und bei 37 °C für 15 bis 20 min im Gerät vorwärmen.
- Die Vollblutprobe für Multiplate® laut Vorgabe (mit dem Gerät verbundene halbautomatische Pipette) mit NaCl 0,9% verdünnen.
- Abschluss der Untersuchung spätestens nach 2 Stunden (Multiplate®) und 3 Stunden (WBA) nach Blutabnahme (Zeitpunkt dokumentieren!).

#### **Agonisten (Chronolog Aggregometer®)**

- Agonisten frisch am Tag der Messung zubereiten bzw. auftauen, Herstellerangaben beachten.
- Gleiches Prinzip wie bei LTA - mit niedriger Agonistenkonzentration beginnen.
- ADP: 10 µM (ggf. steigern auf 20 µM)
- Kollagen: 1 µg/ml (ggf. steigern auf 2 µg/ml)
- Arachidonsäure: 0,5 mM (ggf. steigern auf 1,0 mM)
- Ristocetin: 1,25 mg/ml (0,2 – 0,6 mg/ml bei Verdacht auf VWS Typ 2B)

#### **Agonisten (Multiplate®)**

- Vorbereitung des Testes und der Agonisten nach Herstellervorgabe!
- ASPI-Test (Arachidonsäure) mit 1 ml Aqua Dest (AD) auflösen, aliquotiert bei –20°C einfrieren, und unmittelbar vor Gebrauch auftauen.
- RISTO Test (Ristocetin) mit 1 ml AD auflösen, aliquotiert bei –20°C einfrieren, und unmittelbar vor Gebrauch auftauen.
- COL Test (Kollagen) mit 1 ml AD auflösen, bei Kühlschranktemperatur (4-6°C) lagern!
- ADP Test (ADP) mit 1 ml AD auflösen, aliquotiert bei –20°C einfrieren, und unmittelbar vor Gebrauch auftauen.
- TRAP Test (*Thrombin Receptor Activating Peptide*) mit 1 ml AD auflösen, aliquotiert bei –20°C einfrieren, und unmittelbar vor Gebrauch auftauen.

#### **Auswertungsmodus der Aggregationskurven (Chronolog-Aggregometer®)**

- Vor Beginn der Messung Kalibration mit einer mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllten Küvette.

- Charakterisierung der Aggregationskurven durch folgende Parameter:
  - Obligatorisch: Maximale Aggregation (in Ohm) und Latenzphase (*lag-time* in s).
  - Optional: Aggregationsrate und Fläche unter der Kurve
  - Altersabhängige Referenzbereiche beachten (15),(16).

#### ***Auswertungsmodus der Aggregationskurven (Multiplate®)***

- Parameter: Fläche unter der Kurve (*Area Under the Curve* in Units (AUC)), maximale Aggregation (*Aggregation Units*), Aggregationsgeschwindigkeit (*velocity* in U/min).
- Altersabhängige Referenzbereiche berücksichtigen (11)

#### **Luminometrische Bestimmung der ATP-Freisetzung**

Mit dieser durch *Lundin et al.* erstmals vorgestellten Methode wird die thrombozytäre ATP-Freisetzung gemessen, wodurch Sekretionsdefekte der  $\delta$ -Granula (*Storage-Pool-Defekt*) identifiziert werden können (19, 25).

#### ***Prinzip***

- Citrat-antikoagulierte Vollblut oder PRP wird das Luciferin-Luciferase-Reagenz (LLR) zugefügt, welches in Gegenwart von ATP luminesziert.
- Die bei der ATP-Freisetzung entstehende Lumineszenz wird photometrisch von einem Photomultiplier erfasst.
- Mit Hilfe eines externen ATP-Standards erfolgt die Auswertung der ATP-Freisetzungskurve.

#### ***Gerät***

- Chronolog-Lumiaggregometer® (Chronolog Corporation)

#### ***Agonisten***

- Vorbereitung des Testes und der Agonisten nach Herstellervorgaben!
- Ansätze nach Zugabe von Luciferin-Luciferase-Reagenz bei 37 °C für 2 min vorwärmen
- Kollagen: 2 µg/ml
- Thrombin: 1 E/ml

#### ***Auswertungsmodus der Freisetzungskurve***

- Freisetzungskurve bis zum Erreichen des Peaks aufzeichnen.  
Parameter zur Charakterisierung der ATP-Freisetzungskurve:
  - Obligatorisch: maximale ATP-Freisetzung (Berechnung erfolgt unter Verwendung eines ATP-Standards mit definierter ATP-Menge, die einer separaten Probe zugegeben wird. Optional: Reaktionszeit bis zum Erreichen des Peaks.
  - Altersabhängige Referenzwerte beachten (analog zur Literatur unter IA für das Chronolog Aggregometer)

## Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine in der Zelldiagnostik etablierte Methode (3, 26). Sie eignet sich insbesondere gut zur Diagnose der Thrombasthenie Glanzmann, des Bernard-Soulier-Syndroms und der Storage-Pool Erkrankungen ( $\alpha$ - /  $\delta$ - Granuladefekte). Die besonderen Vorteile liegen in der geringen benötigten Blutmenge, uneingeschränkter Durchführbarkeit auch bei ausgeprägter Thrombozytopenie, rascher Identifikation bestimmter Erkrankungen und der Möglichkeit heterozygote Träger bei Thrombasthenie Glanzmann und Bernard-Soulier-Syndrom zu erkennen (27, 28).

### Prinzip

Quantifizierung konstitutiv exprimierter Oberflächenrezeptoren und Messung von intrinsischen und exogenen Granulainhaltsstoffen vor und nach standardisierter Aktivierung von Thrombozyten.

### Präanalytik

#### PatientIn

Blutbild einschließlich Thrombozytenzahl bestimmen!

- Kein Fasten
- Koffeinabstinenz mind. 2 h
- Nikotinabstinenz mind. 60 min
- Patient kurz ruhen lassen
- Medikamentenanamnese siehe oben

### Blutgewinnung bei IndexpatientIn und gesundem Kontrollproband

- Nur leicht und nicht zu lange stauen
- 3 bis 4 ml Blut abnehmen und für andere Analysen verwenden (z.B. Serumröhrchen)
- Unterdruck-Abnahme-Systeme vermeiden (Vacutainer®)
- Nadel mit 19 bis 21 G
- Plastikröhrchen (Polypropylen) oder silikonisierte Glasröhrchen
- Natriumcitrat 109 oder 129 mM resp. 3,2 oder 3,8%
- Citrat : Blut = 1 : 9 Teile
- Probenverarbeitung 30 - 90 min nach Abnahme (bis zu 4 Stunden nach Abnahme möglich)
- Ausschließlich Analyse von mit Citrat antikoaguliertem Vollblut ohne Fixans oder Konservierung bis 3 Stunden nach erfolgter Färbung
- Keine Lyse der Erythrozyten durchführen - CAVE: ATP- und ADP-Freisetzung
- Proben bei Raumtemperatur transportieren und lagern, nie kühlen!
- Schütteln und mechanischen Stress (auch Rohrpost) vermeiden
- Inkubation ca. 15 Minuten im Dunkeln, dann mit Puffer (1% BSA auf PBS) verdünnen und messen

### Apparative Voraussetzung

- Durchflusszytometer - allgemeine Qualitätskontrollen werden vorausgesetzt

- Thrombozytenzahl: Vollblutprobe benötigt im Regelfall keine Einstellung der Thrombozytenzahl. CAVE: Gesamtzellzahl darf nicht über der "Auflösung" des Gerätes liegen (am FACS-Canto II z.B. 10.000 events / sec)
- Ansatz in Polypropylenröhrchen
- Direkt Fluorochrom-markierte AK verwenden, Tandem-Konjugate vermeiden
- Schwach exprimierte Antigene mit stark fluoreszierenden Farben markieren (z.B. PE); stark exprimierte Antigene mit schwächeren Farben markieren (z.B. FITC)
- Positive immunologische Erkennung der Thrombozyten durch Färbung eines konstitutiv hoch exprimierten Rezeptors mit einem AK gegen CD41a/CD61 oder CD42a/b.
- Sichere Erkennung von schwach exprimierten Rezeptoren oder aktivierungsabhängig exprimierten Rezeptoren durch Messung einer adäquaten Isotyp-Kontrolle vor der jeweiligen Rezeptormessung (IgG oder IgM beachten!). Bei Mehrfarbenmessungen sollte jeweils eine FMO (*Fluorescence-minus-one*)-Kontrolle verwendet werden
- Darstellung der FSC- und SSC-Signale (Scatterplot) in logarithmischer Skalierung (auf Schwellenwerte "Threshold"-Einstellung achten)
- Stop-Kriterium der Messung: ca. 10.000 Thrombozyten (CD41a-positive Ereignisse im FSC/SSC-Gate). Es wird empfohlen, alle Zellen aufzunehmen um Makrothrombozyten und Thrombozyten-Thrombozyten oder Thrombozyten-Leukozytenaggregate identifizieren zu können
- Falls Zähl-beads verwendet werden - nicht mit Thrombozyten zusammen ansetzen

*Empfohlen werden Antikörper gegen folgende Antigene:*

CD41a	Fibrinogenrezeptor (GPIIb/IIIa) - gesamter Komplex (stöchiometrisch)
CD41b	Fibrinogenrezeptor (GPIIb)
CD42a/b	von Willebrand Faktor Rezeptor (GPIX/Ib $\alpha$ )
CD61	Fibrinogenrezeptor, Integrin beta3 (GPIIIa)
CD49b	Kollagenrezeptor (GPIa/IIa)

Empfohlen werden folgende Antikörper gegen aktivierungsabhängig exprimierte Antigene:  
*Messung nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP und TRAP-6 (Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid; Sequenz: SFLLRN)*

CD62P	P-Selectin ( $\alpha$ -Granula)
CD63	GP-53 (erkennt sowohl lysosomale wie partiell auch $\delta$ -Granula)
CD107a/b	LAMP-1/2 (lysosomale Granula)
PAC1	aktivierter GPIIb/IIIa Komplex -Fibrinogenrezeptor ( <i>Inside-out-signaling</i> ) gemessen durch den spezifischen IgM-Antikörper PAC-1.

Zur isolierten Untersuchung der  $\delta$ -Granula eignet sich der **Mepacrine-Assay** (27, 29). Mepacrine ist ein auto-fluoreszentes Antibiotikum, das spezifisch in den  $\delta$ -Granula der Thrombozyten eingelagert wird. Nach Stimulation der Thrombozyten mit Agonisten und der Freisetzung aus den  $\delta$ -Granula nimmt auch die intrazelluläre Konzentration von Mepacrine wieder ab. Diese Abnahme kann durchflusszytometrisch (im FITC-Kanal) gemessen werden und ist somit ein Surrogat-Marker für die  $\delta$ -Granula. Viele Laboratorien verwenden Endpunkt-Messungen (unbeladen, beladen-unstimuliert, nach Zugabe des Agonisten); es sind aber auch kinetische Messungen möglich (27).

**Glanzmann- Diagnostik\*:** Thrombozyten-Zahl normal, Größe (*Forward Scatter*) normal.

CD41a (gesamten Rezeptorkomplex stöchiometrisch erkennend) - Klon P2

CD41b (GPIIb)

CD61 (GPIIIa)

- Aktivierungsmarker PAC-1, + CD42b (als Alternative FITC-markiertes Fibrinogen statt PAC1)

Glanzmann- Typ I: CD41a < 10% (Fib.rez. homozygot verändert)

Glanzmann- Typ II: CD41a >10%

\*Vereinfachte Klassifizierung in Typ I und Typ II.

**Bernard-Soulier-Diagnostik:** Thrombozyten-Zahl: vermindert, Größe (*Forward Scatter*): erhöht

CD42a (GPIX); vermindert

CD42b (GPIb $\alpha$ ); vermindert

CD42c (GPIb $\beta$ ); vermindert. Es können selektiv einzelne Komponenten oder mehrere Untereinheiten durch stöchiometrische Bindungseffekte reduziert sein

CD42d (GPV); Veränderungen sind bislang noch nicht im Zusammenhang mit dem Bernard-Soulier-Syndrom beschrieben

#### **Vorschlag für den rationalen Einsatz der Durchflusszytometrie:**

##### Negativkontrolle:

IgG1-FITC / IgG1-PE (Antikörper mit gleicher Ig-Subklasse und unspezifischer Bindung)

##### Positivkontrolle:

CD41a-FITC / CD42b-PE

(Zur Auffindung bei Thrombasthenie Glanzmann oder beim Bernard-Soulier Syndrom zusätzlich z.B. CD31 / CD36)

##### Thrombasthenie Glanzmann

-IgG1-FITC / IgG1-PE

-CD41a-FITC oder CD41b- FITC / CD61-PE

+FSC/SSC

- normale Oberflächenpräsentation von CD62P und CD63 nach Stimulation, insb. mit starken Agonisten

- keine (erhöhte) Bindung von Fibrinogen oder dem Fibrinogen simulierenden anti-GPIIb/IIIa Antikörper PAC1 nach Stimulation mit ADP, Kollagen, *Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid-6* (TRAP-6)

##### Bernard-Soulier Syndrom:

- IgG1-FITC / IgG1-PE oder korrekte Isotypkontrolle

- CD42a-FITC / CD42b-PE / CD42c (optional)

+ FSC/SSC ("Shift" aufgrund veränderter Größe bzw. Granularität der Thrombozyten)

### **Aktivierungsmarker:**

Fragestellung:

1. ADP-Rezeptor-Stimulierbarkeit (suboptimale und optimale Dosis zur Beurteilung einer Voraktivierung)
2. Thrombinrezeptor-Stimulierbarkeit (suboptimale und optimale Dosis zur Beurteilung einer Voraktivierung)
3. Vorhandensein von Granula
4. Regelrechte Ausschüttung der Granula

Granuläre Aktivierungsmarker:

$\alpha$ -Granula: CD62P

lysosomale Granula: CD63

$\delta$ -Granula: Mepacrine-Beladung oder Serotonin-Reuptake-Test

Rezeptorassoziierte Aktivierungsmarker:

PAC-1: aktivierter Fibrinogenrezeptor

### **Storage-Pool-Erkrankungen:**

Aktivatoren:

Standard: ADP und TRAP-6

humaner Protease Activated Receptor-1 (PAR1-Peptid): Basale

Aktivierungsuntersuchung

*weiterführend:* Kollagen und Thromboxan-A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten (U46619)

Agonistenkonzentrationen:

ADP: 2  $\mu$ M – 10  $\mu$ M

TRAP-6: (1 -) 10  $\mu$ M – 100  $\mu$ M (austitrieren, da die Konzentration produktabhängig ist!)

Inkubation mit Aktivator für 5 Minuten, anschließend für weitere 15 Minuten AK dazu (im Dunkeln inkubieren!), dann Abstoppen mit Puffer (1% BSA oder Albumin auf PBS) und innerhalb von 30- max. 60 Minuten messen



Protokoll aus der Arbeitsgruppe H. Schulze, Universitätsklinikum Würzburg (4 Farben)

	Antikörper				Agonist
Tube	FITC	PE	PE-Cy5 / PerCP / Pacific Blue	APC	
#1	CD61	CD29	CD42a	CD42b	---
#2	CD49b	CD49e	CD49f	CD41a	---
#3	PAC-1	CD63	CD41a	CD62P	---
#4	---	---	CD41a	CD62P	2 µM ADP
#5	PAC-1	CD63	CD41a	FMO*	5 µM ADP
#6	PAC-1	FMO*	CD41a	CD62P	1 µM TRAP-6
#7	FMO*	CD63	CD41a	CD62P	5 µM TRAP-6
#8	PAC-1		CD41a	CD62P	2 µM U46619
#9	PAC-1		CD41a	CD62P	2 µM U46619 + 5 µM ADP
#10	PAC-1		CD41a	CD62P	0,01 µg/ml CRP

\* FMO: Bei Mehrfarbenmessung kann eine FMO (*Fluorescence-minus-one*)- Kontrolle verwendet werden. Die Proben #4 und #6 beschreiben eine suboptimale Agonistenkonzentration, die Proben #5 und #7 jeweils eine optimale / maximale Dosis. CRP = *Collagen-related peptide*

### Beurteilung

- Nach mittlerer Fluoreszenzintensität und Vergleich gegenüber Normalkollektiv.
- Nach MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) im Vergleich zur adäquaten Isotyp- oder FMO-Kontrolle. Bei logarithmischer Histogramm-Skalierung sollte der geometrische MFI verwendet werden.
- Aktivierung auch als % positive Zellen ("% over threshold").
- Deskriptive Angabe des Befundes (keine Zahlen).

## Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist für die Diagnose einiger angeborener Störungen der Thrombozyten an wenigen Zentren etabliert. Die Methode beruht auf dem Nachweis der charakteristischen Fehlverteilung von Thrombozytenproteinen im Blutaussstrich (30).

**Präanalytik:** 14 ungefärbte Blutaussstriche (1 - 3µl je Ausstrich) aus EDTA-Blut. Die Ausstriche sollen möglichst zeitnah nach der Blutentnahme angefertigt werden, um Artefakte zu vermeiden. Die Ausstriche werden luftgetrocknet und können anschließend versendet werden. Zwei vor Ort gefärbte Ausstriche sollen immer mitversendet werden

**Methodik:** Zunächst werden die Ausstriche mittels Aceton, Formalin oder Methanol fixiert und anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper für die anzufärbende Zielstruktur und einem Sekundärantikörper angefärbt

### Zielstrukturen und Diagnosen:

- Thrombozyten-Rezeptoren
- GPIbIX (Bernard-Soulier Syndrom)
- GPIIbIIIa (Thrombasthenie Glanzmann)
- Zytoskelettproteine
- Nicht-muskuläres Myosin IIa (z.B. MYH9-Makrothrombozytopenien)
- Filamin (z.B. Filamin assoziierte Makrothrombozytopenie)
- $\beta$ 1-Tubulin (z.B.  $\beta$ 1-Tubulin assoziierte Makrothrombozytopenie)
- Actinin
- Granulainhaltsstoffe
- $\alpha$ -Granula Strukturen (z.B. Gray-Platelet Syndrom)
- $\delta$ -Granula Strukturen (Delta-Storage-Pool Defekte)
- CD34 (GFI1b-Defekt)

### Wertigkeit:

Die Methode eignet sich insbesondere zur Diagnose der Gruppe der MYH9-Defekte, Bernard-Soulier Syndrom, Thrombasthenie Glanzmann und Gray-Platelet Syndrom.

## Molekulargenetische Methoden

Die molekulargenetische Diagnostik kann bei Nachweis einer oder mehrerer krankheitsverursachender Varianten die Verdachtsdiagnose einer angeborenen thrombozytären Erkrankung sichern und leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Abklärung. Im Rahmen einer vorhersagenden (prädiktiven) Analyse können Familienmitglieder durch den Nachweis oder den Ausschluss der familienspezifischen Variante(n) ihren Anlageträgerstatus bestimmen lassen (*Heterozygotendiagnostik*). Ein fehlender Mutationsnachweis bei einem erkrankten Ratsuchenden schließt die Verdachtsdiagnose einer angeborenen thrombozytären Erkrankung nicht aus, weil im Rahmen der molekulargenetischen Routinediagnostik in der Regel nur die kodierenden Sequenzen untersucht werden.

Neben der Sequenzierung von Kandidatengenomen nach Sanger findet inzwischen in vielen molekulargenetischen Laboren das Next Generation Sequencing (NGS) Anwendung. Die Analyse erfolgt zumeist im Rahmen einer Gruppierung von Kandidatengenomen (NGS Multi-Gen-Panel), die eine nachgewiesene Funktion bei der Biogenese oder der Funktion von Thrombozyten haben (auch als Tier-1- oder "Core"-Gene bezeichnet) und als Panel-basierte Hochdurchsatz-Sequenzierung simultan untersucht werden (31, 32). Für diagnostische Zwecke bei Betroffenen und ihren Familien sollten nur Varianten in Genen mit einem bekannten Zusammenhang zwischen pathogenen Veränderungen und entsprechendem Phänotyp beurteilt werden.

Die Bewertung der gefundenen Varianten sowie deren Mitteilung durch den Molekulargenetiker an den verantwortlichen und aufklärenden Arzt soll unter Berücksichtigung der aktuellen Empfehlungen des American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) und der europäischen Leitlinie für diagnostische Hochdurchsatzsequenzierungen erfolgen (33-35). Für die Einordnung genetischer Varianten wird eine standardisierte Terminologie empfohlen: „pathogene Variante“ (class V), „wahrscheinlich pathogene Variante“ (class IV), „Variante unklarer klinischer Bedeutung“ (variant of uncertain clinical significance, VUS, UV, UCV) (class III), „wahrscheinlich neutrale Variante“ (class II) sowie „neutrale Variante“ (class I). Es werden pathogene und wahrscheinlich pathogene Varianten mitgeteilt jedoch keine neutralen und wahrscheinlich neutralen Varianten (36). Ob Varianten unklarer klinischer Bedeutung mitgeteilt werden, hängt von der im Labor geübten Praxis ab. Eine Variante unklarer klinischer Bedeutung liegt vor, wenn die funktionelle Relevanz und somit die diagnostische bzw. prädiktive Bedeutung einer genetischen Veränderung nicht sicher beurteilt werden kann. Zur weiteren Einordnung der VUS können funktionelle Studien in Zellkultur- und Tiermodellen sowie Segregationsanalysen der Variante unter Einbeziehung betroffener und nicht-betroffener Familienmitgliedern ggf. hilfreich sein (37). Für die Analyse zu Forschungszwecken gelten besondere gesetzliche Bestimmungen.

Empfohlene Referenz-Datenbanken sind ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), ExAc (<http://exac.broadinstitute.org>), gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org>), dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) sowie die "Datenbank der 1000 Genome" (IGSR) (<http://www.internationalgenome.org>).

Informationen zu den gesetzlichen Grundlagen zur molekulargenetischen Untersuchungen sind für Deutschland unter [www.gesetze-im-internet.de](http://www.gesetze-im-internet.de) (<http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/GenDG.pdf>), Österreich unter [www.ris.bka.gv.at](http://www.ris.bka.gv.at) (<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010826>) und die Schweiz unter (Humanforschungsgesetz, HFG) [www.admin.ch/gov/de/start.html#diagnostik](http://www.admin.ch/gov/de/start.html#diagnostik) (<https://www.admin.ch/opc/de/classified-compilation/20061313/index.html>) einzusehen.

## Probenversand

Vor dem Versand der Proben ist immer der Kontakt mit dem Analysezentrum notwendig, um die Versand- und Annahmebedingungen des jeweiligen Zentrums zu klären.

Die Versendung von Proben zur Beurteilung und Diagnose von thrombozytären Erkrankungen ist nur sehr eingeschränkt möglich.

Das Ergebnis einer **Thrombozytenaggregation** aus einer Blutprobe, die über 4 Stunden nach Blutabnahme gelagert wurde, soll nicht mehr verwertet werden; ein Versand an ein entferntes Zentrum ist daher nicht sinnvoll.

Die **luminometrische Bestimmung der ATP-Freisetzung** wird in einzelnen Zentren bis 24 Stunden nach Blutabnahme durchgeführt. Bei der Versendung sollte prinzipiell die Probe einer „gesunden“ Kontrolle mitgeschickt werden.

**Durchflusszytometrische** Untersuchungen aus zugesendeten Proben werden von einigen Analysezentren durchgeführt, können aber aufgrund der präanalytischen Fehleranfälligkeit nicht empfohlen werden. Eine Thrombozytenaktivierung mit anschließender Fixierung erhöht die Haltbarkeit der Probe. Der Mepacrine-Test ist weniger störanfällig; eine Auswertung ist bis zu 48 Stunden nach der Blutabnahme möglich. Zur Qualitätssicherung ist der Mitversand einer gleichbehandelten Kontrollprobe unabdingbar.

Luftgetrocknete Blutaussstriche zur **Immunfluoreszenzmikroskopie** können problemlos versendet werden.

**Molekulargenetische Untersuchungen** können aufgrund der Stabilität von genetischem Material gut auch an versendeten Proben erfolgen.