



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Weiterentwicklung eines Enzymimmunoassays und Entwicklung
einer HPLC-Methode zur Diagnostik der Heparin-induzierten
Thrombozytopenie**

Autor: Sandra Koch
Institut / Klinik: IV. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. med. Harenberg

In der Diagnostik der heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) gilt der C 14-serotonin-release-assay (SRA) als Goldstandard, mit dem Nachteil der Verwendung von radioaktivem Material. Eines der neuesten nicht-radioaktiven Testverfahren ist ein Enzymimmunoassay (EIA), der wie der C14-SRA auf der Bestimmung der Serotoninausschüttung aus Spenderthrombozyten nach Inkubation mit HIT-Serum und Heparin beruht. Dieses spezifische und sensitive Verfahren ist jedoch sehr zeitaufwendig, wodurch eine Weiterentwicklung wünschenswert war. Des weiteren sollte ein nicht-radioaktiver, zeitsparender Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)-Test entwickelt werden. Zu den Versuchen einer Weiterentwicklung des EIA-SRA wurden 20 HIT- und 20 Non-HIT-Seren mit Spenderthrombozyten sowie 0, 0.2 und 10 IU/ml unfraktioniertem Heparin (UFH), niedermolekularem Heparin (LMWH) bzw. 0, 0.02 und 1 IU/ml Danaparoid (bei 300.000 PLT/ μ l) inkubiert und die Serotoninfreisetzung aus den Thrombozyten bestimmt. Nach mehreren Untersuchungen zu einer Verkürzungsmöglichkeit der Inkubationszeiten wurden die Ergebnisse der ursprünglichen Testmethode mit denen des modifizierten Verfahrens verglichen. Es musste festgestellt werden, dass bedingt durch hohe Standardabweichungen eine derartige Verkürzung nicht möglich ist. Zur Entwicklung des HPLC-SRA wurden 99 Seren von HIT-Patienten (n=19), Non-HIT-Patienten (n=20) und gesunden Probanden (n=60) untersucht. Die Patientenserum wurden mit Spenderthrombozyten und 0, 0.2 und 10 IU/ml UFH, LMWH bzw. 0, 0.02 und 1 IU/ml Danaparoid inkubiert. Die freigesetzte Serotoninmenge wurde mittels des neu entwickelten HPLC-SRA quantitativ bestimmt. Wir verwendeten eine Nucleosil-C18-Säule mit entsprechender Vorsäule, L-Dopa-Laufmittel (pH 2.3) sowie einen elektrochemischen Detektor. Die Flussrate betrug 2.5 ml/min. Die Konzentration des freigesetzten Serotonins wurde mithilfe einer Serotonin-Standardkurve ermittelt. Serotonin wurde als Einzelpeak nach 16-17 Minuten eluiert. Von 19 HIT-Proben wurden 18 als positiv erkannt. Alle 20 Non-HIT-Seren und alle 60 gesunden Seren waren negativ. Die Sensitivität betrug 94,7%, die Spezifität 100% im Vergleich zum EIA-SRA. Die HPLC-SRA erlaubt eine schnelle, sensitive, spezifische und quantitative Bestimmung von Serotonin, welches in Anwesenheit von Heparin und HIT-Serum aus Spenderthrombozyten freigesetzt wird. Sie stellt eine alternative, nicht-radioaktive Methode in der Diagnostik der heparin-induzierten Thrombozytopenie dar.