

Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen - Thrombozytopathien

**Interdisziplinäre S2k-Leitlinie
der Ständigen Kommission Pädiatrie der Gesellschaft für
Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH)**

Kurzversion

AWMF-Registernummer
086-003

ICD10-Code
Thrombozytopathie D69.1
Thrombozytopenie D69.4

Stand
Juli 2024



KoordinatorInnen

Werner Streif: werner.streif@i-med.ac.at

Ralf Knöfler: ralf.knoefler@ukdd.de

Jennifer Gebetsberger: jennifer.gebetsberger@i-med.ac.at

AutorInnen

Lorenzo Alberio, Karina Althaus, Oliver Andres, Tamam Bakchoul, Matthias Ballmaier, Frauke Bergmann, Ingvild Birschmann, Doris Böckelmann, Karin Beutel, Holger Cario, Christof Dame, Wolfgang Eberl, Jennifer Gebetsberger, Johanna Gebhart, Susanne Holzhauer, Sebastian Hütker, Kerstin Jurk, Beate Kehrel, Ralf Knöfler, Manuela Krause, Michael Krause, Kristina Mott, Martin Olivieri, Anna Pavlova, Florian Prüller, Harald Schulze, Annelie Siegemund, Gabriele Strauß, Werner Streif, Oliver Tiebel, Verena Wiegering, Ivonne Wieland, Carlo Zaninetti, Barbara Zieger

Beteiligte Fachgesellschaften

- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO)
- Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL)
- Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI)
- Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ)
- Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI)
- Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)
- Österreichische Gesellschaft für Innere Medizin (ÖGIM)
- Österreichische Gesellschaft für Kinder- und Jugendheilkunde (ÖGKJ)
- Österreichische Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC)
- Schweizerisches Hämophilie Netzwerk (SHN)

Wichtiger Hinweis

Die vorliegende Kurzversion der Leitlinie umfasst lediglich die wesentlichen Informationen und Empfehlungen der Langversion. Weiterführende Informationen müssen demnach stets der im September 2024 veröffentlichten und 5 Jahre gültigen Langversion entnommen werden.

Inhaltsverzeichnis

1. Problemstellung.....	3
2. Patientenperspektive.....	3
3. Einleitung	3
4. Diagnosealgorithmus	4
4.1. <i>Klinische Bewertung und Anamnese</i>	<i>5</i>
4.2. <i>Laboruntersuchungen für Thrombozytenfunktionsstörungen</i>	<i>8</i>
5. Präanalytik	12
6. Aggregometrie.....	12
6.1. <i>Lichttransmissionsaggregometrie (LTA).....</i>	<i>12</i>
1. Prinzip.....	12
2. Methodik und Anwendbarkeit	13
6.2. <i>Impedanzaggregometrie (IA) im Vollblut – Whole Blood Aggregometry (WBA)</i>	<i>15</i>
1. Prinzip.....	15
2. Methodik	16
6.3. <i>Luminometrische Bestimmung der ATP-Freisetzung.....</i>	<i>16</i>
1. Prinzip.....	17
6.4. <i>Automatisierte Lichttransmissionaggregometrie.....</i>	<i>17</i>
7. Durchflusszytometrie	17
1. Prinzip.....	18
2. Methodik und Anwendbarkeit	18
8. Immunfluoreszenzmikroskopie.....	23
1. Anwendbarkeit	23
9. Spezialisierte Analysen zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik.....	24
9.1. <i>Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung</i>	<i>24</i>
10. Molekulargenetische Methoden	25
1. Methoden der Gendiagnostik	25
2. Auswertung, Interpretation und Berichterstattung	26
11. Zukünftige Entwicklungen	27
Literatur.....	29

1. Problemstellung

Angeborene Störungen der Thrombozytenfunktion (inherited platelet defects, IPD) stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, die mit komplexen systemischen Erkrankungen assoziiert sind oder isoliert als Ursache einer hämorrhagischen Diathese auftreten. Die Erkrankungen sind häufig schwierig zu diagnostizieren und es gelingt oftmals nicht, sie einem klassifizierten Krankheitsbild zuzuordnen. Angeborene Störungen der Thrombozyten, insbesondere ohne Erniedrigung der Thrombozytenzahl auf unter 100.000/ μ l, bleiben häufig bis zum Eintritt von Blutungssymptomen unentdeckt [1]. Klinische Folge einer Störung der Thrombozyten 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 wenige für die klinische Praxis. Die Auswahl der Labordiagnostik hängt ganz wesentlich von der Vorgeschichte, klinischen Präsentation und den lokalen Gegebenheiten ab. Eine Diagnosestellung gelingt häufig nur in enger Zusammenarbeit mit spezialisierten hämostaseologischen Zentren und molekulargenetischen Laboren.

2. 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.

3. Einleitung

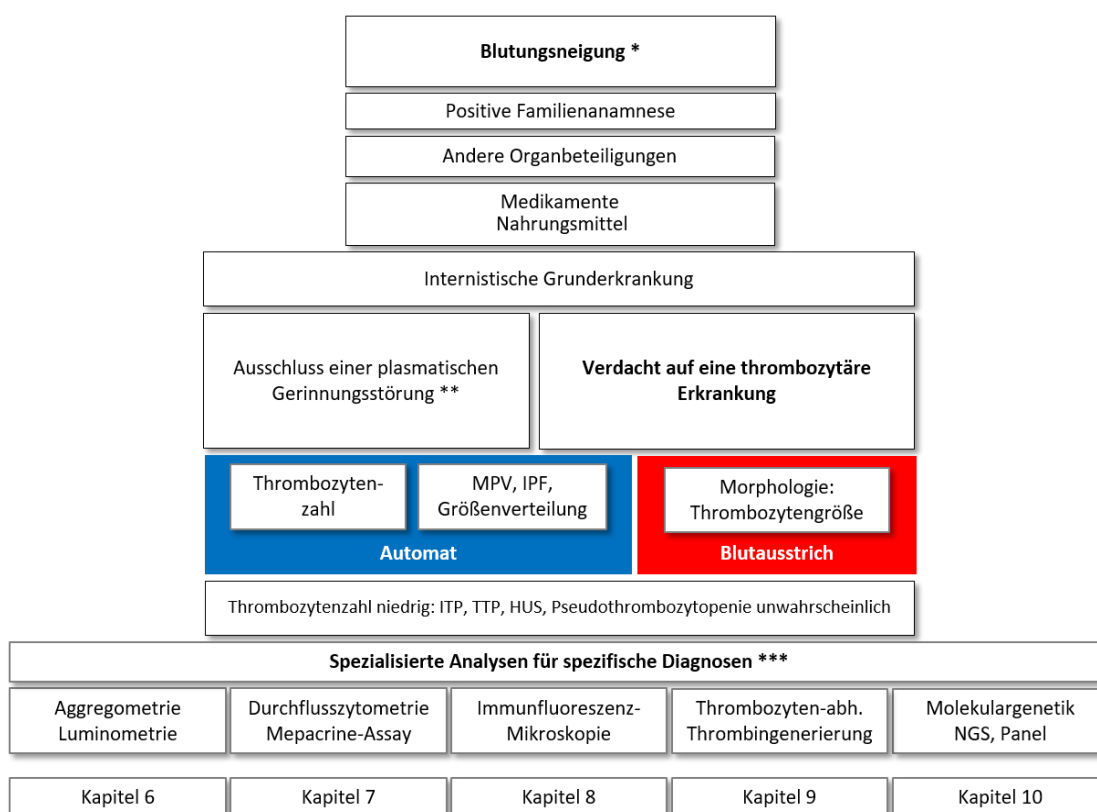
Die vorliegende Leitlinie soll die Diagnose von angeborenen Störungen der Thrombozyten unterstützen. Die diagnostischen Schritte sind individuell anzupassen, abhängig von Familien- und Individualanamnese, vorliegender Grunderkrankung (z.B. einem Symptomenkomplex: Syndrom), Thrombozytenzahl und -morphologie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

Für die häufigsten und gut charakterisierten angeborenen Störungen der Thrombozyten werden weiterreichende Informationen gegeben. Die wichtigsten Untersuchungsmethoden sind im Detail beschrieben.

Die Leitlinie ist nicht geeignet zur Beurteilung von für PatientInnen, die Thrombozyten-aktive Substanzen erhalten oder an erworbenen Störungen der Thrombozytenfunktion oder/ und Thrombozytenzahl leiden.

4. Diagnosealgorithmus

Für die Diagnosestellung hat sich die Verwendung eines Algorithmus bewährt (Abbildung 1).



* Verwendung eines standardisierten Blutungsfragebogen (ISTH BAT u.a.) wird empfohlen.

** Insbesondere auszuschließen sind: von Willebrand Erkrankung, Einzelfaktormangel (Hämophilie A/B u.a.), Hyperfibrinolyse.

*** Auswahl der Methoden: individuell; Molekulargenetik ist als alleinige diagnostische Maßnahme nicht empfohlen.

Abbildung 1: Diagnosealgorithmus zur Unterstützung einer rationalen Herangehensweise bei Blutungsneigung und Verdacht auf eine angeborene Erkrankung der Thrombozyten. Abkürzungen: Mittleres Plättchenvolumen (MPV), Immature Plättchenfraktion (IPF), Immuntrombozytopenie (ITP), Thrombotisch-thrombozytenische Purpura (TTP), Hämolytisch urämisches Syndrom (HUS).

4.1. Klinische Bewertung und Anamnese

- **Welche klinischen Merkmale sind charakteristisch für primäre Hämostasestörungen, einschließlich angeborenen Thrombozytenfunktionsstörungen (IPDs)?**

Primäre Hämostasestörungen, zu denen auch Thrombozytenfunktionsstörungen zählen, sind durch eine mukokutane Blutungsneigung gekennzeichnet. Typisch ist die Neigung zu Menorrhagien, Epistaxis, kutanen Hämatomen und Petechien. Angaben zur Familien- und Individualanamnese sind wichtig. Zur standardisierten Beurteilung der Blutungsneigung kann die deutsche Übersetzung des pediISTH-BAT (bei Kindern) oder ISTH-BAT (bei Erwachsenen) verwendet werden [2, 3].

- **Kommen angeborene Störungen der Thrombozyten bei anderen und komplexen („syndromalen“) Erkrankungen vor?**

Etwa die Hälfte aller vererbten Thrombozytopenien, sowie einige vererbte Thrombozytopathien, treten bei komplexen Erkrankungen auf, bei denen der angeborene Thrombozytendefekt mit hoher Wahrscheinlichkeit mit klinisch relevanten Veränderungen in anderen Zelltypen und Organen, oder mit der Entwicklung einer neoplastischen Erkrankung, verbunden ist [4-9]. Diese wurden von der WHO als myeloische Neoplasien mit Keimbahnprädisposition und vorbestehenden Thrombozytenstörungen, einschließlich solcher, die sich mit molekularen Varianten im Ankyrin-Repeat-Domain-26-Gen (ANKRD26) oder in den Transkriptionsfaktoren ETV6 und RUNX1 entwickeln, definiert [10].

Die Variabilität an Symptomen, die im Rahmen dieser komplexen Erkrankungen auftreten können, ist breit und reicht von kardialen und renalen Malformationen, Skelettanomalien, Entwicklungsverzögerung, Hypercholesterinämie, Arteriosklerose, usw. bis zur malignen Entartungsprädisposition [9].

- **Welche komplexen („syndromalen“) Erkrankungen verdienen besondere Aufmerksamkeit?**

In folgenden sind wichtige und klassische komplexe Erkrankungen („Syndrome“) aufgeführt, die mit Störungen der Thrombozyten assoziiert sind [9, 11]. Dabei können abhängig vom Subtyp (z.B. beim Hermansky-Pudlak-Syndrom) oder von der Lokalisation der pathogenen Variante im Gen (z.B. im MYH9-Gen) unterschiedliche Symptome mit unterschiedlicher Ausprägung vorliegen.

- **ARC-Syndrom (Arthrogryposis multiplex congenita):** Renale Funktionsstörung und Cholestase
- **Chediak-Higashi-Syndrom:** Immundefekt, okulokutaner Albinismus, neurologische Auffälligkeiten
- **DIAPH1-assoziierte Thrombozytopenie:** Hörverlust, Immundefekt
- **Familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose:** Immundefekt
- **GATA1-bedingte Thrombozytopenie (GATA1-RT):** Thalassämieähnliche, dyserythropoetische Anomalien
- **Griscelli-Syndrom:** Albinismus, Immundefekt
- **Hermansky-Pudlak-Syndrom:** Okulokutaner Albinismus, Lungenfibrose, granulomatöse Kolitis, Immundefekt
- **Leukozyten-Adhäsionsdefekt-III:** Immundefekt
- **MYH9-assoziierte Makrothrombozytopenie:** Katarakt, Hörstörung, Nephropathie
- **Paris-Trousseau-Syndrom, Jacobsen-Syndrom:** Je nach Größe der Deletion Entwicklungsverzögerungen, Herzfehlbildung, geistige Retardierung, Veränderungen der Gesichtsmorphologie
- **TAR-Syndrom:** Bilaterale Radiusaplasie, renalen und kardialen Fehlbildungen
- **Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS):** Ekzeme, Kuhmilchallergie, Immundefekt

Verschiedene Datenbanken stehen zur Verfügung, bei denen Angaben zum Phänotyp bei komplexen Erkrankungen abgefragt werden können: OMIM (<https://www.omim.org/>), orphanet (<https://www.orpha.net/de>).

- **Welche diagnostischen Fragebögen (und Scores) sind zur Beurteilung der Blutungsneigung bei Patienten mit Störungen der Thrombozytenfunktion am besten geeignet, und wann sollte ihre Anwendung in der klinischen Praxis erfolgen?**

Derzeit wird eine Vielzahl verschiedener Blutungsfragebögen genutzt, um Blutungshäufigkeit und – schwere systematisch zu erfassen. Der Vorteil dieser Werkzeuge besteht im Wesentlichen darin, in klinischen Studien oder in der klinischen Praxis standardisiert und umfassend Blutungsereignisse zu dokumentieren. Allerdings ist der diagnostische Wert für die Untersuchung von PatientInnen mit Verdacht auf angeborene Gerinnungsstörung für die meisten Fragebögen begrenzt [12]. Der Blutungsscore der Internationalen Gesellschaft für Thrombose und Hämostase, der ISTH-BAT Score, wurde spezifisch für die Diagnose primärer Hämostasestörungen entwickelt und in verschiedenen Patientengruppen evaluiert [3, 13, 14]. Darüber hinaus wurde der Score bereits wiederholt bei

pädiatrischen PatientInnen mit Störungen der primären Hämostase validiert. Bei Kindern ist ein pedISTH-BAT Score > 2, bei Männern ein ISTH-BAT Score > 4, und bei Frauen > 6 als positiv zu bewerten [15]. Der ISTH-BAT hat sich zum Screenen von erwachsenen PatientInnen mit Verdacht auf schwere Thrombozytenfunktionsstörung als sensitiv und zuverlässig gezeigt [16]. Bei pädiatrischen PatientInnen ist der ISTH-BAT nur bedingt geeignet, um Thrombozytenfunktionsstörungen zu diagnostizieren oder auszuschließen. Da Kinder generell keine oder wenige Blutungsgelegenheiten, wie operative Eingriffe oder Verletzungen erlebt haben, nehmen einzelne Blutungsereignisse einen erheblichen Einfluss auf die kumulative Punktzahl. Das führt sowohl zu falsch positiven als auch falsch negativen Befunden und ist damit insbesondere für die Diagnostik milder Störungen der Thrombozyten bedingt oder nicht hilfreich [17].

Bei Mädchen und Frauen mit Menorrhagien kann zusätzlich das Pictoral Blood Assessment Chart (PBAC) herangezogen werden [18]. Der diagnostische Wert für das Vorliegen einer Thrombozytenerkrankung wurde bislang allerdings nicht evaluiert.

- **Welche Medikamentenlisten, Genussmittel und anderes sollen abgefragt werden?**

Thrombozytenfunktionshemmer (derzeitig verfügbar: Tabelle 1; in Phase 3 Zulassungsstudien: Tabelle 10 im Anhang der Langversion), aber auch zahlreiche andere Medikamente, Nahrungs- und Genussmittel sowie Nahrungsergänzungsstoffe (Tabelle 9 in der Langversion) beeinflussen in unterschiedlichem Ausmaß Thrombozyten [19-21].

Tabelle 1: Auswahl derzeitig verfügbarer Thrombozytenfunktionshemmer (Anti platelet drugs) [21, 22].

<i>Wirkstoff</i>	<i>Angriffspunkt</i>	<i>Zeit bis zur Erholung der Thrombozytenfunktion nach Absetzen</i>
ACETYLSALICYL-SÄURE (ASS)	Cyclooxygenase-1 plus zusätzl. Effekte wie die Bildung von Lipoxinen	5 - 7 Tage
CLOPIDOGREL	ADP-Rezeptor P2Y ₁₂	7 - 10 Tage
PRASUGREL	ADP Rezeptor P2Y ₁₂	7 - 10 Tage
TICAGRELOR	ADP Rezeptor P2Y ₁₂	3 - 5 Tage
CANGRELOR	ADP-Rezeptor P2Y ₁₂	30 - 60 min

CILOSTAZOL	PDEIII	12 - 16 h
ILOPROST	PGI ₂ Analog	-
EPTIFIBATID	GPIIb/IIIa Antagonist	4-8 h
TIROFIBAN	GPIIb/IIIa Antagonist	4-8 h

4.2. Laboruntersuchungen für Thrombozytenfunktionsstörungen

- **Welche Laboruntersuchungen sollten bei Verdacht auf IPD durchgeführt werden?**

Bei Verdacht auf eine Störung der Thrombozyten soll das Blutbild analysiert werden. Neben der quantitativen Bestimmung der Blutzellen, einschließlich der Retikulozytenzahl, soll eine an den meisten Analysegeräten verfügbare Thrombozytengrößenverteilungskurve, die Bestimmung des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) [23] und eine Quantifizierung der immaturren Plättchenfraktion (IPF) durchgeführt werden [24]. Die IPF soll in Bezug auf das jeweilige MPV interpretiert werden [25]. Die mikroskopische Beurteilung der Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten ist in der Lichtmikroskopie an gefärbten Blutaussstrichen durchzuführen.

- **Welche Methoden zur Untersuchung von Thrombozytenfunktionen sind für die Diagnose und Klassifizierung von IPDs am zuverlässigsten?**

Für die Diagnose und Klassifizierung von angeborenen Erkrankungen der Thrombozyten sind Methoden wie die **Thrombozytenaggregometrie** (Kapitel 6 Aggregometrie), **Durchflussszytometrie** (Kapitel 7 Durchflussszytometrie), **Immunfluoreszenzmikroskopie** (Kapitel 8 Immunfluoreszenzmikroskopie) und **Molekulargenetik** (Kapitel 10 Molekulargenetische Methoden), besonders zuverlässig (Abbildung 2) [26]. Diese Techniken bieten umfassende Einblicke in die verschiedenen Aspekte der Thrombozytenfunktion und -aktivierung und sind anerkanntermaßen für die Identifizierung spezifischer Pathologien im Rahmen von angeborenen Störungen der Thrombozyten geeignet.

Die **Thrombozyten-abhängige Thrombinbildung**, umfasst Verfahren wie den „Thrombin Generation Assay“ (TGA), und die „Calibrated Automated Thrombography“ (CAT): Kapitel 9.1. Die Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung basiert auf der fluorimetrischen Quantifizierung des Endogenen

Thrombinpotenzials (ETP) im Plättchen-reichen Plasma und spiegelt die Gesamtmenge des gebildeten Thrombins im zeitlichen Verlauf wider [27]. Angeborene Defekte der Phosphatidylserin - Oberflächenpräsentation (z.B. Scott Syndrom, OMIM #262890; Stormorken Syndrom, OMIM #185070) oder andere Störungen, die die Bindung von Gerinnungsfaktoren an aktivierte Thrombozyten betreffen, können durch diese Methode erkannt werden [28, 29].

Von den individuell eingesetzten und seltenen Methoden ist die **Elektronenmikroskopie (ELMI)** oder die suprauflösende Mikroskopiemethode (Super-resolution fluorescence microscopy) [30, 31], mit der man intrazelluläre Strukturen der Thrombozyten, einschließlich der kleinen dichten Körperchen (dense bodies) und andere Moleküle, immunzytochemisch detektieren kann, grundsätzlich als diagnostisches Verfahren anerkannt. Diese Methoden werden nur an sehr wenigen Zentren durchgeführt.

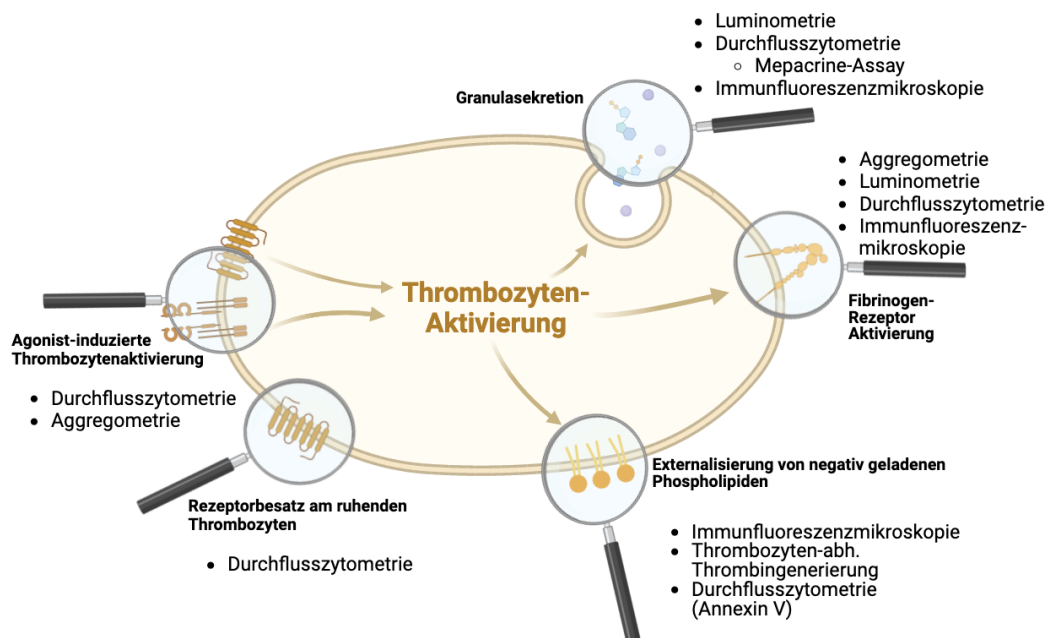


Abbildung 2: Übersicht von wichtigen Testmethoden zur Diagnose von Störungen der Thrombozyten-Aktivierung. Die Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

- **Welche Rolle spielen molekulargenetische Analysen bei der Diagnose von IPDs, und wie sollten sie in die diagnostische Vorgehensweise integriert werden?**

Molekulargenetische Analysen sind entscheidend für Diagnosestellung und -sicherung, insbesondere bei unklaren Fällen oder bei spezieller Verdachtsdiagnose. Sie sollen integraler Bestandteil der Diagnostik sein, sind aber nur zusammen mit anderen Untersuchungen, die den Phänotyp der Blutung oder die Funktion der Thrombozyten charakterisieren, klinisch aussagekräftig.

- **Welche diagnostischen Tests können mit versendeten Proben erfolgen?**

Die meisten Blutbildanalysen, einschließlich Blutausstrichbeurteilung, die Immunfluoreszenzmikroskopie an Blutausstrichen, und sämtliche molekulargenetischen Tests können an versendeten Probenmaterial durchgeführt werden. Hierfür ist das gesonderte Kapitel 5.3 Probentransport/-versand in der Langversion, bzw. spezifische Anforderungen an Probenhaltung und -transport zu beachten.

- **Welche Methoden sind zur Untersuchung von Störungen der Thrombozytenfunktion und Diagnose und Klassifizierung von IPDs nur eingeschränkt geeignet?**

Die Bestimmung der Verschlusszeiten mit dem **PFA 100/200®** (Innovance, Siemens) ist nur eingeschränkt für die Beurteilung der Thrombozytenfunktion geeignet [32-34]. Voraussetzung für die Durchführung ist eine Thrombozytenzahl $> 100.000/\mu\text{l}$ und ein Hämatokrit (Hkt) über 30 %. Verkürzte Verschlusszeiten werden durch Hämolyse, Hkt $> 50\%$ oder Thrombozyten $> 500.000/\mu\text{l}$ verursacht. Die Verschlusszeiten des PFA 100/200® sind bei schweren Störungen der Thrombozytenfunktion, wie bei der Thrombasthenie Glanzmann und beim Bernard-Soulier Syndrom sowie bei der von Willebrand Erkrankung verlängert. Verlängerte Verschlusszeiten finden sich auch bei Ikterus, Hämolyse, Anämie (Hkt $< 35\%$) und Thrombozytopenien. Dagegen ist bei einem Normalbefund das Vorliegen einer Thrombozytenfunktionsstörung oder einer anderen hämorrhagischen Gerinnungsstörung 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. Ein pathologischer Befund bedarf immer einer weiteren Abklärung.

- **Welche Methoden sind zur Untersuchung von Störungen der Thrombozytenfunktion und Diagnose und Klassifizierung von IPDs nicht geeignet und sollten vermieden werden?**

Die **in vivo-Blutungszeit** wird zur Beurteilung von Störungen der Thrombozyten nicht empfohlen.

Ungeeignete Methoden zur Diagnose von angeborenen Thrombozytenstörungen sind der **Rumpel-Leede-Test**, der **Prothrombinverbrauchstest** und der **Thrombusretraktionstest**. Während die **Thrombelastographie** (z.B. ROTEM®) einen Stellenwert als *Point-of-Care* Methode zur Beurteilung der Gerinnselbildung hat, ist sie zur Diagnose von angeborenen Störungen der Thrombozytenfunktion ungeeignet.

Das für das *drug-monitoring* entwickelte halbautomatische System **VerifyNow®** (Instrumentation

Laboratory) und das **Impact-R®** (Matis Medical) sind für die Diagnose von angeborenen Störungen der Thrombozyten nicht geeignet.

Handlungsempfehlungen 1: Diagnosealgorithmus

- | | |
|----|---|
| ↑↑ | <ul style="list-style-type: none">➤ Zur Beurteilung der Blutungsneigung soll ein standardisierter Fragebogen eingesetzt werden.
Konsensstärke: 96 %; Neu (2024)➤ Bei Verdacht auf IPD soll zunächst ein Blutbild mit Differentialblutbild, einschließlich Thrombozytengrößenverteilung, mittleres Thrombozytenvolumen (MPV) und soweit verfügbar Quantifizierung der immaturen Plättchenfraktion (IPF), durchgeführt werden.
Konsensstärke: 100 %; Neu (2024)➤ Eine mikroskopisch-morphologische Zellbeurteilung an routinemäßig gefärbten Blutaussstrichen soll durchgeführt werden.
Konsensstärke: 100 %; Neu (2024)➤ Bei wiederholter, klinisch relevanter, nicht anderweitig erklärbarer Blutungsneigung soll eine erweiterte Gerinnungsdiagnostik, einschließlich der hier angeführten Thrombozytentests, durchgeführt werden.
Konsensstärke: 91 %; Neu (2024) |
| ↑ | <ul style="list-style-type: none">➤ Der pedISTH-BAT (für Kinder) oder ISTH-BAT (für Erwachsene) sollte verwendet werden.
Konsensstärke: 86 %; Neu (2024)➤ Ein negativer Blutungs-Score in standardisierten Fragebögen schließt eine leichte/moderate hämorrhagische Gerinnungsstörung nicht aus. Daher sollten bei entsprechendem Verdacht weitere Untersuchungen, zu denen auch eine thrombozytäre Diagnostik zählt, erwogen werden.
Konsensstärke: 95 %; Neu (2024)➤ Bei PatientInnen mit Störungen der Thrombozytenzahl und -funktion sollten mögliche komplexe („syndromale“) Erkrankungen in Betracht gezogen werden.
Konsensstärke: 100 %; Neu (2024)➤ Für die Diagnose und Klassifizierung angeborener Störungen der Thrombozyten sollten Methoden wie die Aggregometrie, Luminometrie, Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenzmikroskopie, Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung ergänzt durch Molekulargenetik verwendet werden.
Konsensstärke: 100 %; Neu (2024)➤ Molekulargenetische Analysen sollten in begründeten Verdachtsfällen und zur Bestätigung einer Diagnose durchgeführt werden.
Konsensstärke: 100 %; Neu (2024) |
| ↓ | <ul style="list-style-type: none">➤ Die <i>in vitro</i> Blutungszeit wie der PFA 100/200®, die <i>in vivo</i>-Blutungszeit, der Rumpel-Leede-Test, der Prothrombinverbrauchstest, der Thrombusretraktionstest, viskoelastische Testverfahren sowie das VerifyNow® und das Impact-R® sollten für die Diagnose von IPDs nicht eingesetzt werden.
Konsensstärke: 91 %; Neu (2024) |

5. Präanalytik

Handlungsempfehlungen 2: Präanalytik

↑↑	➤ Medikamente und Nahrungs(ergänzungs)mittel, die die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen, sollen, soweit medizinisch vertretbar, rechtzeitig vor der Thrombozytenfunktionsanalytik abgesetzt bzw. pausiert werden. Konsensstärke: 95 %; Neu (2024) ➤ Bei der Blutabnahme für die Thrombozytenfunktionsanalytik sollen Schaumbildung und zu schnelles Abziehen vermieden werden. Konsensstärke: 100 %; Neu (2024) ➤ Blutproben sollen bei Raumtemperatur ohne Schütteln und mechanischen Stress transportiert werden. Konsensstärke: 100 %; Neu (2024) ➤ Der Versand von Blutproben für die durchflusszytometrische Analyse soll nur eingeschränkt, nach Absprache mit dem analysierenden Labor, erfolgen. Konsensstärke: 100 %; Neu (2024) ➤ Die aggregometrische Analyse einer Blutprobe soll vier Stunden nach Blutabnahme abgeschlossen sein. Konsensstärke: 100 %; Neu (2024)
↓↓	➤ Die Blutabnahme für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik soll nicht direkt nach Venenpunktion erfolgen. Konsensstärke: 90 %; Neu (2024) ➤ Unter- und überfüllte Blutabnahmeröhrchen mit Citrat als Antikoagulans sollen nicht weiterverarbeitet werden. Konsensstärke: 100 %; Neu (2024)
↑	➤ Für durchflusszytometrische Untersuchungen sollte zur Qualitätskontrolle eine gleichbehandelte Gesundspenderprobe mitversendet und mituntersucht werden. Konsensstärke: 90 %; Neu (2024)

6. Aggregometrie

Die Aggregometrie ist die Standarduntersuchung der Thrombozytenfunktion, die mit Hilfe verschiedener Agonisten im antikoagulierten Vollblut und spezifisch im plättchenreichen Plasma („platelet-rich plasma“; PRP) erfolgt.

6.1. Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)

Seit der ersten Beschreibung der Thrombozytenaggregationstestung hat sich die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born kaum verändert und wird noch heute als Referenzmethode durchgeführt [35-38].

1. Prinzip

- Kontinuierliche Registrierung der im Verlauf der Aggregation sich ändernden Transmission langwelligen 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.

2. Methodik und Anwendbarkeit

Die Verwendung eines Panels von mindestens drei bis vier verschiedenen Agonisten, wie ADP, Kollagen, Arachidonsäure, Epinephrin, PAR-1 Agonist und Ristocetin tragen zu einer umfassenden Bewertung einer angeborenen Thrombozytenstörung bei.

Adenosindiphosphat (ADP)

- Defekt des P2Y₁₂-Rezeptors inklusive Gi-like Defekt
- Thrombasthenie Glanzmann und Glanzmann-ähnliche Defekte (LAD-III, CalDAG-GEFI)
- δ -storage pool disease (SPD)
- Thromboxan-Synthase Defekt
- COX-1-Mangel
- Mangel an zytosolischer Phospholipase A₂
- Thromboxan-Rezeptor-Defekt

Arachidonsäure

- Thromboxan-Synthase Defekt
- COX-1-Mangel
- Thromboxan-Rezeptor-Defekt
- Thrombasthenie Glanzmann und Glanzmann-ähnliche Defekte (LAD-III, CalDAG-GEFI)
- δ -SPD
- P2Y₁₂-Rezeptordefekt

Kollagen

- Defekt des GPVI-Rezeptors (niedrige Konzentration)
- Thrombasthenie Glanzmann und Glanzmann-ähnliche Defekte (LAD-III, CalDAG-GEFI)
- P2Y₁₂-Rezeptordefekt

- δ -SPD (niedrige-mittlere Konzentration)
- Thromboxan-Synthase Defekt
- COX-1-Mangel
- Mangel an zytosolischer Phospholipase A2
- Thromboxan-Rezeptor-Defekt

Epinephrin

- α 2-adrenerger Rezeptordefekt inklusive Gi-like Defekt
- Thrombasthenie Glanzmann und Glanzmann-ähnliche Defekte (LAD-III, CalDAG-GEFI)
- δ -SPD
- P2Y12-Rezeptordefekt
- Thromboxan-Synthase Defekt
- COX-1-Mangel
- Mangel an zytosolischer Phospholipase A2
- Thromboxan-Rezeptor-Defekt
- Québec-Thrombozytenstörung (QPD)

Ristocetin

- Bernard-Soulier Syndrom
- Von-Willebrand Erkrankung (VWD) vom Thrombozytentyp (Platelet-type VWD) und vom Typ 2B

Differentialdiagnostisch erkennt man eine *Thrombasthenie Glanzmann und Glanzmann-ähnliche Defekte* durch die gestörte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten induziert durch physiologische Agonisten mit der Ausnahme von Ristocetin. Demgegenüber zeigen Thrombozyten von PatientInnen mit *Bernard-Soulier Syndrom* typischerweise eine gestörte Ristocetin-induzierte Thrombozyten-Agglutination aber eine unauffällige Aggregation auf alle anderen Agonisten.

Bei dem *Platelet-type VWD* zeigen unter-schwellige Ristocetin-Konzentrationen eine erhöhte max. Aggregation im Vergleich zu Normalprobanden. Da dieses Muster ebenfalls bei der VWD vom Typ2B zu beobachten ist, kann differentialdiagnostisch ein Plasmatauschversuch durchgeführt werden, um zu entscheiden, ob der VWF im Plasma (VWD 2B) oder der VWF-Rezeptor GPIb auf den Thrombozyten pathologisch überreagiert (*Platelet-type VWD*).

Die LTA eignet sich nur bedingt zur Detektion eines α - oder δ -SPD, da sie nicht spezifisch und nur indirekt diese Defekte erkennen kann. Besonders bei Patienten mit δ -SPD ist die LTA nur sensitiv, wenn man auch niedrige-mittlere Konzentrationen der Agonisten ADP und Kollagen testet, da hohe Konzentrationen den Defekt verdecken können.

Bei allen genannten Thrombozytopathien sollten entsprechende durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bestätigung und Spezifizierung der Erkrankung durchgeführt werden (siehe Kapitel 7 Durchflusszytometrie). Bei strukturellen Defekten der Thrombozyten, wie z. B. quantitativer Rezeptordefekt, SPD, sollte auch eine Immunfluoreszenzmikroskopie zur Bestätigung durchgeführt werden.

Limitierung: Thrombozytopenie: niedrige Thrombozytenzahlen sind häufig an das Vorliegen von vergrößerten Thrombozyten assoziiert. Diese setzen sich bei der Gewinnung von PRP zusätzlich mit den Erythrozyten unten ab und führen zur fehlenden Anreicherung im PRP.

Störgrößen: Hyperbilirubinämie, Hyperlipidämie, Hämolyse

6.2. Impedanzaggregometrie (IA) im Vollblut – Whole Blood Aggregometry (WBA)

Die Impedanzaggregometrie (IA) ist eine schwierig zu standardisierende Variante der Aggregometrie bei der eine mit Citrat- oder Hirudin-antikoagulierte Vollblutprobe analysiert wird. Die Vollblutaggregometrie ist technisch einfach, denn der Agonist wird direkt zur Probe hinzugefügt und der einsetzende Impedanzzanstieg aufgezeichnet. Diese Methode findet vorwiegend Verwendung als *point-of-care* in semi-automatischen Geräten [39]. Untersuchungen im Vollblut sind deutlich insensitiver als die LTA im PRP. Daher ist die IA zum sicheren Ausschluss einer Thrombozytenfunktionsstörung nicht geeignet [40, 41].

1. 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 die Elektroden, welche als zeitliche Funktion der Impedanzzunahme aufgezeichnet wird.

2. Methodik

Agonisten (Chronolog Aggregometer®)

- Gleiches Prinzip wie bei LTA.

Agonisten (Multiplate®)

Für das Multiplate® werden vom Gerätehersteller folgende Tests angeboten (Online Produktinformation von ROCHE, Stand 10.07.2024):

Test	Beschreibung
TRAP-Test	Abklärung der Thrombozytenstimulation über den Thrombinrezeptor (unter Verwendung des Thrombinrezeptor aktivierenden Peptids-6, TRAP-6); sensitiv auf GP-IIb/IIIa-Antagonist-Reagenz.
ASPI-Test	Abklärung der Cyclooxygenase-abhängigen Plättchenaggregation (unter Zugabe von Arachidonsäure); sensitiv auf ASS, NSAIDs und andere Inhibitoren der Plättchen-Cyclooxygenase.
ADP-Test	ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung für den sensitiven Nachweis der Wirksamkeit von Clopidogrel, Prasugrel und anderen ADP-Rezeptorantagonisten.
ADP-Test HS	Prostaglandin E1 Reagenz - Zusatzreagenz zum ADP-Test. Die Zugabe des endogenen Inhibitors PGE1 erhöht die Sensitivität dieses Tests gegenüber Clopidogrel, Prasugrel und anderen ADP-Rezeptorantagonisten.
GPIIb/IIIa-Antagonist-Reagenz	Inhibitor des thrombozytären GP-IIb/IIIa-Antagonist-Reagenz. Die Zugabe von GP-IIb/IIIa-Antagonist-Reagenz zur Blutprobe führt zu einer stark verminderten Aggregation im TRAPtest.

6.3. Luminometrische Bestimmung der ATP-Freisetzung

Mit dieser durch Lundin *et al.* erstmals vorgestellten Methode wird die thrombozytäre ATP-Freisetzung gemessen, wodurch Sekretionsdefekte der δ -Granula (Storage-Pool-Defekt) identifiziert werden können [42, 43].

1. 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.

6.4. Automatisierte Lichttransmissionaggregometrie

Mittlerweile werden von größeren Diagnostika-Herstellern Messsysteme angeboten, welche die Pipettierschritte (PRP und PPP-Transfer, Verdünnung und Zugabe der unterschiedlichen Induktoren) alleinstehend oder in Gerinnungsanalysatoren integriert anbieten, wobei sich die automatisierten Prozesse gerätespezifisch unterscheiden.

Handlungsempfehlungen 3: Aggregometrie

↑↑	➤ Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) soll zur Diagnose von IPDs verwendet werden. Konsensstärke: 90 %; Neu (2024) ➤ Bei der LTA soll neben der max. Aggregation (%) auch der Kurvenverlauf (lag-time, Aggregationsgeschwindigkeit, Desaggregation) bewertet werden. Konsensstärke: 100 %; Neu (2024) ➤ Pathologische Aggregometrie-Befunde soll in einer separaten Folgeuntersuchung validiert werden. Konsensstärke: 94 %; Neu (2024)
↑	➤ Die Luminometrie sollte bei Verdacht auf eine Storage-Pool-Erkrankung (δ-Granula) verwendet werden. Konsensstärke: 84 %; Neu (2024) ➤ Die LTA sollte mit mindestens drei Thrombozyten-Aktivatoren und Ristocetin durchgeführt werden. Konsensstärke: 76 %; Neu (2024) ➤ Die Präanalytik-Protokolle sollten schriftlich festgelegt sein und folgende Punkte umfassen: Zeitpunkt der Blutabnahme, Dauer und Art des Probenverkehrs, maximale Zeit zwischen Abnahme und Zentrifugation, Ruhezeit zwischen Zentrifugation und Messung. Konsensstärke: 75 %; Neu (2024) ➤ Die LTA sollte der Impedanzaggregometrie im Vollblut (WBA) gegenüber bevorzugt werden. Konsensstärke: 100 %; Neu (2024)

7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist insbesondere in der immunologischen Zelldiagnostik etabliert, sie eignet sich aber auch für die Immunphänotypisierung und Funktionsanalyse von Thrombozyten [13, 44].

Insbesondere Erkrankungen der Thrombozyten, die mit dem Verlust eines oder mehrerer Oberflächenrezeptoren einhergehen (z. B. Thrombasthenie Glanzmann, Bernard-Soulier Syndrom) können mit Hilfe der Durchflusszytometrie diagnostiziert werden. Weiterhin lassen sich Storage-Pool-Erkrankungen, d.h. α - / δ - Granuladefekte, durchflusszytometrisch identifizieren [13, 44, 45]. Die besonderen methodischen Vorteile liegen in der geringen benötigten Blutmenge, Durchführbarkeit auch bei ausgeprägter Thrombozytopenie und Detektion von spezifischen Funktionsdefekten der Thrombozyten [46, 47]. Allein und in Kombination mit der LTA stellt die Durchflusszytometrie eine stark diskriminative Methode zur Detektion von angeborenen Thrombozytenfunktionsstörungen dar [48-50].

1. Prinzip

Die Durchflusszytometrie erlaubt es die Größe und Granularität von Thrombozyten aufgrund ihrer lichtstreuenden Eigenschaften zu bestimmen. Darüber hinaus können konstitutiv exprimierte Oberflächenrezeptoren durch spezifische Farbstoff-gekoppelte monoklonale Antikörper markiert und deren Expression gemessen werden. Aussagen über die Reaktivität von Thrombozyten lassen sich durch funktionelle Analysen machen, die nach standardisierter Aktivierung erfolgen. Dabei werden unter anderem auch intrinsische Granulainhaltsstoffe und -membranmarker (z.B. CD62P, CD63) quantifiziert. Technisch ist die Durchflusszytometrie eine Einzellanalyse, die daher auch die Analyse von thrombozytopenen Proben und die Auswertung verschiedener Thrombozytensubpopulationen (wie z.B. sog. prokoagulative Thrombozyten) erlaubt.

2. Methodik und Anwendbarkeit

Antikörper

Empfohlen werden Antikörper gegen folgende Oberflächenrezeptor-Antigene [45, 51]:

CD41a	Fibrinogenrezeptor (GPIIb/IIIa) - gesamter Komplex (stöchiometrisch, z.B. Klon P2)
CD41b	Fibrinogenrezeptor (GPIIb)
CD61	Fibrinogenrezeptor, Integrin beta3 (GPIIIa)
CD42a/b/c	von Willebrand Faktor Rezeptor (GPIX/Ib α /Ib β)
GPVI	Kollagenrezeptor
CD49b/CD29	Kollagenrezeptor (GPIa/IIa)

Eine fehlende oder verminderte Expression von Oberflächenrezeptoren bei der Thrombasthenie Glanzmann (CD41/CD61), des Bernard-Soulier-Syndroms (CD42a-c) und beim Kollagen-Rezeptormangel (GPVI; CD49b/CD29) wird durch die Durchflusszytometrie zuverlässig detektiert [52].

CD42d gesheddetes Glykoprotein V. hemmt einige, insb CD42b/ GPIb alpha abhängige Thrombozytenfunktionen.

Glanzmann-Diagnostik¹: Thrombozyten-Konzentration normal, Größe (*Forward Scatter*) normal.

CD41 heavy and light chain, CD61: vermindert

CD42a/b/c/d: normal

Aktivierungsmarker PAC-1 (als Alternative FITC-/Al488-markiertes Fibrinogen statt PAC-1): vermindert

Glanzmann- Typ I: CD41a < 10 % (Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa homozygot verändert)

Glanzmann- Typ II: CD41a >10 %

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

CD42a (GPIX): vermindert

CD42b (GPIb α): vermindert

CD42c (GPIb β): 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.

Empfohlen werden folgende Antikörper gegen aktivierungsabhängig exprimierte Antigene [45, 46, 53]:

Messung nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP, GPVI-Agonist (CRP-XL oder Convulxin, kein fibrilläres Kollagen wie bei der LTA verwenden), TRAP-6 (Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid; Sequenz: SFLLRN)

¹ Vereinfachte Klassifizierung in Typ I und Typ II

CD62P	P-Selectin (α -Granula)
CD63	GP-53 (erkennt sowohl lysosomale als auch δ -Granula)
CD107a/b	LAMP-1/2 (lysosomale Granula)
PAC-1	aktivierter GPIIb/IIIa Komplex-Fibrinogenrezeptor (Inside-out-signaling) gemessen durch den spezifischen IgM-Antikörper PAC-1
Fibrinogen-FITC/-Al488	indirekter Marker für aktivierter GPIIb/IIIa Komplex-Fibrinogenrezeptor (Inside-out-signaling)

Mepacrine-Assay

Zur isolierten Untersuchung der δ -Granula eignet sich der Mepacrine-Assay [54, 55]. Mepacrine ist ein fluoreszierendes Antibiotikum, das spezifisch in den δ -Granula der Thrombozyten eingelagert wird. Nach Stimulation der Thrombozyten mit Agonisten und der Freisetzung aus den δ -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 δ -Granula. Viele Laboratorien verwenden Endpunkt-Messungen (unbeladen, beladen-unstimuliert, nach Zugabe des Agonisten); es sind aber auch kinetische Messungen möglich. Der Mepacrine-Assay ist darüber hinaus ein äußerst robuster Test und die einzige funktionelle Analyse, die auch noch 24 Stunden nach Blutentnahme und Versand erfolgen kann (siehe Kapitel 5 Präanalytik der Langversion).

Agonisten für aktivierungsabhängige Marker

Der Einsatz verschiedener Agonisten ermöglicht es, unterschiedliche Rezeptoren- bzw. deren Signalkaskade zu untersuchen. Die Verwendung unterschiedlicher (sub)optimaler Agonistenkonzentrationen erlaubt es außerdem, einen Schwellenwert der Thrombozytenreaktivität, insbesondere durch Dosisescalation zu bestimmen. Collagen-related peptide (CRP-X_L) und Convulxin werden zunehmend als Kollagenrezeptor GPVI-Agonist verwendet, wobei hier eine Qualitätssicherung erforderlich ist, da die Potenz des Agonisten stark Chargen-abhängig ist. Die gleichzeitige Stimulation von Thrombozyten durch eine optimale Dosis ADP und U46619 sollte zu einer maximalen Aktivierung führen und dient somit als Positivkontrolle.

Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid-6 (TRAP-6): Thrombinrezeptor-Stimulierbarkeit (suboptimale und optimale Dosis zur Beurteilung einer Voraktivierung), Formulierungsabhängige Titrierung wichtig!
Vollblut: 10 - 100 μ M

Adenosin-di-phosphat (ADP): ADP-Rezeptor-Stimulierbarkeit (suboptimale und optimale Dosis zur Beurteilung einer Voraktivierung): Vollblut: 2 - 10 μ M

Crosslinked collagen-related peptide (CRP-XL); Convulxin: Kollagenrezeptor GPVI-Agonist, Chargin-abhängige Titrierung wichtig! Siehe unten angefügtes Beispielprotokoll.

U46619: Thromboxan-A₂-Rezeptor-Agonist: Vollblut: 2 μ M

Rezeptordefekte des Thrombozyten:

Die Durchflusszytometrie ist eine sensitive Methode zur Detektion von selbst niedrig exprimierten Oberflächenrezeptoren. Sie eignet sich beispielsweise einerseits zur Detektion von hoch-abundanten funktionellen Thrombozytenrezeptoren (CD41a/CD61; CD42a-d; GPVI) bzw. zum Nachweis fehlender/reduzierter Expression von diesen. Andererseits lässt sich mittels Durchflusszytometrie die Expression des schwach exprimierten Stammzellsurrogatmarkers CD34 auf Thrombozyten untersuchen, dessen erhöhte Expression auf Defekte in megakaryozytären Transkriptionsfaktoren hinweist (z.B. GFI1b).

Storage-Pool-Erkrankungen [53]:

Storage-Pool-Erkrankungen sind in der Diagnostik komplex. Quantitative Storage-Pool-Defekte der α -Granula werden durch die Detektion von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit starken Agonisten des Kollagenrezeptors GPVI (CRP-XL oder Convulxin) und des Thrombinrezeptors PAR-1 (TRAP-6) untersucht. Analog werden δ -Storage-Pool-Defekte durch die Oberflächenexpression von CD63 (CAVE: auch Membranmarker für Lysosomen) und der Freisetzung von Mepacrine (Endpunkt oder kinetisch) detektiert. Die Mepacrine-Beladung von unstimulierten Thrombozyten gibt in Kombination mit der CD63-Expression Hinweise auf quantitative oder qualitative Defekte der δ -Granula. Zur Abgrenzung von Defekten der δ -Granula und Lysosomen können Fluorochromgekoppelte Antikörper gegen LAMP-1 und LAMP-2 eingesetzt werden. Die Goldstandardtests für δ -Storage-Pool-Defekte stellen die Luminoaggregometrie (siehe Kapitel 6.3 Luminometrische Bestimmung der ATP-Freisetzung) und die „Whole mount“ Transmissionselektronen-Mikroskopie dar. Obwohl der Mepacrine-Assay zur Unterscheidung von δ -Granula Beladungs- bzw. Entladungs- (oder kombinierten) Defekten als sensitiver Test für eine δ -Storage-Pool-Erkrankung teilweise kontrovers diskutiert wird [53, 56], ist dieser Test in dieser Leitlinie eindeutig empfohlen [57]. Er zeigt einen hohen negativen prädiktiven Wert zum Ausschluss einer δ -SPD [54] und spielt bei thrombozytopenen PatientInnen eine wichtige Rolle, bei denen eine Luminometrie nicht durchgeführt werden kann. Bei PatientInnen mit Verdacht auf einen angeborenen δ -SPD sollten Mehrfachtestungen durchgeführt werden, da dieser Defekt auch erworben sein kann.

Defekte des prokoagulanten Zustands des Thrombozyten:

Angeborene Thrombozyten-Erkrankungen des Ca^{2+} -abhängigen prokoagulanten Zustands (wichtig für die Thrombozyten-abhängige Amplifizierung der Thrombingenerierung und Gerinnung) können durch die Markierung von negativ-geladenen Phospholipiden (z.B. Phosphatidylserin) auf der Thrombozytenoberfläche im Puffer-verdünnten PRP mit Fluorochrom-markiertem Annexin-V detektiert werden. Beim *Scott-Syndrom* z. B. erhält man eine verminderte Annexin-V-Markierung nach Stimulierung mit starken Agonisten wie TRAP-6, GPVI-Agonisten oder in Kombination. Beim *Stormorken-Syndrom* beobachtet man basal schon eine verstärkte Annexin-V- und CD62P-Markierung. Ergänzende Analysen der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung (siehe Kapitel 9.1 Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung) dienen zur Validierung dieser Defekte. Da auch apoptotische Thrombozyten vermehrt Annexin-V binden, sollte zur Abgrenzung von z. B. erworbenen Störungen mit apoptotischen Thrombozyten zusätzlich eine Markierung von CD62P in Kombination mit einem thrombozytenspezifischen Marker (z.B. CD42a, CD41) erfolgen. Prokoagulante Thrombozyten erscheinen für alle drei Marker positiv. Apoptotische Thrombozyten erscheinen für Annexin-V und für den Thrombozytenmarker positiv aber negativ für CD62P [58].

Handlungsempfehlungen 4: Immunfluoreszenzmikroskopie

↑↑	➤ Das Anfertigen von Blutaussstrichen soll nur aus frischem EDTA-Blut (bei Raumtemperatur) erfolgen. Konsensstärke: 100 %; Neu (2024) ➤ Bei Durchführung der Färbung soll immer eine Kontrolle im Labor mitgeführt werden. Konsensstärke: 82 %; Neu (2024)
↑	➤ Die Immunfluoreszenzmikroskopie sollte bei Verdacht auf MYH9-Defekte und Zytoskelettdefekte (β-Tubulin/α-Tubulin und Filamin Defekte) verwendet werden. Konsensstärke: 79 %; Neu (2024) ➤ Die Immunfluoreszenzmikroskopie sollte in Ergänzung oder alternativ zur Durchflusszytometrie bei Verdacht auf Bernard-Soulier Syndrom, Thrombasthenie Glanzmann und Gray-Platelet Syndrom verwendet werden. Konsensstärke: 87 %; Neu (2024)
↓	➤ Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine ergänzende Methode, sie sollte nicht als alleiniger diagnostischer Test eingesetzt werden. Konsensstärke: 91 %; Neu (2024) ➤ Bei Verdacht auf Granuladefekte sollte die Immunfluoreszenzmikroskopie bei Kindern <1 Jahr wegen eingeschränkter Beurteilbarkeit (noch nicht vollständig ausgebildete Granula) nicht durchgeführt werden. Konsensstärke: 95 %; Neu (2024)

8. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie (in Verbindung mit der Lichtmikroskopie) ist für die Diagnose einiger wichtiger angeborener Störungen der Thrombozyten an wenigen Zentren etabliert. Die Methode beruht auf dem Nachweis der charakteristischen Fehlverteilung von Granulainhaltsstoffen, Rezeptorproteinen und Bestandteilen des Zytoskeletts im Blutaussstrich [59-61].

1. Anwendbarkeit

- Thrombozyten-Rezeptoren
- GPIb/IX (Bernard-Soulier Syndrom)
- GPIIb/IIIa (Thrombasthenie Glanzmann)
- Zytoskelettproteine
- Nicht-muskuläres Myosin IIa (z.B. MYH9-Makrothrombozytopenien)
- Filamin A (z.B. Filamin assoziierte Makrothrombozytopenie)
- β 1-Tubulin (z.B. β 1-Tubulin assoziierte Makrothrombozytopenie)
- Actinin
- Granulainhaltsstoffe
- α -Granula Strukturen (von Willebrand Faktor, Thrombospondin, P-Selektin) (z.B. Gray-Platelet Syndrom)
- δ -Granula Strukturen (LAMP-1, LAMP-2, CD63) (Delta-Storage-Pool Defekte)
- CD34 (GFI1B-assozierte Thrombozytopenie)

2. Wertigkeit

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

Handlungsempfehlungen 5: Immunfluoreszenzmikroskopie



- **Das Anfertigen von Blutaussstrichen soll nur aus frischem EDTA-Blut (bei Raumtemperatur) erfolgen.**
Konsensstärke: 100 %; Neu (2024)
- **Bei Durchführung der Färbung soll immer eine Kontrolle im Labor mitgeführt werden.**
Konsensstärke: 82 %; Neu (2024)



- **Die Immunfluoreszenzmikroskopie sollte bei Verdacht auf MYH9-Defekte und Zytoskelettdefekte (β -Tubulin/ α -Tubulin und Filamin Defekte) verwendet werden.**
Konsensstärke: 79 %; Neu (2024)

- **Die Immunfluoreszenzmikroskopie sollte in Ergänzung oder alternativ zur Durchflusszytometrie bei Verdacht auf Bernard-Soulier Syndrom, Thrombasthenie Glanzmann und Gray-Platelet Syndrom verwendet werden.**
Konsensstärke: 87 %; Neu (2024)
- **Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine ergänzende Methode, sie sollte nicht als alleiniger diagnostischer Test eingesetzt werden.**
Konsensstärke: 91 %; Neu (2024)
- **Bei Verdacht auf Granuladefekte sollte die Immunfluoreszenzmikroskopie bei Kindern <1 Jahr wegen eingeschränkter Beurteilbarkeit (noch nicht vollständig ausgebildete Granula) nicht durchgeführt werden.**
Konsensstärke: 95 %; Neu (2024)

9. Spezialisierte Analysen zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik

9.1. Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung

Pathologische Veränderungen in der Thrombozyten-basierten Gerinnungskapazität werden funktionell durch semi-automatisierte Thrombingenerierungstests im plättchenreichen Plasma bzw. im Kontroll-Plasma mit gewaschenen oder gel-filtrierten Patienten-Thrombozyten detektiert [29, 62, 63]. Angeborene Defekte der Phosphatidylserin-Oberflächenpräsentation (z.B. Scott Syndrom, OMIM # 262890; Stormorken Syndrom, OMIM #185070) oder andere Störungen, die die Bindung von Gerinnungsfaktoren an aktivierte Thrombozyten betreffen, können durch diese Methode in Ergänzung mit durchflusszytometrischen Analysen zum prokoagulantem Zustand der Thrombozyten („COATED platelets“) diagnostiziert werden [64] (siehe Kapitel 7 Durchflusszytometrie).

1. Prinzip

Die Thrombozyten-abhängige Thrombinbildung („Thrombin Generation Assay“ [TGA], „Calibrated Automated Thrombography“ [CAT]) basiert auf der fluorimetrischen Quantifizierung des gebildeten Thrombins im zeitlichen Verlauf im rekalkifizierten plättchenreichen Plasma. Unter diesen Bedingungen wird die Thrombin-Bildung durch die Expression von Phosphatidylserin auf der Thrombozytenoberfläche unterstützt [27]. Letztere kann durch „Tissue-Faktor“ (TF) bzw. durch eine starke Aktivierung (z.B. mittels Ko-Stimulation mit Kollagen und Thrombin) der Thrombozyten erreicht werden [65]. Eine TF- und FXII-unabhängige Thrombinbildung auf Thrombozyten kann durch deren Aktivierung im plättchenreichen Plasma mittels Stimulierung des Kollagen-Rezeptors GPVI und Hemmung des FXII-Weges durch Corn-Trypsin-Inhibitor (CTI) induziert werden. Dazu eignen sich die direkten GPVI Agonisten Convulxin [66] und „crosslinked collagen-related peptide“ (CRP-XL) [67]. Das am häufigsten verwendete Kollagen, Horm-Collagen, aktiviert die Thrombozyten zusätzlich über CD36 [68].

Die interindividuelle Varianz der Ergebnisse der Thrombinbildungsmessung ist ohne TF größer, als mit TF, da interindividuelle Variationen der Thrombozyten hierbei physiologisch bedingt stärker einfließen. Die Exposition von Phosphatidylserin auf den Thrombozyten ist eine notwendige Voraussetzung für die Thrombinbildung, aber nicht hinreichend. So spielen Thrombozyten-abhängige Parameter, wie GPIIb [69], Protein-disulfid-Isomerase (PDI) [29, 70], Freisetzung von Polyphosphat aus den δ -Granula [71], CD36 [72], die Fähigkeit „COATed“ Thrombozyten zu bilden [64, 73] und vermutlich noch weitere bisher unbekannte Variablen eine große Rolle.

Die Thrombozyten-abhängige Thrombinbildung, ausgelöst durch Kontakt mit Kollagen, ist für die Aufgabe der Thrombozyten als Wächter des Endothels zu fungieren und bei Infektionen oder sterilen Entzündungen entstandene Lücken zwischen Endothelzellen zu schließen, welche durch Leukozyteneinwanderung hervorgerufen wurden, und damit kleine, aber stetige Blutungen zu schließen, von besonderer Bedeutung [74, 75].

10. Molekulargenetische Methoden

Die molekulargenetische Untersuchung bei angeborenen Erkrankungen der Thrombozyten kann bei eindeutiger Verdachtsdiagnose (wie z.B. bei V.a. Thrombasthenie Glanzmann oder Bernard-Soulier-Syndrom) unmittelbar durchgeführt werden. Wenn dies nicht der Fall ist, sollte zunächst eine technisch unabhängige, labordiagnostische Analyse erfolgen.

Zur weiteren Abklärung kann die molekulargenetische Diagnostik bei Nachweis einer oder mehrerer krankheitsverursachender Varianten die Verdachtsdiagnose einer angeborenen Störung der Thrombozyten sichern und leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Diagnose. Zudem können Familienmitglieder im Rahmen einer vorhersagenden (prädiktiven) Analyse, durch den Nachweis oder den Ausschluss der familienspezifischen Variante(n), ihren Anlageträgerstatus bestimmen lassen (Heterozygotendiagnostik).

1. Methoden der Gendiagnostik

Die molekulargenetische Untersuchung kann mittels Sanger-Sequenzierung oder *Next Generation Sequencing* (NGS) erfolgen. Da mittels Sanger-Sequenzierung technisch pro Sequenzierlauf jeweils nur ein Exon analysiert werden kann, ist hier Voraussetzung, dass konkrete Kandidatengene für die Erkrankung bekannt sind (wie z.B. beim Wiskott-Aldrich Syndrom). Die Sanger-Sequenzierung eignet sich daher für die gezielte Diagnostik von Einzelgenen bzw. Einzel-Varianten.

Die molekulargenetische Diagnose von Erkrankungen, die eine aufwendige und zeitintensive Sequenzierung von großen oder viele Genen voraussetzen würden (z.B. Bernard-Soulier Syndrom, Thrombasthenie Glanzmann, Hermansky-Pudlack Syndrom), eignen sich hingegen besonders für die Untersuchung mittels NGS. Es ist sinnvoll, ein aktualisiertes Genpanel mit funktionell ähnlichen Genen zu erstellen, das Gene gruppiert, die Membran- oder Zytoskelettdefekte von Thrombozyten assoziiert sind und eine nachgewiesene Funktion bei der Biogenese oder der Funktion von Thrombozyten haben (auch als Tier-1- oder „Core“-Gene bezeichnet) [76]. Bei gegebener Indikation können diese Panels durch An- bzw. Abwählen einzelner Gene individualisiert werden. Eine aktualisierte Liste aller relevanten Gene ist unter https://www.isth.org/page/GinTh_GeneLists (Link zuletzt abgerufen am 22.03.24) zu finden.

Ein fehlender Mutationsnachweis schließt die Verdachtsdiagnose einer angeborenen Erkrankung der Thrombozyten nicht aus, weil im Rahmen der molekulargenetischen Routinediagnostik mittels *Whole Exome Sequencing* und digitalem *Filtering* in der Regel nur die kodierenden Sequenzen untersucht werden. Die Analyse beschränkt sich daher oft auf Exone sowie Exon-Intron- und Intron-Exon-Übergänge. Generell ist eine ausreichende Abdeckung in Exon 1 sowie generell bei G/C-reichen DNA-Sequenzen technisch schwierig zu erreichen. In solchen Fällen kann eine Nachsequenzierung mit der Sanger-Methode notwendig sein. Dies ist auf dem Befund spezifisch auszuweisen.

2. Auswertung, Interpretation und Berichterstattung

Bewertung von genetischen Varianten:

Für den Fall, dass eine detektierte Variante als wahrscheinlich krankheitsverursachend eingestuft wurde, sollte dieser Nachweis durch Co-Segregationsanalyse gesichert werden, entweder in drei unabhängigen Fällen oder einem ausgedehnten Stammbaum (mindestens drei Generationen). Weitere Belege für die Kategorisierung einer Variante können aus Tiermodellen (Maus, Zebrafisch usw.), zell- bzw. molekularbiologischen Experimenten oder ggf. durch *in silico* Verfahren zum Vergleich von Aminosäuresequenzen gezogen werden. Zur weiteren Einordnung einer Variante unklarer Signifikanz (VUS) können funktionelle Studien in Zellkultur- und Tiermodellen sowie Segregationsanalysen der Variante unter Einbeziehung betroffener und nicht-betroffener Familienmitgliedern ggf. hilfreich sein [77, 78].

Verschiedene Datenbanken zum Abgleich und zur Validierung verschiedener Varianten werden regelmäßig aktualisiert. 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>)
- "Datenbank der 1000 Genome" (IGSR) (<http://www.internationalgenome.org>)
- Hemostasis/Thrombosis Gene Curation Expert Panel
(<https://clinicalgenome.org/affiliation/40028/>)

Webpages:

Informationen zu den gesetzlichen Grundlagen zur molekulargenetischen Untersuchungen sind für Deutschland unter www.gesetze-im-internet.de (<http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/GenDG.pdf>), Österreich unter 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 (<https://www.admin.ch/opc/de/classified-compilation/20061313/index.html>) einzusehen.

Handlungsempfehlungen 6: Molekulargenetische Methoden

↑↑	➤ Die Molekulargenetik soll zur Diagnose von angeborenen Störungen der Thrombozyten verwendet werden. Konsensstärke: 95 %; Neu (2024) ➤ Zur Identifikation heterozygoter Träger von angeborenen Störungen der Thrombozyten soll die Molekulargenetik verwendet werden. Konsensstärke: 78 %; Neu (2024)
↑	➤ Für die molekulargenetische Untersuchung sollten relevante Gene (aus klinisch-diagnostischen sowie auch aus wirtschaftlichen Gründen) gruppiert untersucht werden. Konsensstärke: 87 %; Neu (2024) ➤ Nicht-konklusive (kausale) molekulargenetische Ergebnisse sollten zu einem späteren Zeitpunkt, entsprechend dem aktuellen Kenntnisstand, wiederholt werden. Konsensstärke: 90 %; Neu (2024)

11. Zukünftige Entwicklungen

Für die Diagnostik von angeborenen Erkrankungen der Thrombozyten zeichnen sich neue Entwicklungen ab, die das Potenzial haben, die Patientenversorgung erheblich zu verbessern. Ein

zentraler Aspekt ist die gerade begonnene Etablierung des **ThromKidplus Patienten-Registers** (Stand: 2024), das eine umfassende Datensammlung und -analyse ermöglichen wird.

Die Qualitätssicherung in der Diagnostik, insbesondere bei der LTA und der Durchflusszytometrie, wird durch regelmäßige **Ringversuche**, die von der **ThromKidplus** Arbeitsgruppe initiiert und durchgeführt werden, gestärkt. Diese Versuche optimieren die Standardisierung und Zuverlässigkeit der Testverfahren in den sich beteiligenden Zentren. Dies ist essenziell für die Klassifizierung und korrekte Diagnosestellung von angeborenen Erkrankungen der Thrombozyten.

Technologische Fortschritte in der Mikroskopie, wie **die konfokale Mikroskopie, die inverse Fluoreszenzmikroskopie und super-hochauflösende Mikroskopie**, eröffnen neue Dimensionen in der Untersuchung der Thrombozytenmorphologie und -funktion. Diese Verfahren ermöglichen eine detaillierte Visualisierung auf zellulärer und molekularer Ebene und tragen zu einem tieferen Verständnis der Pathophysiologie bei.

Die **Durchflusszytometrie** erfährt eine breitere Anwendung für die umfassende Phänotypisierung von Thrombozyten und für innovative Funktionstests. Diese Entwicklungen verbessern die Charakterisierung der Thrombozytenfunktion und tragen zur präzisen Diagnose von Thrombozytopathien bei.

Der Einsatz von **Mikro- und Makrofluidkammern /-geräten**, insbesondere der miniaturisierten Lab-on-a-Chip-Technologie, revolutioniert die Untersuchung der Thrombozytenfunktion. Diese Technologie ermöglicht präzise und effiziente Analysen auf kleinstem Raum und unter physiologischen Bedingungen.

Genomisches Profiling durch Next-Generation-Sequencing hilft bei der Identifizierung von genetischen Mutationen, die Thrombozytenzahl und -funktionen beeinflussen. Diese genetische Diagnostik ist fundamental für die personalisierte Medizin und ermöglicht eine zielgerichtete Behandlung.

Das Zusammenspiel von **integrativer Omik und künstlicher Intelligenz/ maschinellem Lernen** eröffnet neue Perspektiven. Biomarker-Panels mit Multi-Omik-Integration, die genetische, transkriptionelle, proteinbasierte und metabolische Daten vereinen, verbessern die diagnostische Präzision. Die Anwendung von Algorithmen steigert nicht nur die Genauigkeit bei der Datenanalyse, sondern unterstützt auch prädiktive Modelle, die das Patientenmanagement optimieren und personalisieren.

Zusammenfassend verspricht die Zukunft der Diagnostik von angeborenen Störungen der Thrombozyten einen multidisziplinären und technologiegetriebenen Ansatz, der eine präzisere, individualisierte und effizientere Patientenversorgung ermöglicht.

Literatur

1. Wiedmeier SE, Henry E, Sola-Visner MC, Christensen RD: **Platelet reference ranges for neonates, defined using data from over 47,000 patients in a multihospital healthcare system.** *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 2009, **29**(2):130-136.
2. Bidlingmaier C, Grote V, Budde U, Olivieri M, Kurnik K: **Prospective evaluation of a pediatric bleeding questionnaire and the ISTH bleeding assessment tool in children and parents in routine clinical practice.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2012, **10**(7):1335-1341.
3. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Collier B, James P, Neunert C, Lillicrap D: **ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2010, **8**(9):2063-2065.
4. Pecci A, Balduini CL: **Inherited thrombocytopenias: an updated guide for clinicians.** *Blood reviews* 2021, **48**:100784.
5. Bury L, Falcinelli E, Gresele P: **Learning the Ropes of Platelet Count Regulation: Inherited Thrombocytopenias.** *Journal of clinical medicine* 2021, **10**(3).
6. Nurden AT, Nurden P: **Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives.** *Haematologica* 2020, **105**(8):2004-2019.
7. Dovlatova N: **Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders.** *British journal of haematology* 2015, **170**(2):150-161.
8. Zieger B, Boeckelmann D: **Inherited Platelet Disorders: A Short Introduction.** *Hamostaseologie* 2023, **43**(1):52-59.
9. Palma-Barqueros V, Revilla N, Sánchez A, Zamora Cánovas A, Rodríguez-Alén A, Marín-Quílez A, González-Porras JR, Vicente V, Lozano ML, Bastida JM, Rivera J: **Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview.** *International journal of molecular sciences* 2021, **22**(9).
10. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW: **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** *Blood* 2016, **127**(20):2391-2405.
11. Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP: **Screening and diagnosis of inherited platelet disorders.** *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2022, **59**(6):405-444.
12. Moenen F, Nelemans PJ, Schols SEM, Schouten HC, Henskens YMC, Beckers EAM: **The diagnostic accuracy of bleeding assessment tools for the identification of patients with mild bleeding disorders: A systematic review.** *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2018, **24**(4):525-535.
13. Gresele P: **Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2015, **13**(2):314-322.
14. Rashid A, Moiz B, Karim F, Shaikh MS, Mansoori H, Raheem A: **Use of ISTH bleeding assessment tool to predict inherited platelet dysfunction in resource constrained settings.** *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2016, **76**(5):373-378.
15. Revel-Vilk S, Richter C, Ben-Ami T, Yacovich J, Aviner S, Ben-Barak A, Kuperman AA, Ben-Barak S, Kaplinsky C, Miskin H, Tamary H, Kenet G: **Quantitation of bleeding symptoms in a national registry of patients with inherited platelet disorders.** *Blood cells, molecules & diseases* 2017, **67**:59-62.
16. Gresele P, Orsini S, Noris P, Falcinelli E, Alessi MC, Bury L, Borhany M, Santoro C, Glembotsky AC, Cid AR, Tosetto A, De Candia E, Fontana P, Guglielmini G, Pecci A: **Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2020, **18**(3):732-739.
17. Alhaj D, Hagedorn N, Cuntz F, Reschke M, Schuldes J, Ruthenberg J, Bakchoul T, Greinacher A, Holzhauer S: **ISTH bleeding assessment tool and platelet function analyzer in children with mild inherited platelet function disorders.** *European journal of haematology* 2024.

18. Magnay JL, O'Brien S, Gerlinger C, Seitz C: **Pictorial methods to assess heavy menstrual bleeding in research and clinical practice: a systematic literature review.** *BMC women's health* 2020, **20**(1):24.
19. George JN, Shattil SJ: **The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function.** *The New England journal of medicine* 1991, **324**(1):27-39.
20. Scharf RE: **Drugs that affect platelet function.** *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2012, **38**(8):865-883.
21. Gawaz M, Geisler T, Borst O: **Current concepts and novel targets for antiplatelet therapy.** *Nature reviews Cardiology* 2023, **20**(9):583-599.
22. Jourdi G, Lordkipanidzé M, Philippe A, Bachelot-Loza C, Gaussem P: **Current and Novel Antiplatelet Therapies for the Treatment of Cardiovascular Diseases.** *International journal of molecular sciences* 2021, **22**(23).
23. Fixter K, Rabbolini DJ, Valecha B, Morel-Kopp MC, Gabrielli S, Chen Q, Stevenson WS, Ward CM: **Mean platelet diameter measurements to classify inherited thrombocytopenias.** *International journal of laboratory hematology* 2017.
24. Ferreira FLB, Colella MP, Medina SS, Costa-Lima C, Fiusa MML, Costa LNG, Orsi FA, Annichino-Bizzacchi JM, Fertrin KY, Gilberti MFP, Ozelo MC, De Paula EV: **Evaluation of the immature platelet fraction contribute to the differential diagnosis of hereditary, immune and other acquired thrombocytopenias.** *Scientific reports* 2017, **7**(1):3355.
25. Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, Yatomi Y, Higashihara M: **Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia.** *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 2015, **20**(10):587-592.
26. Mani H, Wolf Z, Lindhoff-Last E: **[Progress in diagnostic evaluation of platelet function disorders].** *Hamostaseologie* 2010, **30**(4):217-229.
27. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S: **The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability.** *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 2002, **32**(5-6):249-253.
28. Wielders SJ, Broers J, ten Cate H, Collins PW, Bevers EM, Lindhout T: **Absence of platelet-dependent fibrin formation in a patient with Scott syndrome.** *Thrombosis and haemostasis* 2009, **102**(1):76-82.
29. Jurk K, Lahav J, Van Aken H, Brodde MF, Nofer JR, Kehrel BE: **Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2011, **9**(11):2278-2290.
30. Li D, Shao L, Chen BC, Zhang X, Zhang M, Moses B, Milkie DE, Beach JR, Hammer JA, 3rd, Pasham M, Kirchhausen T, Baird MA, Davidson MW, Xu P, Betzig E: **ADVANCED IMAGING. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics.** *Science (New York, NY)* 2015, **349**(6251):aab3500.
31. Xu P, Deng H, Hong Z, Zhong S, Chen F, Wang L, Wang Z, Mei Y, Luo Z, He Z, Li H, Gan C, Zhang H, Ma Y, Han Z, Zhang YH: **Superresolution Fluorescence Microscopy of Platelet Subcellular Structures as a Potential Tumor Liquid Biopsy.** *Small methods* 2023, **7**(10):e2300445.
32. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK: **Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2006, **4**(2):312-319.
33. Favaloro EJ: **Clinical utility of closure times using the platelet function analyzer-100/200.** *American journal of hematology* 2017, **92**(4):398-404.
34. Moenen F, Vries MJA, Nelemans PJ, van Rooy KJM, Vranken J, Verhezen PWM, Wetzels RJH, Ten Cate H, Schouten HC, Beckers EAM, Henskens YMC: **Screening for platelet function disorders with Multiplate and platelet function analyzer.** *Platelets* 2017:1-7.
35. Born GV, Cross MJ: **THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS.** *The Journal of physiology* 1963, **168**(1):178-195.

36. Clayton S, Born GV, Cross MJ: **INHIBITION OF THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS BY NUCLEOSIDES.** *Nature* 1963, **200**:138-139.
37. Born GV, Hume M: **Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma.** *Nature* 1967, **215**(5105):1027-1029.
38. Gebetsberger J, Prüller F: **Classic Light Transmission Platelet Aggregometry: Do We Still Need it?** *Hamostaseologie* 2023.
39. Halimeh S, Angelis G, Sander A, Edelbusch C, Rott H, Thedieck S, Mesters R, Schlegel N, Nowak-Göttl U: **Multiplate whole blood impedance point of care aggregometry: preliminary reference values in healthy infants, children and adolescents.** *Klinische Padiatrie* 2010, **222**(3):158-163.
40. Al Ghaithi R, Drake S, Watson SP, Morgan NV, Harrison P: **Comparison of multiple electrode aggregometry with lumi-aggregometry for the diagnosis of patients with mild bleeding disorders.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2017, **15**(10):2045-2052.
41. Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M: **Advances in Platelet Function Testing-Light Transmission Aggregometry and Beyond.** *Journal of clinical medicine* 2020, **9**(8).
42. Lundin A, Richardsson A, Thore A: **Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase.** *Analytical biochemistry* 1976, **75**(2):611-620.
43. Knofler R, Weissbach G, Kuhlisch E: **Platelet function tests in childhood. Measuring aggregation and release reaction in whole blood.** *Seminars in thrombosis and hemostasis* 1998, **24**(6):513-521.
44. Ramström S, Södergren AL, Tynngård N, Lindahl TL: **Platelet Function Determined by Flow Cytometry: New Perspectives?** *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2016, **42**(3):268-281.
45. Frelinger AL, 3rd, Rivera J, Connor DE, Freson K, Greinacher A, Harrison P, Kunishima S, Lordkipanidzé M, Michelson AD, Ramström S, Gresele P: **Consensus recommendations on flow cytometry for the assessment of inherited and acquired disorders of platelet number and function: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2021, **19**(12):3193-3202.
46. Jurk K, Shiravand Y: **Platelet Phenotyping and Function Testing in Thrombocytopenia.** *Journal of clinical medicine* 2021, **10**(5).
47. Jourdi G, Ramström S, Sharma R, Bakchoul T, Lordkipanidzé M: **Consensus report on flow cytometry for platelet function testing in thrombocytopenic patients: communication from the SSC of the ISTH.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2023, **21**(10):2941-2952.
48. van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G, Huisman A, Korporaal SJA, Urbanus RT: **Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2018, **16**(4):689-698.
49. Navred K, Martin M, Ekdahl L, Zetterberg E, Andersson NG, Strandberg K, Norstrom E: **A simplified flow cytometric method for detection of inherited platelet disorders-A comparison to the gold standard light transmission aggregometry.** *PloS one* 2019, **14**(1):e0211130.
50. Huskens D, Li L, Florin L, de Kesel P, de Laat B, Roest M, Devreese KMJ: **Flow cytometric analysis of platelet function to improve the recognition of thrombocytopathy.** *Thrombosis research* 2020, **194**:183-189.
51. Andres O, Henning K, Strauß G, Pflug A, Manukjan G, Schulze H: **Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach.** *Platelets* 2018, **29**(4):347-356.
52. Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S: **Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: a British Society for Haematology Guideline.** *British journal of haematology* 2021, **195**(1):46-72.
53. Mezzano D, Harrison P, Frelinger AL, 3rd, Mumford AD, Noris P, Lordkipanidzé M, Gresele P: **Expert opinion on the use of platelet secretion assay for the diagnosis of inherited platelet**

- function disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2022, **20**(9):2127-2135.**
54. Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, Lecompte T, Latger-Cannard V: **Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake/Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2016, **42**(3):282-291.**
55. Andres O, Henning K, Strauss G, Pflug A, Manukjan G, Schulze H: **Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach. *Platelets* 2017:1-10.**
56. van Asten I, Blaauwgeers M, Granneman L, Heijnen HFG, Kruip M, Beckers EAM, Coppens M, Eikenboom J, Tamminga RYJ, Pasterkamp G, Huisman A, van Galen KPM, Korporaal SJA, Schutgens REG, Urbanus RT: **Flow cytometric mepacrine fluorescence can be used for the exclusion of platelet dense granule deficiency. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2020, **18**(3):706-713.**
57. Manukjan G, Eilenberger J, Andres O, Schambeck C, Eber S, Schulze H: **Functional Classification of Paediatric Patients with Non-syndromic Delta-Storage Pool Deficiency. *Hamostaseologie* 2019, **39**(4):383-391.**
58. Josefsson EC, Ramström S, Thaler J, Lordkipanidzé M: **Consensus report on markers to distinguish procoagulant platelets from apoptotic platelets: communication from the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2023, **21**(8):2291-2299.**
59. Greinacher A, Pecci A, Kunishima S, Althaus K, Nurden P, Balduino CL, Bakchoul T: **Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2017, **15**(7):1511-1521.**
60. Zaninetti C, Leinøe E, Lozano ML, Rossing M, Bastida JM, Zetterberg E, Rivera J, Greinacher A: **Validation of immunofluorescence analysis of blood smears in patients with inherited platelet disorders. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2023, **21**(4):1010-1019.**
61. Zaninetti C, Greinacher A: **Diagnosis of Inherited Platelet Disorders on a Blood Smear. *Journal of clinical medicine* 2020, **9**(2).**
62. Wan J, Konings J, de Laat B, Hackeng TM, Roest M: **Added Value of Blood Cells in Thrombin Generation Testing. *Thrombosis and haemostasis* 2021, **121**(12):1574-1587.**
63. Colucci G, Stutz M, Rochat S, Conte T, Pavicic M, Reusser M, Giabbani E, Huynh A, Thürlemann C, Keller P, Alberio L: **The effect of desmopressin on platelet function: a selective enhancement of procoagulant COAT platelets in patients with primary platelet function defects. *Blood* 2014, **123**(12):1905-1916.**
64. Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, Marchetti M, Alberio L: **Thrombocytopathies: Not Just Aggregation Defects-The Clinical Relevance of Procoagulant Platelets. *Journal of clinical medicine* 2021, **10**(5).**
65. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL: **Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood* 2000, **95**(5):1694-1702.**
66. Polgár J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TN, Clemetson KJ: **Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(21):13576-13583.**
67. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ: **Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* 1998, **91**(2):491-499.**
68. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA: **Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**(13):7576-7583.**

69. Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE: **The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity.** *Blood* 2000, **96**(7):2469-2478.
70. Stopa JD, Neuberger D, Puligandla M, Furie B, Flaumenhaft R, Zwicker JI: **Protein disulfide isomerase inhibition blocks thrombin generation in humans by interfering with platelet factor V activation.** *JCI insight* 2017, **2**(1):e89373.
71. Choi SH, Smith SA, Morrissey JH: **Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin.** *Blood* 2011, **118**(26):6963-6970.
72. Dörmann M, Makhoul S, Gross K, Krause M, Pillitteri D, von Auer C, Walter U, Lutz J, Volf I, Kehrel BE, Jurk K: **CD36-fibrin interaction propagates FXI-dependent thrombin generation of human platelets.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2020, **34**(7):9337-9357.
73. Veuthey L, Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Pereira Portela C, Alberio L: **Mechanisms Underlying Dichotomous Procoagulant COAT Platelet Generation-A Conceptual Review Summarizing Current Knowledge.** *International journal of molecular sciences* 2022, **23**(5).
74. Kaiser R, Escaig R, Kranich J, Hoffknecht ML, Anjum A, Polewka V, Mader M, Hu W, Belz L, Gold C, Titova A, Lorenz M, Pekayvaz K, Käab S, Gaertner F, Stark K, Brocker T, Massberg S, Nicolai L: **Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIB/IIIa and GPVI.** *Blood* 2022, **140**(2):121-139.
75. Kaiser R, Escaig R, Nicolai L: **Hemostasis without clot formation: how platelets guard the vasculature in inflammation, infection, and malignancy.** *Blood* 2023, **142**(17):1413-1425.
76. Agrawal U, Bedston S, McCowan C, Oke J, Patterson L, Robertson C, Akbari A, Azcoaga-Lorenzo A, Bradley DT, Fagbamigbe AF, Grange Z, Hall ECR, Joy M, Katikireddi SV, Kerr S, Ritchie L, Murphy S, Owen RK, Rudan I, Shah SA, Simpson CR, Torabi F, Tsang RSM, de Lusignan S, Lyons RA, O'Reilly D, Sheikh A: **Severe COVID-19 outcomes after full vaccination of primary schedule and initial boosters: pooled analysis of national prospective cohort studies of 30 million individuals in England, Northern Ireland, Scotland, and Wales.** *Lancet (London, England)* 2022, **400**(10360):1305-1320.
77. Freson K, Turro E: **High-throughput sequencing approaches for diagnosing hereditary bleeding and platelet disorders.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2017, **15**(7):1262-1272.
78. Andres O, König EM, Althaus K, Bakchoul T, Bugert P, Eber S, Knöfler R, Kunstmann E, Manukjan G, Meyer O, Strauß G, Streif W, Thiele T, Wiegering V, Klopocki E, Schulze H: **Use of Targeted High-Throughput Sequencing for Genetic Classification of Patients with Bleeding Diathesis and Suspected Platelet Disorder.** *TH open : companion journal to thrombosis and haemostasis* 2018, **2**(4):e445-e454.

Versionsnummer: 3.0

Erstveröffentlichung: 10/2012

Überarbeitung von: 07/2024

Nächste Überprüfung geplant: 07/2029

Die AWMF erfasst und publiziert die Leitlinien der Fachgesellschaften mit größtmöglicher Sorgfalt - dennoch kann die AWMF für die Richtigkeit des Inhalts keine Verantwortung übernehmen. **Insbesondere bei Dosierungsangaben sind stets die Angaben der Hersteller zu beachten!**