

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik

Institut für Transfusionsmedizin

Direktor: Dr. med. S. Peine

Thrombophilie-Screening und (semi-) automatisierte Diagnostik von Antiphospholipid-Antikörpern im ambulanten gynäkologischen Bereich

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Diana Katharina Vossen

aus Neuss

Hamburg 2012

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. med K. Gutensohn

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. med. F. Langer

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. med. C. Iking-Konert

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|----------|
| 1. | Einleitung | 7 |
| 1.1 | Ziele der Arbeit..... | 8 |
| 1.2 | Thrombose..... | 8 |
| 1.3 | Thrombophilie..... | 10 |
| 1.3.1 | Laboranalytische Parameter der Thrombophilie..... | 10 |
| 1.3.1.1 | Plasmatische Faktoren..... | 10 |
| 1.3.1.1.1 | Antithrombin..... | 10 |
| 1.3.1.1.2 | Protein C..... | 11 |
| 1.3.1.1.3 | Protein S..... | 11 |
| 1.3.1.2 | Molekulargenetische Marker..... | 12 |
| 1.3.1.2.1 | Faktor V-Mutation (APC-Resistenz)..... | 12 |
| 1.3.1.2.2 | Faktor II-Genmutation (Prothrombin)..... | 12 |
| 1.3.1.2.3 | Methylentetrahydrofolatreduktase-Mutation..... | 12 |
| 1.3.1.3 | Sonstige Laborparameter..... | 13 |
| 1.3.1.3.1 | Faktor-VIII-Erhöhung..... | 13 |
| 1.3.1.3.2 | Protein Z..... | 13 |
| 1.3.1.3.3 | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI 1)..... | 13 |
| 1.4 | Antiphospholipid-Syndrom..... | 13 |
| 1.4.1 | Geschichtlicher Hintergrund..... | 13 |
| 1.4.2 | Definition und Diagnose des Antiphospholipid-Syndroms..... | 14 |
| 1.4.3 | Antiphospholipid-Antikörper..... | 15 |
| 1.4.3.1 | Lupus-Antikoagulans..... | 16 |
| 1.4.3.2 | Cardiolipin Antikörper..... | 17 |
| 1.4.3.3 | β_2 -Glykoprotein I-Antikörper..... | 17 |
| 1.4.3.4 | Weitere Antiphospholipid-Antikörper..... | 17 |
| 1.4.4 | Klinik..... | 17 |
| 1.4.5 | Therapie und Prophylaxe..... | 18 |
| 1.5 | Gynäkologie und Geburtshilfe..... | 19 |
| 1.5.1 | Thrombosen und Thrombophilie..... | 19 |
| 1.5.1.1 | Laboratoriumsmedizinische Parameter..... | 20 |
| 1.5.2 | Antiphospholipid-Antikörper..... | 21 |
| 1.5.3 | Antiphospholipid-Syndrom..... | 21 |
| 1.5.4 | Thrombophilie und Abort..... | 22 |
| 1.5.5 | Hinweise und Therapie..... | 23 |
| 1.6 | Autoimmunerkrankungen..... | 24 |
| 1.6.1 | Systemischer Lupus erythematoses..... | 24 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2. | Material und Methoden | 26 |
| 2.1 | Patientenkollektive | 26 |
| 2.1.1 | Teil 1: Retrospektive Datenanalyse | 26 |
| 2.1.2 | Teil 2: Proben aus Zuweiserkollektiv | 26 |
| 2.1.3 | Teil 3: Verumgruppe | 26 |
| 2.2 | Teil 1: Retrospektive Datenanalyse | 26 |
| 2.2.1 | Laboranalyser und Reagenzien | 27 |
| 2.2.1.1 | Gerinnungsanalyser ACL Top 500 | 27 |
| 2.2.1.1.1 | Reagenzien für MixConLA | 27 |
| 2.2.1.1.2 | Reagenzien für Lupus-Antikoagulans LAC screen/confirm (IL) | 28 |
| 2.2.1.1.3 | Testprinzip für Lupus-Antikoagulans | 28 |
| 2.2.1.1.4 | Beurteilung | 28 |
| 2.2.1.2 | Imtec ELISA | 29 |
| 2.2.1.2.1 | Testprinzip | 29 |
| 2.2.1.2.2 | Kits | 30 |
| 2.2.1.2.3 | Beurteilung | 30 |
| 2.2.2 | Zusätzliche Geräte | 30 |
| 2.2.2.1 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 30 |
| 2.2.3 | Molekulargenetik | 32 |
| 2.3 | Teil 2 und Teil 3 : Proben aus Zuweiserkollektiv und Verumgruppe | 33 |
| 2.3.1 | Laboranalyser | 33 |
| 2.3.1.1 | Zenit ra | 33 |
| 2.3.1.1.1 | Testprinzip | 33 |
| 2.3.1.1.2 | Kits | 33 |
| 2.3.1.1.3 | Beurteilung | 34 |
| 2.3.1.2 | ImmunoCAP 250 | 34 |
| 2.3.1.2.1 | Testprinzip | 34 |
| 2.3.1.2.2 | Reagenzien | 34 |
| 2.3.1.2.3 | Beurteilung | 35 |
| 2.3.1.3 | Alegria | 35 |
| 2.3.1.3.1 | Testprinzip | 35 |
| 2.3.1.3.2 | Kits | 35 |
| 2.3.1.3.3 | Beurteilung | 36 |
| 2.3.1.4 | Imtec-ELISA | 36 |
| 2.3.1.5 | ACL AcuStar | 36 |
| 2.3.1.5.1 | Testverfahren | 36 |
| 2.3.1.5.2 | Kits | 37 |
| 2.3.1.5.3 | Beurteilung | 37 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.3.2 | <i>cut-off</i> -Werte | 37 |
| 2.3.3 | Statistische Auswertung Teil 1 | 38 |
| 2.3.4 | Statistische Auswertung Teil 2 und 3 | 39 |
| 2.3.4.1 | Boxplots | 40 |
| 2.3.4.2 | Cohen's Kappa | 40 |
| 2.3.5 | Zeitanalyse..... | 40 |
| 3. | Ergebnisse | 42 |
| 3.1 | Teil 1: Retrospektive Datenanalyse | 42 |
| 3.1.1 | Antiphospholipid-Antikörper Screening für das primäre Patientenkollektiv..... | 42 |
| 3.1.2 | Selektiertes Patientinnenkollektiv | 43 |
| 3.1.2.1 | Altersverteilung | 43 |
| 3.1.2.2 | Weitere Thrombophilie-Screeningwerte..... | 43 |
| 3.1.2.3 | Protein C | 44 |
| 3.1.2.4 | Protein S | 45 |
| 3.1.2.5 | Antithrombin | 46 |
| 3.1.2.6 | Faktor II- und Faktor V-Mutation | 46 |
| 3.1.2.7 | Antiphospholipid-Antikörper Screening..... | 47 |
| 3.1.2.8 | Messwerte der Antiphospholipid-Antikörper | 48 |
| 3.2 | Teil 2: Proben aus Zuweiserkollektiv | 49 |
| 3.2.1 | Altersverteilung | 50 |
| 3.2.2 | Abortanamnese..... | 50 |
| 3.2.3 | Klinische Daten | 52 |
| 3.2.4 | Thrombophilie | 52 |
| 3.2.4.1 | Weitere Parameter..... | 53 |
| 3.2.5 | Ergebnisse der Testsysteme | 54 |
| 3.2.5.1 | Übereinstimmung der Ergebnisse..... | 59 |
| 3.2.6 | Zeitanalyse..... | 62 |
| 3.2.6.1 | Netto-Aufwand-Zeit..... | 62 |
| 3.2.6.2 | <i>Walk-away</i> -Zeit | 63 |
| 3.3 | Teil 3: Verumgruppe | 63 |
| 3.3.1 | Ergebnisse der Testsysteme | 63 |
| 3.3.1.1 | Übereinstimmung der Ergebnisse..... | 67 |
| 3.3.2 | Geräteüberblick..... | 72 |
| 4. | Diskussion | 73 |
| 4.1 | Teil 1: Retrospektive Datenanalyse | 73 |
| 4.1.1 | Thrombosen und Thrombophilie | 73 |
| 4.1.1.1 | Thrombophiliediagnostik | 73 |
| 4.1.1.2 | Protein C | 73 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.1.1.2.1 | Interpretation der Befunde | 76 |
| 4.1.1.3 | Protein S | 76 |
| 4.1.1.3.1 | Interpretation der Befunde | 77 |
| 4.1.1.4 | Antithrombin | 77 |
| 4.1.1.4.1 | Interpretation der Befunde | 78 |
| 4.1.1.5 | Molekulargenetische Marker | 79 |
| 4.1.1.5.1 | Faktor V- und Faktor II-Mutation | 79 |
| 4.1.1.5.2 | Kombinierte Defekte | 79 |
| 4.1.1.6 | Durchführung des Thrombophilie-Screenings | 80 |
| 4.1.2 | Antiphospholipid-Antikörper | 82 |
| 4.1.3 | Therapie | 85 |
| 4.1.3.1 | Antikoagulation: Dauer und Intensität | 86 |
| 4.1.3.2 | Prophylaxe mit Acetylsalicylsäure in der Schwangerschaft | 88 |
| 4.1.3.3 | Prophylaxe mit Heparin in der Schwangerschaft | 89 |
| 4.1.3.4 | Prophylaxe mit Heparin und Acetylsalicylsäure in der Schwangerschaft | 91 |
| 4.1.4 | Zusammenschau Teil 1 | 91 |
| 4.2 | Teil 2 und 3: Proben aus Zuweiserkollektiv und Verumgruppe | 95 |
| 4.2.1 | Thrombophilie | 95 |
| 4.2.1.1 | Protein C-, Protein S- und Antithrombin-Mangel | 95 |
| 4.2.1.2 | Faktor II-Mutation | 97 |
| 4.2.1.3 | Faktor V-Mutation | 99 |
| 4.2.2 | Mögliche Ursachen eines Aborts | 100 |
| 4.2.2.1 | Antiphospholipid-Antikörper | 100 |
| 4.2.2.1.1 | Cardiolipin-Antikörper | 102 |
| 4.2.2.1.2 | β_2 -GPI-Antikörper | 105 |
| 4.2.2.2 | Assoziierte Mechanismen | 107 |
| 4.2.3 | Testergebnisse | 109 |
| 4.2.3.1 | Vor- und Nachteile der Testsysteme | 110 |
| 5. | Zusammenfassung | 119 |
| 6. | Abkürzungsverzeichnis | 120 |
| 7. | Abbildungsverzeichnis | 122 |
| 8. | Tabellenverzeichnis | 123 |
| 9. | Literaturverzeichnis | 124 |
| 10. | Danksagung | 146 |
| 11. | Lebenslauf | 147 |
| 12. | Eidesstattliche Erklärung | 148 |

1. Einleitung

Die venöse Thrombose oder Thromboembolie sind eine der häufigsten, meist multifaktoriell bedingten Erkrankungen (Martinelli et al. 1998). Dabei können sowohl hereditäre Faktoren, als auch erworbene Faktoren zu einer venösen oder arteriellen Thromboembolie beitragen. Zu den hereditären Faktoren gehören z.B. die Faktor V-Mutation oder Mangelzustände von Protein C oder S. Zu den erworbenen Faktoren zählen z. B. Antiphospholipid-Antikörper, Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II oder Protein C-Mangel (Luxembourg et al. 2007).

Zudem können verschiedene Grunderkrankungen oder klinische Zustände das Thromboserisiko erhöhen. In diesem Zusammenhang kann u. a. das biologische Alter genannt werden, sowie Schwangerschaft, Stoffwechselerkrankungen, Malignome oder Autoimmunerkrankungen, wie das Antiphospholipid-Syndrom. Die Kombination aus mehreren Faktoren erhöhen das Erkrankungsrisiko (Stieflhagen 2000).

Die Thrombophilie ist eine genetisch bedingte oder erworbene Neigung zu Thrombosen. Im Labor lässt sich ein großes Spektrum verschiedener Parameter, die eine Thrombophilie auslösen können, unterscheiden (Lindhoff-Last et al. 2008). Unter anderem gehören zu diesen Parametern die Antiphospholipid-Antikörper. Zu den Antiphospholipid-Antikörpern zählt man das Lupus-Antikoagulans, Cardiolipin-Antikörper, β_2 -Glykoprotein I (β_2 -GPI)-Antikörper und weitere.

Das Vorhandensein der Antiphospholipid-Antikörper im Plasma mit einer klinischen Symptomatik von wiederkehrenden vaskulären Thrombosen und/oder Aborten beschreibt das Antiphospholipid-Syndrom (Miyakis et al. 2006). Da die Symptome auf unterschiedlichen Ursachen beruhen können, tragen die labormedizinischen Untersuchungen zur Diagnose bei.

Es gibt verschiedene Methoden um die Antiphospholipid-Antikörper nachzuweisen, wobei verschiedene Verfahren für den jeweiligen Antikörper zur Verfügung stehen. Zunehmend wird mit Automatisierung gearbeitet meist in Form eines *enzym-linked immunosorbent-assay* (ELISA) (Devreese und Hoylaerts 2009).

1.1 Ziele der Arbeit

Das vorsätzliche Ziel dieser Studie ist es die Beurteilung analytischer Ergebnisse von Antiphospholipid-Antikörpern zu verbessern und es zu ermöglichen eine sichere Diagnose für Patienten zu stellen. Durch eine sicherere Diagnose kann den Patienten mittels einer zielgerichteten Therapie geholfen werden.

Hierzu soll zunächst eine retrospektive Auswertung (Teil 1: Retrospektive Datenanalyse) eines selektiven Patientenkollektivs durchgeführt werden. Die Laboranalysen für das Patientenkollektiv liegen bereits vor. Ziel dieses Teils der Studie ist zum einen die Prävalenz von Thromboseindikatoren bei einem weiblichen Patientinnenkollektiv im ambulanten Bereich aufzugreifen und zum anderen die Verteilung und Häufigkeit der Antiphospholipid-Antikörper in Zusammenhang mit einem Thrombophilie Screening zu erfassen.

In der prospektiven Auswertung (Teil 2: Proben aus Zuweiserkollektiv) sollen verschiedene Geräte zur Analyse der Antiphospholipid-Antikörper miteinander verglichen werden. Es soll ermittelt werden, ob eine Automatisierung in Form von Vollautomatisierung oder eine Teilautomatisierung gegenüber manueller Analyse Vorteile liefert.

Desweiteren sollen Reagenzien für die Diagnostik ausgewählter Antiphospholipid-Antikörper von unterschiedlichen Herstellern mit einbezogen werden, um Unterschiede der verschiedenen Kits/Reagenzien zu prüfen.

Für den prospektiven Teil soll Zuweisermaterial verwendet werden, welches anamnestisch Hinweise auf einen Abort gibt.

Ergänzend sollen Untersuchungen von vorgescreenten Seren mit bestätigtem systemischen Lupus erythematodes durchgeführt werden, um eine Vergleichsgruppe darzustellen (Teil 3: Verumgruppe).

1.2 Thrombose

Der Begriff der Thrombose beschreibt eine verstärkte intravitale, intravasale, lokalisierte Blutgerinnung, die zu einem Blutgerinnsel, genannt Thrombus, führt. Es ist sowohl die zelluläre als auch die plasmatische Gerinnung daran beteiligt. Schon 1856 beschrieb der deutsche Arzt *Rudolf Virchow* drei Faktoren, die er als hauptsächliche Ursachen für die Entstehung einer Thrombose ansah (Aird 2007). Bei diesen drei Faktoren handelt es sich um die Veränderungen der Blutzusammensetzung, des Blutstroms und der Gefäßwand. Sie wurden als Virchow-Trias zusammengefasst und haben noch heute Gültigkeit, wobei der Hyperkoa-

gulabilität, eine erhöhte Gerinnbarkeit des Blutes, besondere Bedeutung zugeschrieben wird (Lane und Grant 2000).

Thrombosen können sowohl im venösen als auch im arteriellen Gefäßsystem auftreten. In der Pathomorphologie unterscheidet man einen Abscheidungsthrombus von einem Gerinnungsthrombus. Der Abscheidungsthrombus ist vorwiegend thrombozytenreich und entsteht im strömenden arteriellen Blut durch Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten an einen primären Defekt der Endothelzellen. Von den aktivierten Thrombozyten freigesetzte Faktoren lösen die plasmatische Gerinnung aus, wodurch sich Fibrin über dem primären Plättchenthrombus abscheidet. Der entstandene Thrombus ragt in den Blutstrom hinein, es entstehen Strömungsturbulenzen und als Folge treten weitere Plättchen-, Fibrin- und Blutzellabscheidungen auf. Der lokal gebildete Thrombus kann das Gefäßlumen verschließen und verursacht dadurch eine Gewebsischämie (Linnemann und Lindhoff-Last 2005a).

Der Gerinnungsthrombus ist reich an Fibrin und Erythrozyten. Ursächlich ist eine Stase, eine Strömungsverlangsamung im venösen System. Durch die Stase entsteht eine Hypoxie aus der eine Freisetzung von Gerinnungsfaktoren, vor allem Faktor VIII, von-Willebrand-Faktor (vWF), Faktor VII und Prothrombin, aus Thrombozyten resultiert (Hamer et al. 1981, Bertina 2004). Es bildet sich zunächst ein homogener Thrombus aus Thrombozyten mit einem lockeren Fibrinnetz, in das sekundär korpuskuläre Bestandteile des Blutes eingelagert werden. Das Fibrinnetz zieht sich zusammen und der Thrombus schrumpft, so dass er im Gefäßlumen frei beweglich ist (Drake et al. 1989). Es können sich Teile des Thrombus lösen und in Form eines Embolus verschleppt werden. Meistens sind die Beinvenen von einer Thrombose betroffen und durch einen von dort verschleppten Embolus kann es zu einer Lungenembolie kommen. Abscheidungs- und Gerinnungsthrombus können in Aneurysmata und großen Gefäßen gemeinsam vorkommen, was man als gemischten Thrombus bezeichnet (Lindhoff-Last et al. 2008).

Die Symptome sind abhängig von der Lokalisation des Thrombus, müssen aber nicht zwingend auftreten. Vor allem bei tiefen Beinvenenthrombosen können Symptome von Entzündungsanzeichen, Spannungsgefühl, ziehenden Schmerzen, Schwellung, Überwärmung, Druckempfindlichkeit oder auch Pulsanstieg auftreten. Die Entzündungszeichen, *rubor, calor, dolor, tumor und functio laesa*, treten nur in 10 Prozent der Fälle auf (Osinbowale et al. 2010).

1.3 Thrombophilie

Unter Thrombophilie versteht man ein erhöhtes individuelles Risiko für die Bildung von Thrombosen. Dieses kann genetisch bedingt oder erworben sein oder auch eine Kombination aus beidem sein. Zu den erworbenen Faktoren zählt man unter anderem Adipositas, Immobilisation, die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder Leberfunktionsstörung. Die genetisch determinierenden Faktoren beschreiben Zustände verschiedener Parameter, wie z.B. Antithrombinmangel (Merriman und Greaves 2006).

Tabelle 1: Erworbene und angeborene prädisponierende Faktoren für eine venöse Thrombose

(Lindhoff-Last et al. 2008).

| | | |
|--|-----------|--|
| Gerinnungsstörung | angeboren | Faktor-V-Leiden-Mutation, Prothrombin-20210-Mutation Antithrombinmangel, Protein-C-Mangel, Protein-S-Mangel Dysfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie (z.B. homozygote MTHFR C677T-Mutation) |
| | erworben | APC-Resistenz (z. B. bei Einnahme hormonaler Kontrazeptiva oder in der Schwangerschaft) Antithrombin-Mangel (z. B. nephrotisches Syndrom, Sepsis) Protein-C-Mangel (z. B. Leberfunktionsstörung, HIV-Infektion) Protein-S-Mangel (z. B. HIV-Infektion, Schwangerschaft) erhöhtes Fibrinogen (z. B. Akute-Phase-Reaktion) Hyperhomocysteinämie (z. B. Niereninsuffizienz, Vitamin-B6-, -B12- oder Folsäuremangel) erhöhte Faktor-VIII-, -IX-, -XI-Aktivität Antiphospholipidantikörper (z. B. sekundär im Rahmen eines systemischen Lupus erythematodes) |
| erworbene prädisponierende Faktoren unabhängig von Gerinnungsstörungen | | Immobilität, Trauma, Operation, Einnahme hormonaler Kontrazeptiva, Hormonersatztherapie, Schwangerschaft und Wochenbett, Malignome, Venenkatheter, nephrotisches Syndrom, myeloproliferative Erkrankung (z. B. essenzielle Thrombozythämie), heparininduzierte Thrombozytopenie, hohes Lebensalter, erhöhter BMI (> 30 kg/m ²), schwere Infektion, Langstreckenflug (Dauer > 8 h), postthrombotisches Syndrom |

Der Pathomechanismus beruht auf einer gestörten Regulierung der Blutgerinnung. Diese kann auf einer verminderten Konzentration von Gerinnungsinhibitoren, einer verstärkten Aktivität plasmatischer Gerinnungsfaktoren oder einer verminderten Tätigkeit des Fibrinolyse-systems beruhen (Djordjević et al. 2010).

1.3.1 Laboranalytische Parameter der Thrombophilie

Im Folgenden werden die wichtigsten prothrombotischen Parameter beschrieben:

1.3.1.1 Plasmatische Faktoren

1.3.1.1.1 Antithrombin

Antithrombin inaktiviert in der Gerinnungskaskade unter anderem Thrombin sowie den Gerinnungsfaktor Xa und stellt dadurch einen physiologischen Gerinnungsinhibitor dar. Bei ei-

nem Mangel entwickelt sich folglich eine gesteigerte Gerinnungsneigung. Der hereditäre Mangel, der sehr selten ist aber mit einem hohen Thromboserisiko vergesellschaftet ist, wird autosomal dominant vererbt (Maclean und Tait 2007). Man unterscheidet einen Typ I, bei dem Antithrombin um 50 Prozent reduziert, und einen Typ II mit verschiedenen Subtypen, bei dem die Antithrombinkonzentration im Normbereich liegt, jedoch die Aktivität eingeschränkt ist. Ein Antithrombinmangel kann auch erworben sein. Eine Leberfunktionsstörung, eine Verbrauchskoagulopathie oder auch eine langfristige Behandlung mit Heparin können zu diesem Mangelzustand führen (Patnaik und Moll 2008).

1.3.1.1.2 Protein C

Auch Protein C ist ein physiologischer Gerinnungsinhibitor. Es ist ein Protein, das in der Leber Vitamin K-abhängig synthetisiert wird. Durch Thrombin, bei dem der langsame Prozess, d.h. die Bindung von Thrombomodulin, beschleunigt wird, wird es zur aktiven Serinprotease umgewandelt. Gemeinsam mit seinem Cofaktor Protein S inaktiviert es Faktor V und VIIIa und hemmt somit die Fibrinbildung. Zudem fördert Protein C die Fibrinolyse und unterstützt die Gerinnselauflösung (Andrew et al. 1987).

Beim Protein C-Mangel werden ebenfalls zwei Formen unterschieden: Typ I mit einer Verminderung der Aktivität und des Antigens und Typ II mit Verminderung der Aktivität bei normaler Antigenkonzentration. Auch hier grenzt man den hereditären Mangel von einem erworbenen Mangel ab. Erworbene Mangelzustände können durch Leberfunktionsstörungen, frische Thrombosen bzw. erhöhten Verbrauch, Verbrauchskoagulopathien oder Sepsis oder Vitamin K-Mangel auftreten (Castellino und Ploplis 2009).

1.3.1.1.3 Protein S

Protein S ist ein Cofaktor des Protein C, beschleunigt seine Wirkung im aktiven Zustand und wird ebenfalls in der Leber Vitamin K-abhängig synthetisiert. Protein S tritt in gebundener und in freier Form auf. Nur das freie Protein S ist als Cofaktor wirksam (Rezende et al. 2004).

Erworbene Mangelzustände entstehen durch einen Vitamin K-Mangel, wie es z.B. bei einer Coumarin-Behandlung der Fall ist, in der Schwangerschaft, durch Hormonersatztherapie, Ovulationshemmer oder HIV-Infektionen (Liberti et al. 1999).

Bei dem hereditären Mangel unterscheidet man drei Typen: Typ I mit einer Verminderung des gesamten Protein S-Antigens mit Aktivitätsminderung, Typ II mit Verminderung der Aktivität bei normaler Konzentration des gesamten und freien Protein S und Typ III mit Verminderung der Aktivität und Konzentration des freien Protein S (Castoldi und Hackeng 2008).

1.3.1.2 Molekulargenetische Marker

1.3.1.2.1 Faktor V-Mutation (APC-Resistenz)

Die häufigste Ursache einer hereditären Thrombose ist die Faktor V-Mutation. Bei dieser Mutation handelt es sich meist um eine Transition von Guanin zu Adenin im Faktor V-Gen an Position 1691 im Exon 10. Diese Transition führt zur APC-Resistenz. Die Resistenz des Faktor Va liegt gegen die proteolytische Aktivität des aktivierten Protein C vor. Deshalb kann Protein C seine Wirkung als Gerinnungsinhibitor nicht mehr ausüben (Bertina et al. 1994).

Die Punktmutation in der APC-Spaltstelle an Position 506 im Faktor V-Molekül wird durch den Austausch der Aminosäure Arginin durch Glutamin verursacht und nennt sich Faktor V-Leiden Mutation. Durch diese Mutation wird bei gleicher prokoagulatorischer Aktivität der mutierte Faktor V zehn Mal langsamer durch APC inaktiviert als der Faktor V-Wildtyp. Es liegt eine Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch APC vor (Heeb et al. 1995).

Eine erworbene APC-Resistenz kann unter Einnahme von Ovulationshemmern auftreten (Rosendorff und Dorfman 2007).

1.3.1.2.2 Faktor II-Genmutation (Prothrombin)

Durch einen Nukleotidaustausch von Guanin zu Adenin im Faktor II-Gen kommt es zu einer erhöhten Konzentration von Prothrombin im Plasma (Lindhoff-Last et al. 2008). Es kann auch eine Kombination mit der Faktor-V-Mutation vorliegen. Durch eine proteolytische Gerinnungskaskade entsteht so vermehrt Thrombin und damit verbunden eine verstärkte Gerinnung und Thromboseeigung. In der Häufigkeit der hereditären Thrombosen folgt die Prothrombin-Mutation der Faktor V-Mutation (Khan und Dickerman 2006).

1.3.1.2.3 Methylentetrahydrofolatreduktase-Mutation

Das Enzym Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) wandelt Homocystein Vitamin B₁₂-abhängig in Methionin um. Bei einem Defekt dieses Enzyms, der durch eine Mutation im Enzym hervorgerufen wird, häuft sich Homocystein an. Die erhöhte Konzentration von Homocystein kann auch nahrungsabhängig, z.B. durch einen Vitamin B₁₂-Mangel, hervorgerufen werden. Der Zusammenhang mit venösen Thrombosen ist noch nicht vollständig geklärt (Cattaneo 2006).

1.3.1.3 Sonstige Laborparameter

1.3.1.3.1 Faktor-VIII-Erhöhung

Faktor VIII ist ein Akute-Phase-Protein und kann somit temporär erhöht sein. Ist er jedoch persistierend erhöht, stellt er mit steigender Aktivität ein erhöhtes Thromboserisiko dar. Die genauen Mechanismen sind noch nicht eindeutig geklärt (Lindhoff-Last et al. 2008).

1.3.1.3.2 Protein Z

Protein Z wird, wie auch Protein C und S, in der Leber Vitamin K-abhängig gebildet. Es weist keinerlei enzymatische Aktivität auf, spielt jedoch eine wichtige Rolle in der Hemmung der Gerinnungskaskade, indem es einen Komplex mit dem Protein Z abhängigen Proteaseinhibitor bildet und Faktor Xa hemmt. Bei einem Mangel von Protein Z wird somit die Gerinnungskaskade verstärkt und es ergibt sich ein erhöhtes Risiko für Thrombosen (Vasse 2008).

1.3.1.3.3 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI 1)

Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI 1) reduziert die Fibrinolyse, indem er die Serinproteasen tPA (*tissue polypeptide antigen*) und Urokinase hemmt und somit Plasminogen nicht zu Plasmin proteolysiert werden kann. Dies fördert die Bildung von stabilen Thromben (Khan und Dickerman 2006).

1.4 Antiphospholipid-Syndrom

1.4.1 Geschichtlicher Hintergrund

Bereits 1906 ist über ein Reagin, den Antiphospholipid-Antikörper, berichtet worden, das man bei Patienten mit Syphilis fand (Wassermann et al. 1906). Cardiolipin wurde 1942 als serologisch aktives Phospholipid aufgedeckt. Es trägt seinen Namen von einem Rinderherzmuskel, in dem es entdeckt wurde (Pangborn 1942).

1952 ist das Lupus-Antikoagulans entdeckt worden, da Personen mit systemischen Lupus erythematoses falsch positive Teste für Syphilis aufwiesen. Die Beschreiber bemerkten eine Gerinnungsstörung bei Patienten mit SLE und stellten fest, dass diese eine verlängerte Prothrombinzeit hatten, obwohl keinerlei Defekt der Faktor II-Aktivität vorlag (Conley und Hatman 1952).

Im Jahre 1959 wurde dargelegt, dass die beschriebenen Antikörpern bzw. Inhibitoren nicht direkt an ein Phospholipid binden, sondern an Komplexe aus Phospholipiden und Phospholipid-bindenden Proteinen (Loelinger 1959). 1990 wurde dies bestätigt und erklärt, dass β_2 -

Glykoprotein I (β_2 -GPI) und Prothrombin-bindende-Phospholipidkomplexe meistens von den Antikörpern gebunden werden (Galli et al. 1990).

Eine besondere Rolle in der Diagnostik und der Beschreibung der Klinik spielte die Entdeckung von Cardiolipin-Antikörper-ELISAs 1983 und die Formulierung des heutigen Antiphospholipid-Syndroms (Harris et al. 1983). Nach wie vor wird über die genauen Kriterien des Antiphospholipid-Syndroms diskutiert.

1987 stellte eine Gruppe Kriterien für die Klassifikation des Antiphospholipid-Syndroms auf, welche auf der Konsensuskonferenz in Sapporo 1998 überarbeitet wurde. Die 1998 aufgestellten Kriterien wurden wiederum in Sydney 2006 revidiert (Miyakis et al. 2006).

1.4.2 Definition und Diagnose des Antiphospholipid-Syndroms

Das Antiphospholipid-Syndrom stellt eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen dar. Es ist meistens bei Frauen im gebärfähigen Alter zu finden. Definiert ist das Antiphospholipid-Syndrom durch eine persistierende Anwesenheit von Antiphospholipid-Antikörpern in Verbindung mit arteriellen und venösen Thrombosen und rezidivierenden Aborten. Der Nachweis dieser Antikörper muss dabei bei wiederholter Messung positiv ausfallen (Pasquali et al. 2008, Sanmarco und Boffa 2009).

Die aktuelle Diagnosestellung richtet sich nach der Revision der Sapporo-Kriterien, die in Sydney im Jahre 2006 festgelegt wurden. Sie setzt sich aus klinischen und Laborkriterien zusammen.

Zu den klinischen Kriterien zählt:

1. Auftreten von arteriellen und venösen Thrombosen, die durch Bildgebung oder histopathologisch gesichert sind. Hierzu zählen keine oberflächlichen Venenthrombosen.
2. Schwangerschaftskomplikationen:
 - Unerklärlicher intrauteriner Fruchttod vor der 10. Schwangerschaftswoche mit sonst normalem Fötus,
 - Frühgeburt vor der 34. Schwangerschaftswoche durch eine Präeklampsie (eine hypertensive Erkrankung mit Proteinurie und Ödemen in der Schwangerschaft), Eklampsie (das Auftreten von Krämpfen im letzten Drittel der Schwangerschaft) oder einer Plazentainsuffizienz (eine Unterversorgung des Fetus aufgrund von Mangelversorgung durch die Plazenta),
 - drei oder mehr aufeinanderfolgende spontane Aborte vor der 10. Schwangerschaftswoche.

Zu den Laborkriterien zählen:

1. wiederholt positives Lupus-Antikoagulans, gemäß den Richtlinien der *International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) 1995*,
2. erhöhte IgG/IgM Cardiolipin-Antikörper-Titer,
3. stark positive β_2 -GPI-Antikörper IgG/IgM.

All diese Tests müssen in einem minimalen Intervall von 12 Wochen wiederholt positiv ausfallen.

Die Diagnose des Antiphospholipid-Syndroms kann gestellt werden, wenn mindestens ein klinisches Kriterium und mindestens ein labormedizinisches Kriterium zutrifft (Eby 2009, Pasquali et al. 2008).

1.4.3 Antiphospholipid-Antikörper

Man vermutet verschiedene Pathomechanismen wie Antiphospholipid-Antikörper eine Hyperkoagulabilität verursachen könnten.

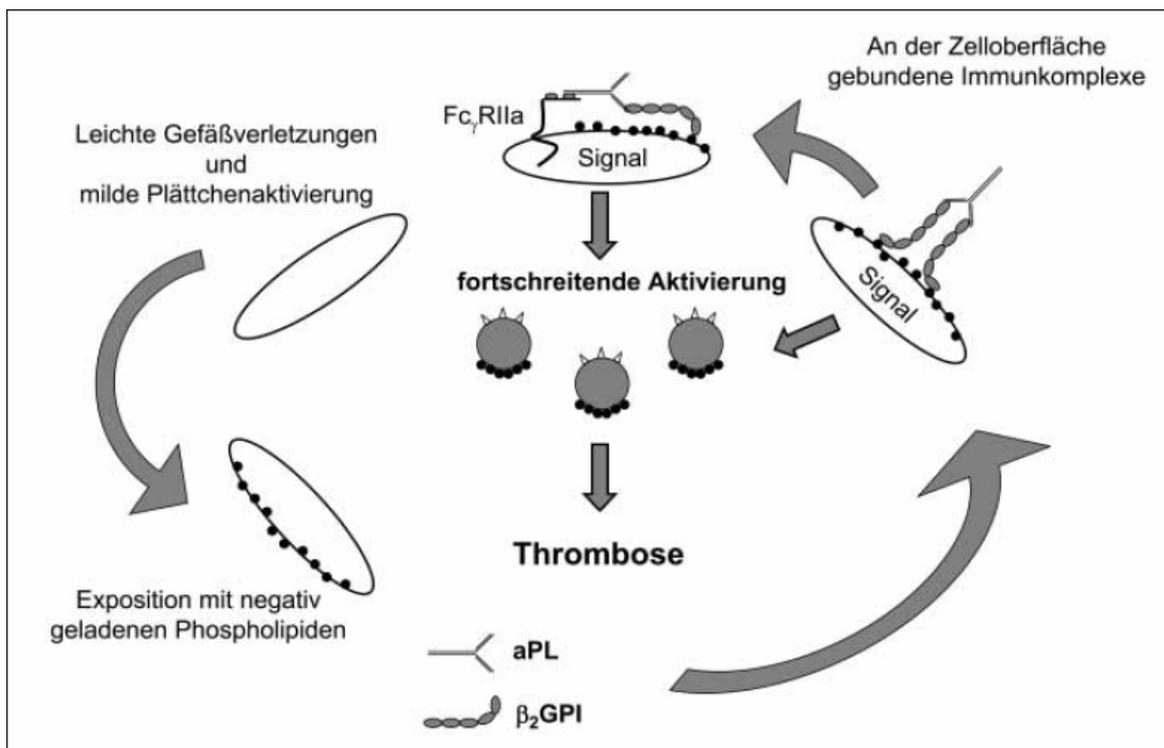


Abbildung 1: Mögliche Pathomechanismen

(Bergmann und Hempel 2008)

Für die Bestimmung der Antiphospholipid-Antikörper gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten. Um Cardiolipin- oder β_2 -GPI-Antikörper zu detektieren, verwendet man spezifische ELISAs. Mittels Blutgerinnungstests ermittelt man die Lupus-Antikoagulantien (Sanmarco und

Boffa 2009). Für eine sichere Diagnose des Antiphospholipid-Syndroms ist es immer erforderlich zwei verschiedene Tests, die auf verschiedenen Methoden beruhen, anzuwenden. Allgemein gilt, dass die Tests für Lupus-Antikoagulans spezifischer und die Cardiolipin- und β_2 -GPI-ELISA sensitiver sind. Derzeit wird für die Diagnostik des Lupus-Antikoagulans der Einsatz von zwei Testverfahren empfohlen. Als erster Test sollte, die *diluted Russell Viper Venom time* (dRVVT) bestimmt werden, um ein Lupus-Antikoagulans aufzudecken. Die dRVVT wird in klinischen Laboren breitflächig verwendet und hat sich als zuverlässig erwiesen. Als zweiter Test sollte die Bestimmung einer aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) unter Verwendung von Silica als Aktivator durchgeführt werden. Sie sollte unter niedriger Konzentration von Phospholipiden durchgeführt werden. Dieser Test gilt als sensitiv (Pengo et al. 2009, Sanmarco und Boffa 2009).

Der Cardiolipin-ELISA beurteilt Antikörper in verdünntem Patientenserum, die an mit Cardiolipin benetzten Platten in Anwesenheit von Rinder- oder Humanenserum stark haften. Er erkennt die Antikörper, die Cardiolipin selbst oder an β_2 -GPI gebundene Proteine binden.

Der direkte β_2 -GPI-ELISA beinhaltet eine Platte, die mit gereinigtem, nativen β_2 -GPI beschichtet ist (Ginnakopoulos et al. 2009b).

Die Tests für Lupus-Antikoagulans können durch Antikoagulantien, die unter anderem zur Therapie des Antiphospholipid-Syndroms gegeben werden, verfälscht werden und dienen somit nur der Diagnoseerstellung. Als Verlaufskontrollen eignen sich die Cardiolipin- und β_2 -GPI-ELISA, da sie nicht durch Antikoagulantien beeinflusst werden (Devreese und Hoylaerts 2009).

Im Folgenden wird auf die einzelnen Antikörper genauer eingegangen:

1.4.3.1 Lupus-Antikoagulans

Das Lupus-Antikoagulans interagiert *in vitro* mit einzelnen oder mehreren Gerinnungsschritten. Die Antikörper verursachen eine verlängerte plasmatische Gerinnung, indem sie Phospholipide, die für die Gerinnungskaskade benötigt werden, *in vitro* binden. *In vivo* spielt dieser Prozess keine Rolle, da hier ausreichend Phospholipide auf den Zellmembranen zu finden sind. Daraus folgt, dass trotz einer *in vitro* gemessenen verlängerten aPTT, *in vivo* eine Hyperkoagulabilität und keine Blutungsneigung vorliegt. Die Antikörper sind vom Typ IgG oder IgM (Palomo et al. 2009).

1.4.3.2 Cardiolipin Antikörper

Cardiolipin Antikörper sind gegen den Komplex aus β_2 -GPI und anionischen Lipiden gerichtet. Sie sind ebenfalls Antikörper gegen Phospholipide und Antikörper vom Typ IgG bzw. IgM (Cullen et al. 2009).

1.4.3.3 β_2 -Glykoprotein I-Antikörper

β_2 -GPI ist ein 54 kDa großes Serumprotein. Es besitzt eine hohe Affinität zu negativ geladenen Phospholipiden. Seine Polypeptidkette ist aus fünf verschiedenen Domänen aufgebaut, wobei das C-terminale Ende, die Domäne V, positiv geladen ist und eine Bindungsstelle für anionische Phospholipide in der Zellmembran bildet. Durch diese Interaktion kann β_2 -GPI eine Konformationsänderung vollziehen, wodurch die Bindungskapazität für anionische Phospholipide stark gesteigert wird (Thaler et al. 2009, von Landenberg et al. 2001).

β_2 -GPI stellt ein natürliches Antikoagulans dar. Durch seine Bindung an negativ geladene Phospholipide führt es zu einer Hemmung der Plättchenaktivierung und des Gerinnungsprozesses. Die Hemmung der Plättchenaktivierung beruht überwiegend auf einer Interaktion mit der A1-Domäne der aktiven Form des vWF, wodurch die Plättchenadhäsion und –aggregation unterbunden wird. Durch die β_2 -GPI-Antikörper wird dieser Prozess neutralisiert. Der vWF ist stark aktiv, wodurch verstärkt Thrombosen entstehen (Cullen et al. 2009).

1.4.3.4 Weitere Antiphospholipid-Antikörper

Im Serum von Patienten, die Antiphospholipid-Antikörper aufweisen, wurden neben β_2 -GPI-Antikörpern auch weitere Antikörper gegen Proteine, die wiederum negativ geladene Phospholipide binden, gefunden. Diese Proteine sind z.B. Prothrombin, Anti-Phosphatidylserin oder Anti-Phosphatidylethanolamin (Balada et al. 2001, Blank und Shoenfeld 2004).

1.4.4 Klinik

Das Antiphospholipid-Syndrom ist eine Autoimmunerkrankung die sich auf viele Organsysteme im Körper auswirkt. Man unterteilt klinisch ein primäres und ein sekundäres Antiphospholipid-Syndrom. Beim primären Antiphospholipid-Syndrom gibt es keinerlei Hinweise auf eine Grunderkrankung. Das sekundäre Antiphospholipid-Syndrom beruht auf einer Grunderkrankung, die z.B. dem rheumatischen Formenkreis angehört. Häufig kommt das Antiphospholipid-Syndrom im Zusammenhang mit Kollagenosen, insbesondere dem systematischen Lupus erythematodes, vor. Es können aber auch akute oder chronische Infektionen, lymphoproliferative Erkrankungen oder eine Medikamenteneinnahme zu Grunde liegen (Linnemann und Lindhoff-Last 2005a).

Das klinische Bild des Antiphospholipid-Syndroms äußert sich durch venöse, arterielle Thrombosen oder Verschlüsse kleiner Blutgefäße, intrauterinen Fruchttod, habituelle Aborte oder eine Thrombozytopenie in Anwesenheit von Antiphospholipid-Antikörpern (Cervera et al. 2002).

Thrombotische Ereignisse findet man meist im venösen System, vor allem in den tiefen Beinvenen, wobei als Folge eine Lungenembolie auftreten kann. Bei atypischen Lokalisationen der Thrombosen, sowie rezidivierenden Thrombosen ohne erkennbare Risikofaktoren speziell bei jungen Patientinnen sollte differentialdiagnostisch an ein Antiphospholipid-Syndrom gedacht werden (Ginsburg et al. 1992).

Thrombosen im arteriellen System sind oft im zentralen Nervensystem lokalisiert. Am häufigsten finden sich Ischämien im Stromgebiet der *Arteria cerebri media*. Differentialdiagnostisch sollte das Antiphospholipid-Syndrom bei einem Apoplex, Myokardinfarkt, einer peripheren Gangrän oder Ischämien viszeraler Organe, ohne erkennbare Risikofaktoren für eine Arteriosklerose, insbesondere bei jungen Patienten, berücksichtigt werden (Ginsburg et al. 1992).

Die häufig vorkommende Thrombozytopenie wird einerseits durch Antikörper gegen thrombozytäre Antigene mit daraus folgender Gerinnungsaktivierung und peripherem Plättchenverbrauch und andererseits durch Bindung der Antikörper an Endothelzellen mit konsekutivem Verlust der antikoagulatorischen Eigenschaften ausgelöst. Sie äußert sich klinisch nur selten in Form von Blutungskomplikationen (Arkfeld und Weitz 2009).

Abzugrenzen zum primären und sekundären Antiphospholipid-Syndrom ist zusätzlich das katastrophale Antiphospholipid-Syndrom. Es beschreibt ein Antiphospholipid-Syndrom, das sich an drei oder mehr Organsystemen manifestiert. Folglich bildet sich ein Multiorganversagen aus (Asherson et al. 2003).

1.4.5 Therapie und Prophylaxe

Eine Therapie wird nur bei Auftreten der beschriebenen Klinik empfohlen. Eine Primärprophylaxe bei Patienten mit alleinigem Nachweis von Phospholipid-Antikörpern ohne eine entsprechende Klinik wird nicht durchgeführt (Ginnakopoulos und Krilis 2009a).

Beim manifesten Antiphospholipid-Syndrom muss zwischen primärem und sekundärem Antiphospholipid-Syndrom unterschieden werden. Die Therapie beim primären Antiphospholipid-Syndrom beruht auf der Prävention bzw. Therapie von Thrombosen. Ergänzt wird beim

sekundären Antiphospholipid-Syndrom eine zusätzliche Therapie der vorliegenden Grunderkrankung (Lim 2009).

Eine antithrombotische Therapie sollte direkt nach Diagnosestellung des Antiphospholipid-Syndroms beginnen. Wenn keine Kontraindikationen bestehen, setzt die Therapie sich aus einer Gabe von Heparin für mindestens vier bis fünf Tage und überlappend mit Vitamin K-Antagonisten, z.B. Marcumar, zusammen. Für den weiteren Therapieverlauf wird komplett auf Vitamin K-Antagonisten umgestellt. Wichtig ist trotzdem die Therapie mit Heparin zu beginnen, da es eine sofortige Wirkung zeigt und Vitamin K-Antagonisten erst nach einer Latenzzeit wirken. Für die Langzeiteinstellung sollte die *international normalized ratio* (INR) zwischen 2–3 bzw. 3 eingestellt werden. Bei Patienten, die eine hohe Rezidivrate an Gefäßverschlüssen hatten, sollte ein Ziel-INR von 3 angestrebt werden, ansonsten gilt ein Ziel-INR von 2-3 (Crowther et al. 1995). Bei manchen Patienten ist die alleinige Langzeittherapie mit einem Vitamin K-Antagonisten trotz hoher Dosierung nicht ausreichend. In diesem Fall kann die Therapie durch Acetylsalicylsäure ergänzt werden. Ob eine immunsuppressive Therapie beim Antiphospholipid-Syndrom sinnvoll ist, ist noch nicht ausreichend belegt.

1.5 Gynäkologie und Geburtshilfe

1.5.1 Thrombosen und Thrombophilie

Das individuelle Thromboserisiko hat bei Frauen im gebärfähigen Alter, die z.B. orale Kontrazeptiva einnehmen möchten, als auch bei Frauen, die in der Postmenopause sind und eine Hormonersatztherapie wünschen, Bedeutung. Für die Risikoeinschätzung ist es wichtig zu wissen, ob die Patientin bereits ein thrombotisches Ereignis hatte oder an sonstigen Gerinnungsstörungen leidet. Besonders wichtig ist eine Risikoabschätzung für die Schwangerschaft, für das Wochenbett und die eventuelle Prävention von habituellen Aborten (Rabe et al. 2009).

Während jeder Schwangerschaft treten Veränderungen im Hämostasesystem auf. Es tritt eine Zunahme des prokoagulatorischen Potentials auf. Dieses ist gekennzeichnet durch einen Konzentrationsanstieg von den Gerinnungsfaktoren V, VII und VIII und von Fibrinogen, sowie von vWF. Zugleich fällt während der Schwangerschaft die Aktivität von Protein S und Antithrombin ab. Zusätzlich ist die Aktivität der Fibrinolyse gedrosselt und die Aktivität der Thrombozyten gesteigert (Stieflhagen 2000, Zotz et al. 2008).

Bei ca. 10 Prozent aller Schwangerschaften kommen Thrombophilien vor, dies gehäuft im dritten Schwangerschaftstrimester. Tiefe Beinvenenthrombosen treten ca. zu zwei Prozent während der Schwangerschaft auf. Das Risiko für tiefe Beinvenenthrombosen ist bei

Schwangeren höheren Alters gesteigert. Verstärkt gefährdet sind Schwangere, die bereits vor der Schwangerschaft eine Gerinnungsstörung hatten (Heilmann 2004, Stiefhagen 2000).

Thrombotische Komplikationen äußern sich in der allgemeinen Gynäkologie klinisch meist in Form von tiefen Beinvenenthrombosen. Die Inzidenz ist altersabhängig und nimmt pro Jahr um ca. ein Prozent zu. Unter die Risikofaktoren in der Gynäkologie gehören die Immobilisation vor als auch nach Operationen, die Operation an sich, Krebserkrankungen und die Einnahme von oralen Kontrazeptiva bzw. Hormonersatztherapie. In Kombination mit Übergewichtigkeit mit einem BMI von 25 kg/m² oder mehr, wird das Risiko zusätzlich gesteigert (Heilmann 2004).

1.5.1.1 Laboratoriumsmedizinische Parameter

Die verschiedenen Thrombophilie-Parameter wurden bereits im Kapitel Thrombophilie beschrieben.

Die meisten genetischen Faktoren, wie eine Mutation im Faktor V- oder im Prothrombin-Gen, zeigen isoliert betrachtet nur eine milde Steigerung des Thromboserisikos. In Kombination mit erworbenen Faktoren kommt es jedoch häufig zur Manifestation von thrombotischen Ereignissen. Etwa die Hälfte der Patientinnen, die in der Schwangerschaft und/oder im Wochenbett eine Thrombose erleiden, sind Trägerinnen von genetisch determinierten Thrombophilieparametern (James 2009).

Tabelle 2: Risiko einer schwangerschaftsassozierten venösen Thromboembolie bei thrombophilen Frauen ohne vorherige Erkrankung

(Zotz et al. 2008).

| Thrombophilie | | relatives VTE-Risiko | | geschätztes absolutes VTE-Risiko in der Schwangerschaft |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------|------------------------|---|
| | | Odds-Ratio | 95%-Konfidenzintervall | |
| Faktor V Leiden | heterozygot | 8,32 | 5,44–12,70 | 8/1000 |
| Prothrombin-Gen-Mutation | | 6,80 | 2,46–18,77 | 6/1000 |
| Faktor V Leiden | homozygot | 34,4 | 9,86–120,05 | 34/1000 |
| Prothrombin-Gen-Mutation | | 26,4 | 1,24–559,20 | 26/1000 |
| Antithrombin-Mangel | allgemein [#] < 60% | 4,7 | 1,30–16,96 | 4/1000 |
| | | 64 | | 60/1000 |
| Protein-C-Mangel | | 4,8 | 2,15–10,57 | 4/1000 |
| Protein-S-Mangel | | 3,2 | 1,48–6,88 | 3/1000 |
| MTHFR C677T | homozygot | 0,74 | 0,22–2,48 | 1/1000 |

MTHFR: Methylentetrahydrofolatreduktase;

[#]Nach Auswertungen der Autoren ist der Antithrombinmangel mit einem deutlich höheren Thromboserisiko assoziiert als in Metaanalysen angegeben. Hintergrund ist das Einfließen von relativen Risiken bei mildem Antithrombinmangel und damit eine Unterschätzung des tatsächlichen Risikos.

Die Tabelle 2 geht von einem Basisrisiko von einem Ereignis pro 1000 schwangeren Patientinnen ohne bekannte Thrombophilie aus (Zotz et al. 2008).

1.5.2 Antiphospholipid-Antikörper

Frauen die positiv auf Antiphospholipid-Antikörper getestet wurden, aber keinerlei Kriterien des Antiphospholipid-Syndroms erfüllen, können als gesund bezeichnet und unter die normale Schwangerschaftspopulation gezählt werden. Eine Behandlung mit Acetylsalicylsäure wies keine Vorteile gegenüber Patienten ohne Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern, die nur eine gesetzlich geregelte Schwangerschaftsvorsorge bekamen, auf (Cowchock und Reese 1997, Derksen et al. 2004).

Eine generelle Screening-Untersuchung auf Antiphospholipid-Antikörper für gesunde Frauen mit z.B. zwei oder weniger Verlusten ihres Embryos sollte ohne grundlegenden Verdacht nicht durchgeführt werden, da es widersprüchliche Meinungen über einen positiven Effekt einer antithrombotischen Therapie (Acetylsalicylsäure als auch Heparin) während der Schwangerschaft gibt (Pattison et al. 1993).

1.5.3 Antiphospholipid-Syndrom

Aborte und vaskuläre Schwangerschaftskomplikationen sind eines der wichtigsten Symptome des Antiphospholipid-Syndroms in der Gynäkologie und kommen bei 15 bis 20 Prozent der Patientinnen mit Antiphospholipid-Syndrom vor.

Schwangerschaftskomplikationen beschreiben unter anderem das Antiphospholipid-Syndrom. Hierzu zählen drei oder mehr Aborte in der Frühschwangerschaft (<10. SSW) ohne einen anderen ursächlichen Befund, eine oder mehrere Fehlgeburten in oder nach der 10. SSW ohne andere Ursachen und eine oder mehrere Frühgeburten vor oder während der 34. SSW durch schwere Präeklampsie oder Plazentainsuffizienz (Opatrny et al. 2006). Je mehr unterschiedliche Antiphospholipid-Antikörper Patientinnen aufweisen, desto höher ist das relative Risiko für einen Abort (Ruffatti et al. 2009).

Für eine Induktion der Ovulation durch ovarielle Stimulation oder eine kontrollierte ovarielle Hyperstimulation ist es wichtig zu wissen, ob die Patientin ein APS aufweist. Ist dies der Fall, kann sie unter einer Prophylaxe mit Antikoagulation eine ovarielle Stimulation durchführen lassen. Durch die Prophylaxe wird die Komplikationsrate deutlich gesenkt. Ohne Kenntnis der Patientin ob bei ihr ein Antiphospholipid-Syndrom vorliegt, ist unter ovarieller Stimulation ihr Risiko für Thrombosen stark erhöht. Für Patientinnen mit systemischen Lupus erythematoses und Antiphospholipid-Syndrom gibt es für die ovarielle Stimulation einen Leitfaden

(Bellver und Pellicer 2009). Es sollte nur eine mäßige ovarielle Stimulation durchgeführt werden, wodurch eine ovarielle Hyperstimulation vermieden werden kann. Durch weitere Maßnahmen sollte eine Prävention des ovariellen Hyperstimulationssyndroms stattfinden. Unter anderem zählt unter diese präventiven Maßnahmen der Transfer eines gefrorenen Embryos bzw. eines gefrorenen gespendeten Ovums. Desweiteren soll nur ein Embryo transferiert werden, um β -HCG auf ein Mindestmaß zu reduzieren, da β -HCG ein Risikofaktor für ein verspätetes ovariell Hyperstimulationssyndrom darstellt (Mathur et al. 2007). Hinzufügend steigt die Schwangerschaftskomplikationsrate bei Patientinnen mit systemischen Lupus erythematoses und/oder Antiphospholipid-Syndrom stark bei Mehrlingsschwangerschaften an. Für eine adjuvante Therapie in Form von Antikoagulantien, Corticosteroiden und eventuell auch Immunsuppressiva sollte gesorgt werden. Ergänzend wird zur Unterstützung der Lutealphase angeraten. Dies ist jedoch noch nicht im Detail geklärt. Bisher ist bekannt, dass die Unterstützung mit Progesteron erfolgen sollte, da Progesteron ein niedrigeres Risiko für Thrombosen birgt als β -HCG und keine Verbindung zum ovariellen Hyperstimulationssyndrom zeigt (Bellver und Pellicer 2009, Papanikolaou et al. 2005).

Ob die Gabe von hormonellen Kontrazeptiva, in Bezug auf ein erhöhtes Thromboserisiko, für Patientinnen mit Antiphospholipid-Syndrom möglich ist, ist strittig (Bellver und Pellicer 2009). Für die Nutzung von Östrogenen, die in hormonellen Kontrazeptiva enthalten sind, gibt es abweichende Empfehlungen. Sie unterscheiden klinische Kriterien von Laborkriterien. Die klinischen Kriterien besagen, dass eine Gabe von Östrogenen nur anzuraten ist, wenn das Syndrom in einem stabilen Zustand ist, keine Lupus-Exacerbation mit Östrogenen schon stattgefunden hat und die Patientin Nichtraucherin und normotensiv ist. Die Laborkriterien weisen auf, dass kein Lupus-Antikoagulans und keine hohen Titer von Antiphospholipid-Antikörpern vorliegen dürfen. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, sollten vorzugsweise nur progesteronhaltige orale Kontrazeptiva oder kombinierte Kontrazeptiva mit niedrigster Dosis an Ethinylestradiol verabreicht werden (Askanase 2004).

1.5.4 Thrombophilie und Abort

Frauen, die angeborene und/oder erworbene thrombophile Risikofaktoren aufweisen, besitzen ein erhöhtes Risiko für schwangerschaftsassozierte vaskuläre Komplikationen. Hierunter zählt vor allem ein Abort, aber auch venöse Thromboembolien, Präeklampsie und intrauterine Wachstumsretardierung. Durch diese Komplikationen ist die maternale und fetale Morbidität und Mortalität gesteigert (Zotz et al. 2008).

Untersuchungen zeigten, dass prokoagulatorische Veränderungen bei Nachweis einer hereditären Thrombophilie ebenfalls einen prothrombotischen Einfluss auf die uteroplazentare Zirkulation haben. Der Einfluss auf die uteroplazentare Einheit führt vermehrt zu Aborten und

anderen schwangerschaftsassozierten vaskulären Komplikationen (Brenner und Blumenfeld 1997).

1.5.5 Hinweise und Therapie

Eine Thrombophilie schließt eine Schwangerschaft nicht aus. Die Schwangere muss aber oftmals eine konsequente Thromboseprophylaxe erhalten, meist in Form eines niedermolekularen Heparins im Zeitraum des letzten Schwangerschaftsdrittels und sechs Wochen nach der Geburt. Das Stillen währenddessen ist möglich (Fogerty und Connors 2009).

Tiefe Beinvenenthrombosen in der Schwangerschaft werden ebenfalls mit niedermolekularem Heparin behandelt. Die Heparingabe sollte 24-36 Stunden vor der Geburt unterbrochen werden und am Tag der Geburt als Prophylaxe fortgeführt werden. Nach der Geburt wird eine orale Antikoagulation zusätzlich bis zu einem INR von 2 bis 3 gegeben. Ist dieser INR erreicht, kann das Heparin abgesetzt werden und die Therapie mit Vitamin K-Antagonisten fortgeführt werden. Ansonsten ist ein Vitamin K-Antagonist sowohl vor als auch in der Schwangerschaft kontraindiziert (Stieflhagen 2000).

Die medikamentöse Thromboembolie-Prophylaxe in der Schwangerschaft umfasst drei alternative Therapieempfehlungen: Die Patientin sollte klinisch beobachtet werden und eine Heparin-gabe in prophylaktischer Dosierung oder in halbtherapeutischer Dosierung erhalten. Diese Empfehlung birgt einen Freiraum in der Therapieentscheidung und kann dadurch gut auf individuelle Risikokonstellationen abgeglichen werden (Zotz et al. 2008).

Die optimale Behandlung für Frauen, die an einem Antiphospholipid-Syndrom und Schwangerschaftskomplikationen leiden, ist noch nicht sicher definiert. Es hat sich gezeigt, dass eine Prophylaxe bestehend aus Acetylsalicylsäure (75-100 mg/d) beginnend präkonzeptionell bis zur 34./36. SSW in Kombination mit der Gabe niedermolekularem Heparin ein- bis zweimal täglich von Beginn der Schwangerschaft bis zur Entbindung effektiv zu sein scheint. Die Gabe von Vitamin K-Antagonisten in der Schwangerschaft ist kontraindiziert, da es das Kind schädigt (Farquharson et al. 2002, Rai 2000).

Auch die Therapie der immer wiederkehrenden Aborte ist noch nicht standardisiert. In einer Studie von Farquharson et al. konnte gezeigt werden, dass mit einer kombinierten Gabe von Heparin und Acetylsalicylsäure versus Acetylsalicylsäure als Monotherapie signifikant die Rate der Lebendgeburten anstieg, 78% versus 72% (Farquharson et al. 2002).

1.6 Autoimmunerkrankungen

1.6.1 Systemischer Lupus erythematoses

Der systemische Lupus erythematoses ist eine Systemerkrankung, bei der Organe, Gewebe und Zellen durch Gewebe-bindende Antikörper und Immunkomplexe geschädigt werden. Betroffen sind überwiegend Frauen im gebärfähigen Alter (Dietel et al. 2005).

Ausgelöst wird der systemische Lupus erythematoses durch verschiedene Interaktionen zwischen bestimmten Genen und Umweltfaktoren, die eine pathologische Immunantwort hervorrufen. Die Immunantwort äußert sich in einer Hypersensibilität und Hyperreaktivität der T- und B-Zellen und zusätzlich in einer ineffektiven Regulation der Antigenverfügbarkeit und einer kontinuierlichen Bildung von Antikörpern. Es gibt verschiedene Antikörper, die beim systemischen Lupus erythematoses vorkommen. Mit einer Prävalenz von 98 % treten die Antinukleären-Antikörper auf. Sie lassen sich in einem Screeningverfahren am Besten nachweisen. Weitere systemische Lupus erythematoses spezifische Antikörper sind die Anti-Smith-Antikörper. Die Anti-Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure-Antikörper sind gegen die Desoxyribonukleinsäure (DNA) gerichtet und die Anti-Smith-Antikörper gegen ein Proteinkomplex an sechs Spezies der nukleären U1-Ribonukleinsäure (Dietel et al. 2005).

Biopsien von vor allem betroffener Haut weisen Immunkomplexablagerungen in der dermal-epidermalen Junktion, Verletzungen der basalen Keratinozyten und Entzündungen, die durch das ausgeprägte Vorkommen von T-Lymphozyten gekennzeichnet sind, auf (Dietel et al. 2005).

Die Diagnose beruht auf charakteristischen klinischen Zeichen (siehe Tabelle 3) und dem Nachweis von Autoantikörpern.

Die Diagnose systemische Lupus erythematoses wird gestellt, wenn ≥ 4 der Kriterien gleichzeitig zu einer bestimmten Zeit während des Krankheitsverlaufes vorhanden sind. Die Spezifität liegt dabei bei ca. 98 % und die Sensitivität bei ca. 75 % (Hochberg 1997, Tan et al. 1982).

Für den systemische Lupus erythematoses gibt es keine Heilung und komplette Remissionen sind selten. Ziele einer Therapie sind akute schwere Exazerbationen zu beherrschen und Langzeittherapiestrategien zu planen, die die Symptome lindern und Organschädigungen vermeiden. Bei einem lebensbedrohlichen systemische Lupus erythematoses werden systemisch Glukokortikoide verabreicht (Dietel et al. 2005).

Tabelle 3: Klassifikationskriterien für die Diagnose des systemischen Lupus erythematoses - ACR-Kriterien (American College of Rheumatology)

(Hochberg 1997, Tan et al. 1982).

| | |
|-------------------------|---|
| Wangenerithem | Erythem, flach oder erhaben, über den Wangenknochen |
| Diskoides Erythem | Erythematöse kreisförmige erhabene Flecken mit keratotischer Schuppung und follikulärer Pfortbildung; atrophische Vernarbungen können vorkommen |
| Photosensitivität | UV-Licht-Exposition verursacht ein Erythem |
| Orale Ulzera | Schließt orale und nasopharyngeale Ulzera ein, die von einem Arzt gesehen wurden |
| Arthritis | Nicht erosive Arthritis, die zwei oder mehr periphere Gelenke betrifft, gekennzeichnet durch Schmerzhaftigkeit, Schwellung oder Erguss |
| Serositis | Pleuritis oder Perikarditis, dokumentiert durch Elektrokardiogramm oder Reibegeräusche oder Nachweis eines Ergusses |
| Nierenbeteiligung | Proteinurie >0,5 g/d oder $\geq 3+$ oder zelluläre Zylinder |
| Neurologische Störungen | Krampfanfälle oder Psychose ohne andere Ursache |
| Hämatologische Befunde | Hämatolytische Anämie oder Leukopenie (< 4000/ μ l) oder Lymphopenie (< 1500/ μ l) oder Thrombopenie (< 100000/ μ l) ohne als Ursache in Betracht kommende Medikamente |
| Immunologische Befunde | Anti-Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure-, Anti-Smith-, und/oder Antiphospholipid-Antikörper |
| Antinukleäre Antikörper | Ein abnormer Antinukleären-Antikörper-Titer mittels Immunfluoreszenz oder entsprechendem Test zu jeder Zeit ohne Nachweis von Medikamenten, von denen bekannt ist, dass sie Antinukleären-Antikörper induzieren |

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektive

Bei unseren Patientenkollektiven handelte es sich um selektierte Patientenkollektive. In Teil 1 und 2 wurden nur Frauen berücksichtigt.

2.1.1 Teil 1: Retrospektive Datenanalyse

Die retrospektive Auswertung bezieht sich auf Daten, die im Speziallabor für Hämostaseologie im AescuLabor Hamburg erhoben wurden. Mittels des Programms Crystal Reports (Crystal Services, Vancouver, Kanada) konnten Daten aus einem Informationspool (LCS; Medat Computer-Systeme GmbH, München, Deutschland) des Labors gewonnen werden. Diese Daten wurden in Excel (Microsoft, Redmond, USA) übertragen und hinsichtlich deren Ergebnisse selektiert.

2.1.2 Teil 2: Proben aus Zuweiserkollektiv

Es wurde Probenmaterialien mit dem anamnestischen Hinweis auf einen Abort gesammelt und bis zum Zeitpunkt der Batchanalyse asserviert. Die eingegangenen Blutproben, Citratplasma oder Serum, wurden zunächst 20 Min. bei 3.500 g zentrifugiert und daraufhin bei -28 bis -35 °C in einem *Screw Cap Tube False Bottom* (92 x 13 mm, Röhrchen, 3,5ml) Röhrchen oder in Röhrchen (5 ml, 75 x 13 mm) beide von Sarstedt (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) eingefroren.

2.1.3 Teil 3: Verumgruppe

Es wurden Serumproben von klinisch charakterisierten Patienten mit Lupus erythematoses gesammelt. Diese Proben wurden von niedergelassenen Rheumatologen zur Diagnostik in das AescuLabor gesendet. Nachdem die Diagnostik durchgeführt wurde, konnten vorhandene Restseren in Röhrchen (5 ml, 75 x 13 mm) von Sarstedt (Sarstedt AG) bei -28 bis -35 °C bis zum Zeitpunkt der Batchanalyse asserviert werden.

2.2 Teil 1: Retrospektive Datenanalyse

Es wurden Daten aus dem Zeitraum von 01.01.2008 bis zum 31.12.2009 aus den Labordaten des AescuLabors aus Medat (Medat Computer-Systeme GmbH) mit Hilfe von Crystal Reports (Crystal Services) gezogen.

Diese Daten wurden in Excel (Microsoft) exportiert und hinsichtlich verschiedener, im Ergebnisteil beschriebener Charakteristika selektioniert.

2.2.1 Laboranalyser und Reagenzien

2.2.1.1 Gerinnungsanalyser ACL Top 500

Das vollautomatische Analysegerät ACL Top 500 (Instrumentation Laboratory [IL], Bedford, Massachusetts, USA) ist ein hämostaseologisches Testsystem. Die vom System ausgegebenen Ergebnisse stellen sich aus direkt gemessenen Hämostaseparametern und berechneten Parametern zusammen. Mit dem ACL Top können koagulometrische (turbidimetrische) Verfahren, chromogene (Absorptions-) Methoden und immunologische Teste durchgeführt werden.

2.2.1.1.1 Reagenzien für MixConLA

- HemosIL aPTT-SP (lupus-sensitive aPTT; IL)

Das Testprinzip der Bestimmung der aPTT wird mit Hilfe von Silica, einer oberflächenaktiven Substanz, eingeleitet. Silica aktiviert Vorphasenfaktoren (HMW-Kininogen, Kallikrein) und Faktor XII, dies geschieht in einer festen Zeitspanne bei 37°C. Darauf werden weitere Reaktionen durch die Zugabe von Calcium ausgelöst und die Zeit bis zur Gerinnungsbildung wird gemessen. Zur Komplexbildung mit aktiviertem Faktor X und Prothrombin sind gerinnungsaktive Phospholipide (partielle Thromboplastine) notwendig. Die aPTT-SP Packung enthält zusätzlich zu dem aPTT Reagenz (5 Flaschen x 9 ml), das aus kolloidalen Silica-Dispersion mit synthetischen Phospholipiden, Puffer und Konservierungsmitteln zusammengesetzt ist, Calciumchlorid 5 x 8 ml Flaschen Calciumchlorid (0,025 mol/l) mit Konservierungsmitteln.

- HemosIL SynthAFax (lupus-insensitive aPTT; IL)

Die Inkubation von Plasma im Beisein einer optimalen Menge an Phospholipiden, einem negativ geladenen Kontakt-Aktivator und Puffer führt zur Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems. Nach Inkubation wird der Gerinnungsablauf durch die Zugabe von Calcium über eine festgelegte Zeitspanne gestartet und die Zeit bis zur Gerinnungsbildung gemessen. Die SynthAFax Packung setzt sich aus dem aPTT Reagenz und Calciumchlorid zusammen. Das aPTT Reagenz enthält 5 x 10 ml flüssiges, gepuffertes Phospholipidreagenz mit synthetischen Liposomen, welches Ellagsäure, Stabilisatoren und Konservierungsmittel enthält. Calciumchlorid (5 x 10 ml) besteht aus einer wässrigen Lösung (0,020 mol/l) mit Konservierungsmitteln.

- HemosIL Normal-Kontroll-Plasma (IL)

Das Normal-Kontroll-Plasma wird aus einem „Human Citrat“-Plasmapool hergestellt. Es dient der Genauigkeit und Überprüfung von Gerinnungstests. Die Normal-Kontroll Packung enthält neben den 10 x 1 ml Flaschen lyophilisiertes Human-Plasma Puffer, Stabilisatoren und Konservierungsmittel.

- Polybren-CaCl₂ 3 x 10ml (IL)
- pathologische Lupus-Kontrolle 2 x 1ml (IL).

2.2.1.1.2 Reagenzien für Lupus-Antikoagulans LAC screen/confirm (IL)

- LAC Screen

Die Packung besteht aus 10 Flaschen x 2 ml lyophilisiertes Material, welches Extrakt des Schlangengifts „Russells Viper Venom“, Phospholipide, Calcium, Polybren, Puffer, Stabilisatoren, Farbstoffe und Konservierungsmittel enthält.

- LAC Confirm

Die Packung setzt sich gleich zusammen, wie die LAC Screen Packung.

2.2.1.1.3 Testprinzip für Lupus-Antikoagulans

MixConLA (IL) ist ein aPTT-basierter Bestätigungstest für Lupus-Antikörper, der nach einem Screening erfolgt und auf dem ACL Top 500 durchgeführt wird. Hierzu wird das Patientenplasma (Citrat-Plasma) 1 + 1 mit Normalplasma vermischt. Durch ein Lupus-sensitives und ein Lupus-insensitives aPTT-Reagenz werden zwei Gerinnungszeiten gemessen. Zwischen diesen wird die Ratio bestimmt. Der gleiche Bestimmungsansatz wird für Normalplasma durchgeführt. Die schlussendliche MixConLA-Ratio ergibt sich aus der Division der Patienten-Ratio durch die Normalplasma-Ratio.

Lupus-Antikoagulans LAC screen/confirm (IL): Diese Teste werden auf dem ACL Top 500 basierend auf der dRVVT aus Citrat-Patientenplasma durchgeführt. Der Test LAC Screen enthält Phospholipide in geringer Konzentration und ist deshalb sensitiv gegenüber Lupus-Antikoagulans-Antikörpern. Beim LAC Confirm Test (IL) sind die Phospholipide in hohen Konzentrationen enthalten, wodurch die Lupus-Antikoagulans-Antikörper neutralisiert werden und die Gerinnungszeit verkürzt wird.

2.2.1.1.4 Beurteilung

Bei der MixConLA liegt der Referenzbereich der normalisierten Ratio zwischen 0,95 und 1,07, dieser ist aber geräteabhängig.

Bei Lupus-Antikoagulans LAC screen/ confirm liegt der Normalbereich der Ratio unter 1,2.

2.2.1.2 Imtec ELISA

Bei dem ELISA (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden, Deutschland) handelt es sich um einen händischen Test. Dieser hat eine Beschichtung mit Imtec-Cardiolipin-Antikörpern IgG/IgM und Imtec- β_2 -GPI 1-Antikörper IgG/IgM.

2.2.1.2.1 Testprinzip

Abbildung 2 soll das ELISA-Prinzip kurz darlegen.

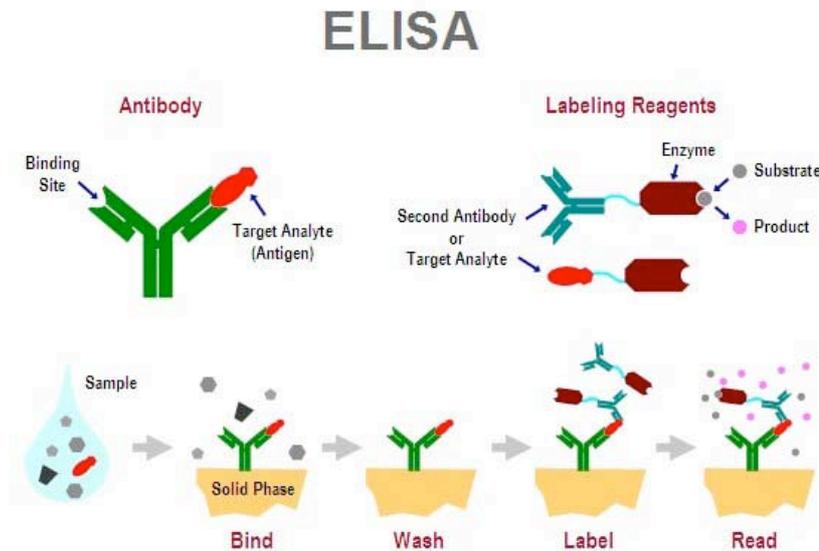


Abbildung 2: ELISA-Prinzip

URL: http://51protocol.com/upimg/100111/1_124500J8.jpg [Stand: 14.01.2012, 10:46].

Die 96-well-Mikrotiterplatten sind bei der Bestimmung von Cardiolipin-Antikörpern IgG/IgM mit Cardiolipin und β_2 -GPI und bei der Bestimmung von β_2 -GPI-Antikörpern IgG/IgM nur mit affinitätsgereinigtem, humanem β_2 -GPI beschichtet. Diese werden mit Kalibratoren, Kontrollen und Serumproben inkubiert. Währenddessen binden vorhandene Antikörper der zu testenden Proben in den vorbehaltenen Vertiefungen. Meerrettich-Peroxidase gebundenes IgG-Konjugat wird daraufhin inkubiert und erkennt die gebundenen Antikörper. Nach jeder Inkubation werden nicht gebundene Partikel mittels Absaugen und Waschen der Kavitäten entfernt. Nach Zugabe einer Substratlösung entsteht ein Farbstoff. Die Farbintensität ist proportional der Konzentration/Avidität der nachgewiesenen Antikörper. Nach Zugabe einer Stopp-lösung zeigt sich der Farbumschlag optisch indem sich die Farbe von blau nach gelb ändert. Die Extinktion wird darauf mit einem Columbus Pro Photometer (Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm gemessen.

2.2.1.2.2 Kits

Das jeweilige Imtec-Cardiolipin-Antikörper Testkit IgG/IgM bzw. β_2 -GPI-Antikörper IgG/IgM Testkit umfasst:

- 12 x Mikrotiterstreifen, mit je 8 Kavitäten, gebrauchsfertig, beschichtet mit Cardiolipin und gereinigtem humanem β_2 -GPI
- 5 x Kalibratoren IgG/IgM, Humanserum 1,5 ml konzentrationsabhängig eingefärbt, gebrauchsfertig. Cardiolipin-Konzentration: 31,25 U/ml, 62,5 U/ml, 125U/ml, 250 U/ml, 500 U/ml
- Negatives Kontrollserum 1,5 ml, human, gebrauchsfertig
- Positives Kontrollserum 1,5 ml, human, gebrauchsfertig
- Waschpuffer 50 ml, Konzentrat
- Verdünnungspuffer 100 ml, gebrauchsfertig, Phosphatpuffer
- Konjugatlösung 15 ml, anti-human-IgG/ IgM HRP Konjugat, gebrauchsfertig
- TMB Lösung 15 ml, gebrauchsfertig, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) 1,2 mmol/l, Wasserstoffperoxid 3 mmol/l
- Stopplösung 15 ml, Schwefelsäure, gebrauchsfertig
- Klebestreifen.

2.2.1.2.3 Beurteilung

Für β_2 -GPI-Antikörper IgG/IgM gelten Werte ≤ 7 U/ml als negativ und Werte > 7 U/ml als positiv. Für Cardiolipin-Antikörper IgG/IgM gelten Werte ≤ 10 GPL/ml bzw. MPL/ml als negativ und darüber liegende Werte als positiv.

2.2.2 Zusätzliche Geräte

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Kary B. Mullis veröffentlichte 1984 eine Methode mit der man eine *in vitro*-Amplifizierung von Nukleinsäure-Fragmenten ohne Verwendung von Zellen durchführen kann. Das Prinzip der PCR wird in Abbildung 3 am Beispiel einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstrangs dargelegt. Zunächst wird der Doppelstrang auf ca. 90 °C erhitzt, wodurch er denaturiert. Daraufhin wird die Temperatur auf ungefähr 50 °C herabgesenkt und zwei aus etwa 15 bis 25 Basen bestehende Oligonukleotide hinzugegeben, die komplementär zu der am 5'-Ende liegenden Sequenz der beiden Einzelstränge sind. Weiterhin werden DNA-Polymerase und Desoxyribonukleotide zugesetzt. Sie vervollständigen die beiden Einzelstränge zu einem Doppelstrang. Der Reaktionszyklus der aus Denaturieren, Anfügen der Oligonukleotide und Extension zu neuen Doppelsträngen besteht wird mehrfach wiederholt. Dadurch ergibt sich

eine exponentielle Zunahme der zu amplifizierenden DNA-Moleküle (Löffler und Petrides 2007).

Die PCR wurde mit dem *Real-Time* PCR Gerät LightCycler 1.5 (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) durchgeführt.

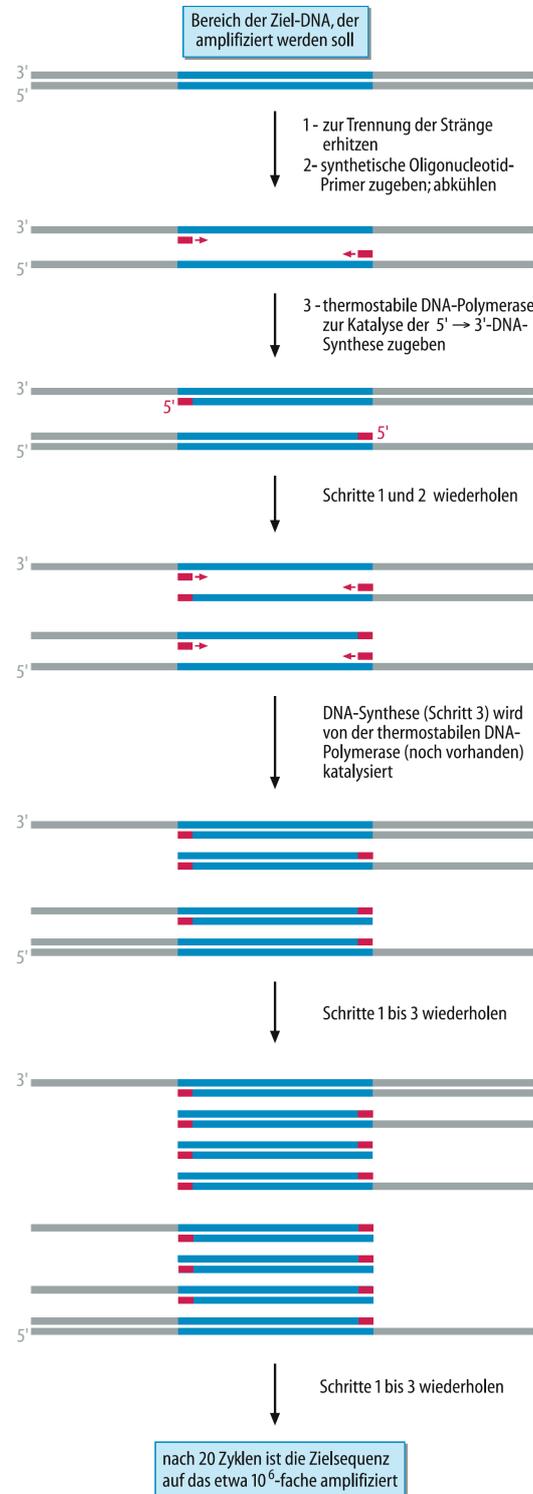


Abbildung 3: Amplifizierung einer spezifischen DNA Sequenz durch die PCR (Löffler und Petrides 2007)

2.2.3 Molekulargenetik

Die Mutation im MTHFR wird durch *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im MTHFR-Gen verursacht. Die beiden häufigsten SNPs sind 677C>T (refSNP ID: rs1801133, A222V) und 1298A>C (refSNP ID: rs1801131, E429A). Die SNPs werden mit Hilfe von oligonukleotiden Primern in Kombination mit der PCR aufgezweigt (Agarwal et al. 2007).

Die Mutation des Faktor V-Gens wird durch einen Basentausch von Guanin zu Adenin in Position 1691 hervorgerufen (Segal et al. 2009).

Im Prothrombin-Gen ist die Mutation durch einen Basentausch von Guanin zu Adenin in Position 20210 gegeben (Segal et al. 2009).

Mittels PCR mit dem *Real-Time* PCR Gerät LightCycler 1.5 (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) erfolgt ein Nachweis der jeweiligen Mutation über eine Schmelzpunktanalyse der Amplifikate. Zusätzlich wird der Vortex Mischer (Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland) benötigt. Als Untersuchungsmaterial kann EDTA (Ethyldiamin-tetraacetat), Citrat oder ein Wangenabstrich verwendet werden.

Benötigte Reagenzien:

- 1 M Tris Puffer
- 4 M NaOH
- HPCL (*High Pressure Liquid Chromatography*) Wasser
- QuantiFast SybrGreen (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Faktor II Primer und Probe
- Faktor V Primer und Probe
- MTHFR 677 Primer und Probe.

Benötigte Materialien:

- Transferpipetten in verschiedenen Größen (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200µl, 100-1000µl)
- Reagiergefäße 1,5 ml
- Sterile Filterpipettenspitzen
- Röhrchen (Sarstedt AG) 50 ml
- LightCycler Kapillaren (Roche Deutschland Holding GmbH) 20µl
- LightCycler Kühlblock für Kapillaren (Roche Deutschland Holding GmbH).

Die Kapillaren werden für jeden Parameter mit einem Master Mix angesetzt: pro zu bestimmenden Parameter werden 10 µl QuantiFast SybrGreen (Qiagen), 7 µl HPCL Wasser, 1 µl zugehöriger Primer und 2 µl der zugehörigen Probe zusammengefügt, kurz gemischt und bei

8.000 x g zentrifugiert. 19 µl von jedem Mix werden für den jeweiligen Parameter in die dementsprechenden Kapillaren pipettiert und noch 3,5 µl Patientenprobe hinzugefügt. Die Kapillaren werden in den Zentrifugeneinsätzen bei 1.200 rpm herunter zentrifugiert. Für den Transport werden die Kapillare in eine Pipettenschachtel umgesetzt und diese wiederum in das Proben Karussell des LightCyclers 1.5 (Roche Deutschland Holding GmbH) gesetzt. Daraufhin wird das PCR Gerät gestartet. Am Ende der Analyse werden die Schmelzpunkte angezeigt, die daraufhin ausgewertet werden.

2.3 Teil 2 und Teil 3: Proben aus Zuweiserkollektiv und Verumgruppe

2.3.1 Laboranalyzer

Alle Geräte wurden vor Beginn der Studie kalibriert und mit positiven und negativen Kontrollen überprüft.

2.3.1.1 Zenit ra

Zenit ra (A. Menarini Diagnostics, Florenz, Italien) ist ein Vollautomat für Immunfluoreszenz und ELISA. Standardisierte Arbeitsabläufe sind durch Vollautomatisierung gegeben. Das System berechnet die Testergebnisse mittels gespeicherter Kalibrierungskurve.

2.3.1.1.1 Testprinzip

Die Magnetpartikel werden für die Messung des Cardiolipin mit Cardiolipin und β_2 -GPI und für die Messung des β_2 -GPI nur mit β_2 -GPI beschichtet. Dies stellt die Festphase dar. Das Konjugat bindet ein Antikörper gegen humane IgG/IgM, der mit einem Acridiniumester-Derivat markiert wurde. Die folgenden Schritte decken sich denen, die in 2.3.1.5.1 beschrieben werden.

2.3.1.1.2 Kits

Das jeweilige Kit setzt sich zusammen aus:

- Reagenz 1 (Magnetpartikel), 2,5 ml: beschichtete Magnetpartikel in Phosphatpuffer mit Stabilisatorprotein, Tensid, Pro-Clin 300 und Natriumazid (<0,1 %) als Konservierungsmittel
- Reagenz 2 (Konjugat), 25 ml: monoklonale Mausantikörper gegen humane IgG/IgM, mit einem Acridiniumester-Derivat markiert in Phosphatpuffer mit Stabilisatorprotein, Tensid, Pro-Clin 300 und Natriumazid (<0,1 %) als Konservierungsmittel
- Reagenz 3 (Diluent), 25 ml: Probenverdünnungsmittel: Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem blauem Farbstoff und Natriumazid (<0,1 %) als Konservierungsmittel

- Reagenz 4 (Kalibrator A), 1,6 ml: Humanserum mit niedriger Konzentration von Cardiolipin IgG/IgM bzw. β_2 -GPI IgG/IgM mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff und Natriumazid (<0,1 %) als Konservierungsmittel
- Reagenz 5 (Kalibrator B), 1,6 ml: Humanserum mit niedriger Konzentration von Cardiolipin IgG/IgM bzw. β_2 -GPI IgG/IgM mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff und Natriumazid (<0,1 %) als Konservierungsmittel.

2.3.1.1.3 Beurteilung

Cardiolipin-IgG/IgM Konzentrationen < 10 GPL/ml bzw. MPL/ml gelten als negativ, sowie für β_2 -GPI IgG/IgM Werte < 10 AU/ml. Für Cardiolipin IgM und β_2 -GPI IgM gelten Werte \geq 10 MPL/ml bzw. AU/ml als positiv. Cardiolipin IgG und β_2 -GPI IgG Konzentrationen zwischen 10 und 20 GPL/ml bzw. AU/ml werden als ein Bereich definiert, in dem das Vorliegen von Antikörpern als unsicher angesehen wird. Darrüberliegende Werte (> 20) gelten als positiv.

2.3.1.2 ImmunoCAP 250

Das ImmunoCAP 250 (Phadia, Uppsala, Schweden) ist ein automatisiertes System für Autoimmun- und Allergieteste. Es verarbeitet Proben von der Testanforderung bis zum Endergebnis bei wenigen Eingriffen.

2.3.1.2.1 Testprinzip

Die EliA Wells (Phadia) aus Polystyrol sind mit definierten Antigenen (bovinem Cardiolipin oder humanem β_2 -GPI) vorbeschichtet. Während des Testprozesses wird Probenmaterial in die EliA Wells pipettiert. Spezifische Autoantikörper aus dem Probenmaterial binden an das Antigen. Diese Bindung wird durch Hinzufügen eines enzymmarkierten Konjugats, dessen Substrat gemessen wird, festgestellt. Die dadurch auftretende Fluoreszenz wird im integrierten Fluormeter registriert.

2.3.1.2.2 Reagenzien

Die EliA Reagenzien (Phadia) sind als modulare Verpackungseinheiten zu erwerben. Es sind jedoch für die Durchführung des jeweiligen Tests alle Komponenten notwendig.

Für die Bestimmung von Cardiolipin-Antikörpern IgG/IgM und β_2 -GPI-Antikörpern IgG/IgM sind folgende testspezifische Reagenzien erforderlich:

- EliA Cardiolipin IgG/IgM Well für die Bestimmung von Cardiolipin-Antikörpern und für die Bestimmung von β_2 -GPI-Antikörper EliA β_2 -Glycoprotein I IgG Well
- EliA APS Positive Control 250
- EliA IgG/IgM Negative Control 250

- *EliA Sample Diluent*
- *EliA IgG/IgM Conjugate 50*
- *EliA IgG/IgM Conjugate 200*
- *EliA IgG/IgM Calibrator Strips*
- *EliA IgG/IgM Curve Control Strips*
- *EliA IgG/IgM Calibrator Well*
- *Development Solution*
- *Stop Solution*
- *Dilution Plates*
- *Washing Solution.*

2.3.1.2.3 Beurteilung

Cardiolipin IgG/ IgM Well (International Calibration: Harris, University of Kentucky, Louisville, KY, USA) Werte < 10 GPL U/ml bzw. 10 MPL U/ml gelten als negativ. Werte zwischen 10 und 40 GPL U/ml bzw. MPL U/ml sind als schwach positiv definiert und Werte > 40 GPL U/ml bzw. 40 MPL U/ml als positiv. β_2 -GPI IgG/IgM Well Werte < 7 U/ml sind negativ. Ermittelte Werte, die zwischen 7 und 10 U/ml liegen, sind als grenzwertig anzusehen und Werte > 10 U/ml als positiv.

2.3.1.3 Alegria

Beim Alegria-Analyser (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Deutschland) handelt es sich um ein semiautomatisiertes Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern. Das Gerät verfügt über ein *Random-Access*, d.h. über eine freie Probenauswahl und eine individuelle Testanforderung und über eine *sensotronic memorized calibration* (SMC) Technologie. Die SMC-Teststreifen basieren auf einer indirekten Enzym-Immuno-Reaktion. Jeder Teststreifen umfasst 8 Kavitäten und ist mit einem individuellen Barcode versehen. Ein Teststreifen ist für eine Bestimmung geeignet. Der SMC-Teststreifen ist mit einem kompletten Reagenzienset ausgestattet, bestehend aus Enzymkonjugat, Enzymsubstrat, Probenverdünnungspuffer und einer testspezifischen Kontrolle für Anti-Cardiolipin IgG/IgM oder Anti- β_2 -GPI IgG/IgM.

2.3.1.3.1 Testprinzip

Das Testprinzip ist mit dem Testprinzip des Imtec-ELISA vergleichbar, siehe 2.2.1.2.1.

2.3.1.3.2 Kits

Das jeweilige Testkit (Orgentec) für Anti-Cardiolipin IgG/ IgM enthält für das Alegria Testverfahren 12 oder 24 SMC-Teststreifen, 12 x 8 Mikrotiterplatten, Kalibratoren, TMB-Substrat,

und Antigen Cardiolipin mit Cofaktor β_2 -GPI. Das jeweilige Testkit für β_2 -GPI-Antikörper IgG/IgM ist gleich zusammengestellt, enthält aber als Antigen nur β_2 -GPI.

2.3.1.3.3 Beurteilung

Die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erfolgt vollautomatisch. Für Cardiolipin-Antikörper IgG liegen Werte < 10 GPL U/ml im negativen Bereich und Werte ≥ 10 GPL U/ml im positiven Bereich. Werte < 7 MPL U/ml gelten für Cardiolipin-Antikörper IgM als negativ und Werte ≥ 7 MPL U/ml als positiv. Für β_2 -GPI-Antikörper IgG/IgM liegt der negative Ergebnisbereich bei Werten < 5 U/ml, Werte zwischen 5 und 8 werden als grenzwertig definiert und der positive Bereich liegt bei Werten > 8 U/ml.

2.3.1.4 Imtec-ELISA

Siehe 2.2.1.2.

2.3.1.5 ACL AcuStar

Beim ACL AcuStar (IL) handelt es sich um eine automatisierte Chemilumineszenz-Technologie (*Immunoassay*). Es werden gebrauchsfertige Reagenzkartuschen verwendet. In dem Gerät integriert sind ein Barcodeleser und ein Touchscreen. Es kann eine kontinuierliche Probenbestückung stattfinden. Es fasst insgesamt 30 Proben.

2.3.1.5.1 Testverfahren

Der jeweilige Antikörper Test ist ein Zweistufen-Chemilumineszenz-Immunoassay, welcher Magnetstreifen enthält, die für Cardiolipin IgG/IgM mit Cardiolipin und gereinigtem humanem β_2 -GPI und für β_2 -GPI IgG/IgM nur mit gereinigtem humanem β_2 -GPI beschichtet sind. Bei Vorhandensein von Antikörpern in der zu messenden Probe, binden die Antikörper an den beschichteten Magnetpartikeln. Nach der ersten Inkubation, magnetischer Separation und einem Waschvorgang, wird ein Tracer hinzugegeben. Der Tracer enthält Isoluminol markierte humane anti-IgG/IgM Antikörper und kann dadurch die eingefangenen Antikörper an den Partikel binden. Nach einer weiteren Inkubation, magnetischer Separation und einem Waschvorgang wird durch Zugabe von Reagenzien, die Chemilumineszenz-Reaktion getriggert. Durch das optische System des Gerätes wird das emittierte Licht gemessen. Die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLUs) sind proportional zu der Antikörper-Konzentration in der Probe.

2.3.1.5.2 Kits

Ein Kit für eine Bestimmung der Antikörper Cardiolipin IgG/IgM bzw. β_2 -GPI IgG/IgM enthält jeweils: eine zugehörige Antikörper Kartusche für 50 Bestimmungen und 2 zugehörige Kalibratoren.

Eine Kartusche enthält je eine Flasche:

- Suspension mit Magnetpartikeln, die mit bovinem Cardiolipin bzw. β_2 -GPI beschichtet sind
- Tracer, der humane anti-IgG/IgM Antikörper, die mit Isoluminol markiert sind, enthält
- Probendiluent

Das Probendiluent wird für die automatische Verdünnung der Probe und eines Reruns benötigt. Die Reagenzien befinden sich in einem Phosphat- oder Boratpuffer, der bovines Serum-Albumin, Cardiolipin, humanes β_2 -GPI, monoklonale Maus IgM/IgG, Stabilisatoren und Konservierungsmittel enthält.

Ein Kalibrator umfasst jeweils ein barcodiertes Röhrchen mit 1 ml einer Lösung des jeweiligen Antikörpers in Kochsalzlösung, die bovines fetales Serum, Stabilisatoren und Konservierungsmittel enthält.

2.3.1.5.3 Beurteilung

Die Ergebnisse werden in U/ml (frei gewählte IgG/IgM *Units*) angegeben. Festgelegt wurde ein Grenzwert von 20 U/ml für jeden Antikörper Parameter. Werte oberhalb von 20 U/ml gelten als positiv.

2.3.2 *cut-off*-Werte

Die *cut-off*-Werte in unserer Studie wurden von den einzelnen Firmen für das zugehörige Gerät ermittelt und festgelegt. An diese vorgegebenen *cut-off*-Werte hat sich unsere Studie gehalten. Beim ACL AcuStar wurde der *cut-off* als Obergrenze des Normalbereichs von 250 Citratplasmen einer Blutbank (99 % Perzentil) ermittelt. Hier galten für alle Antikörper-Werte über 20 U/ml als positiv. Für das Analysegerät ImmunoCAP 250 wurden 400 Seren einer Blutbank von offensichtlich gesunden Personen auf den jeweiligen Antikörper untersucht und die 95 % und 99 % Perzentile bestimmt. 70 der Proben wurden zusätzlich auf dem Gerät Phadia 250 bestimmt, um die Ergebnisse zu überprüfen. Für Cardiolipin IgG/IgM gelten Werte zwischen 10 und 40 GPL/ml bzw. MPL/ml als schwach positiv und Werte > 40 GPL/ml bzw. MPL als positiv. Für β_2 -GPI IgG/IgM ist ein grenzwertiger Bereich zwischen 7 und 10 U/ml definiert. Werte > 10 U/ml werden als positiv angesehen. Für den Imtec-ELISA wurde ebenfalls ein Kollektiv gesunder Personen untersucht und die 95 % und 99% Perzentile bestimmt. Die 99% Perzentile entsprechen z. B. für Cardiolipin IgM 7,1 MPL/ml und für Cardi-

olipin IgG 9,4 GPL/ml. Es gelten Werte als positiv, wenn Cardiolipin IgG/IgM oberhalb 10 GPL/ml bzw. MPL/ml und β_2 -GPI IgG/IgM oberhalb von 7 U/ml liegt. Für die *cut-off*-Werte beim Analysegerät Alegria wurden 250 Proben von Blutspendern getestet und daraus die 99 % Perzentile ermittelt. Bei Alegria gelten Cardiolipin-Werte IgG ≥ 10 GPL/ml, Cardiolipin-Werte IgM ≥ 7 MPL/ml als positiv. Für β_2 -GPI-Werte IgG/IgM sind Werte zwischen 5 und 8 U/ml als grenzwertig definiert und Werte > 8 U/ml als positiv. Auf dem Analysegerät Zenit ra wurden 100 Proben von gesunden Personen auf das Vorliegen der jeweiligen Antikörper überprüft und mittels deren Ergebnisse eine Erfassungsgrenze berechnet. Die Grenze wurde als 95 % Perzentile der negativen Bevölkerung festgelegt und liegt für Cardiolipin-Antikörper IgG bei 6,2 GPL/ml, für Cardiolipin-Antikörper IgM 4,3 MPL/ml, für β_2 -GPI-Antikörper IgG bei 3,8 AU/ml für β_2 -GPI-Antikörper IgM bei 1,8 AU/ml jeweils mit der Reagenziencharge 2. Cardiolipin-Antikörper IgM-Werte ≥ 10 MPL/ml und β_2 -GPI-Antikörper IgM-Werte ≥ 10 AU/ml gelten als positiv. Anti-Cardiolipin IgG- und Anti- β_2 -GPI IgG-Werte zwischen 10 und 20 GPL/ml bzw. AU/ml liegen in einem Graubereich. Erst Werte > 20 GPL/ml bzw. AU/ml gelten als positiv.

Für unsere Studie haben wir bei den drei Firmen (A. Menarini Diagnostics, Orgentec Diagnostika GmbH und Phadia) mit schwach positiven bzw. grenzwertigen Bereichen für die Darstellung der Boxplots und der Berechnung für Cohen's Kappa jeweils den untersten Wert als *cut-off*-Wert verwendet, da bei dem Zenit ra von einem „fragwürdigen“ Bereich gesprochen wird, der in den Sapporo-Kriterien nicht definiert wurde (Miyakis et al. 2006). Beim Alegria wird von einem „grenzwertigen“ Bereich gesprochen, bei welchem es unklar ist, ob Antikörper vorliegen oder nicht. Für ImmunoCAP 250 haben wir uns ebenfalls für den untersten Wert entschieden, da bereits bei schwach positiven Werten Antikörper vorliegen und die anderen Geräte einen gleichen oder ähnlichen *cut-off*-Wert haben und somit eine bessere Vergleichbarkeit gegeben war.

2.3.3 Statistische Auswertung Teil 1

Zur statistischen Auswertung wurde Excel (Microsoft, Redmond, USA) und R.2.13.0 (R-statistics, *open source software*) genutzt.

Für das Antiphospholipid-Antikörper Screening wurden nur weibliche Patienten berücksichtigt und die Antikörper-Verteilung im primären Patientenkollektiv ausgewertet. Die Verteilung wurde ermittelt, indem Patientinnen in Zusammenhang mit der Anzahl der positiven Testverfahren gebracht wurden. Zusätzlich wurden Summen der einzelnen positiven Testverfahren gebildet. Die Ergebnisse wurden in Form von Säulendiagramm und Tabelle dargestellt, welche mit Excel (Microsoft) erstellt wurden.

Für das selektierte Patientenkollektiv wurde die Datentabelle in Excel (Microsoft) hinsichtlich des Geschlechts auf weibliche Patientinnen selektiert und es wurde ein Mindestalter von 18 Jahren als Trigger gesetzt. An Daten musste ein vollständiges Screening auf Thrombophilie und Antiphospholipid-Antikörper vorliegen. Die Altersverteilung wurde mittels gebildeten Mittelwerts, Standardabweichung, Minimum (MIN) und Maximum (MAX) erstellt.

Für die einzelnen Screeningwerte wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Zusätzlich wurde ermittelt bei wie vielen Patientinnen der jeweilige Thrombophilieparameter bestimmt wurde und dies in Prozent dargestellt. Für Protein C, Protein S und Antithrombin wurde zusätzlich jeweils ein Balkendiagramm erstellt, um die pathologischen Werte, die unterhalb des Referenzbereiches liegen, darzustellen.

Für die Faktor II- und Faktor V-Mutation wurden die Verteilung der einzelnen Mutationen und die Kombination der beiden Mutationen für das Patientinnenkollektiv bestimmt und in Form eines Tortendiagramms abgebildet.

Auch für das selektierte Patientinnenkollektiv wurde das Screening für Antiphospholipid-Antikörper durchgeführt und nach gleichem Schema, wie für das primäre Patientenkollektiv, ausgewertet. Zusätzlich wurde mittels R.2.13.0 (R-statistics, *open source software*) ein Boxplot für Cardiolipin-Antikörper IgG/IgM und β_2 -GPI-Antikörper IgG entworfen. Für eine bessere Darstellung der Boxplots wurden Werte über 30 der jeweiligen Einheit auf 30 der jeweiligen Einheit winsorisiert.

2.3.4 Statistische Auswertung Teil 2 und 3

Für die statistische Auswertung des zweiten und dritten Teils wurde zunächst nur Excel (Microsoft) verwendet und mit dessen Verwendung der Mittelwert, sowie Standardabweichung Minimum und Maximum für die Altersverteilung berechnet, die einzelnen Thrombophilieparameter und ihre Verteilung wurden mittels Mittelwert und Standardabweichung ermittelt und dessen Angaben in Absoluten- und Prozentzahlen dargelegt. Desweiteren wurde mit Excel (Microsoft) die Anzahl und Verteilung der Aborte und deren Zeitpunkte bestimmt und mittels Säulendiagramm dargestellt. Die Angaben der Aborte und deren Zeitpunkt beziehen sich hauptsächlich auf die klinischen Daten, die per Fax von niedergelassenen Gynäkologen eingeholt wurden. Bei den Patientinnen, bei denen keine klinischen Daten vorlagen, wurde sich bei der Angabe der Anzahl der Aborte auf den Überweisungsschein verlassen. Bei einem Hinweis auf Abort wurde von einem Abort ausgegangen, bei Angabe der Zahl wurde diese übernommen und bei der Angabe von habituellen Aborten wurde von 3 Aborten ausgegangen. Ebenfalls mittels Excel konnten die Anzahlen der positiven und negativen Ergeb-

nisse der einzelnen Testsysteme beurteilt werden und diese in Form einer Tabelle vorgestellt werden.

2.3.4.1 Boxplots

Die Boxplots wurden mit Hilfe des Institutes für Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf jeweils für einen Parameter mittels R.2.13.0 (R-statistics, *open source software*) dargestellt. Für den jeweiligen *cut-off*-Wert für die einzelnen Parameter der Firmen haben wir Bezeichnungen der Hersteller, die nicht als negativ ausgezeichnet waren, als positiv definiert. Dies bedeutet, dass wir keine Graubereiche, fragwürdigen Bereiche, keine grenzwertigen Bereiche und schwach positive Bereiche unterschieden haben. Auf Grund der schiefen Verteilung der Messungen wurden die Ergebnisse mit Stetigkeitskorrektur und normalisiert für den Geräte-Typ entsprechenden Grenzwert logarithmiert. Die Funktion lautete: $\log(\text{Ausgangswert}/\text{cut-off}+1)$. Die vier Boxplots wurden illustriert mit dem normalisierten *cut-off*-Wert bei $\log(2)$. Hierbei wurden Messwerte oberhalb von 1,5 auf der logarithmierten Skala, d.h. das ca. 3,5-fache des jeweiligen Grenzwertes, winsorisiert.

Die Boxplots wurden für das Abort-Kollektiv und für die Verumgruppe gezeichnet.

2.3.4.2 Cohen's Kappa

Um die Übereinstimmung der positiven und negativen Ergebnisse der einzelnen Geräte darzulegen, wurde mittels R.2.13.0 (R, Auckland, Neuseeland) mit Hilfe des Institutes für Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf anhand der *cut-off*-Werte gebildete Vierfeldertafeln das Übereinstimmungsmaß Cohen's Kappa berechnet. Hier galten die gleichen Grenzwerte, wie bei der Ermittlung der Boxplots.

Cohen's Kappa wurde ebenfalls für das Abort-Kollektiv und für die Verumgruppe berechnet.

2.3.5 Zeitanalyse

Um die Testsysteme untereinander in ihrem Zeitaufwand vergleichen zu können, wurden die einzelnen Vorgehensschritte mittels einer Stoppuhr gemessen und die Zeit für eine Bestimmung einer Probe mit vier Parametern berechnet.

Zenit ra (A. Menarini Diagnostics, Florenz, Italien) wird händisch mit Proben bestückt. Daraufhin arbeitet das Gerät selbstständig, welches die *Walk-away* Zeit darstellt.

Imtec-ELISA (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden, Deutschland) wird vollständig von Hand durchgeführt. Eine Platte fasst 80 Proben. Auf einer Platte wird jeweils ein Parameter bestimmt. Zunächst wurden je 10 μl einer Probe in Röhr-

chen pipettiert, daraufhin wurde eine Verdünnungslösung hinzugefügt, gut gemischt und schließlich auf die Platte gebracht inklusive Kalibratoren und Kontrollen. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur inkubiert, danach gewaschen und Konjugat hinzugefügt, welches zunächst belassen wurde und danach nochmals gewaschen wurde. Danach wurde Substrat hinzugefügt, gewartet und darauf die Stopplösung pipettiert. Zuletzt wurden die Proben dann mit dem Photometer gemessen.

Da diese Schritte immer für 80 Proben in Serie durchgeführt wurden, musste der Zeitaufwand für die Analyse einer Probe mit 4 Parametern rechnerisch ermittelt werden (händische Arbeitszeit für 80 Proben durch 80 dividiert und dann mit 4 multipliziert).

Bei dem ImmunoCAP 250 (Phadia, Uppsala, Schweden) müssen die Proben in einen Probenständer gestellt werden und dieser in die zugehörige Schiene in das Gerät geschoben werden. Anschließend müssen die Anforderungen von Hand eingegeben werden. Nach Betätigung des Start-Knopfes arbeitet das Gerät selbstständig.

Das Analysegerät Alegria (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Deutschland) erfordert zu Beginn händischen Einsatz. Die Schutzfolie der SMC-Teststreifen wird entfernt, in die Halterung eingelegt und 10 µl der Probe in die erste Kavität pipettiert. Die Halterung wird nach Eingabe der Patientenummer in das Gerät geschoben. Nachdem das Gerät die Streifen eingelesen hat, wird der Startknopf betätigt und das Gerät arbeitet ab diesem Zeitpunkt selbstständig.

Beim ACL AcuStar (Instrumentation Laboratory, Bedford, US-Bundesstaat Massachusetts, USA) wird die Probe in einen Probenständer gestellt und dieser in das Gerät gestellt. Den Barcode der Probe liest das Gerät automatisch ein. Am Computer wird die Anforderung eingegeben. Daraufhin erfolgt die Abarbeitung der Proben automatisch.

3. Ergebnisse

3.1 Teil 1: Retrospektive Datenanalyse

3.1.1 Antiphospholipid-Antikörper Screening für das primäre Patientenkollektiv

Das Screening für die Antiphospholipid-Antikörper umfasst den LAC-Screen-Test, die MixConLA Testung, Cardiolipin-Antikörper vom Typ IgG und IgM und β_2 -GPI-Antikörper. Hierbei können einzelne Parameter positiv ausfallen oder auch mehrere kombiniert. Der LAC-Screen-Test wird in schwach positive Werte und positive Werte unterteilt.

Das primäre Patientenkollektiv von 7.717 Patienten und Patientinnen wurde auf Patientinnen eingeschränkt, womit das Kollektiv für dieses Antiphospholipid-Antikörperscreening 6.927 Patientinnen umfasste. In diesem Patientinnenkollektiv wiesen eine Vielzahl an Patientinnen positive Werte für verschieden viele Testverfahren auf.

Tabelle 4 verdeutlicht wie viele Patientinnen in keinem oder einem der Testverfahren (Lac-Screen-Test, MixConLa, Cardiolipin-Antikörper IgG, Cardiolipin-Antikörper IgM, β_2 -GPI-Antikörper IgG) auf Antiphospholipid-Antikörper positiv getestet wurden, beziehungsweise wie viele Patientinnen positive Werte in zwei, drei, vier oder fünf Testverfahren aufwiesen. Es zeigt sich eine abnehmende Häufigkeit der Patientinnen Anzahl mit Zunahme der positiven Werte in den Testverfahren.

Tabelle 4: Antiphospholipid-Antikörper-Screening

Spalte 1: Anzahl positiver Testverfahren; Spalte 2: Anzahl der Patientinnen; (n=6.927).

| Anzahl positiver Testverfahren | Anzahl der Patientinnen |
|--------------------------------|-------------------------|
| 0 | 6.170 |
| 1 | 664 |
| 2 | 72 |
| 3 | 12 |
| 4 | 8 |
| 5 | 1 |

Im Einzelnen, wie in Abbildung 4 zu sehen ist, zeigten 27 (0,39 %) Patientinnen positive Werte im LAC Screen und 89 (1,3 %) schwach positive Werte. Im MixConLA wiesen 167 (2,4 %) Patientinnen einen positiven Wert auf. Für Cardiolipin-Antikörper IgG hatten 119 (1,7 %) Patientinnen positive Werte und für Cardiolipin-Antikörper IgM 85 (1,2 %) Patientinnen. 394 (5,7 %) Patientinnen zeigten positive Werte für β_2 -GPI-Antikörper IgG.

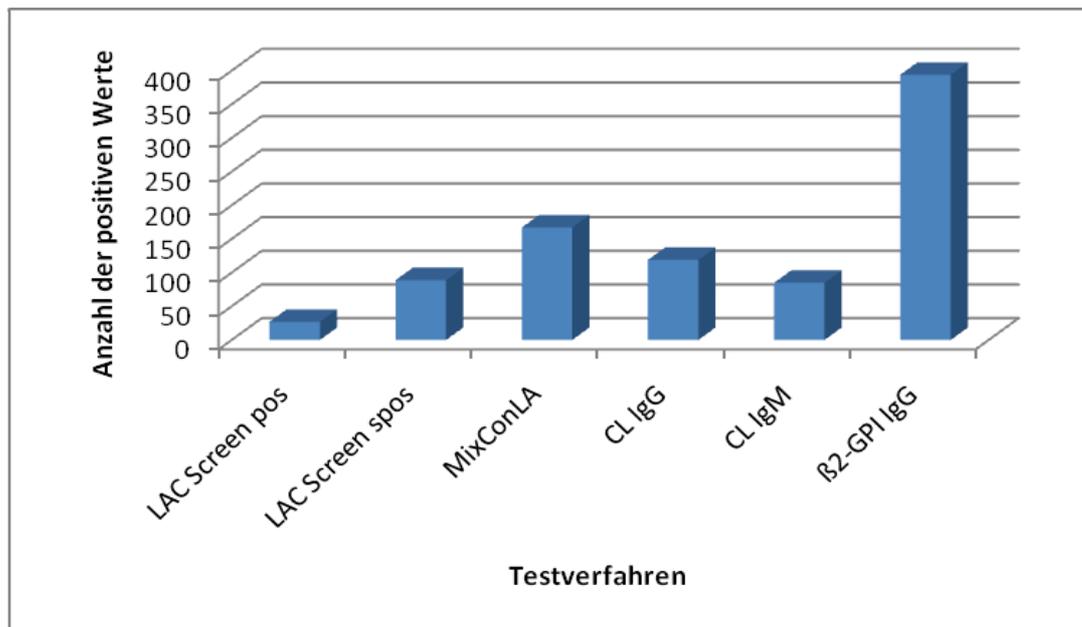


Abbildung 4: Verteilung der Antiphospholipid-Antikörper

LAC Screen pos: LAC-Screen positive; LAC Screen spos: LAC-Screen schwach positive; MixConLA positive; CL IgG: Cardiolipin-Antikörper IgG; CL IgM: Cardiolipin-Antikörper IgM; β₂-GPI IgG: β₂-GPI-Antikörper IgG; (n=6.927)

3.1.2 Selektiertes Patientinnenkollektiv

Das primäre Patientinnenkollektiv umfasste 7.717 Patienten und Patientinnen. In der Studie sollten jedoch nur Frauen mit einem Mindestalter von 18 Jahren berücksichtigt werden, womit sich das Patientinnenkollektiv auf 6.310 Patientinnen einschränkte.

Desweiteren musste bei allen Patientinnen ein vollständiges Thrombophiliescreening vorliegen. Hierfür waren Ergebnisse für Protein C, Protein S, Antithrombin, Faktor II-Mutation und Faktor V-Mutation erforderlich. Zusätzlich musste das Antiphospholipid-Antikörper-Screening vollständig durchgeführt sein. Dieses umfasste den LAC-Screen-Test, die MixConLA Reaktion, Cardiolipin-Antikörper IgG und IgM, β₂-GPI-Antikörper IgG. Vollständig auswertbare Datensätze lagen schließlich für 1.368 Patientinnen als endgültiges Kollektiv vor.

3.1.2.1 Altersverteilung

Der Mittelwert des Alters des Patientinnenkollektives betrug zum Zeitpunkt des jeweiligen Thrombophiliescreenings $36,4 \pm 14,4$ Jahre (Min. 18,0 Jahre, Max. 78,1 Jahre (in Jahren)).

3.1.2.2 Weitere Thrombophilie-Screeningwerte

Bei 10 von 1.368 Patientinnen wurde zusätzlich zu den in 3.1.2 aufgeführten Parametern die MTHFR-Mutation mitbestimmt. Davon wiesen 5 (50 %) Patientinnen keine Mutation auf und 5 (50 %) Patientinnen waren heterozygot.

Als zusätzliche Screeningwerte lagen Faktor VIII-Antigen Bestimmungen bei 1.122 Patientinnen (82,0 %), die Faktor VIII-Aktivität bei 124 Patientinnen (9,1 %), die Thromboplastinzeit (TPZ, Quick) bei 1.361 Patientinnen (99,5 %), die aPTT bei 1365 Patientinnen (99,8 %) und Fibrinogen bei 1.364 Patientinnen (99,7 %) von den 1.368 Patientinnen vor.

Bei den Faktor VIII-Antigen-Ergebnissen lagen 143 (12,75 %) von 1.122, bei welchen Faktor VIII-Antigen bestimmt wurde, über dem Referenzwert von 150 %. Über 160 % befanden sich 105 (9,36 %) Patientinnen Werte. Der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) betrug $105,78 \pm 39,59$ %.

Bei 15 (12,1 %) von 124 Patientinnen, bei denen die Faktor VIII-Aktivität bestimmt wurde, lagen die Werte über dem Referenzbereich von 60-150 %. Dies entspricht 12,10 %. Der Mittelwert \pm SD ergab $71 \pm 22,14$ %.

Bei den 1.361 Patientinnen bei denen die TPZ bzw. der Quickwert bestimmt wurde, lagen von 1.120 Patientinnen (82,3 %) die Werte im Referenzbereich von 70-120 %. Der Mittelwert \pm SD machte $105,03 \pm 25,31$ % aus.

1.196 von 1.365 Patientinnen hatten eine im Referenzbereich liegende aPTT von 24-38 Sekunden. Der Mittelwert \pm SD betrug $33,48 \pm 7,71$ %.

Von 1.364 Patientinnen bei denen Fibrinogen bestimmt worden ist, lagen die Werte von 1.195 Patientinnen im Normbereich von 200-450 mg/dl. Der Mittelwert \pm SD ergab $318,25 \pm 87,35$ mg/dl.

3.1.2.3 Protein C

Der Referenzbereich von Protein C liegt zwischen 70 und 140 %. Bei 1.244 (90,9 %) von 1.368 Patientinnen lagen die Werte im Referenzbereich. Als pathologisch gelten die Werte, die unterhalb und oberhalb des Referenzbereichs liegen. Bei 105 (7,68 %) Patientinnen lag der Protein C Wert unter 70 % und bei 19 (0,07 %) Patientinnen über 140 %. Damit lag bei 7,75 % ein pathologischer Wert vor. Der Mittelwert \pm SD betrug $93,95 \pm 20,64$ %. Der minimale Protein C Wert lag bei 2 % und der maximale Wert bei 176 %.

Abbildung 5 stellt die Verteilung der pathologischen Protein C Werte unterhalb des Referenzbereiches im Patientinnenkollektiv dar.

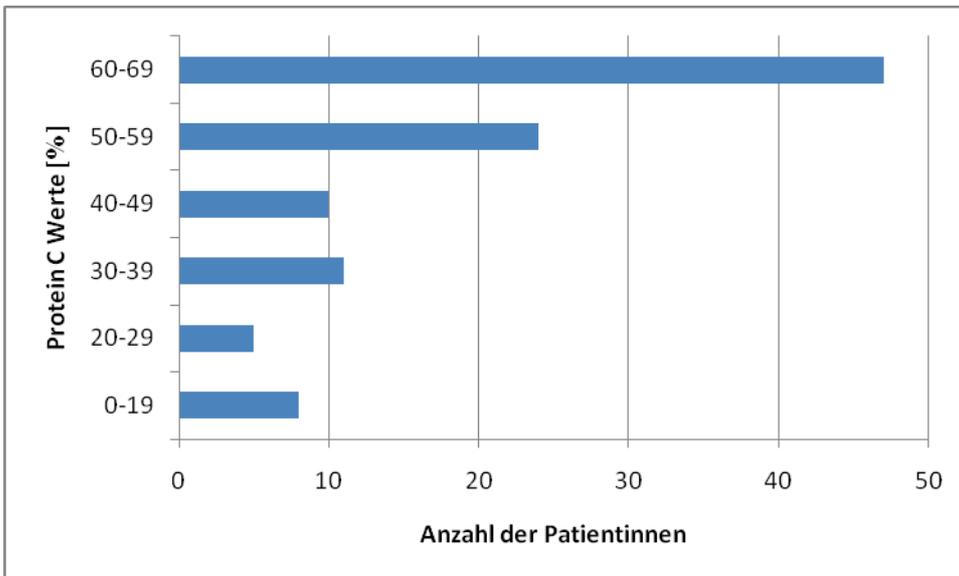


Abbildung 5: Pathologische Protein C Werte unterhalb des Referenzbereiches (n=1.368).

3.1.2.4 Protein S

Bei Protein S liegt der Referenzbereich zwischen 55 und 130 %. Im Referenzbereich lagen die Werte von 1.218 (89,0 %) von 1.368 Patientinnen. Pathologische Werte fanden sich für die Ergebnisse von 150 (11,0 %) Patientinnen. Hiervon lagen 132 (8,0 %) unter dem Referenzbereich und 18 (1,3 %) darüber. Der Mittelwert \pm SD lag bei $83,18 \pm 21,63$ %. Der niedrigste Wert lag bei 9 % und der höchste Wert bei 206 %.

In Abbildung 6 ist die Verteilung der pathologischen Protein S-Werte unterhalb des Referenzbereiches im Patientinnenkollektiv dargelegt.

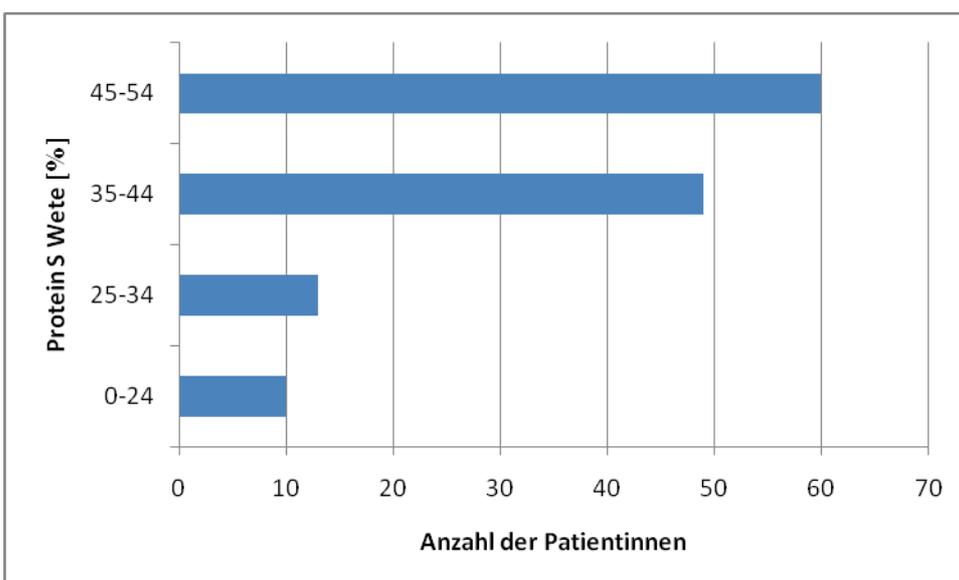


Abbildung 6: Pathologische Protein S Werte unterhalb des Referenzbereiches (n=1.368).

3.1.2.5 Antithrombin

Für Antithrombin ist der Referenzbereich zwischen 80 und 120 % definiert. Von den 1.368 Patientinnen fand sich bei 1.266 (92,5 %) Patientinnen ein im Referenzbereich liegender Antithrombin-Wert. Unterhalb des Referenzbereiches lagen die Werte von 70 (5,1 %) Patientinnen, oberhalb der Werte von 32 (2,3 %) Patientinnen. Der Mittelwert \pm SD des Antithrombins betrug $97,55 \pm 12,03$ %. Der niedrigste Wert lag bei 29 % und der höchste Wert bei 157 %.

Die Verteilung der pathologischen unter dem Referenzbereich liegenden Antithrombin-Werte ist in Abbildung 7 angegeben.

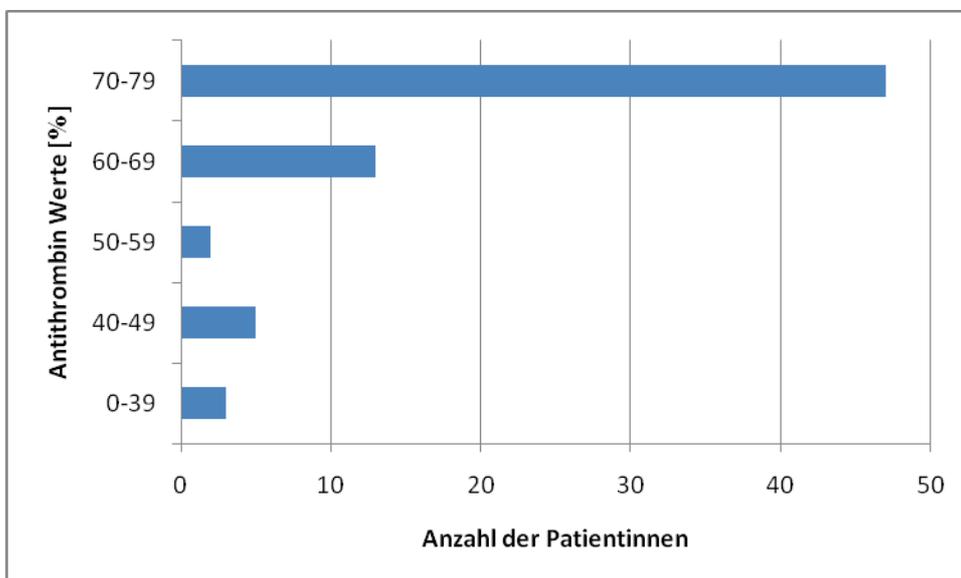


Abbildung 7: Pathologische Antithrombin Werte unterhalb des Referenzbereiches (n=1.368).

3.1.2.6 Faktor II- und Faktor V-Mutation

Sowohl die Faktor II- als auch die Faktor V-Mutation kann in einem heterozygoten oder homozygoten Zustand vorliegen. Bei 68 (5,0 %) von 1.368 Patientinnen konnte eine heterozygote Faktor II-Mutation (F II M het) nachgewiesen werden, bei einer (0,07 %) Patientin eine homozygote Faktor II-Mutation (F II M hom). Bei 153 (11,2 %) von 1.368 Patientinnen war eine heterozygote Faktor V-Mutation (F V M het) zu finden und bei 3 (0,2 %) Patientinnen eine homozygote Faktor V-Mutation (F V M hom).

Die Kombination der beiden Mutationen fand sich bei 8 (0,6 %) von 1.368 Patientinnen mit jeweils einer heterozygoten Mutation.

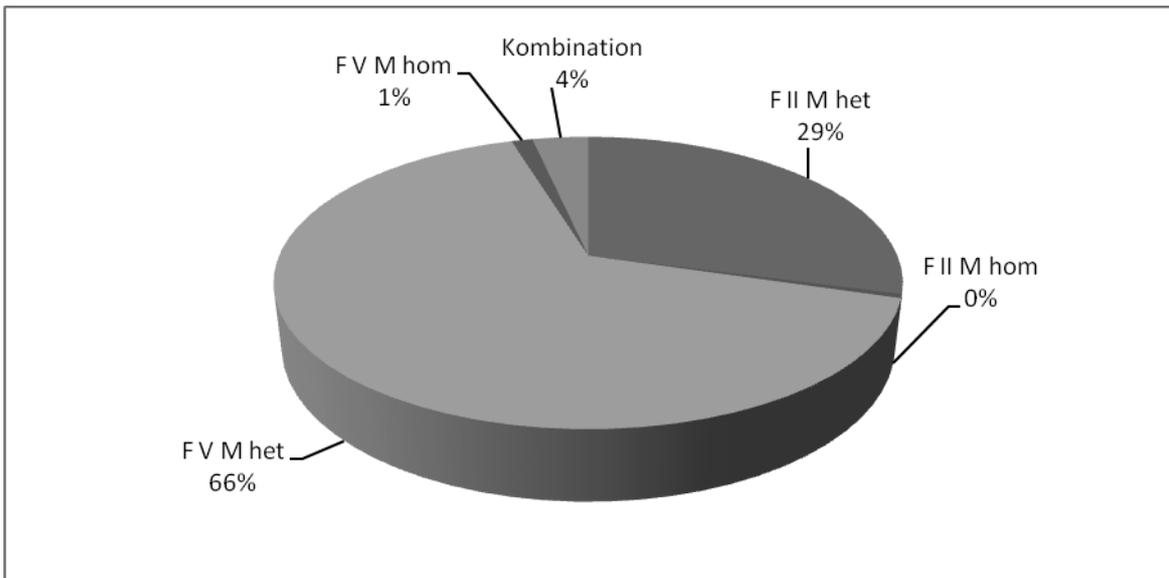


Abbildung 8: Faktor II- und Faktor V-Mutationsverteilung

F II M het: heterozygote Faktor II-Mutation; F II M hom: homozygote Faktor II-Mutation; F V M het: heterozygote Faktor V-Mutation; F V M hom: homozygote Faktor V-Mutation; (n=1.368).

3.1.2.7 Antiphospholipid-Antikörper Screening

Im Patientinnenkollektiv wiesen 176 (12,9 %) von 1.368 Patientinnen einen positiven Wert für eines der Screeningverfahren auf. 19 (1,4 %) der 1.368 Patientinnen hatten zwei positive Screening-Werte und eine (0,07 %) von 1.368 Patientinnen hatte drei positive Werte. Keine positiven Werte wiesen 1.302 (95,2 %) Patientinnen auf (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Antiphospholipid-Antikörper Screening

Spalte 1: Anzahl positiver Testverfahren; Spalte 2: Anzahl der Patientinnen; (n=1.368).

| Anzahl positiver Testverfahren | Anzahl der Patientinnen |
|--------------------------------|-------------------------|
| 0 | 1.172 |
| 1 | 176 |
| 2 | 19 |
| 3 | 1 |

Die meisten positiven Werte waren bei β_2 -GPI-Antikörpern IgG mit 106 (7,7 %) Patientinnen zu finden. Beim LAC-Screen-Test zeigten 4 (0,3 %) Patientinnen einen positiven Wert und 32 (2,3 %) einen schwach positiven Wert. Bei der MixConLA-Testung hatten 32 (2,3 %) Patientinnen einen positiven Wert. Für Cardiolipin-Antikörper IgG fanden sich 23 (1,7 %) positive Werte und für Cardiolipin-Antikörper IgM 20 (1,5 %). Dies ist in Abbildung 9 in Form eines Säulendiagramms dargestellt.

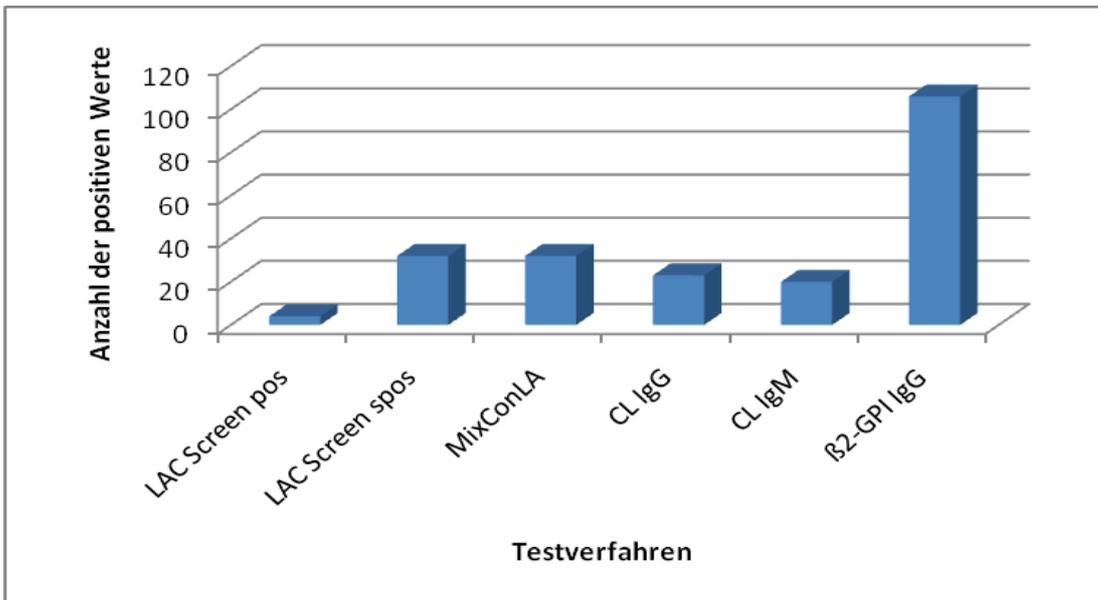


Abbildung 9: Verteilung der Antiphospholipid-Antikörper

LAC Screen pos: LAC-Screen positive; LAC Screen spos: LAC-Screen schwach positive; MixConLA positive; CL IgG: Cardiolipin-Antikörper IgG; CL IgM: Cardiolipin-Antikörper IgM; β₂-GPI IgG: β₂-GPI-Antikörper IgG; (n=1.368).

3.1.2.8 Messwerte der Antiphospholipid-Antikörper

In der Abbildung 10 ist die Verteilung der Messwerte der für Cardiolipin IgG/IgM- und β₂-GPI-Antikörper IgG für das selektive Patientenkollektiv mit 1.368 Patientinnen angegeben. Die Abszissenachse stellt die Antikörper Cardiolipin IgG und IgM und β₂-GPI dar. Die Ordinate stellt die Konzentration jeweils bezogen auf die drei verschiedenen Antikörper dar. Für Cardiolipin IgG/IgM gilt als *cut-off* Wert 10 GPL/ml bzw. MPL/ml und für β₂-GPI IgG 7 U/ml.

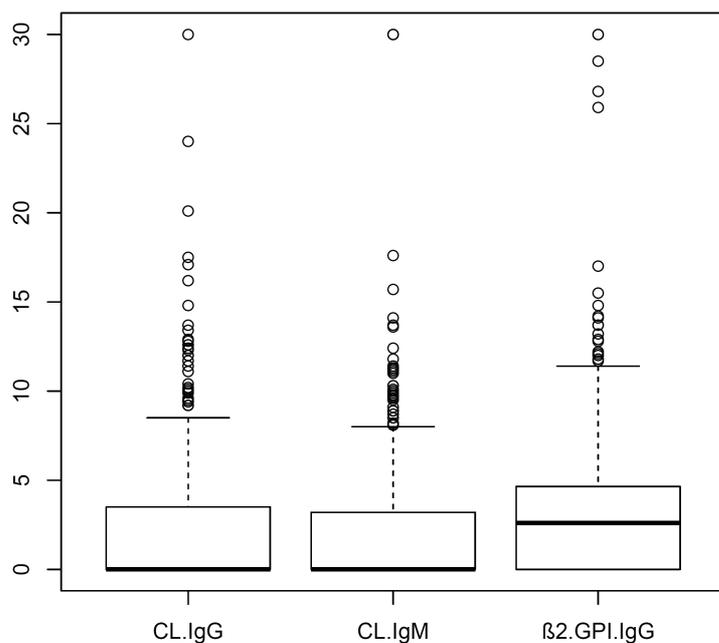


Abbildung 10: Verteilung der Messwerte der Antiphospholipid-Antikörper

X-Achse: CL.IgG: Anti-Cardiolipin-Antikörper IgG; CL.IgM: Anti-Cardiolipin-Antikörper IgM; β_2 .GPI.IgG: Anti- β_2 -GPI-Antikörper IgG; Y-Achse: beschreibt die jeweilige Einheit des Antikörpers: für Cardiolipin-Antikörper IgG GPL/ml, für Cardiolipin-Antikörper IgM MPL/ml und für β_2 -GPI-Antikörper IgG U/ml; Grenzwert für Anti-Cardiolipin-Antikörper IgG beträgt 10 GPL/ml, für Anti-Cardiolipin-Antikörper IgM 10 MPL/ml und für β_2 -GPI-Antikörper IgG 7 U/ml. Werte über 30 der jeweiligen Einheit wurden auf 30 der jeweiligen Einheit winsorisiert (n=1.368).

3.2 Teil 2: Proben aus Zuweiserkollektiv

Proben, die zur Diagnostik in das AescuLabor geschickt wurden und mit einer Abortnotiz auf dem Überweisungsschein versehen waren, wurden, nachdem die angeforderte Diagnostik durchgeführt wurde, gesammelt. Es handelte sich um Citratplasma- oder Serumproben gemäß der Vorgabe des jeweiligen Testes, die bei -28 bis -35 °C Grad eingefroren wurden. Insgesamt wurde über den Zeitraum vom 31.03.2010 bis 31.03.2011 164 Proben asserviert.

Von diesen 164 Proben wurde versucht zusätzlich klinische Informationen über den behandelnden Gynäkologen einzuholen. Klinische Daten über die genaue Anzahl der Aborte, der jeweiligen Schwangerschaftswoche des Aborts und weiterer Komplikation wurden von 99 Proben mittels Fragebogen eingeholt (61,1 %). Die Komplikationen setzten sich aus HELLP-Syndrom (*hämolysis, elevated liver enzyme levels, low platelet count*), Gestose, Präeklampsie und Eklampsie zusammen.

Es konnten nicht von allen 164 Proben klinische Zusatzinformationen eingeholt werden, da eine Patientin aus dem Ausland kam, drei Patientinnen waren unbekannt verzogen, vier Proben waren aufgelöst worden und 57 Gynäkologen haben keine Teilnahme erwünscht.

2 Patientinnen wurden, nachdem klinische Informationen vorlagen, aus der Studie ausgeschlossen, da kein Abort vorlag und die Angaben auf dem Überweisungsschein ein Fehler waren. Somit umfasst das endgültige Kollektiv 162 Patientinnen und folglich liegen bei 97 von den 162 Patientinnen klinische Informationen vor.

Es wurde von jeder Probe eine Bestimmung auf allen fünf Testsystemen ermittelt. Jedoch lag bei drei Proben nicht genügend Citratplasma bzw. Serum vor, sodass eine Bestimmung auf einem Gerät nicht mehr durchgeführt werden konnte. Zweimal [Probe 146, 152] betraf dies ImmunoCAP 250 (Phadia) für alle Parameter und einmal [Probe 256] ACL AcuStar (IL) für Cardiolipin-Antikörper IgM.

3.2.1 Altersverteilung

Zum Zeitpunkt der Batchanalyse lag das Alter des Patientinnenkollektives von 162 Patientinnen bei einem Mittelwert \pm Standardabweichung von $33,8 \pm 5,3$ Jahren. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Analyse 22,4 Jahre alt und die älteste 45,8 Jahre alt.

3.2.2 Abortanamnese

Die folgende Auswertung über die Abortverteilung bezieht sich auf die 162 Patientinnen im Kollektiv. Die Auswertung über den Zeitpunkt bezieht sich auf 95 Patientinnen von denen klinische Daten über den Zeitpunkt vorlagen. Die 162 Patientinnen erlitten insgesamt 357 Aborte. Pro Patientin liegen die Abortgeschehen zwischen einem und zehn Aborten. Der Median liegt 2 Aborten. Der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) beläuft sich auf $2,41 \pm 1,19$ Aborte. Ein Abort liegt bei 33 Patientinnen vor, 2 Aborte bei 58 Patientinnen und habituelle Aborte, also 3 oder mehr Aborte, liegen bei 71 Patientinnen vor. In Tabelle 6 und in Abbildung 11 wird die Verteilung der Abortanzahl der Patientinnenanzahl zugeordnet und dargestellt.

Tabelle 6: Abortverteilung

Die Tabelle zeigt die Anzahl der Patientinnen mit einem bis zu mehr als 4 Aborten und dessen Anteil im Patientinnenkollektiv (n=162).

| Abortanzahl | Anzahl Patientinnen | Anteil Patientinnen |
|-------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 33 | 20,4 % |
| 2 | 58 | 35,8 % |
| 3 | 57 | 35,2 % |
| 4 | 8 | 5,0 % |
| >4 | 6 | 3,7 % |

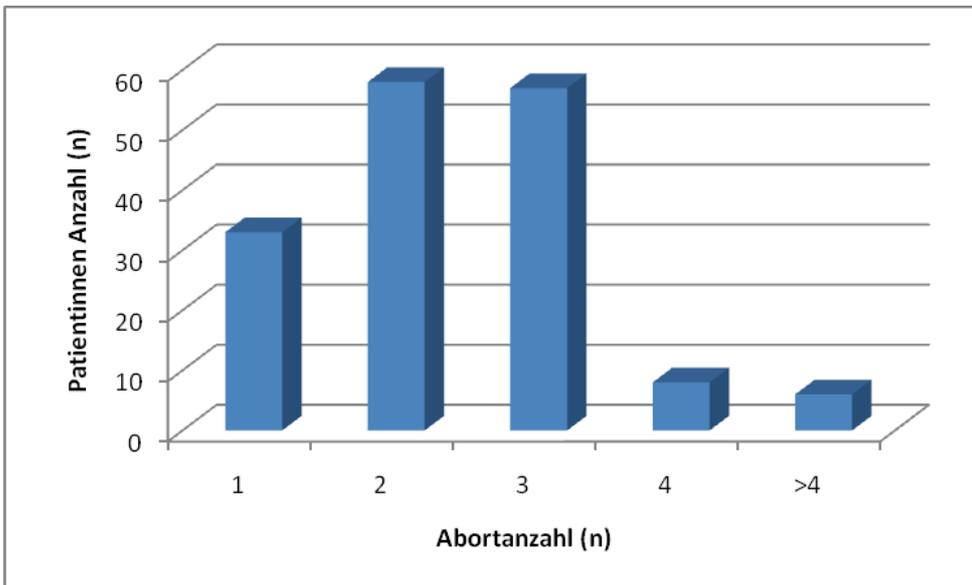


Abbildung 11: Abortverteilung

Dargestellt ist die Abortverteilung im Patientinnenkollektiv (n=162).

Die Zeitangaben der Aborte lagen bei 95 Patientinnen vor. Die Abortzeitpunkte wurden in ≤ 6 . Schwangerschaftswoche (SSW), $6 < X \leq 12$. SSW und > 12 . SSW. eingeteilt. In Abbildung 12 ist die Verteilung ersichtlich. 41 Aborte haben \leq der 6. SSW, 138 Aborte nach der 6. und \leq der 12. SSW und 22 Aborte haben nach der 12. SSW stattgefunden. Insgesamt waren somit 179 von 201 (89,1 %) Aborten Frühaborte (≤ 12 . SSW). Über 156 Aborte lag keinerlei Information zum Zeitpunkt des Geschehens vor.

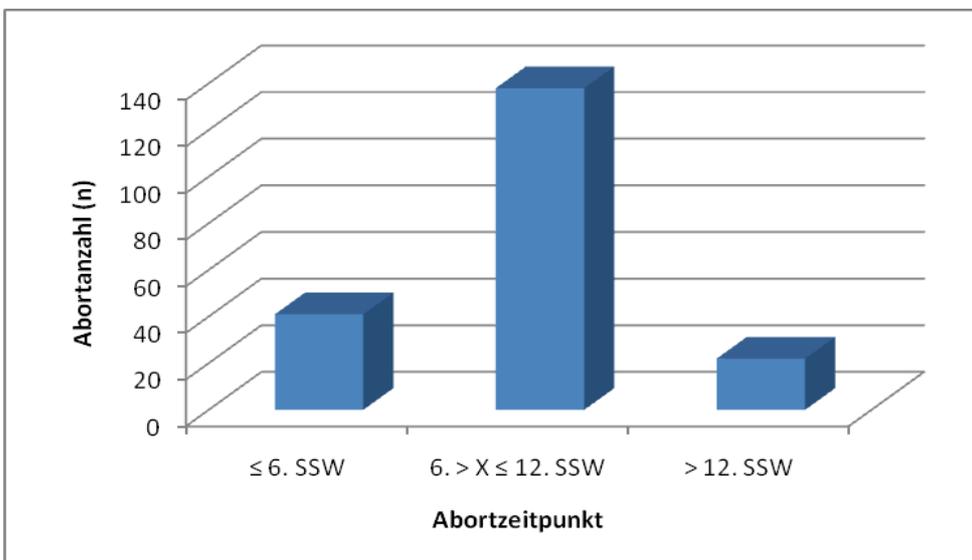


Abbildung 12: Abortzeitpunkte

Dargestellt ist der Abortzeitpunkt in Schwangerschaftswochen (SSW) im Zusammenhang mit der Abortanzahl (n=201 Aborte).

3.2.3 Klinische Daten

Neben den Abortinformationen konnten Informationen von den Probenzuweisern über Komplikationen der Schwangerschaft eingeholt werden. Diese Komplikationen gliederten sich in HELLP-Syndrom, Gestose, Eklampsie und sonstige. Unter den 97 Patientinnen befanden sich 2 Patientinnen mit HELLP-Syndrom, 8 Patientinnen mit einer Gestose und eine Patientin mit einer Eklampsie, wobei bei ihr gleichzeitig auch eine Gestose vorlag. Unter sonstige Komplikationen wurde bei 7 Patientinnen ein *missed abortion* diagnostiziert, zweimal lag ein intrauteriner Fruchttod, viermal eine Trisomie (Trisomie 22, 19, 16, 13), einmal eine Robertson-Translokation der Mutter, zweimal Zwillinge, einmal ein Morbus Basedow, einmal ein Uterus *bicordis* und *arcuatus*, zweimal eine Plazentainsuffizienz, einmal eine Cervixinsuffizienz, einmal eine Totgeburt in der 42. SSW und einmal ein vorzeitiger Blasensprung in der 18. SSW. Zu einer der Plazentainsuffizienzen lag ein histologischer Befund vor, der multiple Infarkte in der Plazenta beschreibt.

3.2.4 Thrombophilie

Ein vollständiges Thrombophilie-Screening, welches Protein C, Protein S, Antithrombin, Faktor II- und Faktor V-Mutation umfasst, lag bei 94 von 162 (58,0 %) Patientinnen vor. Die einzelnen Parameter der 162 Patientinnen waren wie folgt verteilt:

Protein C-Messungen lagen bei 122 von 162 (75,3 %) Patientinnen vor. Von diesen lagen 13 (10,7 %) Werte unterhalb des Referenzbereichs von 70 – 120 % und 10 (8,2 %) darüber. Der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) betrug $98,86 \pm 29,25$ %.

Protein S wurde bei 128 von 162 (79,0 %) Patientinnen bestimmt. 6 (4,7 %) der Patientinnen lagen unterhalb des Referenzbereichs von 70 bis 140 %. Keine der Patientinnen lag über dem Referenzbereich. Der Mittelwert \pm SD befand sich bei $87,18 \pm 19,40$ %.

Antithrombin-Werte lagen bei 122 von 162 (75,3 %) Patientinnen vor. Der Referenzbereich beträgt 80 bis 120 %. Unterhalb des Referenzbereiches befanden sich 7 (5,7 %) Patientinnen und oberhalb 4 (3,3 %) Patientinnen. Der Mittelwert \pm SD betrug $97,78 \pm 12,23$ %.

Faktor II-Mutation wurde bei 97 von 162 (59,9 %) Patientinnen bestimmt. Von diesen waren 92 Patientinnen negativ getestet wurden. Keine homozygote Mutation lag vor. Heterozygot waren 5 (5,2 %) Patientinnen, wobei nur eine Kombination mit Faktor V-Mutation vorlag, die ebenfalls heterozygot war.

Faktor V-Mutation ist bei 107 von 162 (66,0 %) Patientinnen getestet wurden. Es lag keine homozygote Mutation vor. 12 (11,2 %) Patientinnen waren heterozygot und 95 Patientinnen negativ.

3.2.4.1 Weitere Parameter

MTHFR-Mutation wurde bei keiner von 162 (0,0 %) Patientin bestimmt.

Faktor VIII-Aktivität lag bei 36 von 162 (22,2 %) Patientinnen vor, wovon eine Patientin (2,8 %) unterhalb des Referenzbereiches von 60 bis 150 % lag und eine (2,8 %) Patientin unterhalb. Der Mittelwert \pm SD betrug $107,19 \pm 26,13$ %.

Faktor VIII-Antigen-Werte wurden bei 74 von 162 (45,7 %) Patientinnen bestimmt. Davon lagen 7 (9,5 %) Werte oberhalb des Referenzbereichs von 150 %. Der Mittelwert befand sich bei $106,67 \pm 33,78$ %.

Quick-Werte lagen bei 145 von 162 (89,5 %) Patientinnen vor. Unterhalb des Referenzbereichs von 70 bis 120 % lagen die Werte von 3 (2,1 %) Patientinnen und oberhalb von 13 (9,0 %) Patientinnen. Der Mittelwert \pm SD betrug $100,78 \pm 19,58$ %.

aPTT-Werte lagen bei 143 von 162 (88,3 %) Patientinnen vor. Der Referenzbereich beträgt 24 bis 38 Sekunden. Unterhalb von diesem befanden sich die Werte von 4 (2,8 %) Patientinnen und oberhalb von 17 (11,9 %) Patientinnen. Der Mittelwert \pm SD lag bei $33,56 \pm 13,28$ Sekunden.

Fibrinogen wurde bei 145 von 162 (89,5 %) Patientinnen bestimmt. Unterhalb des Referenzbereiches von 200 bis 450 mg/dl befanden sich die Werte von 6 (4,1 %) Patientinnen und oberhalb von 9 (6,2 %) Patientinnen. Der Mittelwert \pm SD lag bei $324,56 \pm 80,88$ mg/dl.

Der LAC-Screen-Test wurde bei 138 von 162 (85,2 %) Patientinnen durchgeführt. 12 (8,7 %) von diesen waren schwach positiv, zwei (1,4 %) Patientinnen waren positiv und 134 waren negativ.

MixConLA wurde bei 137 von 162 (84,6 %) Patientinnen gemessen. Zwei (1,5 %) Patientinnen wurden fraglich positiv, eine (0,7 %) Patientin wurde positiv und 134 Patientinnen wurden negativ getestet.

3.2.5 Ergebnisse der Testsysteme

Die folgenden Boxplots (Box-Whisker-Plot) (Abbildung 13 bis Abbildung 16) spiegeln die Ergebnisse der Messungen der fünf Testsysteme für den jeweiligen Antiphospholipid-Antikörper wieder. Die Ermittlung des einheitlichen *cut-off*-Wertes wurde im Teil Material und Methoden beschrieben. Die Mittellinie einer Box stellt die 50% Perzentile, der Boden die 25% Perzentile und das Dach die 75% Perzentile dar. Die Antennen beschreiben den 1,5-fachen Interquartilsabstand und die Kreise zeigen Ausreißer der Messungen.

Die *cut-off*-Werte wurden jeweils von der zugehörigen Firma vorgeschrieben. Graubereiche bzw. schwach positive Bereiche wurden nicht berücksichtigt.

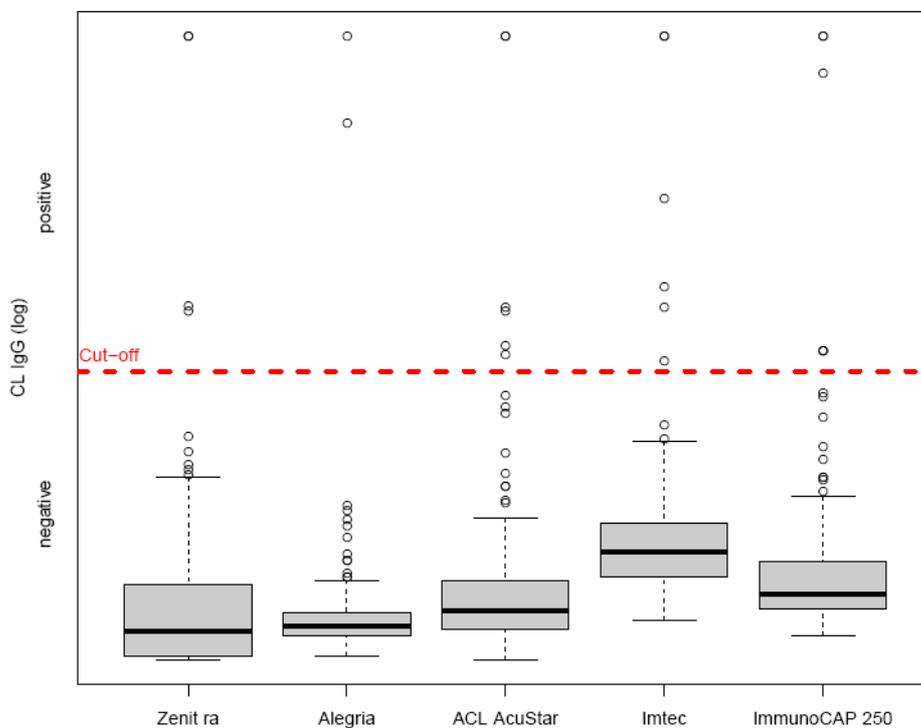


Abbildung 13: Boxplot CL IgG

CL IgG (log): Cardiolipin-Antikörper IgG. Die Ergebnisse wurden mit der Funktion log (Ausgangswert/*cut-off*+1) versehen. Die gestrichelte Linie stellt den *cut-off*-Wert zwischen positiven und negativen Werten dar. Die Kreise demonstrieren Ausreißer (n=162).

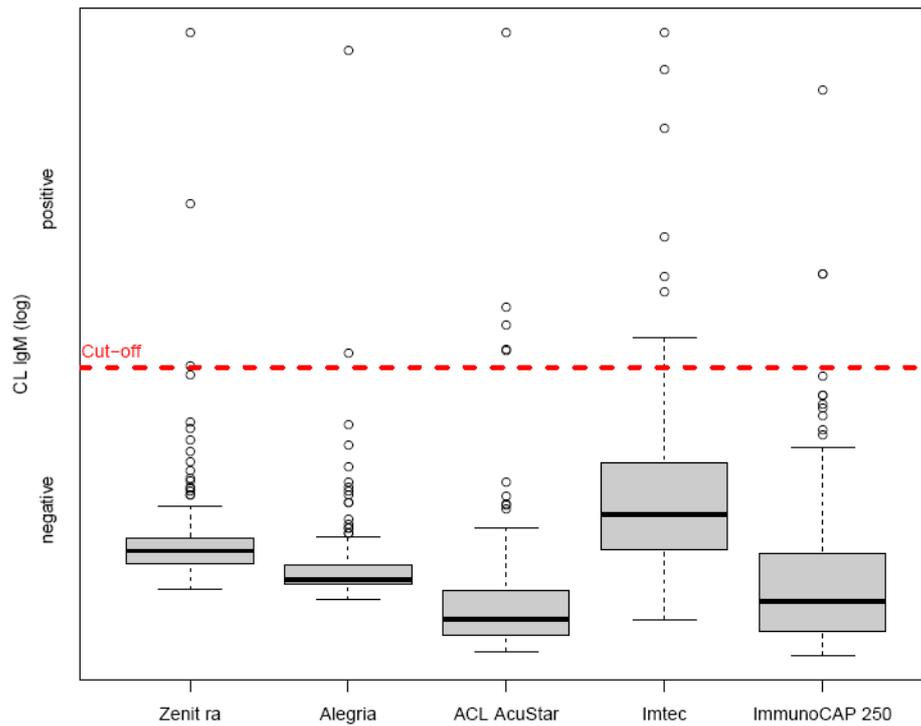


Abbildung 14: Boxplot CL IgM

CL IgM (log): Cardiolipin-Antikörper IgM. Die Ergebnisse wurden mit der Funktion $\log(\text{Ausgangswert}/\text{cut-off}+1)$ versehen. Die gestrichelte Linie stellt den *cut-off*-Wert zwischen positiven und negativen Werten dar. Die Kreise demonstrieren Ausreißer (n=162).

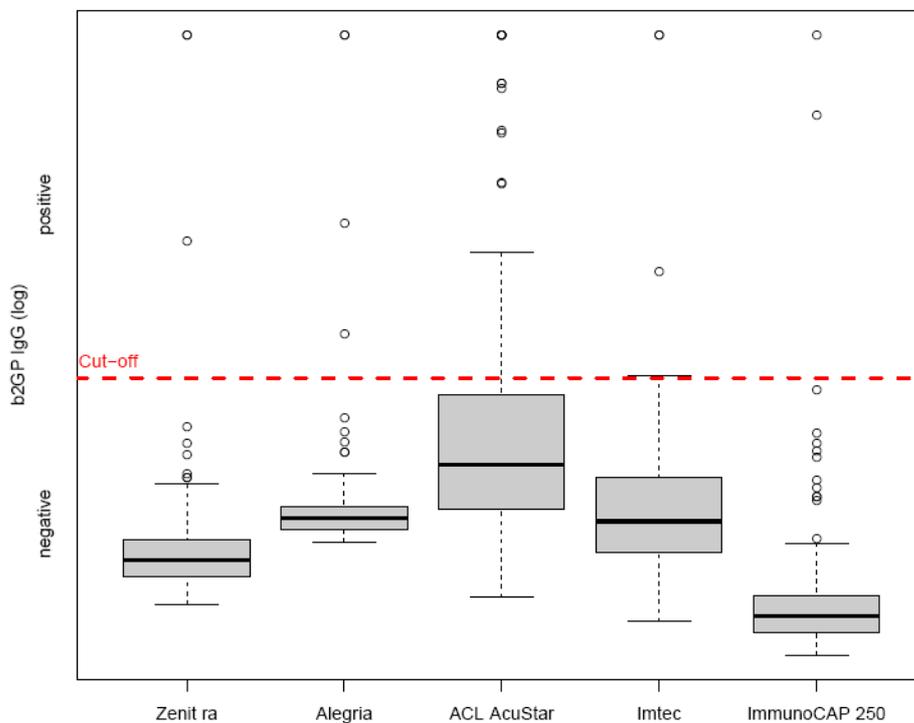


Abbildung 15: Boxplot b2GP IgG

b2GP IgG (log): β_2 -GPI-Antikörper IgG. Die Ergebnisse wurden mit der Funktion $\log(\text{Ausgangswert}/\text{cut-off}+1)$ versehen. Die gestrichelte Linie stellt den *cut-off*-Wert zwischen positiven und negativen Werten dar. Die Kreise demonstrieren Ausreißer (n=162).

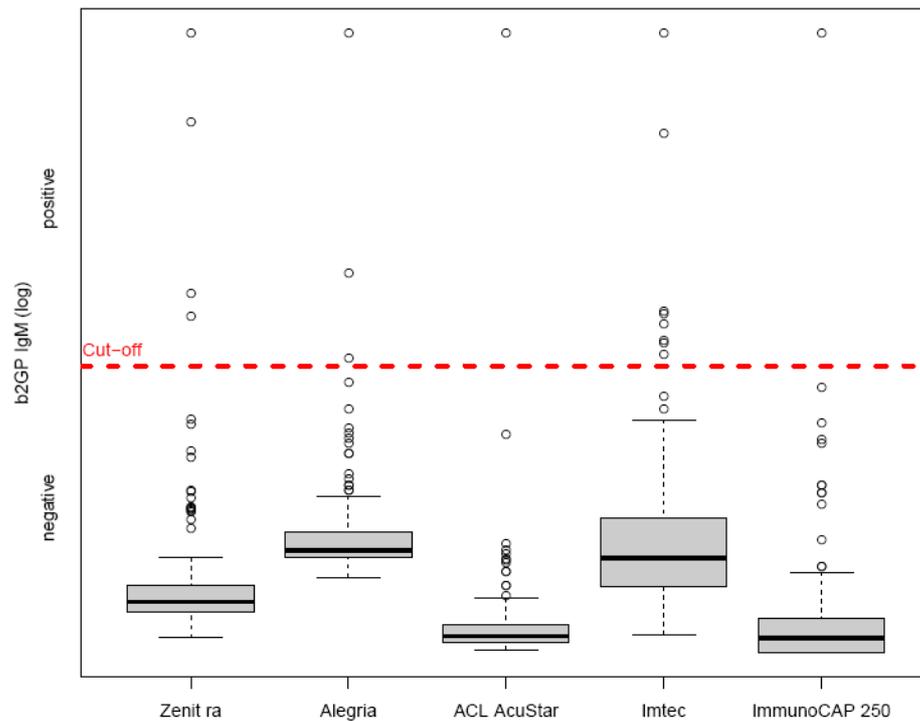


Abbildung 16: Boxplot b2GP IgM

b2GP IgM (log): β_2 -GPI-Antikörper IgM. Die Ergebnisse wurden mit der Funktion $\log(\text{Ausgangswert}/\text{cut-off}+1)$ versehen. Die gestrichelte Linie stellt den *cut-off*-Wert zwischen positiven und negativen Werten dar. Die Kreise demonstrieren Ausreißer (n=162).

Die exakten Daten der Anzahl der positiven Probenmessungen sind in folgender Tabelle 7 zu sehen. Aufgelistet sind jeweils die Anzahl der positiven Proben, die Prozentangabe und die anonymisierte Probennummer (in eckigen Klammern) der positiven Proben für jedes Testsystem und jeden Antikörper.

Die Testergebnisse wurden zunächst in Form von Boxplots visualisiert (siehe Abbildung 13 bis Abbildung 16). Im ersten Blick sehen sich die Testergebnisse der einzelnen Testsysteme sehr ähnlich. Um die Details besser zu betrachten wurden in Tabelle 7 die positiv gemessenen Proben des jeweiligen Gerätes des einzelnen Antikörpers in absoluter Anzahl und in Prozentzahl dargelegt. Zusätzlich wurde in eckigen Klammern die jeweilige anonymisierte Probennummer angegeben. Beim Betrachten der Prozentzahlen ähneln sich auch die Ergebnisse der Testsysteme. Analysiert man jedoch die einzelnen Probennummern ist nur noch eine geringe Übereinstimmung der Testsysteme festzustellen. Um diesen Verhalt besser darzulegen, wurde das Übereinstimmungsmaß Cohen's Kappa ermittelt und dieses in vier Tabellen (Tabelle 8 bis Tabelle 11) mit der Anzahl der übereinstimmenden positiven Proben und der anonymisierten Probennummer dargestellt.

Beim Vergleich der Testergebnisse in Tabelle 7 fällt eine Häufung von positiven Proben bei dem Imtec-ELISA (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden, Deutschland) mit 27 positiven Testergebnissen, aber vor allem bei dem Analysegerät ACL AcuStar (Instrumentation Laboratory, Bedford, US-Bundesstaat Massachusetts, USA) mit 49 positiven Ergebnissen auf. Diese positiven Ergebnisse beim ACL AcuStar sind insbesondere beim β_2 -GPI-Antikörper IgG mit 37 positiven Ergebnissen festzustellen. Dies wird im zugehörigen Boxplot (Abbildung 15) sichtbar.

Tabelle 7: Positive Testergebnisse

CL IgG: Cardiolipin-Antikörper IgG; CL IgM: Cardiolipin-Antikörper IgM; β_2 -GPI IgG: β_2 -GPI-Antikörper IgG; β_2 -GPI IgM: β_2 -GPI-Antikörper IgM (n=162).

| Testsystem | CL IgG | | CL IgM | | β_2 -GPI IgG | | β_2 -GPI IgM | | Summe | |
|---------------|--|--|---|--|---------------------------------|---|--------------------------------------|--|------------------------|-------------------------|
| | fraglich | positiv | fraglich | positiv | fraglich | positiv | fraglich | positiv | fraglich | positiv |
| Zenit ra | 2/162 (1,2%) [152, 187] | 2/162 (1,2%) [127, 270] | / | 3/162 (1,9%) [112, 113, 250] | 1/162 (0,6%) [187] | 2/162 (1,2%) [127, 270] | / | 4/162 (2,5%) [112, 113, 250, 258] | 3/648 (0,5%) | 11/648 (1,7%) |
| Alegria | / | 2/162 (1,2%) [127, 270] | / | 2/162 (1,2%) [113, 270] | 1/162 (0,6%) [113] | 3/162 (1,9%) [127, 196, 270] | 2/162 (1,2%) [153, 270] | 1/162 (0,6%) [113] | 3/648 (0,5%) | 8/648 (1,2%) |
| ACL AcuStar | / | 6/162 (3,7%) [120, 127, 175, 252, 262, 270] | / | 5/161 (3,1%) [112, 113, 1 53, 249, 25 8] | / | 37/162 (22,8%) [101, 104, 112, 113, 120, 124, 127, 133, 138, 145, 146, 162, 169, 174, 184, 186, 187, 193, 196, 199, 202, 203, 215, 218, 221, 225, 227, 244, 250, 251, 254, 261, 262, 265, 270] | / | 1/162 (0,6%) [113] | / | 49/647 (7,6%) |
| Imtec-ELISA | / | 6/162 (3,7%) [127, 152, 171, 212, 256, 270] | / | 8/162 (4,9%) [113, 120, 152, 171, 230, 256, 264, 270] | / | 5/162 (3,1%) [104, 107, 127, 152, 270] | / | 8/162 (4,9%) [113, 118, 140, 142, 152, 153, 199, 258] | / | 27/648 (4,2%) |
| ImmunoCAP 250 | 4/160 (2,5%) [119, 221, 237, 252] | 2/160 (1,3%) [127, 270] | 3/160 (1,9%) [164, 179, 217] | 0/160 (0%) | 0/160 (0%) | 2/160 (1,3%) [127, 270] | 0/160 (0%) | 1/160 (0,6%) [113] | 7/640 (1,1%) | 5/640 (0,8%) |

Die *cut-off*-Werte wurden jeweils von der zugehörigen Firma vorgeschrieben. Graubereiche bzw. schwach positive Bereiche wurden als „fraglich“ definiert.

3.2.5.1 Übereinstimmung der Ergebnisse

Um eine Übereinstimmung der positiven und negativen Ergebnisse der einzelnen Testsysteme darzustellen, wurde Cohen's Kappa berechnet. Der potentielle Wertebereich für Kappa ist [-1;+1.] Es gilt folgende Einteilung des Wertebereichs für die Übereinstimmung:

- 0,8 < κ ≤ 1 sehr gut
- 0,6 < κ ≤ 0,8 gut
- 0,4 < κ ≤ 0,6 akzeptabel
- 0,2 < κ ≤ 0,4 gering
- 0,2 < κ schlecht.

Die folgenden Tabellen (Tabelle 8 bis Tabelle 11) stellen die Kappa Werte dar. Zusätzlich wurden die Probenanzahl (n) der übereinstimmenden positiven Proben und die zugehörige anonymisierte Probennummer (in eckigen Klammern) in den Tabellen mit aufgelistet.

Tabelle 8: Übereinstimmung der Ergebnisse CL IgG

CL IgG: Cardiolipin-Antikörper IgG, κ = Kappa (n=162).

| Testsystem | Zenit ra CL IgG | Alegria CL IgG | ACL AcuStar CL IgG | Imtec-ELISA CL IgG | ImmunoCAP 250 CL IgG |
|----------------------|---|---|---|---|---|
| Zenit ra CL IgG | / | $\kappa=0,66$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,38$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,59$ (n=3) [127,152,270] | $\kappa=0,43$ (n=2) [127,270] |
| Alegria CL IgG | $\kappa=0,66$ (n=2) [127,270] | / | $\kappa=0,49$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,49$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,49$ (n=2) [127,270] |
| ACL AcuStar CL IgG | $\kappa=0,38$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,49$ (n=2) [127,270] | / | $\kappa=0,31$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,48$ (n=3) [127,252,270] |
| Imtec-ELISA CL IgG | $\kappa=0,59$ (n=3) [127,152,270] | $\kappa=0,49$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,31$ (n=2) [127,270] | / | $\kappa=0,34$ (n=2) [127,270] |
| ImmunoCAP 250 CL IgG | $\kappa=0,43$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,49$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,48$ (n=3) [127,252,270] | $\kappa=0,34$ (n=2) [127,270] | / |

Tabelle 9: Übereinstimmung der Ergebnisse CL IgM

CL IgM: Cardiolipin-Antikörper IgM, κ = Kappa (n=162).

| Testsystem | Zenit ra CL IgM | Alegria CL IgM | ACL AcuStar CL IgM | Imtec-ELISA CL IgM | ImmunoCAP 250 CL IgM |
|----------------------|---|---|---|---|---|
| Zenit ra CL IgM | / | $\kappa=0,39$ (n=1) [113] | $\kappa=0,49$ (n=2) [112,113] | $\kappa=0,16$ (n=1) [113] | $\kappa=-0,02$ (n=0) |
| Alegria CL IgM | $\kappa=0,39$ (n=1) [113] | / | $\kappa=0,27$ (n=1) [113] | $\kappa=0,39$ (n=2) [113,270] | $\kappa=-0,02$ (n=0) |
| ACL AcuStar CL IgM | $\kappa=0,49$ (n=2) [112,113] | $\kappa=0,27$ (n=) [113] | / | $\kappa=0,14$ (n=1) [113] | $\kappa=-0,02$ (n=0) |
| Imtec-ELISA CL IgM | $\kappa=0,16$ (n=1) [113] | $\kappa=0,39$ (n=2) [113,270] | $\kappa=0,14$ (n=1) [113] | / | $\kappa=-0,03$ (n=0) |
| ImmunoCAP 250 CL IgM | $\kappa=-0,02$ (n=0) | $\kappa=-0,02$ (n=0) | $\kappa=-0,02$ (n=0) | $\kappa=-0,03$ (n=0) | / |

Tabelle 10: Übereinstimmung der Ergebnisse β_2 -GPI IgG

β_2 -GPI IgM: β_2 -GPI-Antikörper IgM, κ = Kappa (n=162).

| Testsystem | Zenit ra β_2 - GPI IgG | Alegria β_2 - GPI IgG | ACL AcuStar β_2 -GPI IgG | Imtec-ELISA β_2 -GPI IgG | ImmunoCAP 250 β_2 -GPI IgG |
|--|---|---|---|---|---|
| Zenit ra β_2 - GPI IgG | / | $\kappa=0,56$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,12$ (n=3) [127,187, 270] | $\kappa=0,49$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,80$ (n=2) [127,270] |
| Alegria β_2 - GPI IgG | $\kappa=0,56$ (n=2) [127,270] | / | $\kappa=0,16$ (n=4) [113,127, 196,270] | $\kappa=0,43$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,66$ (n=2) [127,270] |
| ACL AcuS- tar β_2 -GPI IgG | $\kappa=0,12$ (n=3) [127,187,270] | $\kappa=0,16$ (n=4) [113,127, 196,270] | / | $\kappa=0,09$ (n=3) [104,127,270] | $\kappa=0,08$ (n=2) [127,270] |
| Imtec-ELISA β_2 -GPI IgG | $\kappa=0,49$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,42$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,09$ (n=3) [104,127, 270] | / | $\kappa=0,66$ (n=2) [127,270] |
| ImmunoCAP 250 β_2 -GPI IgG | $\kappa=0,80$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,66$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,08$ (n=2) [127,270] | $\kappa=0,66$ (n=2) [127,270] | / |

Tabelle 11: Übereinstimmung der Ergebnisse β_2 -GPI IgM

β_2 -GPI IgM: β_2 -GPI-Antikörper IgM, κ = Kappa (n=162).

| Testsystem | Zenit ra β_2 - GPI IgM | Alegria β_2 - GPI IgM | ACL AcuStar β_2 -GPI IgM | Imtec-ELISA β_2 -GPI IgM | ImmunoCAP 250 β_2 -GPI IgM |
|--|---|---|---|---|---|
| Zenit ra β_2 - GPI IgM | / | $\kappa=0,27$ (n=1) [113] | $\kappa=0,39$ (n=1) [113] | $\kappa=0,31$ (n=2) [113,258] | $\kappa=0,39$ (n=1) [113] |
| Alegria β_2 - GPI IgM | $\kappa=0,27$ (n=1) [113] | / | $\kappa=0,50$ (n=1) [113] | $\kappa=0,35$ (n=2) [113,153] | $\kappa=0,49$ (n=1) [113] |
| ACL AcuStar β_2 -GPI IgM | $\kappa=0,39$ (n=1) [113] | $\kappa=0,50$ (n=1) [113] | / | $\kappa=0,21$ (n=1) [113] | $\kappa=1,0$ (n=1) [113] |
| Imtec-ELISA β_2 -GPI IgM | $\kappa=0,31$ (n=2) [113,258] | $\kappa=0,35$ (n=2) [113,153] | $\kappa=0,21$ (n=1) [113] | / | $\kappa=0,24$ (n=1) [113] |
| ImmunoCAP 250 β_2 -GPI IgM | $\kappa=0,39$ (n=1) [113] | $\kappa=0,50$ (n=1) [113] | $\kappa=1,0$ (n=1) [113] | $\kappa=0,24$ (n=1) [113] | / |

Die *cut-off*-Werte wurden jeweils von der zugehörigen Firma vorgeschrieben. Graubereiche bzw. schwach positive Bereiche wurden nicht berücksichtigt.

Für 2 Patientinnenproben zeigten alle Analysensysteme positive Werte für Cardiolipin-Antikörper IgG und für β_2 -GPI-Antikörper IgG. Hierbei handelte es sich, um die gleichen zwei Patientinnen [127,270]. Für Cardiolipin-Antikörper IgM konnte in keinem Fall ein übereinstimmend positives Ergebnis in allen Verfahren ermittelt werden. Für eine Patientin [113] wiesen alle Testsysteme für β_2 -GPI-Antikörper IgM einen positiven Wert auf.

3.2.6 Zeitanalyse

3.2.6.1 Netto-Aufwand-Zeit

Die Zeit, die von einer medizinischen technischen Assistenz am Analysegerät verbracht werden muss, wurde als Netto-Aufwand-Zeit definiert. Diese ist beim Imtec-ELISA (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH) am höchsten mit 44 Min. für die Bestimmung von vier Parametern einer Probe. Folgend ist das Analysegerät Alegria (Orgentec Diagnostika GmbH) mit einer Aufwand-Zeit von 5 Min. Die Vollautomaten Zenit ra (A. Menarini

Diagnostics), ImmunoCAP 250 (Phadia) und ACL AcuStar (IL) sind in ihrem händischen Zeitaufwand vergleichbar mit 1 Min., 1 Min. und 2 Min.

3.2.6.2 Walk-away-Zeit

Die *Walk-away-Zeit* beträgt für die Analyse von 4 Parametern einer Probe beim Imtec-ELISA (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH) 100 Min., beim Alegria (Orgentec Diagnostika GmbH) 72 Min., beim Zenit ra (A. Menarini Diagnostics) 27 Min., beim ImmunoCAP 250 (Phadia) 94 Min. und beim ACL AcuStar (IL) 33 Min.

3.3 Teil 3: Verumgruppe

Es wurden 43 Blutproben von Patienten mit klinisch gesichertem systemischen Lupus erythematoses gesammelt. Mittels der 5 verschiedenen Testsysteme wurden alle 4 Antiphospholipid-Antikörper bestimmt. Tabelle 12 spiegelt die positiven Testergebnisse für den jeweiligen Antikörper für das einzelne Testsystem wieder.

Es wurde versucht von jeder Probe eine Bestimmung auf allen fünf Testverfahren zu ermitteln. Jedoch lag bei einer Probe [326] nicht ausreichend Serum vor, sodass auf dem Zenit ra (A. Menarini) Cardiolipin-Antikörper IgG, auf dem ACL AcuStar (IL) und auf dem ImmunoCAP 250 (Phadia) alle Antikörper nicht bestimmt werden konnten.

3.3.1 Ergebnisse der Testsysteme

Die folgenden Boxplots (Box-Whisker-Plot); (Abbildung 17 bis 20) geben die Ergebnisse der Messungen der fünf Testsysteme für den jeweiligen Antikörper für die Verumgruppe wieder. Methodisch wurde wie bei dem Abortkollektiv vorgegangen. Die *cut-off*-Werte wurden jeweils von der zugehörigen Firma vorgeschrieben. Graubereiche bzw. schwach positive Bereiche wurden nicht berücksichtigt.

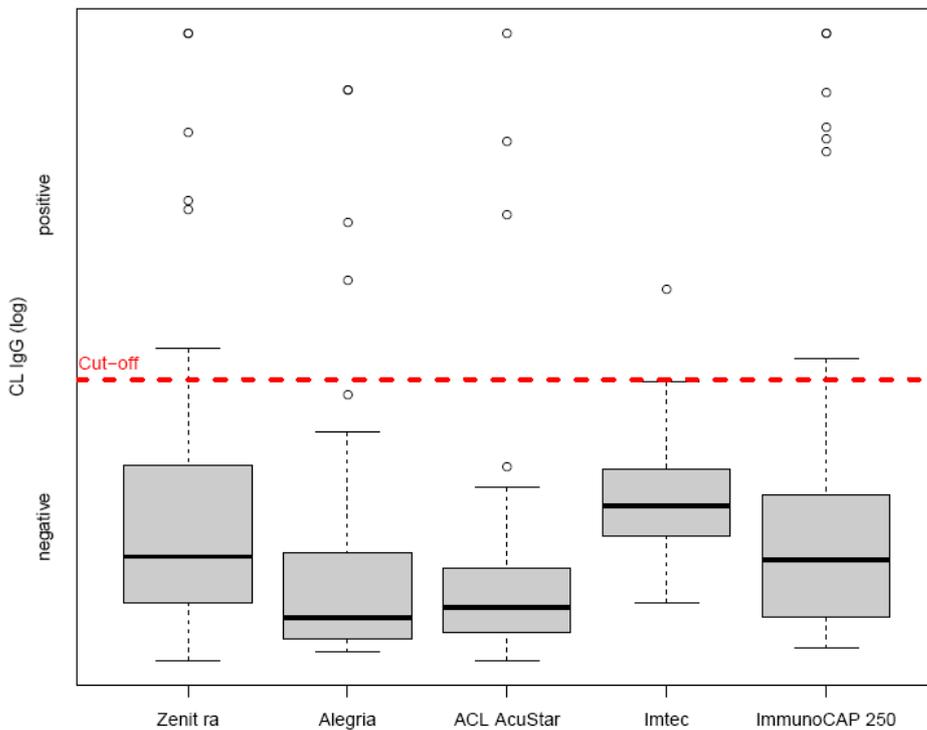


Abbildung 17: Boxplot CL IgG

CL IgG (log): Cardiolipin-Antikörper IgG. Die Ergebnisse wurden mit der Funktion $\log(\text{Ausgangswert}/\text{cut-off}+1)$ versehen. Die gestrichelte Linie stellt den *cut-off*-Wert zwischen positiven und negativen Werten dar. Die Kreise demonstrieren Ausreißer (n=43).

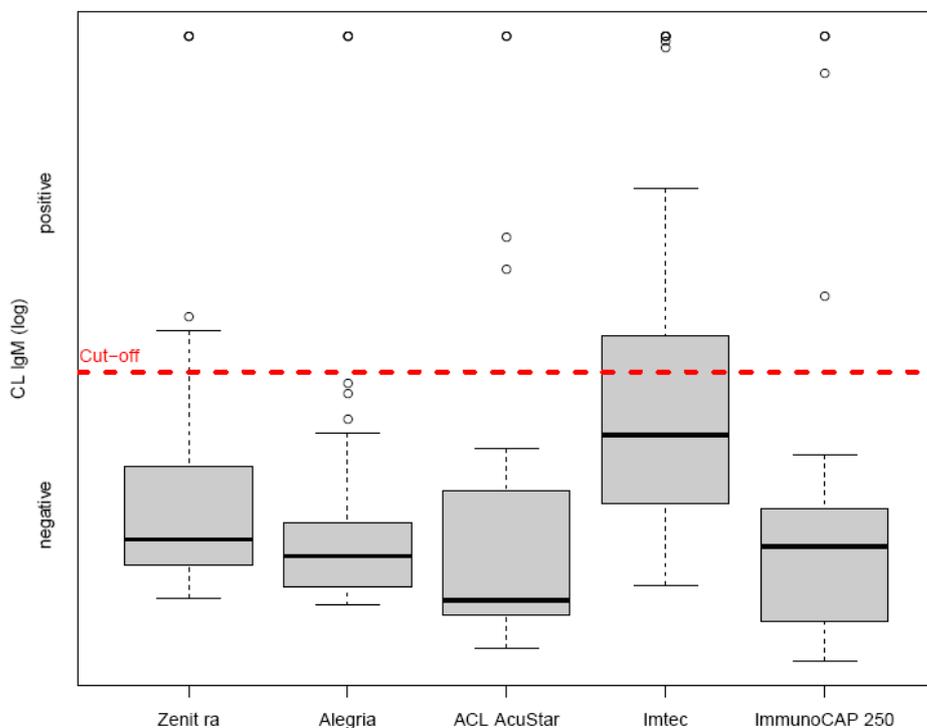


Abbildung 18: Boxplot CL IgM

CL IgM (log): Cardiolipin-Antikörper IgM. Die Ergebnisse wurden mit der Funktion $\log(\text{Ausgangswert}/\text{cut-off}+1)$ versehen. Die gestrichelte Linie stellt den *cut-off*-Wert zwischen positiven und negativen Werten dar. Die Kreise demonstrieren Ausreißer (n=43).

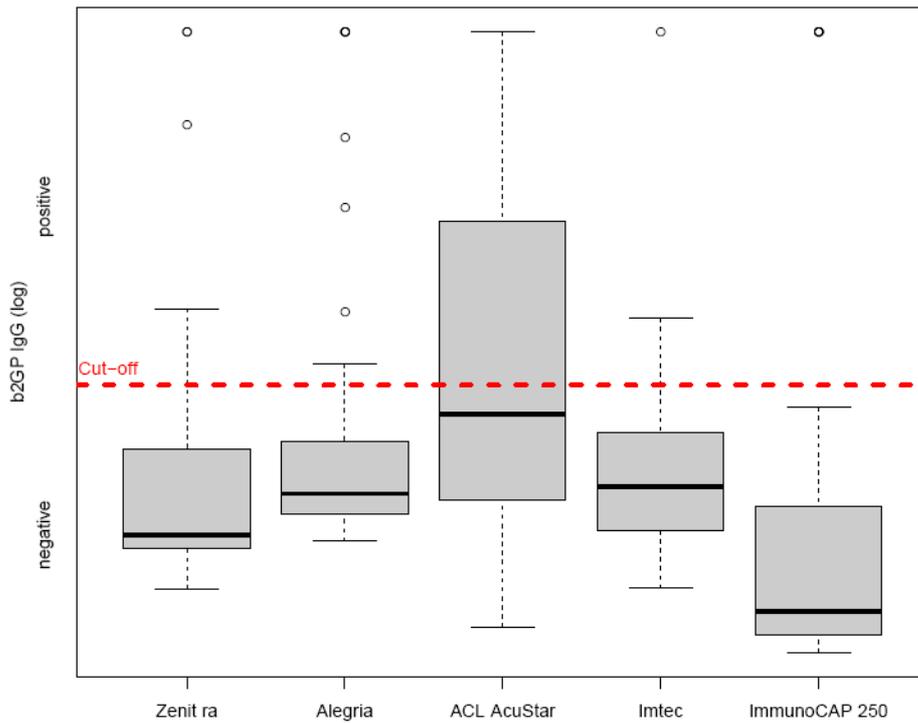


Abbildung 19: Boxplot b2GP IgG

b2GP IgG (log): β_2 -GPI-Antikörper IgG. Die Ergebnisse wurden mit der Funktion $\log(\text{Ausgangswert}/\text{cut-off}+1)$ versehen. Die gestrichelte Linie stellt den *cut-off*-Wert zwischen positiven und negativen Werten dar. Die Kreise demonstrieren Ausreißer (n=43).

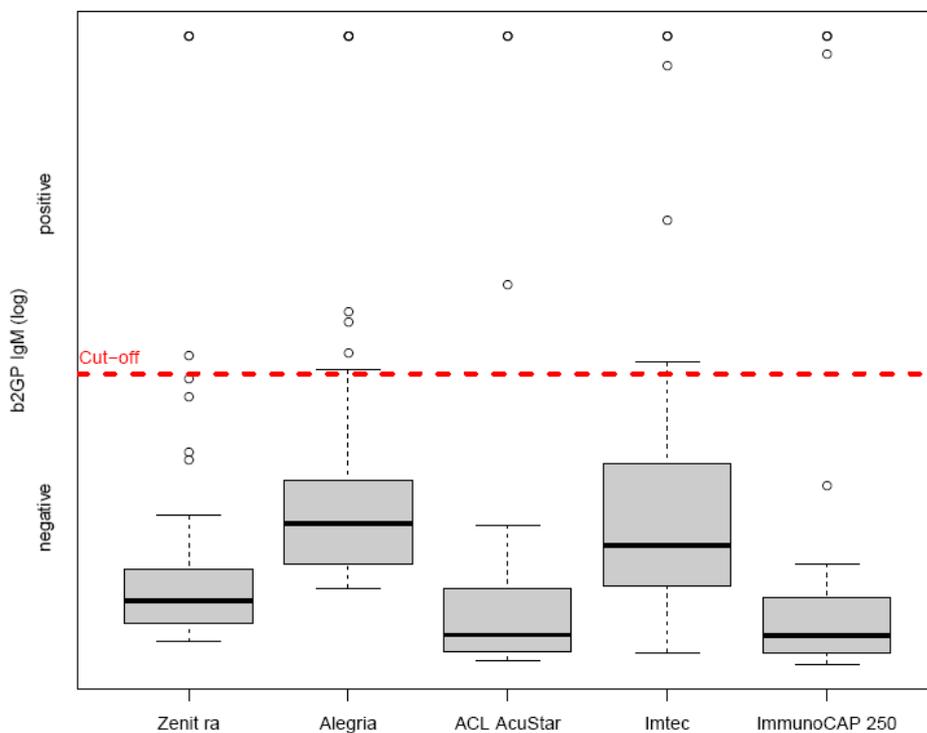


Abbildung 20: Boxplot b2GP IgM

b2GP IgM (log): β_2 -GPI-Antikörper IgM. Die Ergebnisse wurden mit der Funktion $\log(\text{Ausgangswert}/\text{cut-off}+1)$ versehen. Die gestrichelte Linie stellt den *cut-off*-Wert zwischen positiven und negativen Werten dar. Die Kreise demonstrieren Ausreißer (n=43).

Die *cut-off*-Werte wurden jeweils von der zugehörigen Firma vorgegeben. Graubereiche bzw. schwach positive Bereiche wurden nicht berücksichtigt.

Tabelle 12: Positive Testergebnisse

CL IgG: Cardiolipin-Antikörper IgG; CL IgM: Cardiolipin-Antikörper IgM; β_2 -GPI IgG: β_2 -GPI-Antikörper IgG; β_2 -GPI IgM: β_2 -GPI-Antikörper IgM (n=43).

| Testsystem | CL IgG | | CL IgM | | β_2 -GPI IgG | | β_2 -GPI IgM | | Summe | |
|-------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|--|-----------------|-------------------|
| | fraglich | positiv | fraglich | positiv | fraglich | positiv | fraglich | positiv | fraglich | positiv |
| Zenit ra | 2/42 (4,8%) [302,304] | 4/42 (9,5%) [303,318,327,343] | / | 6/43 (14,0%) [302,304,305,330,331,337] | 4/43 (9,3%) [304,306,340,343] | 3/43 (1,2%) [303,318,327] | / | 4/43 (9,3%) [304,305,330,337] | 6/171 (3,5%) | 17/171 (9,9%) |
| Alegria | / | 4/43 (9,3%) [304,327,337,340] | / | 4/43 (9,3%) [302,304,330,337] | 2/43 (4,7%) [303,330] | 6/43 (14,0%) [304,325,327,328,337,340] | 4/43 (9,3%) [305,321,327,331] | 4/43 (9,3%) [302,304,330,337] | 6/172 (3,5%) | 18/172 (10,5%) |
| ACL AcuStar | / | 3/42 (7,1%) [303,318,327] | / | 5/42 (11,9%) [302,304,330,337,338] | / | 18/42 (42,9%) [302,303,304,305,306,318,320,325,327,328,330,331,333,334,337,340,342,343] | / | 4/42 (9,5%) [302,304,330,337] | / | 30/168 (17,9%) |
| Imtec- ELISA | / | 1/43 (2,3%) [302] | / | 15/43 (34,9%) [302,303,304,305,309,315,317,318,321,330,334,336,337,339,343] | / | 7/43 (16,3%) [301,303,305,316,325,327,340] | / | 6/43 (14,0%) [302,304,306,321,330,337] | / | 29/172 (16,9%) |
| Immuno CAP 250 | 5/42 (11,9%) [303,318,325,328,343] | 2/42 (4,8%) [327,340] | 2/42 (4,8%) [302,338] | 3/42 (7,1%) [304,330,337] | 0/42 (0%) | 5/42 (11,9%) [310,325,327,328,340] | 0/42 (0%) | 4/42 (9,5%) [302,304,330,337] | 7/168 (4,2%) | 14/168 (8,3%) |

Die *cut-off*-Werte wurden jeweils von der zugehörigen Firma vorgegeben. Graubereiche bzw. schwach positive Bereiche wurden als „fraglich“ definiert.

3.3.1.1 Übereinstimmung der Ergebnisse

Ebenfalls für die Verumgruppe wurde die Übereinstimmung der positiven und negativen Ergebnisse mittels Cohen's Kappa ermittelt. Die folgenden Tabellen (Tabelle 13 bis 16) stellen die Kappa-Werte dar. Zusätzlich wurden die Probenanzahl (n) der übereinstimmenden positiven Proben und die zugehörige Probennummer (in eckigen Klammern) in den Tabellen mit aufgelistet

Tabelle 13: Übereinstimmung der Ergebnisse CL IgG

CL IgG: Cardiolipin-Antikörper IgG, κ = Kappa (n=43).

| | Zenit ra CL IgG | Alegria CL IgG | ACL AcuStar CL IgG | Imtec-ELISA CL IgG | ImmunoCAP 250 CL IgG |
|----------------------|--|---|---|---|--|
| Zenit ra CL IgG | / | $\kappa=0,32$ (n=2) [304,327] | $\kappa=0,63$ (n=3) [303,318,327] | $\kappa=0,26$ (n=1) [302] | $\kappa=0,55$ (n=4) [303,318,327, 343] |
| Alegria CL IgG | $\kappa=0,32$ (n=2) [304,327] | / | $\kappa=0,22$ (n=1) [327] | $\kappa=-0,04$ (n=0) | $\kappa=0,28$ (n=2) [327,340] |
| ACL AcuStar CL IgG | $\kappa=0,63$ (n=3) [303,318,327] | $\kappa=0,22$ (n=1) [327] | / | $\kappa=-0,04$ (n=0) | $\kappa=0,56$ (n=3) [303,318,327] |
| Imtec-ELISA CL IgG | $\kappa=0,26$ (n=1) [302] | $\kappa=-0,04$ (n=0) | $\kappa=-0,04$ (n=0) | / | $\kappa=-0,04$ (n=0) |
| ImmunoCAP 250 CL IgG | $\kappa=0,55$ (n=4) [303,318,327, 343] | $\kappa=0,28$ (n=2) [327,340] | $\kappa=0,56$ (n=3) [303,318,327] | $\kappa=-0,04$ (n=0) | / |

Tabelle 14: Übereinstimmung der Ergebnisse CL IgM

CL IgM: Cardiolipin-Antikörper IgM, κ = Kappa (n=43).

| Testsystem | Zenit ra CL IgM | Alegria CL IgM | ACL AcuStar CL IgM | Imtec-ELISA CL IgM | ImmunoCAP 250 CL IgM |
|----------------------|---|---|--|---|--|
| Zenit ra CL IgM | / | $\kappa=0,77$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=0,69$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=0,35$ (n=5) [302,304,305,330,337] | $\kappa=0,69$ (n=4) [302,304,330,337] |
| Alegria CL IgM | $\kappa=0,77$ (n=4) [302,304,330,337] | / | $\kappa=0,88$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=0,32$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=0,88$ (n=4) [302,304,330,337] |
| ACL AcuStar CL IgM | $\kappa=0,69$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=0,88$ (n=4) [302,304,330,337] | / | $\kappa=0,27$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=1,0$ (n=5) [302,304,330,337,338] |
| Imtec-ELISA CL IgM | $\kappa=0,35$ (n=5) [302,304,305,330,337] | $\kappa=0,32$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=0,27$ (n=4) [302,304,330,337] | / | $\kappa=0,27$ (n=4) [302,304,330,337] |
| ImmunoCAP 250 CL IgM | $\kappa=0,69$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=0,88$ (n=4) [302,304,330,337] | $\kappa=1,0$ (n=5) [302,304,330,337,338] | $\kappa=0,27$ (n=4) [302,304,330,337] | / |

Tabelle 15: Übereinstimmung der Ergebnisse β_2 -GPI IgG

β_2 -GPI IgG: β_2 -GPI-Antikörper IgG, κ = Kappa (n=43).

| Testsystem | Zenit ra β_2 - GPI IgG | Alegria β_2 - GPI IgG | ACL AcuStar β_2 -GPI IgG | Imtec-ELISA β_2 -GPI IgG | ImmunoCAP 250 β_2 -GPI IgG |
|--|---|---|---|---|---|
| Zenit ra β_2 - GPI IgG | / | $\kappa=0,44$ (n=4) [303,304, 327,340] | $\kappa=0,42$ (n=7) [303,304, 306,318,327, 340,343] | $\kappa=0,32$ (n=3) [303,327,340] | $\kappa=0,23$ (n=2) [327,340] |
| Alegria β_2 - GPI IgG | $\kappa=0,44$ (n=4) [303,304, 327,340] | / | $\kappa=0,48$ (n=8) [303,304, 325,327,328, 330,337,340] | $\kappa=0,44$ (n=4) [303,325,327, 340] | $\kappa=0,55$ (n=4) [325,327, 328,340] |
| ACL AcuStar β_2 -GPI IgG | $\kappa=0,42$ (n=7) [303,304, 306,318,327, 340,343] | $\kappa=0,48$ (n=8) [303,304, 325,327, 328,330, 337,340] | / | $\kappa=0,21$ (n=5) [303,305,325, 327,340] | $\kappa=0,20$ (n=4) [325,327, 328,340] |
| Imtec-ELISA β_2 -GPI IgG | $\kappa=0,32$ (n=3) [303,327, 340] | $\kappa=0,44$ (n=4) [303,325, 327,340] | $\kappa=0,21$ (n=5) [303,305, 325,327,340] | / | $\kappa=0,42$ (n=3) [325,327, 340] |
| ImmunoCAP 250 β_2 -GPI IgG | $\kappa=0,23$ (n=2) [327,340] | $\kappa=0,55$ (n=4) [325,327, 328,340] | $\kappa=0,20$ (n=4) [325,327, 328,340] | $\kappa=0,42$ (n=3) [325,327,340] | / |

Tabelle 16: Übereinstimmung der Ergebnisse β_2 -GPI IgM

β_2 -GPI IgM: β_2 -GPI-Antikörper IgM, κ = Kappa (n=43).

| Testsystem | Zenit ra β_2 - GPI IgM | Alegria β_2 - GPI IgM | ACL AcuStar β_2 -GPI IgM | Imtec-ELISA β_2 -GPI IgM | ImmunoCAP 250 β_2 -GPI IgM |
|--|---|---|---|---|---|
| Zenit ra β_2 - GPI IgM | / | $\kappa=0,62$ (n=4) [304,305, 330,337] | $\kappa=0,72$ (n=3) [304,330, 337] | $\kappa=0,55$ (n=3) [304,330,337] | $\kappa=0,72$ (n=3) [304,330, 337] |
| Alegria β_2 - GPI IgM | $\kappa=0,62$ (n=4) [304,305, 330,337] | / | $\kappa=0,62$ (n=4) [302,304, 330,337] | $\kappa=0,66$ (n=4) [302,304,330, 337] | $\kappa=0,62$ (n=4) [302,304, 330,337] |
| ACL AcuStar β_2 -GPI IgM | $\kappa=0,72$ (n=3) [304,330, 337] | $\kappa=0,62$ (n=4) [302,304, 330,337] | / | $\kappa=0,77$ (n=4) [302,304,330, 337] | $\kappa=1,0$ (n=4) [302,304, 330,337] |
| Imtec-ELISA β_2 -GPI IgM | $\kappa=0,55$ (n=3) [304,330, 337] | $\kappa=0,66$ (n=5) [302,304, 321,330,33 7] | $\kappa=0,77$ (n=4) [302,304, 330,337] | / | $\kappa=0,77$ (n=4) [302,304, 330,337] |
| ImmunoCAP 250 β_2 -GPI IgM | $\kappa=0,72$ (n=3) [304,330, 337] | $\kappa=0,62$ (n=4) [302,304, 330,337] | $\kappa=1,0$ (n=4) [302,304, 330,337] | $\kappa=0,77$ (n=4) [302,304,330, 337] | / |

Die *cut-off*-Werte wurden jeweils von der zugehörigen Firma vorgegeben. Graubereiche bzw. schwach positive Bereiche wurden nicht berücksichtigt.

Für keine Patientinnenprobe zeigten alle Analysemethoden positive Werte für Cardiolipin-Antikörper IgG. Für Cardiolipin-Antikörper IgM wiesen alle Methoden für vier Proben [302, 304, 330, 337] einen positiven Wert auf. Für β_2 -GPI-Antikörper IgG waren es zwei Proben [327, 340] und für β_2 -GPI-Antikörper IgM drei Proben [304, 330,337].

Das Kollektiv weist weniger positive Proben auf als erwartet, da die Patienten und Patientinnen mit einem systemischen Lupus erythematodes unter Therapie stehen.

Auf Zenit ra (A. Menarini Diagnostics, Florenz, Italien) fanden sich bei 13,5 % (n=171) positive Testungen, bei Alegria (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Deutschland) bei 14,0 % (n=172), bei ACL AcuStar (Instrumentation Laboratory, Bedford, US-Bundesstaat Massachusetts, USA) bei 17,9 % (n=168), bei Imtec-ELISA (Human GmbH, Wiesbaden, Deutschland/ Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden, Deutschland) bei 16,9 % (n=172) und bei ImmunoCAP 250 (Phadia, Uppsala, Schweden) bei 12,5 % (n=168) (bei diesen Angaben wurden alle nicht negativen Ergebnisse als positiv gewertet).

In den Ergebnissen der Verumgruppe spiegeln sich die Ergebnisse des Abortkollektives wieder. Es zeigt sich auch in diesem Kollektiv, dass es zunächst eine mittlere bis gute Übereinstimmung zu geben scheint. Verfolgt man diese Ergebnisse bis ins Detail, indem man die positiven Proben, die von zwei Testsystemen einheitlich erkannt wurden, herausarbeitet und als Übereinstimmungsmaß Cohen's Kappa berechnet, zeigt sich eine schlechte bis sehr gute Übereinstimmung. Die Kappa-Werte lagen zwischen -0,04 (Vergleich Cardiolipin-Antikörper IgG zwischen Imtec (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH) und ACL AcuStar (IL) als auch Imtec (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH) und Alegria (Orgentec GmbH)) und 1,0 (Vergleich Cardiolipin-Antikörper IgM und β_2 -GPI-Antikörper IgM zwischen ImmunoCAP 250 (Phadia) und ACL AcuStar (IL)). Somit lässt sich auch für die Verumgruppe feststellen, dass die Versuchsmethoden noch nicht genügend standardisiert sind, um für Patienten und Patientinnen eine sichere Diagnostik zu gewährleisten.

3.3.2 Geräteüberblick

Tabelle 17: Geräteüberblick

Die Tabelle zeigt für jedes einzelne Bewertungskriterium den Punktescore, der von 0-2 reicht und von zwei erfahrenen Mitarbeiterinnen ermittelt wurde. Der Score bezieht sich auf den Vergleich der Geräte. 0: weniger zufrieden stellend; 1: zufrieden stellend; 2: sehr zufrieden stellend.

*Die Handhabung umfasst die Übersichtlichkeit des Gerätes, die Software, die Ein- und Ausschaltvorgänge, die Ergebnisausgabe, die Wartung und die Kalibrierung.

| | Zenit ra | Alegria | Imtec-ELISA | ACL A-cuStar | ImmunoCAP 250 |
|---|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Gesamtzeit für die Bestimmung einer Probe mit 4 Parametern | 2 (28 min) | 1 (77 min) | 0 (144 min) | 1 (35 min) | 1 (95min) |
| Nettozeit | 2 (1 min) | 1 (5 min) | 0 (44 min) | 1 (2 min) | 2 (1 min) |
| Walk-away-Zeit | 2 (27 min) | 1 (72 min) | 0 (100 min) | 1 (33 min) | 1 (94 min) |
| Anzahl der gleichzeitig zu bestimmenden Probenstellplätze für die Analyse von je 4 Parametern | 1 (64 Proben) | 0 (7,5 Proben) | 2 (80 Proben) | 1 (30 Proben) | 1 (50 Proben) |
| Handhabung * | 2 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| Grad der manuellen Tätigkeit | 2 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| Raumbedarf | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| Summe | 11 | 6 | 4 | 9 | 9 |

4. Diskussion

4.1 Teil 1: Retrospektive Datenanalyse

4.1.1 Thrombosen und Thrombophilie

Eine Thrombose stellt eine Erkrankung dar, bei der sich ein Blutgerinnsel in einem Gefäß bildet (Aird 2007). Dies kann sowohl im venösen als auch im arteriellen Gefäßsystem geschehen. Die *Virchow Trias*, die Veränderungen der Blutzusammensetzung, des Blutstroms und der Gefäßwand beschreibt, gilt als Hauptursache der Entstehung (Lane und Grant 2000). Die charakteristischen Symptome einer Thrombose sind Schmerzen, Erythem, Überwärmung und Schwellung (Blann und Lip 2006). Häufige Symptome der möglichen konsekutiven Lungenembolie sind Dyspnoe, Tachypnoe, Pleuraschmerzen, Husten, Tachykardie und Blut im Sputum (Stein et al. 1991).

Bei häufiger auftretenden Thrombosen oder Thrombosen an ungewöhnlichen Stellen, sowie bei Thrombosen in der Schwangerschaft, bei familiärer Vorgeschichte von Thrombosen und dem Vorliegen von einem oder mehreren Kriterien der Sapporo-Kriterien sollte an eine Thrombophilie gedacht werden und diese durch ein Screening abgeklärt werden (Stegnar 2010).

4.1.1.1 Thrombophiliediagnostik

Die Thrombophiliediagnostik hat einen wichtigen Stellenwert in der Hämostaseologie. Die Kombination der plasmatischen Faktoren Protein C, Protein S und Antithrombin, den molekulargenetischen Markern Faktor V-Mutation, MTHFR-Mutation und Faktor II-Genmutation und den Faktoren Lupus-Antikoagulans und Cardiolipin-Antikörper IgG/IgM ist weitgehend anerkannt für ein Thrombophiliescreening (Bates et al. 2004). Lisman et al. plädieren β_2 -GPI-Antikörper und einen Fibrinolyse-Test mit in das Screening aufzunehmen, da diese Faktoren ebenfalls mit einer Neigung zu Thrombosen assoziiert sind (Lisman et al. 2005).

4.1.1.2 Protein C

Das aktivierte Protein C ist einer der Inhibitoren des Gerinnungssystems und damit ein wichtiger Parameter für das Thrombophilie-Screening. Es gibt keinerlei Leitbefunde, durch die sich ein Protein C-Mangel darstellt. Lediglich die Anamnese einer auffälligen, eventuell familiären Thromboseneigung kann ein Hinweis darauf sein (Seligsohn und Lubetsky 2001, Marlar 2001). Der Protein C-Referenzbereich liegt zwischen 70-140 %. Bei reifen Neugeborenen ist Protein C physiologisch vermindert. Erst ab dem 90. Lebensjahr ist eine Normalisierung zu erwarten (Nowak-Göttl et al. 2003). Unter Einnahme von Ovulationshemmern ist je nach Östrogengehalt der Protein C-Spiegel erhöht und auch während einer Schwangerschaft steigt er an (Said et al. 2010). Ebenfalls im Laufe des Alters steigt Protein C physiologisch im

Blut leicht an. Desweiteren ist der Protein C-Spiegel bei einem Vorliegen des nephrotischen Syndroms, einer ischämischen Herzerkrankung und des Diabetes mellitus erhöht (Miletich 1990).

Neben einer Erhöhung des Protein C-Spiegels kann auch eine Erniedrigung vorliegen, deren Ursachen betrachtet werden müssen. Durch Synthesestörung, die durch eine Lebererkrankung, einen Vitamin K-Mangel, chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder eine Asparaginasetherapie hervorgerufen werden kann, ist der Protein C-Wert im Blut erniedrigt (Castellino und Ploplis 2009). Das Protein C kann durch Umsatzstörungen ebenfalls erniedrigt werden. Unter diese Umsatzstörungen zählt man eine Verbrauchskoagulopathie, Entzündungen, Sepsis, systemische Hyperfibrinolyse, Dilutions- sowie Verlustkoagulopathien bei massiven Blutungen, Verbrennungen und Polytraumen. Einen Inhibitoreffekt löst das Lupus-Antikoagulans gegen Protein C-Phospholipidkomplexe im Plasma aus, wodurch ein erniedrigter Protein C-Wert vorliegt. Hierbei ist das Thromboserisiko nochmals erhöht (Castellino und Ploplis 2009). In der Bevölkerung tritt ein Protein C-Mangel zu 0,2 bis 0,8 % auf (Tait et al. 1994, Koster et al. 1995). In unserer Studie wiesen 7,68 % der Patientinnen einen pathologischen Protein C-Wert auf. Dieses Ergebnis, sowie die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse für Protein S und Antithrombin, können vielseitig beeinflusst worden sein. Die in unserer Studie zur retrospektiven Analyse verwendeten Daten stammen aus Einsenderproben aus ganz Deutschland. Auf Grund dessen muss man die Transportdauer bis in das AescuLabor und mögliche Temperaturschwankungen, z.B. durch Lagerung, in der Präanalytik als Ursache für mögliche Ergebnisabweichungen betrachten. Heijboer et al. verwendeten in ihrer Studie frisches Blutplasma, welches sie mindestens zwei Messdurchläufen unterzogen. Sie ließen Proben nur als positiv gelten, wenn diese in zwei Messungen pathologische Werte aufwiesen. In unserer Studie haben wir die Werte der Patientinnen genutzt, die der niedergelassene behandelnde Arzt erhalten hat, um eine Diagnose zu stellen. Möglicherweise sind die Ergebnisse von Heijboer et al. exakter, wir spiegeln jedoch den Alltag wieder. Ebenfalls Koster et al. verwendeten frisches Blutplasma. In der Studie von Heijboer et al. wurden zusätzlich Faktor II und Faktor X bestimmt, die im Normalbereich liegen mussten, womit sie einen Vitamin K-Mangel und eine Lebererkrankung ausschlossen. Koster et al. bestimmten Faktor II und die Prothrombin-Zeit, um einen Vitamin K-Mangel auszuschließen. In unserer Studie sind wir auf diesen Aspekt nicht eingegangen. Dies stellt womöglich eine weitere Ursache für Ergebnisabweichungen dar.

Bei ambulanten Patienten/Patientinnen mit einer bereits stattgehabten venösen Thrombose fanden Studien einen Protein C-Mangel im Kollektiv bei 2,7 bis 4,6 % (Koster et al. 1995, Heijboer et al. 1990). Diese Studien zeigen im Vergleich zu unseren Untersuchungen, dass unser Patientinnenkollektiv mit hoher Wahrscheinlichkeit unter einem erhöhten Thromboseri-

siko stand. Eine weitere Studie untersuchte junge Patienten/Patientinnen unter 45 Jahren mit einer venösen Thrombose und fand einen Protein C-Mangel bei 4 % der Patienten/Patientinnen (Gladson et al. 1988). In unserem Kollektiv tritt verglichen mit den anderen Studien die höchste Prävalenz auf. Dies liegt möglicherweise daran, dass die Patientenkollektive unterschiedlich zusammengesetzt sind. Unsere Studie befasste sich nur mit weiblichen Patienten, die retrospektiv ein vollständiges Thrombophilie-Screening (siehe Material und Methoden) vorliegen hatten. Damit haben wir eine Selektion vorgenommen, die auf einen Verdacht auf Thrombophilie, stattgehabte Thrombosen und eine positive Eigen-/ Familienanamnese schließen lässt. Das Patientenkollektiv von Koster et al. setzte sich aus Patienten und Patientinnen zusammen, die in drei verschiedene Gerinnungszentren in den Niederlanden zur Behandlung oder zum Einstellen einer Antikoagulationstherapie nach einer ersten tiefen Venenthrombose kamen. Patienten/Patientinnen mit einer malignen Erkrankung wurden aus der Studie ausgeschlossen. Heijboer et al. rekrutierten ihre Patienten von niedergelassenen Allgemeinmedizinern aus der Umgebung von Amsterdam. Diese sollten ihre Patienten bei einem Verdacht auf eine akute tiefe Beinvenenthrombose zur Thromboseeinheit des akademischen medizinischen Zentrums in Amsterdam senden. Hier wurde neben einer Anamnese und einer körperlichen Untersuchung eine Plethysmographie durchgeführt. Bei einer auffälligen Plethysmographie wurde weiterhin eine Venographie mit Kontrastmittel durchgeführt, um die Thrombose zu bestätigen. Eine weitere Ursache für unsere hohe Prävalenz beruht darauf, dass unser Patientinnenkollektiv (n=1.368) um vieles größer ist als der der anderen Studien (Gladson et al. n=141; Heijboer et al. n=277; Koster et al. n=474). Desweiteren konnten wir keine Ausschlüsse auf Grund von Einflussfaktoren treffen. In der Studie von Heijboer et al. liegt der Altersbereich von 17 bis 91 Jahren, in der Studie von Gladson et al. liegt das Alter unter 45 Jahren, in der Studie von Koster et al. unter 70 Jahren und in unserer Studie zwischen 18 und 78 Jahren (Heijboer et al. 1990, Koster et al. 1995, Gladson et al. 1988).

Während einer Vitamin K-Antagonisten-Therapie ist es schwierig einen kongenitalen Protein C-Mangel zu diagnostizieren. Wenn während der Therapie eine dringende Indikation besteht, kann man versuchen den kongenitalen Protein C-Mangel über Bezugsgrößen beispielsweise der immunologisch bestimmten Thromboplastin-Konzentration zu diagnostizieren, was sich als problematisch erweist. Um eine sichere Diagnose zu stellen, ist zu empfehlen, die Vitamin K-Antagonisten-Therapie abzusetzen und erst 6-8 Wochen danach die Diagnostik durchzuführen. Dies schränkt die Diagnosestellung sehr ein, da viele Patienten mit einer Thromboseneigung, die eventuell zuvor kein Thrombophilie-Screening bekommen haben, 6-8 Wochen warten müssen (Pabinger et al. 1990).

Um das Thromboserisiko des Patientinnenkollektives in Bezug auf einen Protein C-Mangel (oder auch Protein S- oder Antithrombin-Mangel) beurteilen zu können, müsste man die Patientinnen ausschließen, die einen Protein C-Mangel auf Grund einer der oben beschriebenen Ursachen hatten, z. B. einer Leberzirrhose. Nach diesem Prinzip ist Heijboer et al. vorgegangen und fand heraus, dass ein Mangel von Protein C bzw. Protein S oder Antithrombin bei ambulanten Patienten mit akuter tiefer Venenthrombose zu 8,3 % (95 CI, 5,4 - 12,4) für die Thrombose verantwortlich gemacht werden konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 2,2 % (Heijboer et al. 1990). In unserer Studie konnten wir diese beschriebenen Ursachen nicht ausschließen, da wir auf Grund des Zuweiserkollektives keine ausreichende Anamnese der Patientinnen vorliegen hatten.

4.1.1.2.1 Interpretation der Befunde

Ein Befund mit einer Protein C-Konzentration zwischen 20-70 % bedeutet noch nicht zwangsläufig ein erhöhtes Thromboserisiko. Denn Miletich et al. hatten in ihrer Studie 1 % asymptotische Probanden mit Protein C-Spiegeln in diesem Bereich. Dennoch sollte von einem erhöhten Risiko für Thromboembolien ausgegangen werden und bis zur definitiven Bestätigung dieser Verdachtsdiagnose sollten wiederholte Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei sollten genetische Risikofaktoren ausgeschlossen werden und die oben genannten Ursachen eines erworbenen Protein C-Mangels berücksichtigt werden (Miletich 1990).

Bei Konzentrationen unter 5 % liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein homozygoter Protein C-Mangel vor, der bereits in den ersten Lebensstagen massive Thromboembolien verursacht (Miletich 1990).

4.1.1.3 Protein S

Als Cofaktor des Protein C ist Protein S ebenfalls ein sehr wichtiger Parameter für die Diagnostik einer erhöhten Thromboembolieneigung. Ein Protein S-Mangel äußert sich durch keinerlei Leitbefunde und kann nur durch eine auffällige Anamnese vermutet werden. Die Diagnose eines Protein S-Mangels wird zusätzlich durch eine schwierige Bestimmung, aufwändige genetische Untersuchungen und erhebliche Schwankungen des Protein S-Spiegels im Blut erschwert (Seligsohn und Lubetsky 2001).

Der Referenzbereich für Protein S liegt zwischen 55 und 130 %. Bei reifen Neugeborenen ist der Protein S-Wert physiologisch vermindert, das freie Protein S jedoch hoch, da das Bindungsprotein, C4b-BP, ebenfalls vermindert ist. Im Laufe der ersten drei Lebensmonate nähern sich die Werte den Erwachsenenwerten an (Pichler und Pichler 2008). Unter der Einnahme von Ovulationshemmern fällt das gesamte Protein S ab. Das freie Protein S bleibt

gleich, da auch das Bindeprotein vermindert ist (Kluft 2007). Während einer Schwangerschaft fällt der Protein S-Spiegel des freien und des gesamten Protein S-Wertes kontinuierlich bis auf die Hälfte des Ausgangswertes vor der Schwangerschaft ab (Said et al. 2010).

Protein S kann wie Protein C durch die gleichen Ursachen, angeboren oder erworben, durch eine Synthesestörung, Umsatzstörung oder einen Inhibitor, erniedrigt vorliegen. Dies muss bei der Betrachtung des Referenzbereiches bedacht werden. Die Prävalenz der Bevölkerung eines Protein S-Mangels beträgt unter 0,1 % (Koster et al. 1993). In unserem Patientinnenkollektiv ist mit einer Häufigkeit von 8 % ein pathologischer Protein S-Wert aufgetreten. Dies zeigt eine Erhöhung der Thrombosegefahr im Kollektiv. Jedoch liegen uns keinerlei Zusatzdaten zu den Patientinnen vor, so dass wir nur den Wert an sich betrachten können und die beschriebenen Einflussfaktoren nicht mit in die Risikoanalyse einer Thromboseneigung einbeziehen können. Ergänzend fanden Koster et al. bei Patienten mit einer Anamnese einer venösen Thrombose einen Protein S-Mangel bei 2,2 % ihres Kollektives (Koster et al. 1993). Eine weitere Studie untersuchte junge Patienten/Patientinnen unter 45 Jahren mit einer venösen Thrombose und fand einen Protein S-Mangel zu 5 % (Gladson et al. 1988). Auch hier, im Vergleich mit dem Protein C-Mangel, weist unsere Studie eine höhere Prävalenz auf. Dies kann an den bei Protein C-Mangel beschriebenen Möglichkeiten liegen.

4.1.1.3.1 Interpretation der Befunde

Konzentrationen im Bereich zwischen 20 und 70 % können auf eine erhöhte Thromboseneigung hinweisen. Bei einem heterozygoten Protein S-Mangel muss ein erniedrigter Protein S-Wert jedoch nicht mit einer erhöhten Thromboseneigung einhergehen. Bei erniedrigten Werten und einer Anamnese, die darauf hinweist, sollten weitere Tests zur Bestätigung und eine Diagnostik zum Ausschluss anderer, vor allem genetischer Risikofaktoren durchgeführt werden (Lane et al. 1996). Bei Konzentrationen unter 5 % liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein homozygoter Protein S-Mangel vor, der bereits in den ersten Lebensstagen zu massiven Thromboembolien führt (Michiels und Hamulyák 1998).

4.1.1.4 Antithrombin

Antithrombin wird als der wichtigste Inhibitor der Blutgerinnung angesehen. Bereits subnormale Konzentrationen von 40-70 % können ein erhöhtes Thromboembolierisiko hervorrufen (Abildgaard 2007).

Die Antithrombin-Konzentrationen wirken sich ohne die Anwesenheit von Heparin nicht auf die Gerinnungsteste aus. Sobald Heparin gegenwärtig ist, wird Antithrombin sofort wirksam. Dies spiegelt sich in den Gerinnungszeiten der Tests für die aPTT und der Thrombinzeit wieder, die eine gute Korrelation mit der Heparin-Konzentration zeigen. Nach Beginn einer

Heparintherapie fällt in den ersten Tagen das Antithrombin vorübergehend um ca. 25 % des vorherigen Wertes ab. Bei einer Vitamin K-Antagonisten-Therapie steigt der Antithrombin-Wert an (Abildgaard 2007).

Der Referenzbereich des Antithrombins liegt zwischen 80 und 120 %. Er ist physiologisch bei reifen Neugeborenen erniedrigt und normalisiert sich ab dem 90. Lebensjahr (Nowak-Göttl et al. 2003). Ebenfalls liegt eine Erniedrigung bei einer Einnahme von Ovulationshemmern und einer Hormonersatztherapie in der Menopause vor. Die Erniedrigung beträgt hierbei um ca. 10 % niedriger als der Ausgangs-Antithrombin-Wert (Kluft 2007). In der Schwangerschaft liegt der Antithrombin-Wert im unteren Normbereich (Morikawa et al. 2010). Im Alter liegt keine Veränderung des Antithrombins vor (Hager und Platt 1990).

Wie bei Protein S und Protein C können die gleichen Ursachen für eine erniedrigte Antithrombin-Aktivität vorliegen. Bei Antithrombin liegen ergänzend zusätzlich erniedrigte Werte beim Initialstadium der Heparin-Therapie und bei systemischer fibrinolytischer Therapie mit Streptokinase vor (Wong und White 2007). Über die Ursachen und Einflussgrößen unter denen unsere Patientinnen möglicherweise standen, können wir keine Aussage treffen. Es lässt sich feststellen, dass in unserem Kollektiv ein erhöhter Antithrombin-Mangel mit 5,1 % im Vergleich zur durchschnittlichen Bevölkerung mit 0,02 bis 0,05 % auftrat (Tait et al. 1994). In zwei Studien die ambulante Patienten mit einer Anamnese einer venösen Thrombose untersuchten, trat ein Antithrombin-Mangel zu 1 % auf (Koster et al. 1995, Heijboer et al. 1990). Diese Studien untermauern unsere Vermutung, dass unser Patientinnenkollektiv unter einem erhöhten Risiko für Thrombosen steht. Jedoch können wir keine Aussage über die Anamnese der Patientinnen geben. Abweichungen unseres Ergebnisses von den Ergebnissen anderer Studien können auf Grund von Unterschieden in der Zusammensetzung des Patientinnenkollektivs, in der Patientinnenanzahl, im Patientinnenalter oder in der Präanalytik vorkommen. Auf diese Punkte wurde unter 4.1.1.2 näher eingegangen.

4.1.1.4.1 Interpretation der Befunde

Bei Vitamin K-Mangel bzw. unter Einnahme von Vitamin K-Antagonisten liegt eine Antithrombinaktivität von über 120 % vor, die aber ohne klinische Bedeutung ist (Wada et al. 2008). Bei einer Antithrombinaktivität von 40-70 % kann ein erhöhtes Risiko für Thromboembolien vorliegen. Diese kann in Form von einem angeborenen Antithrombinmangel, der meist zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr auftritt, beruhen. Die Diagnose sollte erst nach mehrfacher Bestätigung und nach Betrachten aller Einflussgrößen auf den Antithrombin-Wert geäußert werden. Ein erworbener Antithrombinmangel kann ebenfalls bei dieser Antithrombinaktivität vorliegen. Es sollte möglichst die Ursache ausfindig gemacht werden und anschlie-

ßend mit der Therapie, welche sich aus Antikoagulanzenbehandlung und Substitutionstherapie zusammen setzt, begonnen werden (Lane und Caso 1989).

Liegen Antithrombin-Werte unter 40% vor, ist dies ebenfalls mit einem erhöhten Thromboembolierisiko vergesellschaftet. Werte in diesem Bereich sind häufig bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Leberzirrhose zu finden (Wada et al. 2008).

4.1.1.5 Molekulargenetische Marker

4.1.1.5.1 Faktor V- und Faktor II-Mutation

In unserer Studie trat eine Faktor V-Mutation mit einer Häufigkeit von 11,4 % (11,2 % heterozygot und 0,2 % homozygot) und eine Faktor II-Mutation zu 5,07 % (5 % heterozygot und 0,07 % homozygot) auf. Diese Werte sind etwas erhöht im Vergleich zur Bevölkerung Europas, bei der eine Faktor V-Mutation in einem Bereich von 3 bis 8 % und eine Faktor II Mutation zu ca. 2 % vorkommt (Juul et al. 2004, Bank et al. 2004). Die Erhöhung liegt sehr wahrscheinlich daran, dass unser Patientinnenkollektiv unter einem Verdacht auf eine Thromboseneigung steht. Im Vergleich zu einem Kollektiv mit stattgehabten venösen Thrombosen (Faktor V-Mangel zu 18,8 bis 28,8 % und Faktor II-Mangel ca. 7,1 %) sind unsere Prävalenzen jedoch erniedrigt (Juul et al. 2004, Bank et al. 2004). Dies liegt vermutlich daran, dass wir Patientinnen ausgewertet haben, deren Blutproben einem Thrombophilie-Screening unterzogen wurden und eine solche Anfrage vermutlich bei bereits risikogefährdeten Patientinnen angefordert wurde und das Risiko sich eventuell nicht bestätigt hat und somit die Prävalenzen erniedrigt wurden.

4.1.1.5.2 Kombinierte Defekte

Thrombophile Risikofaktoren, die sowohl erworben als auch hereditär auftreten können, sind ein häufiges Vorkommnis und treten somit auch oft kombiniert auf. Eine Kombination von Faktor V- und Faktor II-Mutation tritt bei der Normalbevölkerung < 0,05 % auf. Bei Patienten mit Thrombosen sind 2 % betroffen (Seligsohn und Lubetsky 2001, Oger et al. 2006). In unserem Patientinnenkollektiv trat diese Kombination bei 0,6 % auf. Diese Erhöhung gegenüber der Normalbevölkerung ist wahrscheinlich auf das Patientinnenkollektiv zurückzuführen, da es sich um ein Einsenderkollektiv der Abteilung für Gerinnung handelt und damit eine Selektion stattgefunden hat. Die Erniedrigung gegenüber den Patienten mit Thrombosen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass wir bei unseren Patienten einen Verdacht auf Thromboseneigung haben und kein gesichertes Ereignis vorliegt.

4.1.1.6 Durchführung des Thrombophilie-Screenings

Ein Thrombophilie-Screening sollte nicht ohne Indikation durchgeführt werden, sondern nur wenn es sich als sinnvoll darstellt (Perry und Ortel 2003). Nach Seligsohn und Lubetsky wird eine Thrombophilie als sehr wahrscheinlich angesehen, wenn bei einem Patient ein thromboembolisches Ereignis vor dem 45. Lebensjahr ohne erkennbare Ursachen vorliegt, bei rezidivierenden Thromboembolien, bei familiärer Thromboseneigung, bei atypisch lokalisierten Gefäßverschlüssen, nach einer Todgeburt oder nach drei oder mehr ungeklärten Spontanaborten. Zusätzlich ist eine Thrombophilie bei Auftreten einer Thrombose unter Einnahme von Ovulationshemmern oder in Folge einer Schwangerschaft oder im Wochenbett zu vermuten. Trifft einer dieser Punkte zu ist die Durchführung eines Thrombophilie-Screenings anzuraten (Seligsohn und Lubetsky 2001). Zusätzlich sollte immer eine Diagnostik der Allgemeinmedizin durchgeführt werden und zusätzlich zu den Thrombophilie-Screening-Parametern die Prothrombinzeit, aPTT, Fibrinogen und die Thrombinzeit bestimmt werden (Perry und Ortel 2003, De Stefano et al. 2002). Jedoch sollte bei einer Anforderung eines Thrombophilie-Screenings auch an die Kosten gedacht werden. Desweiteren sollte das Screening auf eine Thrombophilie frühestens 6 Wochen nach einer Schwangerschaft erfolgen, da durch die Schwangerschaft die Gerinnungsparameter verändert sind (Von Wolff und Strowitzki 2005).

Für die Antiphospholipid-Antikörper gibt es derzeit kein Testverfahren, das eine 100-prozentige Sensitivität oder Spezifität aufweist. Aus diesem Grund ist eine Kombination von Testen in Zusammenhang mit der klinischen Diagnostik notwendig, um die Diagnose des Antiphospholipid-Syndroms zu erfassen (Urbanus et al. 2008). Mit unserem zweiten Teil dieser Studie wollten wir versuchen, das geeignetste Testsystem für die Diagnostik des Antiphospholipid-Syndroms herauszuarbeiten.

Für die Diagnostik des Lupus-Antikoagulans ist eine Stufendiagnostik in Form von Screening, Plasmaaustauschversuch, Bestätigungstest und Ausschluss eines Faktorenmangels oder spezifischen Faktoreninhibitoren üblich, um somit eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen (Urbanus et al. 2008). Jedoch kann die Sensitivität vor allem durch die Präanalytik beeinträchtigt werden. Um diesen Einflussfaktor zu minimieren ist es wichtig die Restthrombozyten auf eine möglichst kleine Zahl im zu analysierenden Plasma zu reduzieren, da sie eine zusätzliche nicht definierbare Menge an Phospholipiden freisetzen können. Bei Zerfall der Thrombozyten könnten die frei gewordenen Phospholipide an die Antikörper binden und zu falsch negativen Ergebnissen führen. Es sollte ein zu analysierendes Plasma mit unter 10/nl Thrombozyten verwendet werden (Pengo et al. 2009). Es ist jedoch unpraktikabel für ein Routinelabor diesen Wert zu erreichen, da dies nur durch Filtration über 0,22-µm-Filter oder zweimaliges Zentrifugieren gelingt. Desweiteren spricht eine erhöhte Ge-

fahr der Probenverwechslung durch wiederholtes Umfüllen, erhöhte Kosten und möglicherweise ein Aktivitätsverlust von einzelnen Faktoren gegen ein Plasma mit unter 10/nl Thrombozyten. Außerdem wird durch scharfes Zentrifugieren der Thrombozytenzerfall erhöht (Pengo et al. 2009). Für das eigene Labor gilt es, die Zentrifugation bestmöglich zu optimieren und ein plättchenarmes Plasma zu erzeugen von unter 20/nl Thrombozyten. Weiterhin sollten wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden werden, da dabei ebenfalls Thrombozyten zerfallen und Phospholipide freigesetzt werden. Wenn das Plasma aufgehoben werden soll, sollte dies bei schnellem Einfrieren bis zu -70 °C geschehen. Generell sollte vor der Bestimmung des LA die aPTT oder der Faktor Xa bestimmt werden, um eine Heparinisierung auszuschließen (Pengo et al. 2009).

Die Antikörper weisen eine Heterogenität auf, wodurch eine 100-prozentige Sensitivität und Spezifität nicht möglich sind. Für möglichst optimale Ergebnisse ist eine Kombination von methodisch unabhängigen Testsystemen nötig (Pengo et al. 2009).

Der Nachweis von Cardiolipin-Antikörpern besitzt nur eine geringe Spezifität und muss deshalb nach 12 Wochen wiederholt werden (Miyakis et al. 2006), wodurch temporär infektionsbedingt auftretende Antikörper ausgeschlossen werden. Ein wiederholt positiver Test für Cardiolipin-Antikörper ist verlässlich (Male et al. 2005). Eine höhere Spezifität wurde erreicht, indem β_2 -GPI der Testung für Cardiolipin-Antikörper hinzugefügt wurde (Miyakis et al. 2006), da es ein unabhängiger Risikofaktor für Thrombose (Reber und de Moerloose 2004) und Schwangerschaftskomplikationen (Lee et al. 2001) ist, die Variationsbreite zwischen verschiedenen Laboren geringer ist und der Test bei Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom bei 3 bis 10 % der Fälle als alleiniger Antikörper positiv ausfällt (Nash et al. 2004, Lee et al. 2003).

Alle Labortestsysteme sind in ihrer Reproduktivität und Standardisierung begrenzt. Vergleiche zwischen verschiedenen Testen sind daher nur eingeschränkt möglich. Verläufe der Antikörperwerte sollten deshalb nur mit demselben Testsystem durchgeführt werden (Pengo et al. 2009).

Ein weiteres Problem der Standardisierung besteht darin, einen *cut-off*-Wert zu definieren. Dies liegt unter anderem an der Verwendung von unterschiedlichen Testkits und unterschiedlichen Methoden, wodurch abweichende Werte für die Antikörper entstehen und dies vor allem bei niedrigen Titern/Konzentrationen (Reber et al. 1995). Hieraus folgt, dass die Ergebnisse der Labordiagnostik für das Antiphospholipid-Syndroms von dem Labor abhängt, das die Tests durchführt. Aus diesem Grund sind derzeit nur mittlere und hohe Anti-Cardiolipin-Antikörper Werte im Bereich der 99-ten Perzentile oder über 40 *units* IgG bzw.

IgM in die diagnostischen Kriterien mit einzubeziehen, welches die Spezifität der Teste verbessert (Miyakis et al. 2006). Dies ist möglicherweise auch der Grund, warum im selektierten Patientenkollektiv der 1.368 Patientinnen nur 23 (1,7 %) positive Fälle für Cardiolipin-Antikörper IgG und nur 20 (1,5 %) für Cardiolipin-Antikörper IgM vorkommen.

Die Standardisierung der Labordiagnostik für das Antiphospholipid-Syndrom konnte im Vergleich zu den 1999 aufgestellten Sapporo-Kriterien verbessert werden, seit die β_2 -GPI-Antikörper ELISA mit definiert beschichteten Glykoprotein Mikrotiterplatten zur Verfügung stehen. Es zeigten sich vermehrt Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Durchführungen als bei den vorherigen Cardiolipin-Antikörper Testen. Jedoch treten hier vermehrt Werte im Grenzbereich auf, die wiederum schwer zu beurteilen sind (Devreese und Hoylaerts 2009). Die hohe Spezifität, die der β_2 -GPI-Antikörper ELISA bietet, kann jedoch auch nachteilig sein, da er alle Antikörper, die gegen β_2 -GPI gerichtet sind detektiert, auch die, die nicht pathologisch sind sowie Phospholipid-unabhängige Antikörper gegen β_2 -GPI. Dadurch ist der Test schwieriger zu beurteilen, als die anderen Teste, die nur auf Antikörper ausgerichtet sind, die Pathologien hervorrufen. Hinzufügend detektiert der β_2 -GPI-Antikörper ELISA auch Antikörper mit einer niedrigen Affinität (De Laat et al. 2006). Möglicherweise ist aus diesen Gründen in unserem selektierten Patientinnenkollektiv das höchste Vorkommen von Antiphospholipid-Antikörper-Screening-Parametern bei β_2 -GPI-Antikörpern IgG. Dieser Parameter war bei 106 von 1.368 (7,7 %) Patientinnen erhöht. Der Erfolg der Möglichkeit der Bestimmung des β_2 -GPI-Antikörper verbessert trotz alledem die Spezifität und die Angabe, ob ein erhöhtes Thromboserisiko vorliegt oder nicht (De Laat et al. 2006).

Im prospektiven Teil der Studie wird sich genau mit diesen Problemen, also der Standardisierung, der Vergleich von Ergebnissen von unterschiedlichen Geräten, den Geräten an sich und der Beurteilung von *cut-off*-Werten befasst.

Ziel des retrospektiven Teils der Studie war es zum einen die Prävalenz von Thromboseindikatoren darzustellen und zum anderen die Verteilung und Häufigkeit der Antiphospholipid-Antikörper in Zusammenhang mit einem Thrombophiliescreening zu erfassen. Dies wurde aus Daten des Zuweiserlabors AescuLabor durchgeführt.

4.1.2 Antiphospholipid-Antikörper

Antiphospholipid-Antikörper stellen ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Thrombose dar. Das Risiko ist je nach Literaturquelle um 2,3 bis 8,5 erhöht (Kearon et al. 1999, Rance et al. 1997). Die Inzidenz in der Normalbevölkerung für Cardiolipin-Antikörper liegt bei ca. 2 % und für Lupus-Antikoagulans bei 0,3 bis 5 % (Heilmann und Rath 2002). In unserem selektierten Patientinnenkollektiv wurde Lupus-Antikoagulans bei 2,6 % durch den LAC-Screen-Test und

bei 2,3 % durch die MixConLA nachgewiesen. Cardiolipin-Antikörper IgG konnten bei 1,7 % und Cardiolipin-Antikörper IgM bei 1,5 % der 1.368 Patientinnen nachgewiesen werden. Jedoch handelt es sich bei unserem Kollektiv um ein selektiertes Kollektiv mit einem Verdacht auf ein erhöhtes Thromboserisiko.

Je nach Autor gibt es verschiedene Vermutungen, wie die Antiphospholipid-Antikörper Thrombosen verursachen. Salmink et al. gehen davon aus, dass die Antikörper negativ geladene Oberflächenstrukturen binden, die erst durch eine Endothelverletzung oder durch Induktion eines Mechanismus, genannt Flip-Flop, bei der ein Teil der Innenfläche des Endothels als Außenfläche exponiert wird, freigelegt wird. Dieser Mechanismus wird vor allem durch die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten über den Kollagenrezeptor an vWF und freigelegtes Kollagen durch Endothelverletzungen gefördert. Im nächsten Schritt wird Phosphatidylserin an der Thrombozytenoberfläche freigesetzt und wirkt als Prokoagulant. Es werden *tissue factor* und weitere Gerinnungsfaktoren aus der Zirkulation gebunden und Thrombin an der Thrombozytenoberfläche generiert. Hierdurch kommt es zur Thrombozytenfreisetzung und zur Bildung eines konsekutiven Thrombus (Salemink et al. 2000).

Ein Antikörper kann erst krankheitserzeugend wirken, wenn er seine passenden Antigene, die ihm präsentiert werden, bindet. In diesem Fall sind die Antigene negativ geladene Phospholipide. Es werden zwei Mechanismen vermutet, wie die Antikörper die Entstehung von Thrombosen auslösen. Die Antikörper sollen die phospholipidabhängige Gerinnungshemmung und den Protein C-Pathway beeinflussen (Galli et al. 1998). Das Lupus-Antikoagulant verursacht dabei eine erworbene APC-Resistenz. Hinzufügend wird der *tissue factor pathway inhibitor* in seiner Funktion beeinträchtigt, da er auch an negativ geladenen Oberflächen und an den phospholipid-abhängigen Faktor Xa bindet. Dadurch wird vermehrt Thrombin generiert (Galli et al. 1998).

In Metaanalysen, Fall-Kontroll-Kohortenstudien und prospektiven Studien wurden die prädiktiven Werte der verschiedenen Antikörper gegenübergestellt und es wurde gezeigt, dass die Antikörper, die eine Lupus-Antikoagulant-Aktivität hervorrufen, mit thrombotischen Ereignissen korrelieren (Ginsberg et al. 1995, Kearon et al. 1999, Urbanus et al. 2009, Wahl et al. 1998).

Die β_2 -GPI-Antikörper stellen eine heterogene Gruppe von Antikörpern dar. Manche binden an allen fünf Domänen des β_2 -GPI und andere nur an eine Domäne. Andere wiederum binden an mehreren Bindungsstellen. Die Antikörper, die an das Epitop um die Aminosäure Arginin 39 und Arginin 43 an Domäne I des β_2 -GPI bindet, wiesen am ehesten einen Zusammenhang mit einer klinischen Manifestation des Antiphospholipid-Syndroms auf (De Laat

et al. 2005, Ioannou et al. 2007). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Antikörper, die nur auf der Domäne I binden mehr Relevanz haben als die, die gegen alle Domänen des β_2 -GPI gerichtet sind (Van Os et al. 2010).

Patienten, die nicht nur positiv für Lupus-Antikoagulans sind, sondern zusätzlich positive Werte für β_2 -GPI-Antikörper zeigen, weisen ein erhöhtes Risiko für wiederkehrende Thrombosen auf als Patienten, bei denen nur einen Antikörper nachweisbar ist. Der genaue Mechanismus ist noch nicht belegt (Pengo et al. 2010). Es ist jedoch bekannt, dass die Lupus-Antikoagulans-Aktivität nicht nur auf Antikörpern gegen β_2 -GPI sondern auch gegen Prothrombin zurückzuführen ist (Simmelink et al. 2003). Nach Miyakis et al. stellen Prothrombin-Antikörper passive Zusatzfaktoren im Antiphospholipid-Syndrom dar (Miyakis et al. 2006). Oku et al. verneinen dies jedoch (Oku et al. 2008). Schlussendlich zeigt die Kombination zwischen Lupus-Antikoagulans und den β_2 -GPI-Antikörpern der Subgruppe, die die Lupus-Antikoagulans-Aktivität induzieren, einen engen Zusammenhang mit einem erhöhten Thromboembolierisiko. Diese Subgruppe wird für die Pathophysiologie des Antiphospholipid-Syndroms verantwortlich gemacht (Van Os et al. 2010).

Pathophysiologisch weiß man, dass die β_2 -GPI-Antikörper gegen anionische Strukturen gerichtet sind und nicht, wie bisher angenommen, direkt gegen anionische Phospholipide (Oku et al. 2008). Die Antikörper rufen eine *gain-of-function*-Reaktion hervor. Das bedeutet ein Gen gewinnt an Aktivität, in der Funktion des β_2 -GPI ist dies für das gesteigerte Thrombose-Risiko verantwortlich (Van Os et al. 2010).

Es wird davon ausgegangen, dass Risikofaktoren, die die Koagulation beeinflussen, das Risiko für venöse Thrombosen steigern und die Faktoren, die auf Thrombozyten einwirken, für arterielle Thrombosen verantwortlich sind. Bei den β_2 -GPI-Antikörpern kann man noch nicht sagen, ob es sich um einen oder zwei Prozesse handelt. Es wurde dargestellt, dass β_2 -GPI-Antikörper, die in einem Komplex vorliegen, an verschiedenen Zellen binden und diese ebenfalls aktivieren können. Diese These unterstützt die Behauptung, dass Thrombosen und Schwangerschaftskomplikationen (unerklärlicher intrauteriner Fruchttod vor der 10. Schwangerschaftswoche mit sonst normalem Fötus, Frühgeburt vor der 34. Schwangerschaftswoche durch eine Präeklampsie, Eklampsie oder einer Plazentainsuffizienz oder drei oder mehr aufeinanderfolgende spontane Aborte vor der 10. Schwangerschaftswoche) auf einer Dysregulation verschiedener Zellen, die im Großteil an der Hämostase beteiligt sind, beruhen (Palomo et al. 2009).

Shi et al. konnten zeigen, dass β_2 -GPI-Antikörper den inhibierenden Effekt von β_2 -GPI auf Faktor Xa an den aktivierten Thrombozyten blockieren (Shi et al. 1993). Der antikoagulatori-

sche Effekt von β_2 -GPI ist jedoch nicht sicher *in vivo* nachgewiesen. Die Bindung von β_2 -GPI an negativ geladenen Phospholipiden wird durch die Anwesenheit von β_2 -GPI-Antikörpern um den Faktor 100 gesteigert. Dieser Anstieg der Bindungsfähigkeit könnte die physiologische Funktion von β_2 -GPI verändern oder könnte die Bindung von anderen Phospholipid-bindenden Proteinen inhibieren (Takeya et al. 1997). Desweiteren wird behauptet, dass β_2 -GPI-Antikörper sowohl die Protein C-Aktivierung als auch das aktivierte Protein C hemmen, dies aber nur in der Anwesenheit von β_2 -GPI. Durch diese Hemmung wird eine Blutgerinnung gefördert (Ieko et al. 1999).

Weitere Daten belegen, dass Antiphospholipid-Antikörper die Expression des *tissue factor* hochregulieren. Der *tissue factor* geht einen Komplex mit Faktor VIIIa ein und aktiviert die Faktoren IX und X, wodurch die Blutgerinnung gesteigert wird (Boles und Mackman 2010).

Nach wie vor ist das Wissen über die Antiphospholipid-Antikörper nicht ausreichend, um eine standardisierte Labordiagnostik und Therapie des Antiphospholipid-Syndroms zu stellen. In weiteren Studien sollte auf die molekulare Struktur der Antikörper vor allem des β_2 -GPI eingegangen werden, um mit diesem Wissen einen Goldstandard für Labordiagnostik zu entwickeln (Van Os et al. 2010).

Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Antiphospholipid-Antikörper-Parameter unserer Studie. Es wird deutlich, dass viele Werte negativ sind. Außerdem liegt keine eindeutige Diskriminierung zwischen positiven und negativen Werten vor. Die geringe Diskriminierung spiegelt die schwierige Wahl eines sinnvollen *cut-off*-Wertes wieder.

Patienten, die sowohl arterielle als auch venöse spontane Thrombosen erlitten haben sollten, vor allem dann, wenn die Thrombosen an ungewöhnlichen Lokalisationen zu finden sind, auf Antiphospholipid-Antikörper gescreent werden. Dies gilt besonders für Menschen jüngerer Alters mit arteriellen Gefäßverschlüssen ohne Hinweise auf eine Arteriosklerose. Hinzufügend sollten Frauen untersucht werden, die einen Frühabort oder andere Schwangerschaftskomplikationen hatten (Bergmann und Hempel 2008).

4.1.3 Therapie

Schwangerschaften von Frauen mit einer Anamnese von habituellen Aborten im Zusammenhang mit positiven Testungen auf Antiphospholipid-Antikörpern haben ohne eine Therapie keine gute Prognose für den Ausgang der Schwangerschaft. In Studien wurde gezeigt, dass ohne eine Therapie bei Frauen mit wiederholten Aborten und vorliegen positiver Antiphospholipid-Antikörper-Testungen die Abortrate bei 90 % lag (Branch et al. 1992, Rai et al. 1995). Eine Kontrollgruppe mit wiederholten Aborten und negativ getesteten Antiphospholi-

pid-Antikörpern wiesen eine Lebendgeburtenrate von 66 % auf (Regan und Rai 2002). Bei unbehandelten Frauen mit positiv getestetem Lupus-Antikoagulans konnte eine erfolgreiche Schwangerschaft mit einem gesunden, reifen Neugeborenen nur in 15 % der Fälle aufgewiesen werden (Blumenfeld et al. 1991).

Diese dargelegten Studien, sollen verdeutlichen wie wichtig die richtige Therapie für den Ausgang einer Schwangerschaft für eine Frau mit Antiphospholipid-Syndrom ist. Jedoch ist die Therapie nicht eindeutig festgelegt. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Therapieverfahren diskutiert.

4.1.3.1 Antikoagulation: Dauer und Intensität

Nach dem *American Collage of Chest Physicians* sollte bei Patienten mit einem Antiphospholipid-Syndrom mit Zustand nach venösem Gefäßverschluss mit einer Heparintherapie begonnen werden, die folgend auf eine Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten umgestellt wird. Dabei wird eine niedrig dosierte Therapie mit einem Ziel-INR <3 von einer hoch dosierten Therapie mit einem Ziel-INR von >3 unterschieden. Dabei wird der Zielwert des INR für die Therapie des Antiphospholipid-Syndroms heftig diskutiert (Khamatshta et al. 1995). Khamatshta et al. empfehlen einen INR von 3,0 oder höher, um eine stärkere Intensität zu erreichen und somit das Risiko für ein erneutes thrombotisches Ereignis zu reduzieren (Khamatshta et al. 1995). Eine weitere Quelle empfiehlt einen Ziel-INR von 2,0-3,0 für Patienten mit einem Antiphospholipid-Syndrom nach erstem thrombotischem Ereignis und einen Ziel-INR von $\geq 3,0$ bei wiederkehrenden Thrombosen (Ruiz-Irastorza et al. 2007). Mittels verschiedener Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Ziel-INR von 3,0-4,0 eine höhere Rezidivrate an Gefäßverschlüssen als mit einem niedrigeren Ziel-INR von 2,0-3,0 hat (Crowther et al. 1995, Finazzi et al. 2005). Dieses Ergebnis wurde bereits bestätigt und hinzufügend aufgeführt, dass ein höherer INR-Wert die Blutungskomplikationen von 14,6 % auf 27,8 % (Hazard ratio 2,18; 95% Konfidenzintervall 0,9-5,15) ansteigen lässt (Finazzi et al. 2005). Die hier genannten Studien beziehen sich sowohl auf venöse als auch auf arterielle Thrombosen. Es ist unbekannt, ob andere große Studien diese Gruppen trennen oder nicht.

Wichtig bei der Vitamin K-Antagonisten-Gabe ist, dass bei Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom der INR nicht aussagekräftig ist. Bei 6,5 % bis 10 % der Patienten mit Lupus-Antikoagulans oder Antiphospholipid-Antikörpern ist die Prothrombinzeit verlängert. Dadurch ist der INR-Wert nicht zu beurteilen (Moll und Ortel 1997, Rosborough und Shepherd 2004). Aus diesem Grund sollte ein Wert zur Überprüfung genommen werden, der nicht von Antiphospholipid-Antikörpern beeinflusst wird, z. B. die Faktor II-Aktivität. Nachdem ein Patient mit Vitamin K-Antagonisten auf einen stabilen INR von 2,0-3,0 eingestellt wurde, sollte in den

fortlaufenden Kontrollen zusätzlich zum INR die Faktor II-Aktivität bestimmt werden, um eine genauere und zuverlässigere Aussage treffen zu können (Kasthuri und Roubey 2007).

Auch die Dauer der Antikoagulation ist noch nicht eindeutig geklärt. Das Risiko, ein weiteres thrombotisches Ereignis zu erleiden, ist mit 10-29 % pro Jahr hoch (Galli und Barbui 2003). Eine weitere Studie fand heraus, dass das Risiko einer erneuten Thrombose nach Absetzen der Antikoagulation innerhalb der folgenden 2 Jahren 50 % und innerhalb der folgenden 8 Jahren sogar 78 % beträgt (Derksen et al. 1993). Fest steht, dass eine langfristige orale Antikoagulation in Form von Vitamin K-Antagonisten nötig ist. Auch bei persistierendem Lupus-Antikoagulans nach dem thrombotischen Ereignis ist dies indiziert, da es mit einer hohen Rezidivrate von Thrombosen belegt ist. Bei arteriellen Ereignissen ist eine prophylaktische Gabe mit Thrombozytenfunktionshemmern, wie Acetylsalicylsäure, empfehlenswert, um das Rezidivrisiko zu senken (Levine et al. 2004). Andere Meinungen besagen, dass eine Primärprophylaxe bei Patienten mit lediglich positivem Nachweis auf Lupus-Antikoagulans oder Cardiolipin-Antikörpern und keinen bisherigen thrombotischen Ereignissen nicht anzuraten ist. Dies bestätigt eine Studie, die keinen signifikanten Unterschied zum Placebo gegenüber einer Primärprophylaxe mit Acetylsalicylsäure zeigt (Erkan et al. 2007).

Für die Behandlung und Prophylaxe von Schwangerschaftskomplikationen bei Frauen mit einem Antiphospholipid-Syndrom muss man die Patientinnen mit alleinigem Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern von denen mit Schwangerschaftskomplikationen unterscheiden. Denjenigen ohne Komplikationen, die nur positiv in der Testung auf Antikörper auffallend wurden, wird keine Primärprophylaxe empfohlen. Es hat sich gezeigt, dass die prophylaktische Gabe von Acetylsalicylsäure in niedriger Dosierung keinen Einfluss auf die Komplikationsrate hat (Cowchock und Reese 1997).

In verschiedensten Studien wurde dargelegt, dass die Gabe von intravenösem IgG als auch die Gabe von Prednisolon keinen Erfolg hat. Ergänzend ist in vielen Studien (Laskin et al. 1997, Cowchock et al. 1992, Silver et al. 1993) beschrieben geworden, dass eine Behandlung mit Prednisolon mit einer signifikant höheren mütterlichen Morbidität und frühzeitigen Entbindungen, die häufig mit frühzeitigen Rupturen von Membranen und Präeklampsie einher gingen, verbunden ist (Derksen et al. 2004).

Allerdings hat sich eine Prophylaxe bestehend aus Acetylsalicylsäure (75-100 mg/d) - beginnend präkonzeptionell bis zur 34./36. SSW in Kombination mit der Gabe von niedermolekularem Heparin ein- bis zweimal täglich von Beginn der Schwangerschaft bis zur Entbindung - als effektiv gezeigt (Farquharson et al. 2002, Rai et al. 1997). Aber auch diese sich als effektiv erwiesene Methode ist weiter in Diskussion.

Ob Heparin zweimal oder einmal täglich gegeben werden sollte, ist u. a. abhängig von der Anamnese der Patientin, aber auch nicht abschließend geklärt. Eine Heparinprophylaxe im Wochenbett von Frauen mit APS assoziierten Schwangerschaftskomplikationen ist umstritten. Im Falle einer Heparinisierung wird eine Prophylaxe von sechs Wochen postpartal vorgeschlagen (Ruiz-Irastorza und Kamashta 2008).

Wenn eine Patientin bereits ein thrombotisches Ereignis erlitten hat und unter oraler Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten steht, sollte sie auf Heparin umgestellt werden, bevor eine Konzeption stattfindet oder spätestens aber nach Ausbleiben der Regelblutung. Diese Maßnahme ist erforderlich, da Vitamin K-Antagonisten die Plazentaschranke passieren und somit teratogen zwischen der 6. und 12. SSW wirken und intrakranielle Blutungen im Fetus hervorrufen können (Ginsberg et al. 2001).

4.1.3.2 Prophylaxe mit Acetylsalicylsäure in der Schwangerschaft

Acetylsalicylsäure kann nach heutigem Wissensstand bei einer entsprechenden Indikation in einer *low-dose*- (75-100 mg pro Tag) Behandlung in der Schwangerschaft eingesetzt werden (Schaefer und Spielmann 2001). In einer kleinen Fall-Kontrollstudie wurden, nachdem bei Tieren in hoher Dosis Acetylsalicylsäure verabreicht und Fehlbildungen erzeugt worden waren, auch beim Menschen teratogene Effekte, z. B. ein erhöhtes Gastroschisis-Risiko, entdeckt (Martinez-Frias et al. 1997). In anderen Studien konnte kein teratogener Effekt beim Menschen nachgewiesen werden (Slone et al. 1976). In einer hohen Dosierung von Acetylsalicylsäure kann es ab der 28. – 30. Schwangerschaftswoche durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese zu einem frühzeitigen Verschluss des Ductus arteriosus Botalli kommen. Dies geschieht jedoch nicht unter einer *low-dose* Therapie. Unter einer *low-dose* Therapie werden nach aktueller Einschätzung weder die Gesundheit der Mutter noch die fetale oder neonatale Gerinnung beeinträchtigt (Group 1994, Schaefer und Spielmann 2001, Vetter 1995).

In zwei Studien (Farquharson et al. 2002, Pattison et al. 2000) wurde eine hohe Rate von lebenden Geburten bei Frauen mit wiederholten Aborten unter einer Monotherapie mit Acetylsalicylsäure beobachtet. In anderen Studien (Rai et al. 1997, Kutteh 1996) wiederum wurden niedrige Raten erfasst. Eine Arbeitsgruppe vermutet, dass die Ergebnisse der Lebendgeburten mit einem Placeboeffekt belegt sind und der Wert der Gabe von Acetylsalicylsäure fraglich ist. Vielmehr wird das gute Ergebnis der unterstützenden Pflege der Schwangeren und einer Schwangerschaftsvorsorge in kürzeren Abständen als die gesetzlich vorgeschriebene zugerechnet, da auch unter Placebogabe mehr Lebendgeburten als ohne Medikamentengabe aufgezeichnet wurden (Pattison et al. 2000).

In einer Studie, die sich mit Frauen mit positiven Antiphospholipid-Antikörper-Testen und niedrigem Risiko für Schwangerschaftskomplikationen beschäftigt hat, hat sich kein Unterschied zwischen den Frauen, die mit *low-dose* Acetylsalicylsäure oder mit einem Placebo behandelt wurden, gezeigt (Cowchock und Reese 1997).

Derzeit verspricht man sich nur durch die kombinierte Therapie von niedermolekularem Heparin und Acetylsalicylsäure in der Schwangerschaft eine Effektivität (Rai 2000).

4.1.3.3 Prophylaxe mit Heparin in der Schwangerschaft

Oft wird niedermolekulares Heparin dem unfraktionierten Heparin vorgezogen. Es hat den Vorteil, dass es eine längere Halbwertszeit im Plasma und eine bessere Dosissteuerbarkeit hat. Hinzufügend überquert es die Plazentaschranke nicht und ist für eine einmal tägliche Gabe geeignet. Außerdem erzeugt das niedermolekulare Heparin weniger häufiger eine HIT und Heparin induzierte Osteoporosen. Trotzdem sollte bei längerfristiger Gabe von niedermolekularem Heparin eine Osteoporoseprophylaxe in Form von Vitamin D und Calcium verabreicht werden. Der Nachteil des niedermolekularen Heparins ist, dass die Behandlung teurer ist, als die Behandlung mit unfraktioniertem Heparin (Derksen et al. 2004, Ginsberg et al. 2001). Im Tierexperiment konnten Auswirkungen auf die fetale Gerinnung festgestellt werden, obwohl niedermolekulares Heparin die menschliche Placenta nicht oder kaum überschreitet (Greer 1999, Sanson et al. 1999). Es konnte aber nachgewiesen werden, dass Heparin beim Menschen nicht embryo- oder fetotoxisch wirkt (Ginsberg et al. 2001). Für den Feten oder Embryo konnte in Studien mit über 300 Schwangeren gezeigt werden, dass niedermolekulares Heparin sowie unfraktioniertes Heparin keine spezifischen entwicklungstoxischen Wirkungen hat oder schlechter für ihn verträglich ist als unfraktioniertes Heparin (Bar et al. 2000).

Im weitem Textverlauf wird sich nur noch auf das niedermolekulare Heparin bezogen. Neben Osteoporose können bei den Patientinnen weitere Nebenwirkungen auftreten. Hierunter zählen durch Heparin induzierte Blutungen und Heparin-induzierte Immunreaktionen (Deruelle und Coulon 2007). Größere Blutungen in der Schwangerschaft unter niedermolekularem Heparin liegen bei einer Rate von ca. 2 % (Greer und Nelson-Piercy 2005, Lindqvist und Dahlback 2000). Es sollte eine genaue Geburtsplanung stattfinden. Für die Geburt ist es indiziert Heparin abzusetzen. Dadurch können Blutungen unter der Geburt reduziert werden und es besteht die Möglichkeit einer regionalen Anästhesie (Deruelle und Coulon 2007). Ungeklärt ist wie viele Stunden vor der Geburt Heparin abgesetzt werden soll. Zurzeit wird ein Absetzen der Heparintherapie 24 Stunden vor Beginn der Geburt und eine Wiederaufnahme 12 Stunden nach einer unkomplizierten Geburt empfohlen. Dies kann durch die Studie von

Kominiarek et al. belegt werden. In dieser Studie wurden Blutungskomplikationen unter der Geburt von Patientinnen, die wie empfohlen mit Heparin behandelt wurden, und Frauen mit einer physiologischen Geburt verglichen. Es zeigt sich kein Anstieg von Blutungskomplikationen unter der Heparintherapie (Kominiarek et al. 2007). Eine andere Studie zeigte, dass es genauso sicher sei, die Heparintherapie zwischen 12 und 24 Stunden als 24 Stunden vor Beginn der Geburt abzusetzen (Maslovitz et al. 2005).

Unter die Heparin-induzierten Immunreaktionen zählen die HIT und allergische Hautreaktionen. Wie erwähnt löst das niedermolekulare Heparin seltener eine HIT aus als das unfraktionierte Heparin (Warkentin et al. 1995). Beobachtet wurde eine generelle Verminderung von Auftreten der HIT während einer Schwangerschaft, wodurch die Angaben kritisch zu beurteilen sind (Fausett et al. 2001). Es gibt wenige aussagekräftige Studien, die eine genaue Inzidenz der HIT in der Schwangerschaft angeben. Es wird eine Inzidenz unter 1 % vermutet (Deruelle und Coulon 2007). Allergische Hautreaktionen kommen mit einer Inzidenz von ca. 2 % vor und müssen von Reaktionen, die durch den Einstich beim Spritzen entstehen können, unterschieden werden (Brenner et al. 2005a). Bei 30 % der Patientinnen mit einer allergischen Hautreaktion zeigt sich diese in Form von Blutergussbildung, brennendem Hautgefühl und subkutanen Zysten (Deruelle et al. 2006).

All diese Nebenwirkungen zeigen sich selten und eine Therapie mit niedermolekularem Heparin ist anzuraten, da es nachweislich die Schwangerschaftsrate steigert und vor allem bei Patientinnen mit wiederholten Aborten, intrauteriner Wachstumsretardierung, gehäufter Präeklampsie und Todgeburt die Lebendgeburtenrate steigert (Brenner et al. 2000, Grandone et al. 2002).

Ein weiterer strittiger Punkt ist die Dosierung des Heparins. In einer größeren Studie konnte dargelegt werden, dass es wenig Unterschied macht, ob man eine Patientin mit 40 mg oder 80 mg Enoxaparin pro Tag behandelt. In keiner der beiden Gruppen (40 mg bzw. 80 mg) kam es zu Blutungen oder HIT. Da die Effizienz von Heparin in beiden Dosierungen gegeben ist, wird von einer Dosis von 40 mg pro Tag ausgegangen, um eine Schwangerschaftsrate bei Frauen mit wiederholtem Abort und Thrombophilie zu steigern (Brenner et al. 2005a). Für die Zukunft sollte die Effizienz und Sicherheit von Heparin in Bezug auf das Gewicht der Mutter erforscht werden, ebenso wie die Dauer der Behandlung und die genaue Dosierung des niedermolekularen Heparins.

Derzeit gilt Heparin, insbesondere niedermolekulares Heparin, neben Acetylsalicylsäure *low-dose* aus toxikologischer Sicht auf den Embryo bzw. Fötus als Mittel der Wahl in der Schwangerschaft zur Prophylaxe von Thromboembolien und zur gerinnungshemmenden

Langzeittherapie bei Thrombophilie, Antiphospholipid-Syndrom und systemischen Lupus erythematoses (Schaefer und Spielmann 2001).

4.1.3.4 Prophylaxe mit Heparin und Acetylsalicylsäure in der Schwangerschaft

In Studien, die die Gabe von einer Kombination von Acetylsalicylsäure und Heparin mit der Gabe von Acetylsalicylsäure als Monotherapie verglichen haben, ist herausgefunden worden, dass eine kombinierte Therapie mehr Lebendgeburten fördert (Derksen et al. 2004). Zwei prospektive randomisierte Studien belegen dies. Sie fanden heraus, dass die Kombination zwischen unfraktioniertem Heparin mit Acetylsalicylsäure besser ist als Acetylsalicylsäure alleine, da die Schwangerschaftsrate bei einer Kombinationstherapie 71-80% im Gegenteil zur Monotherapie mit nur 42-50% betrug (Rai et al. 1997, Kutteh 1996). Eine weitere Quelle berichtet, dass ein Unterschied zwischen *low-dose* Acetylsalicylsäure allein versus Acetylsalicylsäure kombiniert mit Dalteparin besteht, da die Lebendgeburtenrate sich von 72% versus 78% steigert (Farquharson et al. 2002). Rai et al. berichten jedoch, dass in der Studie von Farquharson et al. die Laborkriterien der Diagnostik des Antiphospholipid-Syndroms nicht beachtet worden seien und somit seine Studie keine Aussagekraft verliehen werden könne (Rai und Regan 2002). Es zeigte sich kein Unterschied in der Kombination *low-dose* Acetylsalicylsäure mit *high-* oder *low-dose* unfraktioniertem Heparin (Kutteh und Ermel 1996). Ob unfraktioniertes oder niedrigmolekulares Heparin in Kombination mit Acetylsalicylsäure verwendet werden soll, ist noch nicht entschieden. Empson et al. empfehlen eine Gabe von unfraktioniertem Heparin, aber dies beruht auf nicht signifikanten Werten (Empson et al. 2005). Zwei kleinere Studien fanden in der Kombination mit Acetylsalicylsäure keinen Unterschied zwischen niedrigmolekularem Heparin und unfraktioniertem Heparin (Nobel et al. 2005, Stephenson et al. 2004).

Es wurde herausgefunden, dass der Vorteil der Kombinationstherapie nur in den ersten 13 Gestationswochen vorhält, da in dieser Zeit die erste Phase der Trophoblasteninvasion beendet wird und die Plazenta besteht. Es wird vermutet, dass Heparin die Trophoblastenzellen vor einem Kontakt mit den Antiphospholipid-Antikörpern schützt (Rai et al. 1997).

4.1.4 Zusammenschau Teil 1

In diesem Teil der Studie wurden Datensätze von einem weiblichen Kollektiv, welches unter Verdacht auf Thrombophilie stand, bzw. bei dem eine positive Eigen- und/oder Familienanamnese vorlag, untersucht, um Patientinnen mit Thromboseneigung herauszufiltern. Bei jeder Patientin lag ein laboranalytisches Thrombophilie-Screening vor, welches retrospektiv ausgewertet wurde. Insgesamt lagen vollständige Datensätze dieses Screenings, gemäß den Vorgaben des Material und Methoden-Teils, bei 1.368 Patientinnen vor. Im Vergleich mit anderen Studien, einschließlich Studien, die Patientinnen aus speziellen hämostaseologi-

schen Kliniken oder Zentren untersuchten, lag bislang keine Publikation mit einem vergleichbar großen Datensatz vor.

Ein Protein C-Mangel fand sich in unserem Kollektiv bei 7,68 %, ein Protein S-Mangel bei 8 % und ein Antithrombin-Mangel bei 5,1 %. In einer Studie von Dulícuek et al. wurden ebenfalls Frauen (n = 200), die mindestens eine venöse Thrombose erlitten hatten und unter 45 Jahre alt waren, auf Thrombophilie untersucht (Dulícuek et al. 2002). Hier fand sich ein Protein C-Mangel bei 4 %, ein Protein S-Mangel bei 12 % und ein Antithrombin-Mangel bei 3 % der Patientinnen. Diese Unterschiede im Vergleich zu unseren Untersuchungen können darauf beruhen, dass Dulícuek et al. das Kollektiv im Alter nach oben hin einschränkte und das Kollektiv aus einer eingegrenzten Region (Ost-Böhmen) stammte. Wir schränkten das Alter nach oben hin nicht ein und untersuchten ein Kollektiv, das aus ganz Deutschland stammte. Desweiteren lag bei allen Patientinnen von Dulícuek et al. ein gesichertes thrombotisches Ereignis vor, das wir nicht vorweisen können, sondern in Teilen vermuten können. Santamaria et al. untersuchten ein Kollektiv von 325 Frauen mit einer positiven Familienanamnese (ein oder mehrere positiv getestete Thrombophilie-Parametern bei mindestens zwei Verwandten mit oder ohne thrombotisches Ereignis). Bei den 325 Frauen trat ein Protein C-Mangel bei 10,5 %, ein Protein S-Mangel bei 9,2 % und ein Antithrombin-Mangel bei 1,8 % auf (Santamaría et al. 2001). Santamaria et al. beschränkten ebenfalls ihr Kollektiv auf eine Region, da sie die Frauen von Familienangehörigen rekrutierten, die in der „Thrombose Unit“ in Barcelona in Behandlung waren, wodurch sich Unterschiede in den Prävalenzen ergeben können. Auch hinsichtlich der Altersverteilung gab es in der Studie von Santamaria et al. Einschränkungen. Sie wählten nur Frauen im Alter zwischen 15 und 49 Jahre aus. In unserer Studie sind alle Patientinnen eingeschlossen worden, die 18 Jahre und älter waren. Baglin et al. untersuchten in ihrer Studie in Cambridge unter anderem Frauen, die eine schwangerschafts-assoziierte Thrombose, inklusive der Zeit zwei Monate nach der Geburt des Kindes, erlitten hatten. Unter diesen 11 Frauen fand sich kein Protein C-, Protein S- oder Antithrombin-Mangel (Baglin et al. 2003). Möglicherweise ist ihr Kollektiv, im Vergleich zu unserem Kollektiv mit 1.368 Patientinnen, für eine objektive Aussage zu klein gewählt. Durch verschiedene ethnische Herkunft unterscheiden sich die Prävalenzen thrombophiler Parameter, was einen weiteren Grund unterschiedlicher Ergebnisse zwischen verschiedenen Studien darstellen kann (White und Keenan 2009). Einschränkend muss angemerkt werden, dass auch präanalytische Einflüsse zu Unterschieden der Ergebnisse führen können (Bonini et al. 2002, Crim und Okorodudu 2007). So können wir zumindest für unsere Untersuchungen nicht vollständig ausschließen, dass transport- bzw. zeitbedingte Faktoren zu einer partiellen Beeinträchtigung der Proben geführt haben können.

Unter den molekulargenetischen Markern zeigte sich in unserem Kollektiv ein Auftreten der heterozygoten Faktor V-Mutation mit 5 %, eine homozygote Faktor V-Mutation mit 0,07 %, eine heterozygote Faktor II-Mutation mit 11,2 % und eine homozygote Faktor II-Mutation mit 0,2 %. Im weiblichen Kollektiv von Dulícuek et al. trat eine Faktor V-Mutation bei 40 % der Patientinnen und eine Faktor II-Mutation bei 4 % auf. Die Gruppe unterscheidet nicht in hetero- und homozygote Mutationen. Christiansen et al. fanden ebenfalls in einem weiblichen Kollektiv (n = 272) eine Faktor V-Mutation bei 19 % und eine Faktor II-Mutation bei 6 % (Christiansen et al. 2005 5). Das Kollektiv von Christiansen et al. stammte aus den Niederlanden und jede Patientin wies zumindest eine tiefe Beinvenenthrombose auf. Santamaria et al. analysierten 325 Frauen mit einer positiven Familienanamnese auf Thromboseneigung. Sie wiesen zu 8 % eine Faktor V-Mutation und zu 24 % eine Faktor II-Mutation nach (Santamaría et al. 2001). Mitic et al. untersuchten 202 Patientinnen aus Serbien mit erstmaliger venöser Thrombose, die in der Schwangerschaft oder im Kindbett stattgefunden hat. In deren Kollektiv trat eine Faktor V-Mutation bei 22,3 % und eine Faktor II-Mutation bei 10,4 % der Patientinnen auf (Mitic et al. 2011). Martinelli et al., die ebenfalls Frauen mit schwangerschafts-assoziierten Thrombosen untersuchten fanden vergleichbare Prävalenzen, wie Mitic et al. (Martinelli et al. 2002). Gerhard et al. jedoch wies in deren Kollektiv, das ebenfalls aus Frauen mit schwangerschafts-assoziierten Thrombosen bestand, höhere Prävalenzen als in der Studie von Mitic et al. auf. In ihrem Kollektiv zeigte sich eine Faktor V-Mutation bei 43,7 % und eine Faktor II-Mutation bei 16,9 % der Patientinnen (Gerhardt et al. 2000). Es zeigten sich, im Vergleich zwischen unserem Kollektiv und den Kollektiven der andern aufgezeigten Studien, die alle ausschließlich Frauen untersuchten, Unterschiede in den Prävalenzen. Diese könnten an einer abweichenden Selektion der Patientinnen und an einer divergierenden ethnischen Zusammensetzung der Kollektive liegen (White und Keenan 2009). Das Kollektiv von Mitic et al. lag beispielsweise in einem Altersabschnitt von 17 bis 42 Jahren, da sie sich nur auf schwangerschafts-assoziierte Thrombosen konzentrierten. Hierdurch können Abweichungen zu unserem Kollektiv, das alle Patientinnen ab einem Alter von 18 bis 43 Jahre in die Studie einschloss, entstanden sein.

Cardiolipin-Antikörper IgG fanden wir bei 1,7 %, Cardiolipin-Antikörper IgM bei 1,5 %, β_2 -GPI-Antikörper IgG bei 7,7 % und Lupus-Antikoagulans (LAC-Screen-Test) bei 2,6 % des Patientinnenkollektives. Dulícuek et al. fanden in deren weiblichem Kollektiv Cardiolipin-Antikörper bei 5 % (Dulícuek et al. 2002). Ogunyemi et al. untersuchten 30 schwangere Frauen mit einer venösen Thrombose oder einer Lungenembolie. Sie wiesen bei 20 % des Patientinnenkollektives Cardiolipin-Antikörper IgG, bei 10 % Cardiolipin-Antikörper IgM und bei 7 % Lupus Antikoagulans nach (Ogunyemi et al. 2003). Bergrem et al. fanden im Gegensatz zu Ogunyemi et al. niedrigere Prävalenzen der Antiphospholipid-Antikörper. Sie untersuchten ein Kollektiv, das aus 299 Frauen mit einer erstmaligen venösen schwangerschafts-

assoziierten Thrombose bestand, und wiesen bei 0,7 % des Kollektives Cardiolipin-Antikörper IgG, bei 1,7 % Cardiolipin-Antikörper IgM, bei 0,7 % β_2 -GPI-Antikörper IgG und bei 1,3 % Lupus-Antikoagulans nach (Bergrem et al. 2010). Diese Daten sind vergleichbar mit unseren Prävalenzen in einem weiblichen Kollektiv mit einem Verdacht auf Thromboseneigung. Die Schwankungen in den Prävalenzen von jeweils einem Kollektiv mit venösen Thrombosen bzw. in unserer Studien mit dem Verdacht auf eine Thromboseneigung stellen die Schwierigkeit dar, die Prävalenzen der Antiphospholipid-Antikörper verschiedener Studien zu vergleichen, da es keinen Goldstandard für deren Diagnostik gibt. So verwendet jedes Labor unterschiedliche Testsysteme mit unterschiedlichen *cut-off*-Werten. Diese Problematik wird im zweiten Teil der Studie behandelt. Zusätzlich unterscheiden sich die Prävalenzen der Antiphospholipid-Antikörper in verschiedenen ethnischen Populationen (Biggioggero und Meroni 2010).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieses Studienteils in einem selektierten Kollektiv das Vorliegen verschiedener Parameter, die mit einer Thromboseneigung assoziiert sein können. Diese Parameter fanden sich auch in anderen Studien wieder, die vergleichbare aber auch abweichende Ergebnisse zu unseren Ergebnissen aufwiesen. Die im ersten Teil unserer Studie erhobenen Daten dienten zusätzlich der Einschätzung der Prävalenzen der Antiphospholipid-Antikörper und als Vorbereitung des zweiten Teils, in dem auf die Diagnostik der Antiphospholipid-Antikörper bei Patientinnen mit stattgehabten Abort eingegangen wurde.

4.2 Teil 2 und 3: Proben aus Zuweiserkollektiv und Verumgruppe

Im zweiten Teil der Studie wurden verschiedene laboranalytische Verfahren zur Bestimmung von Cardiolipin- und β_2 -GPI-Antikörpern eingesetzt. Dazu wurden moderne vollautomatisierte Analysensysteme untereinander, mit einem semi-automatisierten Testverfahren und einem händischen Test mittels Proben von Patientinnen mit einem oder mehreren Aborten in der Anamnese verglichen. Als Kontrollgruppe wurden Proben von Patienten und Patientinnen mit systemischen Lupus erythematodes verwandt. Ziel dieses Teils der Studie war der Vergleich der Ergebnisse und Methoden. In Folge sollten hieraus Rückschlüsse auf die Interpretation labormedizinischer Daten für den klinischen Alltag abgeleitet werden.

Zunächst wird in der Diskussion auf die Thrombophilie-Parameter eingegangen, um auf pathologische Auffälligkeiten im Patientinnenkollektiv einzugehen.

4.2.1 Thrombophilie

Unser Patientinnenkollektiv im prospektiven Teil 2 der Studie besteht aus Patientinnen deren Blutproben entweder von niedergelassenen Gynäkologen in das AescuLabor der Abteilung für Hämostaseologie eingeschendet wurden oder von ambulanten Patientinnen des AescuLabor aus der Abteilung für Hämostaseologie. Alle Patientinnen hatten auf dem Überweisungsschein einen Hinweis auf einen Abort. Bei diesen selektierten Patientinnen hatten wir somit die Annahme einer Thrombophilie. Je nach Anforderung erfolgte ein vollständiges bzw. unvollständiges Thrombophilie-Screening vor. Insgesamt lag bei 94 von 162 Patientinnen ein vollständiges Thrombophilie-Screening vor, einschließlich Protein C, Protein S, Antithrombin, Faktor II- und Faktor V-Mutation.

4.2.1.1 Protein C-, Protein S- und Antithrombin-Mangel

In unserem Patientinnenkollektiv traten pathologische Protein C-Werte zu 10,7 % bei 122 vorliegenden Bestimmungen der 164 Patientinnen (n=122/164), pathologische Protein S-Werte zu 4,7 % (n=128/162) und pathologische Antithrombin-Werte zu 5,7 % (n=122/162) auf. Die Patientinnen wiesen alle mindestens einen Abort auf (n=162). Die Verteilung der Aborte ist in Kapitel 3.2.2 dargestellt. In einer Studie von Raziel et al., die ein Abortkollektiv im Vergleich mit einer Kontrollgruppe ohne Aborte untersuchten und im Abortkollektiv vermehrte thrombophile Auffälligkeiten fanden, zeigte sich ein Protein C-Mangel zu 5,5 % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 2,5 %, ein Protein S-Mangel zu 10 % gegenüber 2,5 % in der Kontrollgruppe und in beiden Gruppen kein Antithrombin-Mangel (Raziel et al. 2001). Unsere Studie zeigt im Vergleich zu Raziel et al. eine höhere Inzidenz des Protein C-

Mangels und des Antithrombin-Mangels, jedoch eine geringere Inzidenz eines Protein S-Mangels. Die Unterschiede können darauf beruhen, dass Raziel et al. ein kleineres Kollektiv untersuchten. In deren Abortkollektiv befanden sich 36 Patientinnen und in der Kontrollgruppe 40 Patientinnen. In unserer Studie hatten wir 122/162 Protein C-, 128/162 Protein S- und 122/162 Antithrombin-Bestimmungen, wodurch unsere Studie möglicherweise aussagekräftiger ist.

Einschränkend muss angemerkt werden, dass in dieser Studie keine direkte Kontrollgruppe im Sinne von Patientinnen ohne eine Anamnese eines Abortes herangezogen wurde. Dies begründete sich dadurch, dass wir vorrangig Methoden für die Analyse von Antiphospholipid-Antikörpern untersuchten und uns für ein selektiertes Kollektiv von Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses entschieden hatten. Bei diesen Patienten ist grundsätzlich von einer höheren Inzidenz von Antiphospholipid-Antikörpern auszugehen (Day et al. 1998, Hochberg 1997, Tan et al. 1982), so dass sie als „Positivkontrolle“ fungierte. Raziel et al. schränkte sein Kollektiv stark ein. In dem von ihm untersuchten Kollektiv hatten die Patientinnen zwischen 3 und 9 Aborte oder zwei Aborte, die von einer intrauterinen Wachstumsstörung oder einer Placenta-Ablösung gefolgt wurden. Desweiteren wurden die Patientinnen auf uterine Anomalien, metabolische und hormonelle Störungen, chromosomale Anomalien, Infektionen und Autoimmunerkrankungen untersucht und bei einem auffälligen Befund aus der Studie ausgeschlossen. Das Kontrollkollektiv bestand aus gesunden Frauen, die bereits eine bis vier erfolgreiche Schwangerschaften hatten und keinerlei thrombotisches Ereignis (Raziel et al. 2001). Im Gegensatz dazu lagen bei unserer Studie keine Ausschlusskriterien vor. Wir schlossen alle Patientinnen mit einem Hinweis auf Abort ein. Unsere Patientinnen wiesen zwischen einem und 10 Aborten auf. Desweiteren schlossen wir auch die Patientinnen ein, die klinische Auffälligkeiten hatten, da ein pathologischer Befund positive Antiphospholipid-Antikörper nicht ausschließt. Durch diese unterschiedliche Auswahl der Patientinnenkollektive können Unterschiede in den Ergebnissen erklärt werden. Unsere Studie als auch die Studie von Raziel et al. zeigt, dass in einem Kollektiv von Patientinnen, die vermehrt Aborte erlitten, häufiger ein Protein C-, Protein S- und Antithrombin-Mangel auftritt als in einer Kontrollgruppe. Auch in weiteren Studien wurde diese Feststellung gemacht (Adelberg und Kuller 2002). D'Uva et al. fanden von der Tendenz vergleichbare Ergebnisse zu unserer Studie (D'Uva et al. 2008). Sie untersuchten 250 ambulante Patientinnen, die auf Grund von wiederholten Aborten an ein Sterilitäts-Zentrum in Süditalien überwiesen wurden. Alle Patientinnen in der Studie hatten zwei oder mehrere Aborte im ersten Trimester oder ein oder mehrere Spätaborte. Sie mussten an weiteren Einschlusskriterien einen physiologischen Karyotyp als auch einen Uterus ohne Pathologien sowie eine physiologische Tubendurchgängigkeit aufweisen. Ausgeschlossen wurden Patientinnen mit Hypophysen-, Schilddrüsenunterfunktion, Hyperprolaktinämie, Lutealinsuffizienz, polyzystischem Ovar, einer entzündlichen oder infektiösen Erkrankung, Diabetes mellitus, Schwangerschaft, Übergewicht oder nur einem

Abort. Die Kontrollgruppe bestand bei D'Uva et al. aus 75 Frauen, die bereits eine oder mehrere erfolgreiche Schwangerschaften ohne Komplikationen (z. B. intrauterine Wachstumsstörung, Totgeburt oder Plazenta-Ablösung) hatten. Desweiteren durfte die Kontrollgruppe keine thrombotischen Ereignisse und diese auch nicht bei Verwandten ersten Grades vor dem 65. Lebensjahr vorweisen. D'Uva et al. fanden einen Protein C-Mangel bei 13 % im Kollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 2,6 % und einen Protein S-Mangel bei 1,7 % im Kollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 0 %. Ein Antithrombin-Mangel war in beiden Kollektiven nicht vorhanden. D'Uva et al. schließen sich der These von Sarig et al. an, dass die Inzidenz thrombophiler Parameter bei Frauen mit wiederholten Aborten erhöht sein könnte, sofern keine Ursachen wie z. B. endokrine Erkrankungen und uterine Anomalien vorliegen (Sarig et al. 2002a). Dieser These können wir uns nicht anschließen, da wir kein Ausschlusskriterium angewendet haben und trotzdem höhere Inzidenzen als D'Uva et al. fanden. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen als auch den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Studien fanden Gris et al. in ihrer Studie, dass ein Protein C-, Protein S- und ein Antithrombin-Mangel bei Frauen mit rezidivierenden Aborten nicht häufiger vorkam als in ihrer Kontrollgruppe. Sie untersuchten 500 Frauen mit ungeklärten rezidivierenden Aborten und verglichen die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe, die aus 100 gesunden Müttern und 50 kinderlosen Frauen bestand (Gris et al. 1997). Möglicherweise fanden sie keine erhöhte Inzidenz, da die Kontrollgruppe nicht allein aus gesunden Frauen, die bereits erfolgreiche Schwangerschaften hatten, bestand. Es besteht die Möglichkeit, dass kinderlose Frauen nicht schwanger geworden sind, da sie möglicherweise einen Protein C-, Protein S- oder Antithrombin-Mangel vorliegen hatten.

Nach Preston et al. scheint das Risiko für einen Abort durch einen Protein C- oder Protein S-Mangel nicht erhöht (OR 1,4 [95 % CI: 0,9-2,2] und 1,2 [95 % CI: 0,7-1,9]). Hingegen scheint das Risiko für eine Totgeburt moderat erhöht zu sein (Preston et al. 1996). Ergänzend entdeckten Preston et al., dass vor allem Patientinnen mit einem Antithrombin-Mangel ein erhöhtes Risiko für eine Totgeburt (OR 5,2 [95 % CI: 1,5-1,8]) bzw. einen Abort (OR 1,7 [95 % CI: 1,0-2,8]) haben (Preston et al. 1996). Sanson et al. fanden im Gegensatz dazu, dass Patientinnen mit einem Protein C-, Protein S- oder Antithrombin-Mangel einen zweifachen (95 % CI: 1,2-3,3; $p < 0,003$) Anstieg des Abortrisikos haben (Sanson et al. 1996). Jedoch gibt es unseres Wissens nach keine Studie darüber, die Patientinnen mit Antithrombin-Mangel und wiederholten Aborten untersucht. Dies erweist sich als schwierig, da die Prävalenz des Antithrombin-Mangels sehr niedrig ist (Adelberg und Kuller 2002).

4.2.1.2 Faktor II-Mutation

Die Faktor II-Mutation trat in unserem Kollektiv zu 5,2 % (n=97) auf. In allen Fällen handelt es sich um eine heterozygote Mutation. In anderen Studien, die Patientinnen mit wiederhol-

ten Aborten untersuchten, lag die Prävalenz einer Faktor II-Mutation bei 2 % bis 11 %, im Gegensatz zu unauffälligen Schwangerschaften mit 0,8 bis 2 % (Foka et al. 2000, Pihusch et al. 2001, Reznikoff-Etievant et al. 2001, Souza et al. 1999). Unser Kollektiv zeigt damit, wie die vorherigen Studien, eine erhöhte Prävalenz der Faktor II-Mutation bei Patientinnen mit einem oder mehreren stattgefundenen Aborten. Andere Autoren fanden jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Aborten und der Faktor II-Mutation (Brenner et al. 1999, Kutteh et al. 1999, Wramsby et al. 2000). Verdeutlicht wird dieser Zusammenhang in einer Metaanalyse von Krabbendam et al. Sie stellten 11 Studien einander gegenüber und fanden für die Faktor II-Mutation heraus, dass drei der Studien einen Zusammenhang zwischen Faktor II-Mutation und wiederholten Aborten zeigten, diese sich aber in den Ergebnissen unterscheiden (Krabbendam et al. 2005). Diese Unterschiede beruhen nach Krabbendam et al. auf den verschiedenen Studienpopulationen (Amerikaner versus Brasilianer versus Griechen), unterschiedlichen Kontrollgruppen und einer unterschiedlichen Definition eines wiederholten Abortes. Unterschiede der Ergebnisse der 11 untersuchten Studien liegen wahrscheinlich auch an einem abweichenden Studiendesign, an unterschiedlichen Studientypen oder an divergierenden Einschlusskriterien. Foka et al. untersuchte 80 griechische Frauen, die mindestens zwei oder mehr spontane Aborte erlitten hatten (Foka et al. 2000). Die Frauen wurden aus der universitären Frauenklinik rekrutiert. Sie wurden auf Autoantikörper, hormonelle Störungen, Gerinnungsstörungen, uterine Anomalien und Karyotyp-Abweichungen untersucht, aber bei Auffälligkeiten nicht ausgeschlossen. Keine Patientin hatte anamnestisch ein thrombotisches Ereignis. Diese Studie ist mit unserer vergleichbar, da wir ebenfalls keine Patientin auf Grund von pathologischen klinischen Veränderungen als auch Veränderungen im Gerinnungslabor ausgeschlossen haben. Jedoch weisen die Patientinnen von Foka et al. alle zwei oder mehr spontane Aborte auf. Unsere Patientinnen hatten teilweise auch einen Abort. Desweiteren weist die Studie von Foka et al. ein Kontrollkollektiv von 100 Frauen vor, die zumindest eine erfolgreiche Schwangerschaft durchliefen und keinen Abort hatten. Foka et al. fanden eine Prävalenz der Faktor II-Mutation bei 9 % ihrer Patientinnen im Vergleich zu 2 % in der Kontrollgruppe (OR 4,7 [95 % CI: 0,9 – 23]; p= 0,038) (Foka et al. 2000). Raziol et al. schlossen in ihr Patientinnenkollektiv Frauen ohne pathologische Auffälligkeiten (siehe 4.2.1.1) außer ungeklärten habituellen Aborten ein. Sie fanden eine Prävalenz von 5,5 % (n= 36) im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe mit 2 % (n= 40) (Raziol et al. 2001). D'Uva et al. wiesen in ihrer Studie, die 250 ambulante süditalienische Patientinnen, mit keinen weiteren Auffälligkeiten, außer zwei oder mehr Aborten im ersten Trimester oder einem oder mehreren Spätaborten umfasste (siehe 4.2.1.1), einen signifikanten Unterschied in der Prävalenz von 15 % im Patientinnenkollektiv im Gegensatz zu 2,6 % im Kontrollkollektiv (p= 0,001) nach (D'Uva et al. 2008). Eine zusammenfassende Bewertung findet sich in einer Metaanalyse von Rey et al. aus dem Jahr 2003. Hier zeigt sich, dass das Vorliegen

einer Faktor II-Mutation mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit mit wiederholten Aborten zusammenhängt (Rey et al. 2003).

4.2.1.3 Faktor V-Mutation

Die Faktor V-Mutation wurde in unserem Patientinnenkollektiv mit 11,2% (n=107) in heterozygoter Form nachgewiesen. Dies spiegelt eine leichte erhöhte Inzidenz im Gegensatz zur Bevölkerung in Europa, wobei ein Nord-Süd-Gefälle zu beachten ist, mit 3 bis 7 % wieder, aber nicht im Vergleich zu einem Kollektiv mit Patientinnen mit einer thromboembolischen Erkrankung. In einem Kollektiv mit thromboembolischen Erkrankung ist die heterozygote Faktor V-Mutation in 20 bis 40 % der Patientinnen zu finden (Adelberg und Kuller 2002). Die Unterschiede sind wahrscheinlich auf die Selektion von Patientinnen mit Abort des jeweiligen Kollektivs und regionale Unterschiede zurückzuführen.

In Fall-Kontrollstudien (Brenner et al. 1999, Foka et al. 2000, Grandone et al. 1997, Reznikoff-Etievant et al. 2001, Sarig et al. 2002b, Younis et al. 2000, Wramsby et al. 2000, Souza et al. 1999, Ridker et al. 1998) sowie Metaanalysen (Rey et al. 2003, Krabbendam et al. 2005) die den Zusammenhang der Faktor V-Mutation und ungeklärten Aborten untersuchten, zeigten sich Prävalenzen von bis zu 48 %. Die Mehrzahl der Studien wiesen auf einen Zusammenhang zwischen einer Faktor V-Mutation und einem thrombotischen bzw. einem Abortgeschehen hin. In anderen Studien konnten jedoch keine erhöhten Prävalenzen bei Patientinnen mit Abort nachgewiesen werden (Kutteh et al. 1999, Lindqvist et al. 1999). Die Unterschiede der Prävalenzen lassen sich vermutlich auf die verschiedenen Zusammensetzungen der Patientinnenkollektive zurückführen. D'Uva et al. fanden in ihrem Patientinnenkollektiv eine Prävalenz der heterozygoten Faktor V-Mutation von 5,2 % (n= 115) im Gegensatz zu ihrem Kontrollkollektiv von 1,3 % (n= 75). Ihr Patientinnenkollektiv bestand aus Patientinnen mit zwei oder mehr Aborten im ersten Trimester oder einem oder mehreren Spätaborten ohne sonstige Auffälligkeiten (D'Uva et al. 2008). Raziol et al. hatte ein ähnliches Patientinnenkollektiv. Sie schlossen ebenfalls Patientinnen mit pathologischen Auffälligkeiten außer mit unerklärlichen habituellen Aborten aus ihrer Studie aus (Raziol et al. 2001). Sie konnten eine Faktor V-Mutation bei 17 % (n= 36) im Vergleich zum Kontrollkollektiv mit 5 % (n= 40) nachweisen (Raziol et al. 2001). Foka et al. fanden in ihrem Patientinnenkollektiv mit griechischen Frauen mit zwei oder mehr spontanen Aborten zu 19 % (n= 80) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 4 % (n= 100; OR 5,5; [95 % CI: 1,7 – 17]; p= 0,003) eine heterozygote Faktor V-Mutation (Foka et al. 2000).

Desweiteren wird in manchen Studien nicht in heterozygote und homozygote Mutation unterschieden, z. B. in der Studie von Vora et al. (Vora et al. 2008). In weiteren Studien wurde explizit auf diesen Unterschied eingegangen (Adelberg und Kuller 2002, D'Uva et al. 2008,

Foka et al. 2000, Raziell et al. 2001). Es zeigte sich, dass Trägerinnen einer homozygoten Mutation gegenüber Trägerinnen mit einer heterozygoten Mutation ein zweifach höheres Abortrisiko und ein fünffach höheres Risiko für eine Totgeburt haben (Brenner et al. 1999, Meinardi et al. 1999). In der Metaanalyse von Rey et al. aus dem Jahre 2003 wird eine zusammenfassende Bewertung dargestellt. Sie fanden heraus, dass eine Faktor V-Mutation mit wiederholten Aborten im ersten Trimester zusammenhängen kann. Dieser Zusammenhang ist stärker bei wiederholten Spätaborten und wiederum stärker, wenn andere Ursachen eines Abortes ausgeschlossen werden. Hinzufügend entdeckten sie, dass ein einmaliger Spätabort ebenfalls mit einer Faktor V-Mutation assoziiert ist (Rey et al. 2003).

4.2.2 Mögliche Ursachen eines Aborts

Ein Abort kann aus verschiedensten Gründen erfolgen. Wir wollten herausfinden, ob die gesammelten Proben mit einem Hinweis auf einen Abort, als mögliche Ursache eine Thrombophilie, vor allem das Vorliegen von Antiphospholipid-Antikörpern, haben. Die Prävalenz von Antiphospholipid-Antikörpern bei Frauen mit wiederholtem Abort beträgt zwischen 12 und 40 % (Alijotas-Reig et al. 2010, Empson et al. 2002, Lockwood et al. 1989, Parazzini et al. 1991, Zammiti et al. 2006, Reznikoff-Etievant et al. 1999).

4.2.2.1 Antiphospholipid-Antikörper

In verschiedenen Studien wurde versucht, den Zusammenhang zwischen wiederholten Abortgeschehen und Antiphospholipid-Antikörpern nachzuweisen. In unserer Studie konnten 3 Patientinnen, die alle einen oder mehrere Aborte erlitten hatten, mit allen Methoden für einen oder zwei dieser Antikörper positiv getestet werden. Durch unser Studiendesign ist es schwierig eine Aussage über den kausalen Zusammenhang zwischen Antiphospholipid-Antikörpern und Aborten zu treffen, da wir die Patientinnen nicht im Schwangerschaftsverlauf betrachtet haben, nicht klinisch untersucht haben und keine ausführliche Anamnese erhoben werden konnte. Im Mittelpunkt unserer Studie lag die Diagnostik der Antiphospholipid-Antikörper. Hierbei stellte sich heraus, dass bei detaillierter Analyse von fünf aktuellen Testsystemen eine geringe Übereinstimmung der Testergebnisse vorlag.

Laut Vinatier et al. sind Antiphospholipid-Antikörper für 5 bis 40 % wiederholter Aborte verantwortlich (Vinatier et al. 2001). Lynch et al. beobachteten ihr Studienkollektiv, das aus 389 kinderlosen Frauen mit aktuell unauffälliger vorliegender Schwangerschaft bestand. Sie stellten fest, dass das Auftreten von Antiphospholipid-Antikörpern während ihrer ersten Untersuchung vor der 25. SSW mit einem erhöhten Risiko für einen Schwangerschaftsverlust assoziiert ist (Lynch et al. 1994). Auch Lockwood et al. konnten ein erhöhtes Risiko in diesem Zusammenhang ermitteln. Sie untersuchten das Risiko von Antiphospholipid-Antikörpern in Bezug auf einen Abort bei Frauen mit einer unauffälligen Schwangerschaft. Sie fanden ein 7-

bis 8-fach erhöhtes Risiko für einen Abort bei Schwangeren mit Antiphospholipid-Antikörpern (Lockwood et al. 1989). Rai et al. wiederum konnten eine Neigung zu Mehrfachaborten bei Patientinnen mit Antiphospholipid-Antikörpern nachweisen (Rai et al. 1995). Über den Zeitpunkt des Abortes zeigen die Studien keine deutliche Übereinstimmung, da sie unterschiedliche Häufungen der Aborte in Bezug auf die Schwangerschaftswochen fanden. Beispielsweise wurde in einer prospektiven Studie festgestellt, dass bei Patientinnen mit bereits stattgefundenen Spätaborten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Lebendgeburten Antiphospholipid-Antikörper, vor allem die die gegen Cardiolipin gerichtet sind, nicht mit einem erhöhten Risiko an Frühaborten einhergeht (Simpson et al. 1998). Im Gegensatz zu Simpson et al. legte Rai et al. dar, dass die Aborte, die mit Antiphospholipid-Antikörpern zusammenhängen, im ersten Trimester stattfinden (Rai et al. 1995). Haywood und Brown sowie Simpson et al. berichteten hingegen, dass zwischen Antiphospholipid-Antikörpern und Aborten im zweiten Trimester eine Verbindung besteht (Simpson et al. 1998, Haywood und Brown 1991). Higashiro et al. stellten fest, dass Antiphospholipid-Antikörper häufiger bei Frauen mit wiederholten Spätaborten nachzuweisen waren (Higashiro et al. 1998).

Aborte von Schwangeren bei denen Antiphospholipid-Antikörper nachweisbar waren sind durch plazentare Thrombosen und Infarkte gekennzeichnet. Häufig sind aber auch entzündliche Prozesse festzustellen z.B. eine Vakulitis der Gefäße der Plazenta (Bick und Baker 1994, Szczepanski et al. 1998). Man vermutet, dass die Antiphospholipid-Antikörper, vor allem β_2 -GPI, sowohl das klassische als auch das alternative Komplementsystem aktivieren. Es könnte sein, dass die Proteine des Komplementsystems Trophoblastenzellen verletzen, Monozyten und Neutrophile rekrutieren als auch aktivieren, die Abgabe von *tissue factor* fördern und somit einen Abort erzeugen könnten. Ebenfalls freie Radikale und proteolytisch wirksame Proteine könnten die Trophoblastenzellen angreifen und gleiche Folgen hervorrufen. Eine Hochregulation von *tissue factor* kann eine Koagulationskaskade starten, die zur Thrombose führt (Alijotas-Reig und Vilardell-Tarres 2009, Chu 2006). Pierangeli et al. schreiben jedoch, dass Antiphospholipid-Antikörper als Risikofaktor für Thrombosen und/oder Schwangerschaftskomplikationen schwer zu beurteilen sind, da wenige umfassende prospektive Studien über diesen Zusammenhang vorhanden sind. Die Studien, die dazu zu finden sind, haben überwiegend ein sehr kleines Kollektiv, Selektionsverzerrungen, eine hohe Anzahl von Komorbiditäten, sind retrospektiv, bestehen zum Teil aus einer Fall-Kontroll-Studie oder weisen keine Kontrollgruppe auf (Pierangeli et al. 2011). Desweiteren wurden nach Meinung von Pierangeli et al. in einer Vielzahl der Studien eine inadäquate oder unvollständige Datenanalyse durchgeführt. Probleme zeigen sich in niedrigen *cut-off*-Werten, einer nur einmal durchgeführten Messung und einer geringen Standardisierung (Reber et al. 2008). Studien, die über Antiphospholipid-Antikörper als Risikofaktoren berichten, sollten demnach kritisch beurteilt werden.

Abou-Nassar et al., die unter anderem den Zusammenhang zwischen Antiphospholipid-Antikörpern und Plazentakomplikationen mittels Metaanalyse untersucht haben, kamen zu ähnlichen Schlussfolgerungen, wie Pierangeli et al. Sie konnten einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Lupus-Antikoagulans, Cardiolipin-Antikörpern und β_2 -GPI-Antikörpern mit Plazentakomplikationen ermitteln. Jedoch zeigte sich, dass die meisten der ausgewerteten Studien eine zu geringe Patientinnenanzahl hatten, Selektions- und *Recall*-Verzerrungen auftraten, die einzelnen Kollektive sehr unterschiedlich waren, verschiedene *cut-off*-Werte verwendet wurden und die Zeitpunkte der Antikörpertestungen und deren Wiederholung verschieden gewählt wurden, um einen signifikanten Zusammenhang nachzuweisen. Vor allem Daten über β_2 -GPI sind ihrer Meinung nach insuffizient, weshalb keine definitive Aussage getroffen werden kann, ob zwischen β_2 -GPI-Antikörpern und Plazentakomplikationen ein positiver Zusammenhang besteht. Um eine Aussage über ein Risiko für Patienten/Patientinnen mit positiver Testung für Antiphospholipid-Antikörpern für Thrombose oder Schwangerschaftskomplikationen zu treffen, müssten zunächst repräsentative Studien durchgeführt werden (Abou-Nassar et al. 2011). In unserer Studie befand sich eine Patientin mit einem histologischen Befund von multiplen Plazentainfarkten; diese Patientin wurde auf allen 5 Testsystemen für Cardiolipin-Antikörper IgG und β_2 -GPI-Antikörper IgG positiv getestet. Bei einer weiteren Patientin mit Plazentainsuffizienz lag jedoch keine positive Testung auf Antiphospholipid-Antikörper vor. Aufgrund der geringen Anzahl positiver Befunde können wir keine eindeutige Aussage über den Zusammenhang von Antiphospholipid-Antikörpern und Plazentakomplikationen treffen.

4.2.2.1.1 Cardiolipin-Antikörper

Die Prävalenz von Cardiolipin-Antikörpern liegt bei Patientinnen mit wiederholten Aborten 5 und 51 % (Vinatier et al. 2001, Blumenfeld und Brenner 1999). In unserem Kollektiv befanden sich positive Proben (hierbei wurden alle nicht negativen Werte als positiv definiert) auf allen Testsystemen summiert für Cardiolipin IgG bei 3,0 % (n=24/808 Testungen) und für Cardiolipin IgM bei 2,6 % (n=21/807 Testungen).

Vora et al. untersuchten 198 indische Frauen mit drei oder mehr Aborten, die alle unauffällige Befunde betreffend ätiologischer Faktoren für einen Abort hatten, unter anderem auf Antiphospholipid-Antikörper. In ihrem Kollektiv befanden sich positive Antikörper-Teste für Cardiolipin IgG in 22 % im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe mit 1 %. Die Kontrollgruppe bestand aus 100 indischen gesunde Frauen mit mindestens einem gesunden Kind, keinen Schwangerschaftskomplikationen, keinen Aborten, keiner vorliegenden aktuellen Schwangerschaft, keiner Einnahme von oralen Kontrazeptiva und keinen Thrombosen. Cardiolipin-Antikörper IgM traten im Patientinnenkollektiv mit 19,6 % und im Kontrollkollektiv im ELISA zu 1 % auf.

Alle Teste wurden nach minimal 4 Monaten wiederholt, um mögliche Messfehler auszuschließen (Vora et al. 2008). Mtiraoui et al. rekrutierten 200 Frauen mit drei oder mehr wiederholten Aborten aus dem Mutterschaftszentrum des Farhat Hached Krankenhaus in Tunesien. Die Patientinnen, die ätiologische Faktoren für die Aborte aufwiesen und/oder eine positive Eigen- oder Familien-Anamnese für Thrombosen hatten, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Das Kontrollkollektiv umfasste 200 Frauen mit unkomplizierten Schwangerschaften, die hinsichtlich ihres Alters als auch in der Anzahl der Schwangerschaften mit dem Patientinnenkollektiv übereinstimmte. Im Patientinnenkollektiv zeigte sich eine Prävalenz von 20,5 % für Cardiolipin-Antikörper IgG im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 2,0 % (OR 4,4 - 36; $p < 0,001$) und von 3,5 % für Cardiolipin-Antikörper IgM im Vergleich zum Kontrollkollektiv von 0,5 % (OR 0,88 – 59; $p = 0,07$). Die Teste wurden an zwei Zeitpunkten mit einem ELISA durchgeführt (Mtiraoui et al. 2007). Bustos et al. fand eine Prävalenz von 15,3 % ($n=118$) für Cardiolipin- Antikörper IgG in seinem Patientinnenkollektiv im Vergleich zu 3,2 % ($n= 125$) in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) und eine Prävalenz von 21,2 % ($n=118$) für Cardiolipin-Antikörper IgM im Gegensatz zum Kontrollkollektiv mit 12,8 % ($n= 125$; $p < 0,05$). Das Patientinnenkollektiv von Bustos et al. setzte sich aus Frauen mit drei oder mehr wiederholten spontanen Aborten aus dem Reproduktionszentrum des Krankenhauses in Buenos Aires in Argentinien zusammen. Die Patientinnen wurden hinsichtlich Ursachen eines Abortes untersucht und bei auffälligen Befunden ausgeschlossen. Die Kontrollgruppe umfasste Frauen, die mindestens zwei Kinder und keinen Abort hatten. Die Cardiolipin-Antikörper Teste wurden auf einem ELISA mit Sigma C-1649 Testkit (Sigma, St. Louis, USA) durchgeführt (Bustos et al. 2006). Vora et al., Mtiraoui et al. und Bustos et al. konnten durch ihre Studien einen positiven Zusammenhang von Cardiolipin-Antikörpern und wiederholten Aborten ermitteln.

Vergleicht man die Prävalenzen der Cardiolipin-Antikörper von Vora et al., Mtiraoui et al. und Bustos et al. mit den Prävalenzen unserer Studie, lässt sich feststellen, dass wir niedrigere Prävalenzen aufweisen und uns nicht der Aussage eines deutlichen positiven Zusammenhangs zwischen Cardiolipin-Antikörpern und Aborten anschließen können. Dies kann daran liegen, dass die verschiedenen Studien andere ethnische Gruppen als wir untersuchten und Antikörper in ethnisch verschiedenen Gruppen mit unterschiedlicher Häufigkeit auftreten (Uthman und Khamashta 2005). Dies ist möglicherweise ebenfalls eine Begründung, warum die Kontrollgruppe von Bustos et al. eine Prävalenz für Cardiolipin-Antikörper IgM von 12,5 % aufweist. Eine weitere Ursache für unsere niedrigeren Prävalenzen ist, dass wir die 162 Proben insgesamt auf jeweils 5 Testsystemen auf Cardiolipin-Antikörper untersuchten und damit eine bessere Objektivität aufweisen, da jedes Testsystem eine unterschiedliche Sensitivität, Spezifität und einen unterschiedlichen *cut-off*-Wert hat. Zwar haben Mtiraoui et al. und Vora et al., nach Vorgaben der Sapporo-Kriterien nach einem Zeitintervall, die Testungen

wiederholt, jedoch auf einem einzelnen Testsystem. Möglicherweise ist deren jeweiliger ELISA sehr empfindlich Antikörpern gegenüber oder sie verwenden jeweils einen niedrigen *cut-off*-Wert. Durch Unterschiede in den Testsystemen, können die Ergebnisse der einzelnen Studien beeinflusst worden sein. Einige Studien zeigten geringe Übereinstimmungen in den Ergebnissen von Cardiolipin-Antikörper-Testen, sowohl bei kommerziellen als auch bei internen Methoden (Favaloro et al. 2005, Pengo et al. 2007). Unsere Ergebnisse wurden durch ein einzelnes Testsystem, vergleichbar mit denen anderer Studien, weniger beeinflusst, da wir die Ergebnisse von 5 Testsystemen in die Prävalenz einfließen ließen. Möglicherweise liegen die geringeren Prävalenzen auch an unserem Patientinnenkollektiv, da wir Patientinnen mit einem und mehr Aborten und nicht allein mit habituellen Aborten hatten und wir keine Patientin auf Grund von ätiologischen Faktoren ausgeschlossen hatten. Diese Proben gehen fünfmal in den Vergleich ein, womit sich mögliche ungünstig gewählte Proben stärker auf die Prävalenzen auswirken, als wenn diese nur einmal gewertet werden. Dies macht einen Vergleich der Prävalenzen womöglich schwierig.

Bei detaillierter Betrachtung der einzelnen Ergebnisse von Bustos et al. zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang für Cardiolipin-Antikörper IgG als auch Cardiolipin-Antikörper IgM mit wiederholten Aborten (Bustos et al. 2006). Diesen signifikanten Zusammenhang ermittelten andere Fall-Kontrollstudien ebenfalls (Unander et al. 1987, Parazzini et al. 1991, Parke et al. 1991). Mtiraoui et al. fanden keinen signifikanten Zusammenhang für Cardiolipin-Antikörper IgM und wiederholten Aborten, jedoch für Cardiolipin-Antikörper IgG (Mtiraoui et al. 2007). Die Ergebnisse von Nielsen und Christiansen decken sich nicht mit denen von Mtiraoui et al. Sie fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen Cardiolipin-Antikörper IgM und wiederholten Aborten (OR 0,34; [95 % CI: 0,2 – 0,7]; p = 0,01), aber nicht für Cardiolipin-Antikörper IgG (Nielsen und Christiansen 2005). Die Resultate von Lynch et al. wiederum gleichen denen von Mtiraoui et al. (Lynch et al. 1994). Sie stellten ebenfalls Cardiolipin-Antikörper IgG als besseren Vorhersageindikator für einen Zusammenhang mit wiederholten Aborten als Cardiolipin-Antikörper IgM dar. Diese Aussage deckt sich mit der von Unander et al. Unander et al. stellten fest, dass Cardiolipin-Antikörper IgM der schwächere Vorhersageindikator sind, da eine hohe Inzidenz von Cardiolipin-Antikörpern IgM bei Patientinnen mit Infektionskrankheiten gefunden wurde (Unander et al. 1987). Jedoch verteidigen Nielsen und Christiansen ihr Ergebnis dahingehend, dass Cardiolipin-Antikörper IgM einen signifikanten Zusammenhang mit wiederholten Aborten darstellen, da sie zu Beginn ihrer Studie ihre Patientinnen auf Infektionskrankheiten untersuchten und keine Erkrankung vorlag (Nielsen und Christiansen 2005). Im Gegensatz zu Bustos et al. wies Alijotas-Reig et al. für seine Studiengruppe (n=25) mit wiederholten Aborten, drei oder mehr ungeklärte Aborte vor der 10. SSW umfassend, im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe (n=68), die mindestens eine unauffällige Schwangerschaft und keinen Abort hatten, keinen signifikanten Zusam-

menhang zwischen Cardiolipin-Antikörper IgG und IgM und wiederholten Aborten auf (Alijotas-Reig et al. 2010). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Ergebnissen der zuvor erwähnten Studien. Mögliche Abweichungen der Ergebnisse können damit begründet werden, dass Alijotas-Reig et al. nur wiederholte Aborte vor der 10. SSW betrachteten und zusätzlich ein kleines Kollektiv mit 25 Patientinnen hatten. Jedoch sind ihre Ergebnisse übereinstimmend mit denen von Sailer et al., Gris et al. und Galli et al. (Galli et al. 2007, Gris et al. 2000, Sailer et al. 2006). Galli et al. fanden keine signifikante Assoziation zwischen Cardiolipin-Antikörpern und deren klinischen Symptomen. Diese Feststellung wird von einem systematischen Review untermauert. In der Arbeit von Galli et al. konnte gezeigt werden, dass β_2 -GPI-Antikörper eine bessere signifikante Assoziation mit Aborten haben als Cardiolipin-Antikörper (Galli et al. 2003).

4.2.2.1.2 β_2 -GPI-Antikörper

In unserer Studie, die 162 Patientinnen mit mindestens einem Abort und keinen Ausschlusskriterien in Bezug auf ätiologische Faktoren der Aborte untersuchte, ergab sich eine Prävalenz von 6,1 % (n=49/808 Testungen) für β_2 -GPI-Antikörper IgG und eine Prävalenz von 1,9 % (n=15/808 Testungen) für β_2 -GPI-Antikörper IgM.

Zammiti et al. untersuchten 172 Frauen mit drei oder mehr ungeklärlichen Schwangerschaftsverlusten zwischen der 5. und 20. SSW. Ausgeschlossen wurden Patientinnen mit einem induzierten Abort, einer Infektion, einer systemischen Erkrankung, uterinen Anomalien, Anomalien des Karyotyps und einer positiven Eigen- und/oder Familien-Anamnese hinsichtlich einer Thrombose. Die Kontrollgruppe bestand aus 173 gesunden Frauen mit unkomplizierten Schwangerschaften. Das Blut wurde 8-12 Wochen nach der letzten Schwangerschaft entnommen und auf β_2 -GPI-Antikörper mittels ELISA untersucht. Der zugehörige *cut-off*-Wert lag bei 20 U/ml. Sie fanden heraus, dass die Prävalenzen für β_2 -GPI-Antikörper IgG (p = 0,414) und IgM (p = 0,502) vergleichbar zwischen der Patientinnenkohorte und der Kontrollgruppe waren. Mittels Regressionsanalyse konnten Zammiti et al. zeigen, dass β_2 -GPI-Antikörper IgM mit wiederholten Aborten innerhalb der 5. bis 10. SSW assoziiert waren (OR 8,9 [95 % CI: 1,23 – 64,63]; p < 0,05), jedoch nicht mit Spätaborten (OR 1,8 [95 % CI: 0,18 – 19,17]). Für β_2 -GPI-Antikörper IgG zeigte sich in der Regressionsanalyse kein signifikanter Zusammenhang für wiederholte Früh- als auch für Spätaborte. Sowohl für β_2 -GPI-Antikörper IgG wie für β_2 -GPI-Antikörper IgM ließ sich kein signifikanter Zusammenhang für die Kombination von wiederholten Früh- und Spätaborten aufweisen (Zammiti et al. 2006). Wir haben die Kombination von Früh- und Spätaborten untersucht, wobei der größte Teil der Aborte (89,1 %), von denen wir klinische Details vorliegen hatten (n=95 Patientinnen), vor der 12. SSW stattfand und damit zu den Frühaborten zählen (nach ICD 10). Außerdem haben wir auch Patientinnen mit nur einem Abort betrachtet und nicht wie Zammiti et al. Patien-

tinnen mit drei oder mehr Aborten. Unsere Prävalenzen für β_2 -GPI-Antikörper IgG/IgM sind vor allem für β_2 -GPI-Antikörper IgG vergleichbar mit Prävalenzen anderer Studien, die ebenfalls Patientinnen mit Aborten untersuchten. In unserer Studie traten in 6,1 % (49 von 808 Testungen) positive Testungen für β_2 -GPI-Antikörper IgG und in 1,9 % (15 von 808 Testungen) für β_2 -GPI-Antikörper IgM auf. Zammiti et al. wiesen erhöhte Antikörper-Werte in ihrem Patientinnenkollektiv für β_2 -GPI-Antikörper IgG bei 4,7 % (8 von 172 Patientinnen) und für β_2 -GPI-Antikörper IgM bei 2,9 % (5 von 172 Patientinnen) nach. Vora et al. zeigten in ihrem Patientinnenkollektiv eine Prävalenz von 8,5 % (n= 198) für β_2 -GPI-Antikörper IgG auf im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit 1 % (n= 100) und eine Prävalenz von 5,5 % (n=198) für β_2 -GPI-Antikörper IgM im Vergleich zum Kontrollkollektiv zu 1 % (n=100) auf (Vora et al. 2008). Mtiraoui et al. fanden in ihrem Patientinnenkollektiv, welches Frauen mit drei oder mehr Aborten zwischen der 5. und 20. SSW umfasste, β_2 -GPI-Antikörper IgG zu 4,5 % (n=200) im Vergleich zum Kontrollkollektiv zu 2,5 % (n=200; OR 0,6 – 5,6; p= 0,42) und β_2 -GPI-Antikörper IgM im Patientinnenkollektiv zu 4,5 % (n=200) im Gegensatz zum Kontrollkollektiv zu 3,0 % (n= 200) (OR 0,5 – 4,4; p= 0,6) (Mtiraoui et al. 2007). Mtiraoui et al., die keine signifikante Erhöhung der β_2 -GPI-Antikörper IgG und IgM in ihrem Kollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden, schließen sich der Feststellung von Zammiti et al. an, dass es keine Assoziation zwischen β_2 -GPI-Antikörper IgG und IgM und einer Kombination zwischen Früh- und Spätaborten gibt (Mtiraoui et al. 2007). Im Vergleich mit den Prävalenzen der aufgezeigten Studien, können wir uns hingegen nicht der Aussage von Zammiti et al. anschließen, dass β_2 -GPI-Antikörper IgM mit wiederholten Aborten in der 5. bis 10. SSW assoziiert sind (Zammiti et al. 2006).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Zammiti et al., die einen Zusammenhang zwischen β_2 -GPI-Antikörper IgM und wiederholten Aborten in der 5. bis 10. SSW herausfanden, beschreiben andere Studien einen Zusammenhang zwischen β_2 -GPI-Antikörper IgG und wiederholten spontanen Aborten (Alijotas-Reig et al. 2010, Gris et al. 2000, Lee et al. 1999), weitere beziehen sich wiederum auf β_2 -GPI-Antikörper IgM (Forastiero et al. 1997, Mezzesimi et al. 2007), aber nicht auf β_2 -GPI-Antikörper IgG (Arnold et al. 2001, Lynch et al. 1999) als potentieller Risikofaktor für wiederholte Aborte. Eine zusammenfassende Beurteilung findet sich in einer Metaanalyse von Abou-Nassar et al. aus dem Jahr 2011. Hier zeigt sich, dass es zum Zeitpunkt der Metaanalyse nur ungenügende Daten gab, um einen signifikanten Zusammenhang zwischen β_2 -GPI-Antikörpern und Abort zu ermitteln (Abou-Nassar et al. 2011).

Die Unterschiede der Prävalenzen als auch die unterschiedlichen Zusammenhänge von β_2 -GPI-Antikörpern IgG/IgM und wiederholten Aborten liegen möglicherweise, neben verschiedener ethnischer Herkunft der Kollektive (Uthman und Khamashta 2005) und unterschiedli-

chen *cut-off*-Werten der verschiedenen Testsysteme (Reber und de Moerloose 2004), an der divergierenden Sensitivität verschiedener Testsysteme, die in den Studien verwendet wurden (Ailus et al. 1996). Z. B. wurde in den Studie von Vora et al., Zammiti et al. als auch von Mitraoui et al. jeweils ein ELISA verwendet. Die hohe Spezifität, die der β_2 -GPI-Antikörper ELISA bietet, kann auch nachteilig sein, da er alle Antikörper, die gegen β_2 -GPI gerichtet sind, detektiert. Die β_2 -GPI-Antikörper sind eine heterogene Gruppe von Antikörpern (Forastiero et al. 1997). So werden auch die Antikörper vom ELISA detektiert, die nicht pathologisch sind und Phospholipid-unabhängige Antikörper gegen β_2 -GPI. Dadurch ist der Test diagnostisch schwieriger zu beurteilen, als die anderen Teste, die nur auf pathologische Antikörper ausgerichtet sind. Hinzufügend detektiert der β_2 -GPI-Antikörper ELISA auch Antikörper mit einer niedrigen Affinität (De Laat et al. 2006). Wir verwanden 5 verschiedene Testsysteme und addierten die positiven Ergebnisse (hierbei wurden alle nicht negativen Werte als positiv definiert) auf. Somit sind unsere Ergebnisse nicht von einem Testsystem abhängig. Jedoch verwendeten wir auf jedem Testsystem die gleichen 162 Proben, um später einen Vergleich zwischen den Testsystemen herzustellen. In der Betrachtung der Prävalenzen, kann dies aber die Ergebnisse verzerrt haben, wenn unser Kollektiv möglicherweise weniger positive Fälle als andere Studienkollektive aufweist, da wir im Gegensatz zu den anderen Studien auch Patientinnen mit einem oder zwei Aborten eingeschlossen haben.

4.2.2.2 Assoziierte Mechanismen

Neben den Antiphospholipid-Antikörpern können andere Ursachen für einen bzw. mehrere Aborte auftreten. Diese könnten in unserer Studie vor allem bei den Patientinnen in Frage kommen, bei denen keine Parameter in der Labordiagnostik positiv ausfielen. Anatomische Auffälligkeiten, wie z.B. Uteruspolypen, Myome, Uterusanomalien, Zervixinsuffizienz oder das Synechien-Ashermann-Syndrom (Verwachsungen bzw. Verklebungen der Gebärmuttervorder- und -rückwand) stellen in 9 bis 27 % die Ursache für einen wiederholten Schwangerschaftsabbruch dar (Steck und Marzusch 1977, Li et al. 2002b, Buchholz et al. 2003). In unserem Kollektiv wies eine Patientin einen Uterus bicordis und arcuatus auf, eine Patientin eine Zervixinsuffizienz und zwei Patientinnen eine Plazentainsuffizienz. Die meisten zuvor dargestellten Studien schlossen Patientinnen mit anatomischen Auffälligkeiten aus (Mitraoui et al. 2007, Vora et al. 2008, Zammiti et al. 2006). Jedoch zeigte sich in unserer Studie, dass die Patientin mit Uterus bicordis und arcuatus auf fast allen Testsystemen positive Werte für Cardiolipin-Antikörper IgM und auf vereinzelt Testsystemen positive Werte für β_2 -GPI-Antikörper IgG und IgM hatte. Ebenfalls wurde eine Patientin mit einer Plazentainsuffizienz mit histologisch multiplen Plazentainfarkten auf allen Testsystemen positiv für Cardiolipin-Antikörper IgG und β_2 -GPI-Antikörper IgG getestet.

Desweiteren können genetische Ursachen herangezogen werden. Sie verursachen 50 bis 60 % der Aborte, die im ersten Trimenon stattfinden. Zu den häufigsten genetischen Ursachen zählt eine Trisomie, eine Polyploidie oder eine X-Monosomie (Heilmann et al. 2008). In unserem Patientinnenkollektiv lagen in 4,1 % der Fälle mögliche genetische Ursachen für einen Abort vor. Diese Abweichung liegt möglicherweise daran, dass die Patientinnen mit genetisch verändertem Erbgut des Feten diesen nach Kenntnis darüber einer Abtreibung unterzogen haben und deshalb kein Thrombophiliescreening durchgeführt wurde.

Auch können hormonelle Ursachen wiederholten Aborten zugrunde liegen. Vermutet wird ein Einfluss der Schilddrüsenfunktion vor allem eine Hypothyreose (Roberts und Murphy 2000). In unserem Kollektiv kam einmal ein Morbus Basedow vor, jedoch ging dieser mit einer Hyperthyreose einher. Ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus stellt ebenfalls einen Risikofaktor für Abortgeschehen dar (Greene 1999). Zu 8,2 % trat eine Gestose während der Schwangerschaft in unserem Kollektiv auf. Wir können jedoch keine Aussage treffen ob diese nicht behandelt wurde und damit für ein Abortgeschehen verantwortlich sein konnte. Als weitere hormonelle Ursache kommt die Lutealinsuffizienz oder das polycystische Ovar-Syndrom in Frage (Li et al. 2002a, Liddell et al. 1997).

Ebenfalls können immunologische Ursachen eine Rolle spielen. Zum einen kann eine Abstoßungsreaktion des Embryos in Zusammenhang mit den natürlichen Killerzellen stattfinden oder durch eine Aktivierung von T-Helferzellen, die ihrerseits Zytokine und spezifische Wachstumsfaktoren ausschütten (Erlebacher et al. 2004). Es könnten auch infektiöse Ursachen oder psychovegetative Ursachen in Betracht gezogen werden (Li et al. 2002b, Liddell et al. 1991).

Eine Arbeitsgruppe fand eine Korrelation zwischen dem Plasmawert von Lipoprotein(a) und *plasminogen activator inhibitor* bei Patienten mit Antiphospholipid-Antikörpern. Vermutlich fördert Lipoprotein(a) die Entstehung von thrombotischen Ereignissen, und zwar indem es mit Plasminogen um die Bindung an Fibrin, Fibrinogen und Endothelzellbindungsstellen konkurriert. Dieser Anstieg von fibrinolytischer Aktivität ist in der Plazenta verstärkt durch die lokale Synthese und Abgabe von *plasminogen activator inhibitor 2* (Edelberg und Pizzo 1991, Yamazaki et al. 1994).

Ein anderer Mechanismus beschreibt die Entstehung von Thrombosen in der Plazenta durch Antiphospholipid-Antikörper auf Grund von kompetitiven Interaktionen mit dem plazentalen Antikoagulans Protein 1 (Triplett 1993).

4.2.3 Testergebnisse

Bei dieser Studie ist hervorzuheben, dass eine sehr große Datenmenge von Patientinnen aus ganz Deutschland und ein Querschnitt aus ambulanten Praxen erhoben wurden. Somit können wir eine Aussage über eine breite geographische Verteilung in Deutschland treffen. Vorliegende Studien wie Bustos et al. und Mtiraoui et al. verwanden Proben von Patientinnen, die alle in einem Zentrum des Krankenhauses in Behandlung waren.

Um die Übereinstimmung der positiven und negativen Testergebnisse der einzelnen Testsysteme zu zeigen, verwendeten wir das statistische Übereinstimmungsmaß Cohen's Kappa. Cohen's Kappa liegt in unserem Abortkollektiv für Cardiolipin-Antikörper IgG zwischen 0,31 und 0,66, für Cardiolipin-Antikörper IgM zwischen -0,03 und 0,49, für β_2 -GPI-Antikörper IgG zwischen 0,08 und 0,80 und für β_2 -GPI-Antikörper IgM zwischen 0,21 und 1,0. Dies zeigt, dass die Übereinstimmung der einzelnen Geräte sehr stark von schlechter bis guter Übereinstimmung schwankt und kein Ansatz von Standardisierung festzustellen ist.

Negative Kappa-Werte können möglicherweise durch eine schlechte Reliabilität und eine niedrige Probandenzahl zustande kommen und verschieben den Mittelwert nach unten. Eine weitere Erklärung für negative Kappa-Werte ist, dass die beiden Testsysteme weniger übereinstimmen als zufällig erwartet (Fleiss und Cohen 1973). Werte $\kappa < 0,2$ verdeutlichen eine schlechte Übereinstimmung. Diese tritt im Abortkollektiv bei Cardiolipin-Antikörpern IgM im Vergleich zwischen ImmunoCAP 250 und den anderen Testsystemen auf.

In diesem Teil der Studie haben wir die Testsysteme und die Reagenzien eines händischen, semi-automatisierten und von drei voll-automatisierten Testverfahren getestet und verglichen.

Würde man eine Extrapolation durchführen, würde sich die Menge der positiven Tests auf dem ACL AcuStar (IL) noch deutlicher abzeichnen. Ein Trend wäre vor allem bei β_2 -GPI-Antikörpern festzustellen. Diese Häufung an positiven Ergebnissen im Vergleich zu den anderen Testsystemen liegt womöglich daran, dass es sich bei dem Analysegerät ACL AcuStar, wie auch bei Zenit ra (A. Menarini), um eine Immunoassay Technologie handelt und diese dadurch charakterisiert ist, dass sie niedrige Detektionsgrenzen aufweist (Lowe 1996). Diese Grenzen sind beim ACL AcuStar möglicherweise niedriger als bei Zenit ra und bei den anderen ELISAs.

Diese Abhebung des ACL AcuStars (IL) konnten Pierangeli et al. in ihrem Vergleich zwischen ACL AcuStar (IL), APhL ELISA (Louisville APL Diagnostics, Seabrook, USA) und zwei weiteren Vollautomaten, einem *fluoro-enzyme* Immunoassay (Phadia) und BioPlex 2200

(Bio-Rad, USA) nicht verzeichnen, da sie eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen, vor allem den positiven Ergebnissen der einzelnen Parameter fanden. Sie untersuchten keine Patientinnen mit Abort, aber 26 Seren von Antiphospholipid-Syndrom-Patienten/Patientinnen und 21 Kontrollen, die sich aus 14 Proben von gesunden Individuen und 7 Proben von Patienten mit infektiöser Erkrankung zusammensetzten (Pierangeli et al. 2011). Es wurde in der Studie jedoch nicht dargestellt, ob diese Übereinstimmung auf den einzelnen Patienten/Patientin bezogen werden konnte oder ob Kappa über alle Messungen eine gute Übereinstimmung ergab. Auf den ersten Blick (siehe Tabelle 7) könnte man auch in unserer Studie von einer mittleren bis guten Übereinstimmung ausgehen. Jedoch haben wir die einzelnen positiven Proben jedes Testsystems untereinander verglichen und zusätzlich das Übereinstimmungsmaß Kappa (siehe Tabelle 8 bis 11) bestimmt, wodurch sich eine schlechte bis teilweise gute Übereinstimmung darstellte.

Unterschiedliche Ergebnisse von der gleichen Probe auf unterschiedlichen Geräten können mit einer unterschiedlichen Wahl des *cut-off*-Wertes begründet werden oder durch interne Unterschiede des jeweiligen Gerätes (Reber et al. 1995). Bei den Geräten unserer Studie handelt es sich um Immunoassay-Technologie. Die Schwierigkeit der einzelnen Hersteller besteht in Teilen darin, eine Festphase mit einer hydrophilen Substanz, meist einem Antigen, zu beschichten. Vor allem treten Probleme bei der Immobilisierung eines Antigens auf, da die Antigene einerseits resistent gegen Beanspruchung z.B. Waschen sein müssen und andererseits muss die Präsentation des Antigens so sein, dass es von den nachzuweisenden Antikörpern erkannt wird (Harris 1992, Pengo et al. 1987, Rombos et al. 1990). Für den Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern werden auf der Festphase - häufig sind dies Mikrotiterplatten - negativ geladene Phospholipide, meist Cardiolipin, immobilisiert (Harris 1992, Rombos et al. 1990, Pengo et al. 1987). Man kann vermuten, dass bei Geräten mit weniger positiven Ergebnissen das Antigen vermehrt durch den Waschschrift gelöst wird und bei Geräten mit vermehrt positiven Ergebnissen die Antigene stärker an der Festphase haften bleiben.

4.2.3.1 Vor- und Nachteile der Testsysteme

Der Imtec-ELISA (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH) ist ein händischer Test und dadurch sehr Zeit- bzw. Personal-intensiv. Der ELISA fasst pro Platte 80 Proben und liefert zuverlässig Ergebnisse. Durch die umfassende manuelle Arbeit besteht die Möglichkeit einer Verwechslungsgefahr, indem die Proben während der Verdünnung und beim pipettieren in die 96-*well*-Mikrotiterplatte vertauscht werden. Er eignet sich aus Kostengründen nur für die Bestimmung vieler Proben, da für eine Platte immer eine Standardreihe angesetzt werden muss und dies sich erst bei mehreren, am besten 80, Proben rechnet.

Somit entspricht die Zeit, die wir für die Bestimmung einer Probe mit 4 Parametern angeben, annähernd der Zeit, die man für 80 Proben benötigt. Der ELISA ist für mehrere Proben angelegt. Dadurch unterscheidet sich die Zeit für die Bestimmung einer Probe kaum von der Zeit für 80 Proben.

Das Analysegerät Alegria (Orgentec Diagnostika GmbH) war durch sein integriertes *Touchscreen*-System ohne einen weiteren externen Computer selbsterklärend zu bedienen. Der Alegria umfasst 30 SMC (*sensotronic memorized calibration*)-Teststreifenplätze. Aus einem SMC-Streifen kann ein Parameter bestimmt werden. Pro Parameter wird ein SMC-Teststreifen benötigt. Somit sind für die Bestimmung der 4 verschiedenen Antiphospholipid-Antikörper einer Blutprobe vier TMC-Teststreifen notwendig. Das Gerät unterscheidet nicht zwischen Citrat und Plasma. Für eine Diagnostik für jeweils eine Probe mit 4 Parametern wäre Kapazität für 7 Proben gegeben. Die zu bestimmende Blutprobe muss jedoch per Hand in den SMC-Teststreifen pipettiert werden, ein Arbeitsschritt welcher Personalbedarf erfordert. Hierbei besteht die Gefahr der Vertauschung der Proben. Eine weitere Vertauschungsfahr besteht, in der richtig zugeordneten Eingabe der Teststreifenposition der Probe über den *Touchscreen*. Vorteilhaft ist, dass Alegria über eine interne Kalibration verfügt, die in jedem Streifen enthalten ist. Es ist somit nicht nötig, dass eine Arbeitskraft diese anfordert oder durchführen muss. Außerdem ist das Gerät wartungsfrei, was ebenfalls einen Zeitaufwand einspart. Nachteilig ist, dass das Gerät die Ergebnisse erst dann angibt, nachdem alle Proben analysiert wurden. Dies bedeutet, umso mehr Anforderungen man an das Gerät stellt, desto länger dauert es bis man die Ergebnisse erhält, wobei der Unterschied nicht wesentlich ist. Für 4 SMC-Streifen benötigt das Gerät 72 min und für 30 SMC-Streifen 95 min. Während der Analysen kann man das Gerät nicht unterbrechen, um z.B. einen SMC-Streifen hinzuzufügen. Während der Batchanalyse ist bei dem Analysegerät Alegria aufgefallen, dass die Barcodes auf den TMC-Teststreifen nicht zuverlässig erkannt wurden. Nicht gelesene Barcodes mussten erneut eingelesen werden oder sogar ausgetauscht werden.

Das Analysegerät Zenit ra (A. Menarini Diagnostics) ist nach einer kurzen Einarbeitung leicht und übersichtlich zu bedienen. Es ist ein Vollautomat, wodurch wenig Zeit einer Arbeitskraft in Anspruch genommen werden muss. Desweiteren ist es ein Standby-Gerät, wodurch Zeit für Anschaltvorgänge eingespart wird. Die Proben müssen einmal vor den Barcodeleser gehalten werden und daraufhin innerhalb von 10 Sekunden auf eine freie Position im Probenrack gestellt werden. Danach müssen die Anforderungen im Computer eingegeben werden. Zenit ra hat Stellplätze für 64 Proben. Nachdem es eine Probe pipettiert hat, kann man bereits die nächste Probe hineinstellen. Das Gerät gibt nach jeder Bestimmung einer Anforderung das Ergebnis aus. Während das Gerät die Analysen durchführt, ist es relativ laut. Ein weiterer Nachteil ist, dass Zenit ra noch keine CE-Zulassung für Citratproben hat.

ImmunoCAP 250 (Phadia) wies eine einfache Handhabung auf. Auf einem externen Computer konnten die Anforderungen eingegeben werden. Zusätzlich besitzt das Gerät einen integrierten Bildschirm, über welchen verbildlicht Angaben gemacht werden, wie z.B. der Füllungsstand der Reagenzien. Die Proben wurden in einen Ständer gestellt und auf einer Schiene in das Gerät geschoben, währenddessen das Gerät die Barcodes scannt. Es können 50 Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Sobald die ersten 10 Proben pipettiert sind, können die nächsten Proben auf dem Ständer eingesetzt werden. Nachteilig ist, dass das Gerät, während es Analysen durchführt, mit keinerlei Reagenzien (z.B. Konjugat-, Verdünnungslösung, Start- und Stoppreagenz) nachgeladen werden kann. Ebenfalls können während laufender Bestimmungen keine Anforderungen hinzugefügt werden. Auch können Platten nicht ausgetauscht werden. Um eine Anforderung hinzuzufügen, muss das Gerät neu gestartet werden. Das Gerät kalibriert sich alle 4 Wochen von selbst. Nach jedem Start führt es nur eine Kalibratorkontrolle mittels Kurvenkontrollmessung durch.

ACL AcuStar (IL) ist ein Standby-Gerät und spart dadurch Zeit beim Anschalten ein. Es fasst 30 Proben gleichzeitig. Je 5 Proben stehen in einem Rack. Diese 5 Proben können durch neue Proben ersetzt werden, wenn ein Ständer pipettiert wurde. Die Software ist übersichtlich und wird über einen externen Computer bedient. Die Mengen der Zusatzreagenzien (Systemspülung, Triggerlösung) sind in Prozent angegeben, woraus sich die Anzahl der noch möglichen Analysen nicht ersehen lässt. Das Gerät hat einen hohen Verbrauch an Spüllösung. Es benötigt z.B. für 128 Analysen ca. 43% von 5 Litern), ebenfalls einen hohen Verbrauch an Trigger (Auslöser-Lösung). Z. B. verbraucht es für 128 Analysen 10 % Triggerlösung von insgesamt 250 ml. Der Küvettenverbrauch ist zusätzlich hoch, da zwei Küvetten pro Analyse benötigt werden. ACL AcuStar unterscheidet als einziger der getesteten Analysegeräte zwischen Serum- und Citratproben. Weiterhin gibt der ACL AcuStar nach jeder Bestimmung einer Anforderung das Ergebnis aus.

Im Netto-Zeitaufwand ergaben sich zwischen den Vollautomaten kaum Unterschiede. Der händische Test (ELISA) hatte den höchsten Zeitaufwand, gefolgt vom semi-automatisierten Testverfahren beim Analysegerät Alegria.

Jedoch sollte nicht nur der Netto-Zeitaufwand betrachtet werden, sondern auch die Zeit, die auf das Ergebnis gewartet werden muss und nicht am Gerät verbracht wird, definiert als *Walk-away-Zeit*. Diese unterscheidet sich bei den Geräten. Sie ist ein Faktor, der betrachtet werden sollte, da sie möglicherweise indirekt Zeit eines Mitarbeiters/einer Mitarbeiterin in Anspruch nimmt oder auch Wartezeit darstellen kann. Die Wartezeit bezieht sich zunächst auf das Warten des Ergebnisses einer möglicherweise dringlichen Anforderung, aber auch

darauf, dass das Gerät nur eine bestimmte Anzahl an Proben fasst und wenn eine größere Anzahl bearbeitet werden muss, diese Zeit abgewartet werden muss. Die geringste *Walk-away*-Zeit wies Zenit ra (A. Menarini) mit 27 min auf, gefolgt von dem Gerät ACL AcuStar (IL) mit 33 Min.

Wir können über kein Gerät urteilen, ob es den Wert richtig bestimmt hat oder nicht, da es kein standardisiertes Referenzverfahren gibt. Lediglich die Geräte untereinander haben wir vergleichen können. Pengo et al. legen dar, dass alle Labortestsysteme in ihrer Reproduzierbarkeit und Standardisierung begrenzt sind. Die Antikörper weisen eine Heterogenität auf, wodurch eine 100-prozentige Sensitivität und Spezifität nicht möglich sind. Vergleiche zwischen verschiedenen Testsystemen sind daher nur eingeschränkt möglich. Verläufe der Antikörperwerte sollten deshalb nur mit demselben Testsystem durchgeführt werden (Pengo et al. 2009).

Ein Problem der Standardisierung besteht darin, einen cut-off-Wert zu definieren. Dies liegt unter anderem an der Verwendung von unterschiedlichen Testkits und unterschiedlichen Methoden, wodurch abweichende Werte für die Antikörper entstehen und dies vor allem bei niedrigen Titern/Konzentrationen. Hieraus folgt, dass die Ergebnisse der Labordiagnostik für das Antiphospholipid-Antikörper von dem Labor abhängt, das die Tests durchführt. Aus diesem Grund sind laut der Sapporo-Kriterien 2006 nur mittlere und hohe Anti-Cardiolipin-Antikörper Werte im Bereich der 99 % Perzentile oder über 40 GPL/ml bzw. MPL/ml und β_2 -GPI-Werte ebenfalls im Bereich der 99 % Perzentile in die diagnostischen Kriterien mit einzubeziehen, welches die Spezifität der Tests verbessert (Miyakis et al. 2006). Die cut-off-Werte, die von den Sapporo-Kriterien 2006 vorgeschlagen wurden, senken das Risiko von Fehldiagnosen des Antiphospholipid-Syndroms und einer folgenden Therapie von Patienten/Patientinnen, die möglicherweise unter diesem Syndrom nicht leiden. Jedoch können Patienten/Patientinnen bei einem so hohen Grenzwert übersehen werden (Ruffatti et al. 2008).

Nach Nielsen und Christiansen sollte ein einheitlicher cut-off-Wert und ein standardisiertes Verfahren für die Bestimmung der Antiphospholipid-Antikörper ermittelt werden, damit die Studien homogener werden und diese untereinander besser in Beziehung gesetzt werden können (Nielsen und Christiansen 2005). Diese Problematik wird ebenfalls in einer Metaanalyse aus dem Jahr 2011 deutlich (Abou-Nassar et al. 2011).

Swadźba et al. verglichen vier verschiedene *cut-off*-Werte je Antikörper im Zusammenhang mit Thromboserisiko. Es zeigte sich, dass der *cut-off*-Wert von 40 GPL/ml bzw. MPL/ml für Cardiolipin-Antikörper IgG/IgM eine hohe Spezifität aufwies, jedoch nicht sehr sensitiv war.

Desweiteren fanden sie heraus, dass die 95 % Perzentile zwar ein niedrigeres Risiko für Thrombosen darstellte, welches aber immer noch signifikant blieb (95 % CI 1,81-4,48). Weiterhin konnten sie mit diesem *cut-off*-Wert die höchste Sensitivität (68 %) erzielen, jedoch eine erniedrigte Spezifität, so dass sie die 99 % Perzentile bevorzugen (Swadźba et al. 2007).

Nach Pengo et al. ist die Bestimmung des Lupus-Antikoagulans das Verfahren der Wahl um klinisch relevante Antiphospholipid-Antikörper zu erfassen (Pengo et al. 2010). Ebenfalls sind Reber et al. der Meinung, dass ein Verfahren, das die Aktivität der Antikörper aufzeigt, z.B. die Inhibition der Gerinnungsreaktion (Lupus-Antikoagulans), ein besserer Prädiktor für ein erhöhtes Thromboserisiko als ein ELISA, der nur die Anwesenheit von Antikörpern aufdeckt, ohne zu unterscheiden ob sie die Koagulation beeinflussen oder nicht, ist. Dies ist ein Punkt der gegen den Einsatz eines ELISAs spricht, da sie wenig standardisiert sind (Reber et al. 2008).

Nach Galli et al. ist es zurzeit nicht möglich eine Detektion von niedrigen Titern von Cardiolipin-Antikörpern und β_2 -GPI-Antikörpern durchzuführen. Auf dieser Grundlage behaupten Wissenschaftler, dass das ELISA Verfahren für Cardiolipin-Antikörper nicht spezifisch genug ist, um die Antikörper zu detektieren (Galli et al. 2008).

Der wiederholte Nachweis eines positiven Antikörpers reicht bereits aus, um ein von zwei Kriterien der Diagnose des Antiphospholipid-Syndroms zu erfüllen. In den meisten klinischen Laboren wird Lupus-Antikoagulans, Cardiolipin- und β_2 GPI-Antikörper gleichzeitig analysiert und damit die Wahrscheinlichkeit auf einen positiven Test erhöht (Pengo et al. 2006). Von den Ergebnissen der Antikörper-Testung hängt neben der Klinik ab, ob bei einer Patientin die Diagnose des Antiphospholipid-Syndroms gestellt wird, welches wiederum von therapeutischer Bedeutung ist. Sind die verwendeten Methoden sehr empfindlich eingestellt, so fallen die Antikörper schneller positiv aus, das bei passender Klinik Therapiekonsequenzen mit sich bringt. Dies bedeutet, dass bei falsch positiven Ergebnissen die Patientin eine Antikoagulation erhält und damit unter einem erhöhten Blutungs-, HIT- und Osteoporose-Risiko steht. Dabei muss verdeutlicht werden, dass ein positiver Antikörpertest ein nötiges Einschlusskriterium, neben weiteren klinischen zu erfüllenden Kriterien, für die Diagnose des Antiphospholipid-Syndroms ist und kein diagnostischer Test für das Antiphospholipid-Syndrom (Roubey 2010). Sind Testsysteme zu unempfindlich eingestellt, so resultieren vermehrt negative Ergebnisse in der Testung und das Antiphospholipid-Syndrom wird nicht diagnostiziert, obwohl es möglicherweise vorliegt. Somit kann es nicht behandelt werden und die Patientin hat ein erhöhtes Risiko, Thrombosen oder Aborte zu erleiden.

Auf einem Workshop 2010 wurden ein Antiphospholipid ELISA (Louisville APL Diagnostics, Seabrook, USA) und drei Vollautomaten, ACL AcuStar (IL), ein *fluoro-enzyme* Immunoassay (Phadia) und BioPlex 2200 (Bio-Rad, Hercules, USA), miteinander verglichen. Die verschiedenen Methoden unterschieden sich in der Angabe der Einheiten der Titer von Cardiolipin- und β_2 -GPI-Antikörpern. Untersucht wurden Seren von 26 Antiphospholipid-Syndrom Patienten/Patientinnen (Pierangeli et al. 2011). Diese Studie untersuchte kein Abortkollektiv, wie unsere Studie, ist aber trotzdem auf Grund ihrer Ergebnisse erwähnenswert. Im Gegensatz zu unseren Studienergebnissen, fanden Pierangeli et al. eine hervorragende Korrelation der positiven Ergebnisse für die zu testenden Proben. Die negative Kontrollgruppe, die sich aus Proben von gesunden Personen zusammensetzte, wurde von allen Methoden als negativ erkannt. Alle Methoden, vor allem ACL AcuStar und BioPlex 2200, zeigten eine geringe Variation von unter 10 % zwischen den einzelnen Methoden. Ebenfalls zeigten die klinische Sensitivität, Spezifität und der positive prädiktive Wert eine gute Übereinstimmung zwischen den Testsystemen, egal ob es sich um eine händische oder eine automatisierte Methode handelte. Dieses Ergebnis sollte darlegen, dass der Prozess der Standardisierung voranschreitet und sich verbessert (Pierangeli et al. 2011). In unserer Studie spiegelt sich dieser positiv dargestellte Prozess nicht wieder. Es zeigten sich insgesamt Kappa-Werte zwischen -0,2 (Vergleich Cardiolipin-Körper IgM zwischen ImmunoCAP 250 (Phadia) und jeweils den anderen Testsystemen) und 1,0 (Vergleich β_2 -GPI-Antikörper IgM zwischen ImmunoCAP 250 (Phadia) und ACL AcuStar (IL)). Es verdeutlicht eine schlechte bis sehr gute Übereinstimmung der Testsysteme. Dies bedeutet, dass die Testsysteme untereinander sehr verschieden sind und eine weitere Standardisierung, die zur Zeit nach unseren Ergebnissen nicht ausreichend erscheint, erforderlich ist, um eine vergleichbare Diagnostik auf verschiedenen Geräten zu gewährleisten.

Weitere Studien untermauern unsere Feststellung, dass eine Standardisierung der unterschiedlichen Testsysteme noch nicht ausreicht (Kutteh und Franklin 2004, Roberts und Murphy 2000, Tincani et al. 2001). Kutteh und Franklin verglichen Testergebnisse von Antiphospholipid-Antikörper-Testen von 10 verschiedenen medizinischen Zentren, die jeweils einen hauseigenen ELISA für die Analyse nutzten. In jedem Zentrum wurden Cardiolipin-, Phosphatidylserin-, Phosphatidylinositol-, Phosphatidylglycerol- und Phosphatidylethanolamin-Antikörper IgG, IgM und IgA bestimmt. Es wurden 20 Patientenproben analysiert, die zuvor positiv auf ein oder mehr Antiphospholipid-Antikörper getestet wurden. Sie untersuchten zwar kein Abortkollektiv wie wir, aber sie ziehen eine wichtige Schlussfolgerung aus ihren Ergebnissen, der wir zustimmen. Die Übereinstimmung der 10 verschiedenen Labore in den Ergebnissen der 20 Proben in allen verschiedenen Antikörpern betrug lediglich 55 %. Bei der Betrachtung eines Antikörpers und eines Immunglobulins konnte eine Übereinstimmung von 83,8 % erreicht werden. Kutteh und Franklin verdeutlichen damit, dass die Klinik des Patienten-

ten zusätzlich zu den Laborwerten betrachtet werden sollte, da in verschiedenen Laboren, verschiedene Ergebnisse für die gleichen Proben erzielt wurden (Kutteh und Franklin 2004).

Unterstützt werden diese Ergebnisse von einer weiteren Studie von Roberts et al. Diese Studiengruppe verglich Ergebnisse der Bestimmungen von Cardiolipin-Antikörpern IgG/IgM aus drei Laboren von 36 Proben von Frauen mit habituellem Abort und einer Kontrollgruppe von 26 Proben von gesunden Frauen. In den drei Laboren wurde jeweils ein ELISA genutzt, jedoch mit verschiedenen Kits. In Labor 1 wurde ein Kit von Cambridge Life Science gebraucht, in Labor 2 zunächst ein hauseigenes Kit. Dieser wurde dann auf einen Kit von Sigma Diagnostics umgestellt, und in Labor 3 wurde ein Kit von Orgentec Diagnostica verwendet. Kappa betrug für IgG/IgM für Labor 1 und 2 0,02/0,10, für Labor 1 und 3 0,38/0,20 und für Labor 2 und 3 0,16/0,02. Kappa legt dar, dass sich für Cardiolipin-Antikörper IgM zwischen den drei Laboren keine Übereinstimmungen und für Cardiolipin-Antikörper IgG nur eine geringe Übereinstimmung ergaben (Robert et al. 2002). Tincani et al. fanden sehr ähnliche Ergebnisse. Sie schlossen 30 verschiedene Labore mit verschiedenen ELISA-Kits ein, um Bestimmungen von Cardiolipin-Antikörpern IgG/IgM mittels 10 Seren, die von 7 weiblichen und einem männlichen Patienten mit einem diagnostizierten Antiphospholipid-Syndrom und zwei gesunden Frauen stammen, zu vergleichen. In 22 Laboren wurden hauseigene und in 8 Laboren kommerzielle ELISA-Kits verwendet. Unter die kommerziellen Kits fielen zwei Kits von Biomedical Diagnostics, zwei von Inova, einer von Novamed, einer von Eurospital, einer von Kallestad und einer von Imtec. Sie verwanden kein Abortkollektiv, fanden aber vergleichbare Ergebnisse zu unseren Ergebnissen und den Studien von Robert et al., Kutteh und Franklin und Roberts und Murphy. Tincani et al. begründen die starke Variationsbreite zwischen den verschiedenen ELISA-Kits vor allem mit der verschiedenen Nutzung von Kalibrationen und unterschiedlichen Methoden der *cut-off*-Wert-Bestimmung (Tincani et al. 2001).

Eine andere Studie verglich Cardiolipin-Antikörper IgG/IgM und β_2 -GPI-Antikörper IgG/IgM Bestimmungen auf einem ELISA Bindazyme (The Binding Site, Birmingham, UK) mit Zenit ra (A. Menarini Diagnostics) mittels 30 Proben, die von Patienten/Patientinnen mit diagnostizierten Antiphospholipid-Syndrom stammten. Sie fanden eine mittlere Übereinstimmung der beiden Methoden für alle vier Parameter mit einem Kappa von 0,509-0,565 mit einem gewählten *cut-off*-Wert von 10 in der Einheit des jeweiligen Parameters auf Zenit ra an. Die Übereinstimmung der Sensitivität und Spezifität war vom jeweiligen gewählten *cut-off*-Wert abhängig (Persijn et al. 2011). Ebenfalls eine mittlere bis gute Übereinstimmung der Analysemethoden trafen Villalta et al. im Vergleich von 62 Patienten/Patientinnen mit einem diagnostizierten Antiphospholipid-Syndrom und einem Kontrollkollektiv, bestehend aus 20 Syphilispatienten, 33 Patienten mit Lyme-Borreliose, 30 Patienten mit Hepatitis C und assoziierter Kryoglobulinämie und 40 gesunden Patienten/Patientinnen, an. Die verglichenen Analyse-

methoden waren ein Vollautomat EliA-Phadia (Phadia) und zwei kommerzielle ELISA (Orgentec Diagnostika GmbH; Inova, San Diego, CA, USA). Kappa lag bei einem 99 % Perzentil *cut-off*-Wert bei Werten von 0,426 (Vergleich für β_2 -GPI-Antikörper IgG zwischen EliA und Orgentec) bis 0,841 (Vergleich für β_2 -GPI-Antikörper IgM zwischen EliA und Inova) (Villalta et al. 2009). Möglicherweise fanden Persijin et al. und Villalta et al. eine bessere Übereinstimmung der Testsysteme als wir, da sie kein Abortkollektiv untersuchten, sondern Patienten/Patientinnen mit einem diagnostiziertem Antiphospholipid-Syndrom und bei diesen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit positive Antiphospholipid-Antikörper vorlagen und die Testsysteme somit nicht viele grenzwertige Fälle hatten. Dies kann man vor allem an den Daten von Villalta et al. erkennen. Gerade bei den grenzwertigen Fällen konnten wir in unserer Studie Uneinigkeiten der verschiedenen Testsysteme beobachten. Nach Galli et al. ist es derzeit nicht möglich niedrige bzw. grenzwertige Titer von β_2 -GPI-Antikörpern und Cardiolipin-Antikörpern auf ELISAs zu detektieren (Galli et al. 2008).

Kappa hängt davon ab, welche Methoden miteinander verglichen werden. Manche Methoden wiesen mehr Übereinstimmung auf als andere. Dies zeigte sich ebenfalls in unserer Studie, in der die Kappa-Werte bei -0,2 (Vergleich Cardiolipin-Körper IgM zwischen ImmunoCAP 250 (Phadia) und jeweils den anderen Testsystemen) bis 1,0 (Vergleich β_2 -GPI-Antikörper IgM zwischen ImmunoCAP 250 (Phadia) und ACL AcuStar (Instrumentation Laboratory)) lagen. Die Variationen der Übereinstimmungen der verschiedenen Bestimmungsmethoden verdeutlichen erneut, dass auf verschiedenen Geräten für gleiche Proben unterschiedliche Werte erzielt werden. Von den Ergebnissen der Geräte hängen, neben der Klinik des Patienten/der Patientin, die Diagnose und die Therapie ab. Als Ziel weiterer Forschung sollte weiterhin versucht werden, die Standardisierung zu verbessern und möglichst einen „Goldstandard“ zu entwickeln.

Die Ergebnisse der Testsysteme der Abortproben können wir durch die Ergebnisse der Verumgruppe (Teil 3) bestätigen. In der Verumgruppe waren 43 Patienten/Patientinnen mit systemischen Lupus erythematoses, der von niedergelassenen Rheumatologen diagnostiziert wurde. Eines der ACR-Kriterien (*American College of Rheumatology*) für die Diagnose eines systemischen Lupus erythematoses ist eine positive Testung auf Antiphospholipid-Antikörper (Hochberg 1997, Tan et al. 1982). Cardiolipin-Antikörper kommen bei 16-60% der systemischen Lupus erythematoses Patienten und Patientinnen vor (Day et al. 1998), somit wurde in der Verumgruppe von einem hohen Anteil von positiven Antikörperwerten ausgegangen, was sich nicht bestätigt hat. Die geringe Anzahl positiver Ergebnisse für eine Kontrollgruppe liegt möglicherweise daran, dass die Patienten und Patientinnen mit dem klinisch gesicherten systemischen Lupus erythematoses unter Behandlung standen und dadurch die Antikörper-testungen negativ ausgefallen sind. Die meisten Antikörper korrelieren mit der Aktivität des

systemischen Lupus erythematoses. Wenn die Erkrankung gut behandelt wird, sinken die Antikörperkonzentrationen (Sherer et al. 2004). Durch die Senkung der Antikörperwerte kann eine Antwort auf die Therapie gezeigt werden (Cambridge et al. 2006). Außerdem kann über die Zeit eine Schwankung der Antikörper auftreten, die Testsysteme sowie die Behandlung können sich verändert haben und nehmen Einfluss auf die Antikörperwerte (Out et al. 1992). Desweiteren müssen nicht alle Patienten und Patientinnen, die an einem systemischen Lupus erythematoses erkrankt sind, positive Antiphospholipid-Antikörper aufweisen, da die Diagnosestellung sich nach den ACR-Kriterien (*American College of Rheumatology*) richtet und die positiven Antiphospholipid-Antikörper nur zu einem Kriterium von 11 gehört (Tan et al. 1982).

Cohen's Kappa liegt in unserer Verumgruppe für Cardiolipin-Antikörper IgG zwischen -0,04 und 0,63, für Cardiolipin-Antikörper IgM zwischen 0,27 und 1,0, für β_2 -GPI-Antikörper IgG zwischen 0,20 und 0,55 und für β_2 -GPI-Antikörper IgM zwischen 0,55 und 1,0. Mittels Cohen's Kappa können für die Verumgruppe vergleichbare Ergebnisse, wie für das Abortkollektiv, dargestellt werden. Es zeigte sich, dass die Übereinstimmung der einzelnen Geräte sehr stark von schlechter bis guter Übereinstimmung schwankt und kein Ansatz von Standardisierung festzustellen ist.

Ein Abort kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden. Unter einer dieser Ursachen zählen die Antiphospholipid-Antikörper. Die Prävalenz von Antiphospholipid-Antikörpern bei Frauen mit wiederholtem Abort beträgt zwischen 12 und 40 % (Alijotas-Reig et al. 2010, Empson et al. 2002, Lockwood et al. 1989, Parazzini et al. 1991, Zammiti et al. 2006, Reznikoff-Etievant et al. 1999). Für die Diagnostik ist es entscheidend diese Antikörper möglichst fehlerfrei zu detektieren. Mit unserer Studie wollen wir dazu beitragen, dass die Labordiagnostik der Antiphospholipid-Antikörper insofern verbessert wird, dass Unterschiede verschiedener Analyseverfahren und –geräte bewusst werden. Anhand Tabelle 17 zeigt sich, dass Zenit ra (A. Menarini) den höchsten Score bei dem von uns untersuchten automatisierten Verfahren erlangt hat und somit nach unserer Meinung im Vergleich zu den anderen Geräten in den beschriebenen Kriterien am besten für die Diagnostik der Antiphospholipid-Antikörper geeignet ist. Die definitive Bewertung der auf den verschiedenen Testsystemen erzielten Werten kann nur sehr schwierig beurteilt werden, da es keinen „Goldstandard“ gibt und somit kein Vergleich zu einem „wahren“ Wert gezogen werden kann. Mittels Kappa konnte die Übereinstimmung der Ergebnisse der einzelnen Geräte bestimmt werden. Es zeigte sich eine in Teilen gute, im Detail betrachtet jedoch inhomogene Übereinstimmung der einzelnen Testsysteme, woraus man auf eine nicht vorliegende Standardisierung schließen kann.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit gliedert sich in einen retrospektiven und einen prospektiven Teil.

Im retrospektiven Teil der Studie wurde ein selektiertes Patientenkollektiv untersucht. Die Proben dieser Patienten waren auf eine Thrombophilie gescreent worden. Über einen Zeitraum von zwei Jahren konnten bei 1.368 Patienten vollständige Analysespektren, gemäß der in „Material und Methoden“ beschriebenen Vorgaben, ausgewertet werden. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Inzidenz thrombophiler Parameter mit Bezug auf die in der Literatur gängigen Bezugsgrößen von Personen ohne einen Anhalt für eine Thrombophilie. Dieser Teil der Studie diente ferner der Vorbereitung des prospektiven, zweiten Teils der Dissertation und sollte aufzeigen, mit welcher Frequenz positive Ergebnisse für Antiphospholipid-Antikörper vorlagen.

Der prospektive Teil der Studie schloss eingesandte Proben von Patientinnen mit einem anamnestischen Hinweis auf einen oder mehrere Aborte ein. Soweit möglich wurden zusätzlich klinische Daten erhoben. Dieser Teil der Studie sollte dazu dienen, einen Vergleich verschiedener vollautomatisierter und teilautomatisierter Testverfahren, sowie einem manuellen Testverfahren für die Diagnostik von Antiphospholipid-Antikörpern zu ermitteln.

Zunächst zeigte sich anhand errechneter Prozentangaben eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Schlüsselte man diese jedoch genauer auf, bestätigte sich dies nicht. Es wurde deutlich, dass ein Testergebnis derselben Patientin nicht dem Testergebnis eines anderen Testsystems gleicht. Zwischen den Testsystemen wurde daher das statistische Übereinstimmungsmaß mittels Cohen's Kappa ermittelt. Es zeigten sich Kappa-Werte zwischen -0,02 und 1,0 für das Abortkollektiv und zwischen -0,04 und 1,0 für die Kontrollgruppe (Patienten/Patientinnen mit systemischen Lupus erythematoses). Dadurch wird deutlich, dass die Ergebnisse der verschiedenen Testsysteme nur in einem geringen Maß übereinstimmen.

Wir folgern aus den Ergebnissen, dass solange kein „Goldstandard“ bzw. geeignetes standardisiertes Referenzmaterial für die Analytik der Antiphospholipid-Antikörper zur Verfügung steht, die Beurteilung dieser Laborergebnisse in der Gynäkologie und Geburtshilfe kritisch und unter Einbeziehung der Klinik erfolgen sollte.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| ACA | Anti-Cardiolipin Antikörper |
| APC | aktiviertes Protein C |
| APS | Antiphospholipid-Syndrom |
| aPTT | aktivierte partielle Thromboplastinzeit |
| AU | <i>arbitrary unit</i> |
| BMI | Body-Mass-Index |
| CI | Konfidenzintervall |
| C4b-BP | <i>C4b-binding protein</i> |
| DI | Deziliter |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dRVVT | <i>diluted Russell Viper Venom time</i> |
| ELISA | <i>enzym-linked immunosorbent-assay</i> |
| F II M het | heterozygote Faktor II-Mutation |
| F II M hom | homozygote Faktor II-Mutation |
| F V M het | heterozygote Faktor V-Mutation |
| F V M hom | homozygote Faktor V-Mutation |
| g | Erdbeschleunigung 9,81 m/s ² |
| GPL | IgG Phospholipid units |
| HELLP | <i>haemolysis, elevated liver enzyme levels, low platelet count</i> |
| HIT | Heparin-induzierte Thrombozytopenie |
| HPCL | <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Instrumentation Laboratory |
| INR | <i>international normalized ratio</i> |
| ISTH | <i>International Society of Thrombosis and Haemostasis</i> |
| IU | <i>international unit</i> |
| IVF | <i>In vitro</i> Fertilisation |
| kDa | kilo Dalton |
| LA | Lupus-Antikoagulans |
| MAX | Maximum |
| Mg | Milligramm |
| MIN | Minimum |
| Min | Minute |
| MPL | IgM Phospholipid units |
| MTHFR | Methylentetrahydrofolatreduktase |

| | |
|----------------|--|
| OR | Odd's Ratio |
| PAI 1 | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| POF | prämatüre Ovarialinsuffizienz |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> (Drehung pro Minute) |
| SD | Standardabweichung |
| SLE | systemischer Lupus erythematoses |
| SMC | <i>sensoric memorized calibration</i> |
| β_2 -GPI | β_2 -Glykoprotein I |
| β -hCG | humanes Choriongonadotropin |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| tPA | <i>tissue polypeptide antigen</i> |
| TPZ | Thromboplastinzeit |
| vWF | von-Willebrand-Faktor |

7. **Abbildungsverzeichnis**

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Mögliche Pathomechanismen | 15 |
| Abbildung 2: ELISA-Prinzip | 29 |
| Abbildung 3: Amplifizierung einer spezifischen DNA Sequenz durch die PCR..... | 31 |
| Abbildung 4: Verteilung der Antiphospholipid-Antikörper | 43 |
| Abbildung 5: Pathologische Protein C Werte unterhalb des Referenzbereiches | 45 |
| Abbildung 6: Pathologische Protein S Werte unterhalb des Referenzbereiches..... | 45 |
| Abbildung 7: Pathologische Antithrombin Werte unterhalb des Referenzbereiches | 46 |
| Abbildung 8: Faktor II- und Faktor V-Mutationsverteilung | 47 |
| Abbildung 9: Verteilung der Antiphospholipid-Antikörper | 48 |
| Abbildung 10: Verteilung der Messwerte der Antiphospholipid-Antikörper..... | 49 |
| Abbildung 11: Abortverteilung | 51 |
| Abbildung 12: Abortzeitpunkte..... | 51 |
| Abbildung 13: Boxplot CL IgG | 54 |
| Abbildung 14: Boxplot CL IgM..... | 55 |
| Abbildung 15: Boxplot b2GP IgG..... | 55 |
| Abbildung 16: Boxplot b2GP IgM | 56 |
| Abbildung 17: Boxplot CL IgG | 64 |
| Abbildung 18: Boxplot CL IgM..... | 64 |
| Abbildung 19: Boxplot b2GP IgG..... | 65 |
| Abbildung 20: Boxplot b2GP IgM | 65 |

8. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Erworbene und angeborene prädisponierende Faktoren für eine venöse Thromboseneigung..... | 10 |
| Tabelle 2: Risiko einer schwangerschaftsassozierten venösen Thromboembolie bei thrombophilen Frauen ohne vorherige Erkrankung..... | 20 |
| Tabelle 3: Klassifikationskriterien für die Diagnose des systemischen Lupus erythematoses - <i>ACR-Kriterien (American College of Rheumatology)</i> | 25 |
| Tabelle 4: Antiphospholipid-Antikörper-Screening | 42 |
| Tabelle 5: Antiphospholipid-Antikörper Screening..... | 47 |
| Tabelle 6: Abortverteilung..... | 50 |
| Tabelle 7: Positive Testergebnisse..... | 58 |
| Tabelle 8: Übereinstimmung der Ergebnisse CL IgG | 59 |
| Tabelle 9: Übereinstimmung der Ergebnisse CL IgM..... | 60 |
| Tabelle 10: Übereinstimmung der Ergebnisse β 2-GPI IgG | 61 |
| Tabelle 11: Übereinstimmung der Ergebnisse β 2-GPI IgM..... | 62 |
| Tabelle 12: Positive Testergebnisse..... | 66 |
| Tabelle 13: Übereinstimmung der Ergebnisse CL IgG | 67 |
| Tabelle 14: Übereinstimmung der Ergebnisse CL IgM..... | 68 |
| Tabelle 15: Übereinstimmung der Ergebnisse β 2-GPI IgG | 69 |
| Tabelle 16: Übereinstimmung der Ergebnisse β 2-GPI IgM..... | 70 |
| Tabelle 17: Geräteüberblick | 72 |

9. Literaturverzeichnis

- Abildgaard, U. (2007) Antithrombin-early prophecies and present challenges. *Thromb Haemost* 98: 97-104.
- Abou-Nassar, K., Carrier, M., Ramsay, T., Rodger, M. A. (2011) The association between antiphospholipid antibodies and placenta mediated complications: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Res* [Epub ahead of print].
- Adelberg, A. M., Kuller, J. A. (2002) Thrombophilias and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol Surv* 57: 703-709.
- Agarwal, R. P., Peters, S. M., Shemirani, M., Von Ahnen, N. (2007) Improved Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction Detection of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 677C>T and 1298A>C Polymorphisms Using Nearest Neighbor Model-Based Probe Design. *JMD* 9: 345-350.
- Ailus, K., Tulppala, M., Palosuo, T., Ylikorkala, O., Vaarala, O. (1996) Antibodies to beta 2-glycoprotein I and prothrombin in habitual abortion. *Fertil Steril* 66: 937-941.
- Aird, W. C. (2007) Vascular bed-specific thrombosis. *J Thromb Haemost* 5: 283-291.
- Alijotas-Reig, J., Ferrer-Oliveras, R., Rodrigo-Anoro, M. J., Farran-Codina, I., Cabero-Roura, L., Vilardell-Tarres, M. (2010) Anti-beta(2)-glycoprotein-I and anti-phosphatidylserine antibodies in women with spontaneous pregnancy loss. *Fertil Steril* 93: 2330-2336.
- Alijotas-Reig, J., Vilardell-Tarres, M. (2009) Is Obstetric Antiphospholipid Syndrome a Primary Nonthrombotic, Proinflammatory, Complement-Mediated Disorder Related to Antiphospholipid Antibodies? *Obstet Gynecol Surv* 65: 39-45.
- Andrew, M., Paes, B., Milner, R., Johnston, M., Mitchell, L., Tollefsen, D. M., Powers, P. (1987) Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 70: 165-172.
- Arkfeld, D. G., Weitz, I. C. (2009) Immune thrombocytopenia in patients with connective tissue disorders and the antiphospholipid antibody syndrome. *Hematol Oncol Clin N Am* 23: 1239-1249.
- Arnold, J., Holmes, Z., Pickering, W., Farmer, C., Regan, L., Cohen, H. (2001) Anti-beta 2 glycoprotein 1 and anti-annexin V antibodies in women with recurrent miscarriage. *Br J Haematol* 113: 911-914.
- Asherson, R. A., Cervera, R., De Groot, P. G. (2003) Catastrophic antiphospholipid syndrome: International consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 12: 530-534.
- Askanase, A. D. (2004) Estrogen therapy in systemic lupus erythematosus. *Treat Endocrinol* 3: 19-26.

- Baglin, T., Luddington, R., Brown, K., Baglin, C. (2003) Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet* 362: 523-526.
- Balada, E., Ordi-Ros, J., Paredes, F., Villarreal, J., Mauri, M., Vilardell-Tarrés, M. (2001) Antiphosphatidylethanolamine contribute to diagnosis of antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 30: 235-241.
- Bank, I., Libourel, E. J., Middeldorp, S., Van Pampus, E. C., Koopman, M. M., Hamulyák, K., Prins, M. H., Van Der Meer, J., Büller, H. R. (2004) Prothrombin 20210A mutation: a mild risk factor for venous thromboembolism but not for arterial thrombotic disease and pregnancy-related complications in a family study. *Arch Intern Med* 164: 1932-1937.
- Bar, J., Cohen-Sacher, B., Hod, M., Blickstein, D., Lahav, J., Merlob, P. (2000) Low-molecular-weight heparin for thrombophilia in pregnant women. *Int J Gynecol Obstet* 69: 209-213.
- Bates, S. M., Greer, I. A., Hirsh, J., Ginsberg, J. S. (2004) Use of antithrombotic agents during pregnancy: the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 126: 627-644.
- Bellver, J., Pellicer, A. (2009) Ovarian stimulation for ovulation induction and in vitro fertilization in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Fertil Steril* 92: 1803-1810.
- Bergmann, F., Hempel, M. (2008) Diagnosis and clinical symptoms of antiphospholipid syndrome. *Hämostaseologie* 28: 141-149.
- Bergrem, A., Jacobsen, E. M., Skjeldestad, F. E., Jacobsen, A. F., Skogstad, M., Sandset, P. M. (2010) The association of antiphospholipid antibodies with pregnancy-related first time venous thrombosis-a population-based case-control study. *Thromb Res* 125: e222-227.
- Bertina, R. M. (2004) Elevated clotting factor levels and venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33: 399-400.
- Bertina, R. M., Koeleman, B. P., Koster, T., Rosendaal, F. R., Dirven, R. J., De Ronde, H., Van Der Velden, P. A., Reitsma, P. H. (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369: 64-67.
- Bick, R. L., Baker, W. F. Jr. (1994) The antiphospholipid and thrombosis syndromes. *Med Clin North Am* 78: 667-684.
- Biggioggero, M., Meroni, P. L. (2010) The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmun Rev* 9: A299-304.
- Blank, M., Shoenfeld, Y. (2004) Antiphosphatidylserin antibodies and reproductive failure. *Lupus* 13: 661-665.
- Blann, A. D., Lip, G. Y. (2006) Venous thromboembolism. *BMJ* 332: 215-219.

- Blumenfeld, Z., Brenner, B. (1999) Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* 72: 765-774.
- Blumenfeld, Z., Weiner, Z., Lorber, M., Sujov, P., Thaler, I. (1991) Anticardiolipin antibodies in patients with recurrent pregnancy wastage: treatment and uterine blood flow. *Obstet Gynecol* 78: 584-589.
- Boles, J., Mackman, N. (2010) Role of tissue factor in thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus* 19: 370-378.
- Bonini, P., Plebani, M., Ceriotti, F., Rubboli, F. (2002) Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 48: 691-698.
- Branch, D. W., Silver, R. M., Blackwell, J. L., Reading, J. C., Scott, J. R. (1992) Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. *Obstet Gynecol* 80: 614-620.
- Brenner, B., Bar, J., Ellis, M., Yarom, I., Yohai, D., Samueloff, A. (2005a) Effects of enoxaparin on late pregnancy complications and neonatal outcome in women with recurrent pregnancy loss and thrombophilia: results from the LIVE-ENOX study. *Fertil Steril* 84: 770-773.
- Brenner, B., Blumenfeld, Z. (1997) Thrombophilia and fetal loss. *Blood Rev* 11: 72-79.
- Brenner, B., Hoffman, R., Blumenfeld, Z., Weiner, Z., Younis, J. S. (2000) Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin. *Thromb Haemost* 83: 693-697.
- Brenner, B., Sarig, G., Weiner, Z., Younis, Y., Blumenfeld, Z., Lanir, N. (1999) Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 82: 6-9.
- Buchholz, T., Lohse, P., Rogenhofer, N., Kosian, E., Pihusch, R., Thaler, C. J.; (2003) Polymorphism in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 18: 2473-2477.
- Bustos, D., Moret, A., Tambutti, M., Gogorza, S., Testa, R., Ascione, A., Prigoshin, N. (2006) Autoantibodies in Argentine women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 55: 201-207.
- Cambridge, G., Leandro, M. J., Teodorescu, M., Manson, J., Rahman, A., Isenberg, D. A., Edwards, J. C. (2006) B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: Effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum* 54: 3612-3622.
- Castellino, F. J., Ploplis, V. A. (2009) The protein C pathway and pathologic processes. *J Thromb Haemost* 7: 140-145.
- Castoldi, E., Hackeng, T. M. (2008) Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol* 15: 529-536.

- Cattaneo, M. (2006) Hyperhomocysteinemia and Venous Thromboembolism. *Sem Thromb Haemost* 32: 716-723.
- Cervera, R., Piette, J. C., Font, J., Khamashta, M. A., Shoenfeld, Y., Camps, M. T., Jacobsen, S., Lakos, G., Tincani, A., Kontopoulou-Griva, I., Galeazzi, M., Meroni, P. L., Derksen, R. H., De Groot, P. G., Gromnica-Ihle, E., Baleva, M., Mosca, M., Bombardieri, S., Houssiau, F., Gris, J. C., Quéré, I., Hachulla, E., Vasconcelos, C., Roch, B., Fernández-Nebro, A., Boffa, M. C., Hughes, G. R., Ingelmo, M. (2002) Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 46: 1019-1027.
- Christiansen, S. C., Cannegieter, S. C., Koster, T., Vandenbroucke, J. P., Rosendaal, F. R. (2005) Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *JAMA* 293: 2352-2361.
- Chu, A. J. (2006) Tissue factor upregulation drives a thrombosis-inflammation circuit in relation to cardiovascular complications. *Cell Biochem Funct* 24: 173-192.
- Conley, C. L., Hatman, R. C. (1952) A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 31: 621- 622.
- Cowchock, S., Reese, E. A. (1997) Do low-risk pregnant women with antiphospholipid antibodies need to be treated? Organizing Group of the Antiphospholipid Antibody Treatment Trial. *Am J Obst Gynecol* 176: 1099-1100.
- Cowchock, S., Reese, E. A., Balaban, D., Branch, D. W., Plouffe, L. (1992) Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obst Gynecol* 166: 1318-1323.
- Crim, J., Okorodudu, A. (2007) Evaluation of changing patterns in clinical laboratory errors. *Clin Chem* 53: A207.
- Crowther, M. A., Ginsberg, J. S., Julian, J., Denburg, J., Hirsh, J., Douketis, J., Laskin, C., Fortin, P., Anderson, D., Kearon, C., Clarke, A., Geerts, W., Forgie, M., Green, D., Costantini, L., Yacura, W., Wilson, S., Gent, M., Kovacs, M. J. (1995) A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 332: 993-997.
- Cullen, P., Adam, S., Kaiser, B., Neumaier, M. (2009) Diagnosis thrombophilia with particular reference to genetic factors. *J Lab Med* 33: 283-292.
- D'uva, M., Di Micco, P., Strina, I., Ranieri, A., Alviggi, C., Mollo, A., Fabozzi, F., Cacciapuoti, L., Di Frega, M. T., Iannuzzo, M., De Placido, G. (2008) Etiology of hypercoagulable state in women with recurrent fetal loss without other causes of miscarriage from Southern Italy: new clinical target for antithrombotic therapy. *Biologics* 2: 897-902.

- Day, H. M., Thiagarajan, P., Ahn, C., Reveille, J. D., Tinker, K. F., Arnett, F. C. (1998) Autoantibodies to beta2-glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid antibody syndrome: clinical correlations in comparison with other antiphospholipid antibody tests. *J Rheumatol* 25: 667-674.
- De Laat, B., Derksen, R. H. W. M., De Groot, P. G. (2006) High-avidity anti-beta glycoprotein I antibodies highly correlate with thrombosis in contrast to low-avidity anti-beta glycoprotein I antibodies. *J Thromb Haemost* 2006: 1619-1621.
- De Laat, B., Derksen, R. H. W. M., Urbanus, R. T., De Groot, P. G. (2005) IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta2-glycoprotein I cause LAC and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 105: 1540-1545.
- De Stefano, V., Rossi, E., Paciaroni, K., Leone, G. (2002) Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica* 87: 1095-1108.
- Derksen, R. H. W. M., De Groot, P. G., Kater, L., Nieuwenhuis, H. K. (1993) Patients with antiphospholipid antibodies and venous thrombosis should receive long term anticoagulant treatment. *Ann Rheum Dis* 52: 689-692.
- Derksen, R. H. W. M., Khamashta, M. A., Branch, D. W. (2004) Management of the obstetric antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 50: 1028-1039.
- Deruelle, P., Coulon, C. (2007) The use of low-molecular-weight heparins in pregnancy - how safe are they? *Curr Opin Obstet Gynecol* 19: 573-577.
- Deruelle, P., Denervaud, M., Hachulla, E., Ducloy-Bouthors, A. S., Valat, A. S., Puech, F., Trillot, N., Hatron, P. Y., Subtil, D. (2006) Use of low-molecular-weight heparin from the first trimester of pregnancy: a retrospective study of 111 consecutive pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 127: 73-78.
- Devreese, K., Hoylaerts, M. F. (2009) Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome. *Eur J Haematol* 83: 1- 16.
- Dietel, M., Suttorp, N., Zeitz, M. (2005) *Harrisons Innere Medizin*. 16.Auflage. ABW Wissenschaftsverlag. Berlin. 2107-2114.
- Djordjević, V., Rakićević, L., Radojković, D. (2010) An overview of genetic risk factors in thrombophilia. *Srp Arh Celok Lek* 138: 79-81.
- Drake, T. A., Morrissey, J. H., Edgington, T. S. (1989) Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 134: 1087-1097.
- Dulícuek, P., Malý, J., Pesuavová, L., Pecka, M. (2002) Prevalence of inherited thrombophilia in young thrombosis patients from the East Bohemian region. *Blood Coagul Fibrinolysis* 13: 569-573.
- Eby, C. (2009) Antiphospholipid syndrome review. *Clin Lab Med* 29: 305- 319.

- Edelberg, J. M., Pizzo, S. V. (1991) Lipoprotein(a):the link between impaired fibrinolysis and atherosclerosis. *Fibrinolysis* 5: 135-143.
- Empson, M., Lassere, M., Craig, J. C., Scott, J. R. (2002) Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: a systematic review of therapeutic trials. *Obstet Gynecol* 99: 135-144.
- Empson, M., Lassere, M., Craig, J., Scott, J. (2005) Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD002859.
- Erkan, D., Harrison, M. J., Levy, R., Peterson, M., Petri, M., Sammaritano, L., Unalp-Arida, A., Vilela, V., Yazici, Y., Lockshin, M. D. (2007) Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrom: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positiv individuals. *Arthritis Rheum* 56: 2382-2391.
- Erlebacher, A., Zhang, D., Parlow, A. F., Glimcher, L. H. (2004) Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. *J Clin Invest* 114: 39-48.
- Farquharson, R. G., Quenby, S., Greaves, M. (2002) Antiphospholipid syndrome in pregnancy: A randomised, controlled trial of treatment. *Obstet Gynecol* 100: 408-413.
- Fausett, M. B., Vogtlander, M., Lee, R. M., Esplin, M. S., Branch, D. W., Rodgers, G. M., Silver, R. M. (2001) Heparin-induced thrombocytopenia is rare in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 185: 148-152.
- Favaloro, E. J., Wong, R. C., Silvestrini, R., Mcevoy, R., Jovanovich, S., Roberts-Thomson, P. (2005) A multilaboratory peer assessment quality assurance program-based evaluation for anticardiolipin antibody, and beta2-glycoprotein I antibody testing. *Semin Thromb Hemost* 31: 73-84.
- Finazzi, G., Marchioli, R., Brancaccio, V., Schinco, P., Wisloff, F., Musial, J., Baudo, F., Berrettini, M., Testa, S., D'angelo, A., Tognoni, G., Barbui, T. (2005) A randomized clinical trail of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost* 3: 848-853.
- Fleiss, J. L., Cohen, J. (1973) The equivalence of weighted Kappa and intraclass correlation coefficient as measures of reliability. *Educ Psychol Meas* 33: 323-327.
- Fogerty, A. E., Connors, J. M. (2009) Management of inherited thrombophilia in pregnancy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16: 464-469.
- Foka, Z. J., Lambropoulos, A. F., Saravelos, H., Karas, G. B., Karavida, A., Agorastos, T., Zournatzi, V., Makris, P. E., Bontis, J., Kotsis, A. (2000) Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 15: 458-462.

- Forastiero, R. R., Martinuzzo, M. E., Cerrato, G. S., Kordich, L. C., Carreras, L. O. (1997) Relationship of anti beta2-glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 78: 1008-1014.
- Galli, M., Barbui, T. (2003) Antiphospholipid antibodies and thrombosis: strength of association. *Hematol J* 4: 180-186.
- Galli, M., Borrelli, G., Jacobsen, E. M., Marfisi, R. M., Finazzi, G., Marchioli, R., Wisloff, F., Marziali, S., Morboeuf, O., Barbui, T. (2007) Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood* 110: 1178-1183.
- Galli, M., Comfurius, P., Maassen, C.; Hemker, H. C., De Baets, M. H., Van Breda-Vriesman, P. J., Barbui, T., Zwaal, R. F., Bevers, E. M. (1990) Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 335: 1544-1547.
- Galli, M., Luciani, D., Bertolini, G., Barbui, T. (2003) Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 102: 2717-2723.
- Galli, M., Reber, G., De Moerloose, P., De Groot, P. G. (2008) Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemostas* 6: 399-401.
- Galli, M., Ruggeri, L., Barbui, T. (1998) Differential effects on anti-β2-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies on the anticoagulant activity of activated protein C *Blood* 91: 1999-2004.
- Gerhardt, A., Scharf, R. E., Beckmann, M. W., Struve, S., Bender, H. G., Pillny, M., Sandmann, W., Zotz, R. B. (2000) Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 342: 374-380.
- Ginnakopoulos, B., Krilis, S. A. (2009a) How we treat the antiphospholipid syndrome. *Blood* 114: 2020-2030.
- Ginnakopoulos, B., Passam, F., Ioannou, Y., Krilis, S. A. (2009b) How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 113: 985- 994.
- Ginsberg, J. S., Greer, I., Hirsh, J. (2001) Use of antithrombotic agents during pregnancy. *Chest* 119: 122-131.
- Ginsberg, J. S., Wells, P. S., Brill-Edwards, P., Donovan, D., Moffatt, K., Johnston, M., Stevens, P., Hirsh, J. (1995) Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 86: 3685-3691.
- Ginsburg, K. S., Liang, M. H., Newcomer, L., Goldhaber, S. Z., Schur, P. H., Hennekens, C. H., Stampfer, M. J. (1992) Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 117: 997-1002.

- Gladson, C. L., Scharrer, I., Hach, V., Beck, K. H., Griffin, J. H. (1988) The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost* 59: 18-22.
- Grandone, E., Brancaccio, V., Colaizzo, D., Sciannamé, N., Pavone, G., Di Minno, G., Margaglione, M. (2002) Preventing adverse obstetric outcomes in women with genetic thrombophilia. *Fertil Steril* 78: 371-375.
- Grandone, E., Margaglione, M., Colaizzo, D., D'addeda, M., Cappucci, G., Vecchione, G., Sciannamé, N., Pavone, G., Di Minno, G. (1997) Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal loss. *Thromb Haemost* 77: 822-824.
- Greene, M. F. (1999) Spontaneous abortions and major malformations in women with diabetes mellitus. *Semin Reprod Endocrinol* 17: 127-136.
- Greer, I. A. (1999) Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *Lancet* 353: 1258-1265.
- Greer, I. A., Nelson-Piercy, C. (2005) Low-molecular-weight heparins thromboprophylaxis and treatment of venous thromboembolism in pregnancy: a systematic review of safety and efficacy. *Blood* 106: 401-407.
- Gris, J. C., Quéré, I., Sanmarco, M., Boutiere, B., Mercier, E., Amiral, J., Hubert, A. M., Ripart-Neveu, S., Hoffet, M., Tailland, M. L., Rousseau, O., Monpeyroux, F., Dauzat, M., Sampol, J., Daures, J. P., Berlan, J., Marès, P. (2000) Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nimes Obstetricians and Haematologists Study-NOHA. *Thromb Haemost* 84: 228-236.
- Gris, J. C., Ripart-Neveu, S., Maugard, C., Tailland, M. L., Brun, S., Courtieu, C., Biron, C., Hoffet, M., Hédon, B., Marès, P. (1997) Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb Haemost* 77: 1096-1103.
- Group, Clasp Collaborative (1994) CLASP: a randomized trial of low-dose aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia among 9364 pregnant women. CLASP (Collaborative Low-dose Aspirin Study in Pregnancy) Collaborative Group. *Lancet* 343: 619-629.
- Hager, K., Platt, D. (1990) Hämostase im Alter. *Med Welt* 41: 786-790.
- Hamer, J. D., Malone, P. C., Silver, I. A. (1981) The PO₂ in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis. *Br J Surg* 68: 166-170.
- Harris, E. N. (1992) Serological detection of antiphospholipid antibodies. *Stroke* 23: 13-6.
- Harris, E. N., Gharavi, A. E., Boey, M. L., Patel, B. M., Mackworth-Young, C. G., Loizou, S., Hughes, G. R. (1983) Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2: 1211-1214.

- Haywood, L., Brown, M. D. (1991) Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 34: 1-17.
- Heeb, M. J., Kojima, Y., Greengard, J. S., Griffin, J. H. (1995) Activated protein C resistance: molecular mechanism based on studies using purified Gln506-factor V. *Blood* 85: 3405-3411.
- Heijboer, H., Brandjes, D. P., Büller, H. R., Sturk, A., Ten Cate, J. W. (1990) Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in out-patients with deep-venous thrombosis. *N Engl J Med* 323: 1512-1516.
- Heilmann, L. (2004) Disorders of haemostasis in obstetrics and gynaecology. *Hämostaseologie* 24: 252-260.
- Heilmann, L. D. J., Ludwig, M., Mallmann, P., Tempfer, C., Thaler, C. J., Con Wolff, M., Würfel, W. (2008) Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen "Diagnostik und Therapie beim wiederholten Spontanabort": Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. (DGGG). Arbeitsgemeinschaft Immunologie für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. (AGIM) 1-13.
- Heilmann, L., Rath, W. (2002) Thrombophilie in der Schwangerschaft. Unimed Bremen
- Higashiro, M., Takakuwa, K., Arakawa, M., Tamura, M., Yasuda, M., Tanaka, K. (1998) Anti-cardiolipin antibody and anti-cardiolipin beta-2-glycoprotein I antibody in patients with recurrent fetal miscarriage. *J Perinat Med* 26: 384-389.
- Hochberg, M. C. (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1725.
- Ieko, M., Ichikawa, K., Triplett, D. A., Matsuura, E., Atsumi, T., Sawada, K., Koike, T. (1999) β 2-Glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum* 42: 167-174.
- Ioannou, Y., Pericleous, C., Giles, I., Latchman, D. S., Isenberg, D. A., Rahman, A. (2007) Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum* 56: 280-290.
- James, A. H. (2009) Venous thromboembolism in pregnancy. *Thromb Vasc Biol* 29: 326-331.
- Juul, K., Tybjaerg-Hansen, A., Schnohr, P., Nordestgaard, B. G. (2004) Factor V Leiden and the risk for venous thromboembolism in the adult Danish population. *Ann Intern Med* 140: 330-337.
- Kasthuri, R. S., Roubey, R. A. (2007) Warfarin and the antiphospholipid syndrome: does one size fit all? *Arthritis Rheum* 57: 1346-1347.
- Kearon, C., Gent, M., Hirsh, J., Weitz, J., Kovacs, M. J., Anderson, D. R., Turpie, A. G., Green, D., Ginsberg, J. S., Wells, P., Mackinnon, B., Julian, J. A. (1999) A

- comparison of three months of anticoagulation with extended anticoagulation for a first episode of idiopathic venous thromboembolism. *N Engl J Med* 340: 901-907.
- Khamatshta, A. M., Cuadrado, M. J., Mujic, F., Taub, N. A., Hunt, B. J., Huges, G. R. V. (1995) The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med* 332: 993-997.
- Khan, S., Dickerman, J. D. (2006) Hereditary thrombophilia. *Thrombosis Journal* 4: 15.
- Kluft, C. (2007) Effects of hormone treatment on hemostasis variables. *Climacteric* 10: 32-37.
- Kominiarek, M. A.;Angelopoulos, S. M., Shapiro, N. L.;Studee, L., Nutescu, E. A., Hibbard, J. U. (2007) Low-molecular-weight heparin in pregnancy: peripartum bleeding complications. *J Perinatol* 27: 320-334.
- Koster, T., Rosendaal, F. R., Briët, E., Van Der Meer, F. J., Colly, L. P., Trienekens, P. H., Poort, S. R., Reitsma, P. H., Vandenbroucke, J. P. (1995) Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: An infrequent but clear risk factor for venous thrombosis. *Blood* 85: 2756-2761.
- Koster, T., Rosendaal, F. R., De Ronde, H., Briët, E., Vandenbroucke, J. P., Bertina, R. M. (1993) Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 342: 1503-1506.
- Krabbendam, I., Franx, A., Bots, M. L., Fijnheer, R., Bruinse, H. W. (2005) Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 118: 143-153.
- Kutteh, W. H. (1996) Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone. *Am J Obst Gynecol* 174: 1584-1589.
- Kutteh, W. H., Ermel, L. D. (1996) A clinical trial for the treatment of antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss with lower dose heparin and aspirin. *Am J Reprod Immunol* 35: 402-407.
- Kutteh, W. H., Franklin, R. D. (2004) Assessing the variation in antiphospholipid antibody (APA) assays: Comparison of results from 10 centers. *Am J Obst Gynecol* 191: 440-448.
- Kutteh, W. H., Park, V. M., Deitcher, S. R. (1999) Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 71: 1048-1053.
- Lane, D. A., Caso, R. (1989) Antithrombin: structure, genomic organization, function and inherited deficiency. *Baillières Clin Haematol* 2: 961-998.
- Lane, D. A., Grant, P. J. (2000) Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 95: 1517-1532.

- Lane, D. A., Mannucci, P. M., Bauer, K. A., Bertina, R. M., Bochkov, N. P., Boulyjenkov, V., Chandy, M., Dahlbäck, B., Ginter, E. K., Miletich, J. P., Rosendaal, F. R., Seligsohn, U. (1996) Inherited thrombophilia. Part 2. *Thromb Haemost* 76: 824-834.
- Laskin, C. A., Bombardier, C., Hannah, M. E., Mandel, F.P., Ritchie, J.W., Farewell, V., Farine, D., Spitzer, K., Fielding, L., Soloninka, C. A., Yeung, M. (1997) Prednisone and aspirin in women with autoantibodies and unexplained recurrent fetal loss. *N Engl J Med* 337: 148-153.
- Lee, E. Y., Lee, C. K., Lee, T. H., Chung, S. M., Kim, S. H., Cho, Y. S., Yoo, B., Moon, H. B. (2003) Does the anti-beta2-glycoprotein I antibody provide additional information in patients with thrombosis? *Thromb Res* 111: 29-32.
- Lee, R. M., Branch, D. W., Silver, R. M. (2001) Immunglobulin A anti-beta2-glycoprotein antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. *Am J Obst Gynecol* 185: 748-753.
- Lee, R. M., Emlen, W., Scott, J. R., Branch, D. W., Silver, R. M. (1999) Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in women with recurrent spontaneous abortion, unexplained fetal death, and antiphospholipid syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 181: 642-648.
- Levine, S. R., Brey, R. L., Tilley, B. C., Thompson, J. L., Sacco, R. L., Sciacca, R. R., Murphy, A., Lu, Y., Costigan, T. M., Rhine, C., Levin, B., Triplett, D. A., Mohr, J. P., Investigators, Apass (2004) Antiphospholipid antibodies and subsequent thrombo-occlusive events in patients with ischemic stroke. *JAMA* 2912: 576-584.
- Li, T. C., Iqbal, T., Anstie, B., Gillham, J., Amer, S., Wood, K., Laird, S. (2002a) An analysis of the pattern of pregnancy loss in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 78: 1100-1106.
- Li, T. C., Makris, M., Tomsu, M., Tuckerman, E., Laird, S. (2002b) Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 8: 463-481.
- Liberti, G., Bertina, R. M., Rosendaal, F. R. (1999) Hormonal state rather than age influences cut-off values of protein S: reevaluation of the thrombotic risk associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 82: 1093-1096.
- Liddell, H. S., Pattison, N. S., Zanderigo, A. (1991) Recurrent miscarriage-outcome after supportive care in early pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 31: 320-322.
- Liddell, H. S., Sowden, K., Farquhar, C. M. (1997) Recurrent miscarriage: screening for polycystic ovaries and subsequent pregnancy outcome. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 37: 402-406.
- Lim, W. (2009) Antiphospholipid antibody syndrome. *Hematology* 233-239.
- Lindhoff-Last, E., Luxembourg, B., Pabinger, I. (2008) Update Thrombophilie. *Hämostaseologie* 28: 365-375.
- Lindqvist, P. G., Dahlback, B. (2000) Bleeding complications associated with low molecular weight heparin prophylaxis during pregnancy. *Thromb Haemost* 84: 140-141.

- Lindqvist, P. G., Svensson, P. J., Marsàl, K., Grennert, L., Luterkort, M., Dahlbäck, B. (1999) Activated protein C resistance (FV:Q506) and pregnancy. *Thromb Haemost* 81: 532-537.
- Linnemann, B., Lindhoff-Last, E. (2005a) *Virchow-Trias*. Erstaufgabe 2005. Springer Medizin Verlag. Heidelberg. 40-44.
- Lisman, T., De Groot, P. G., Meijers, J. C., Rosendaal, F. R. (2005) Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 105: 1102-1105.
- Lockwood, C. J., Romero, R., Feinberg, R. F., Clyne, L. P., Coster, B., Hobbins, J. C. (1989) The prevalence and biologic significance of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a general obstetric population. *Am J Obstet Gynecol* 161: 369-373.
- Loelinger, A. (1959) Prothrombin as a cofactor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus. *Thromb Diath Haemorrh* 3: 273-276.
- Löffler, G., Petrides, P. (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. 17. Auflage. Springer Medizin Verlag. Heidelberg. 247-248.
- Lowe, C. R. (1996) Analytical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 7: 1-3.
- Luxembourg, B., Krause, M., Lindhoff-Last, E. (2007) *Basiswissen Gerinnungslabor*. Dtsch Arztebl 104: 1489-1498.
- Lynch, A., Byers, T., Emlen, W., Rynes, D., Shetterly, S. M., Hamman, R. F. (1999) Association of antibodies to beta2-glycoprotein 1 with pregnancy loss and pregnancy-induced hypertension: a prospective study in low-risk pregnancy. *Obstet Gynecol* 93: 193-198.
- Lynch, A., Marlar, R., Murphy, J., Davila, G., Santos, M., Rutledge, J., Emlen, W. (1994) Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome. A prospective study. *Ann Intern Med* 120: 470-475.
- Maclean, P. S., Tait, R. C. (2007) Hereditary and acquired antithrombin deficiency: epidemiology, pathogenesis and treatment options. *Drugs* 67: 1429-1440.
- Male, C., Foulon, D., Hoogendoorn, H., Vegh, P., Silverman, E., David, M., Mitchell, L. (2005) Predictive value of persistent versus transient antiphospholipid antibody subtypes for the risk of thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 106: 4152-4158.
- Marlar, R. A. (2001) The protein C system - how complex is it? *Thromb Haemost* 85: 756-757.
- Martinelli, I., De Stefano, V., Taioli, E., Paciaroni, K., Rossi, E., Mannucci, P. M. (2002) Inherited thrombophilia and first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium. *Thromb Haemost* 87: 791-795.
- Martinelli, I., Manucci, P. M., Distephano, V., Taioli, E., Rossi, V., Crosti, F., Paciaroni, K., Leone, G., Faioni, E. (1998) Different risks of thrombosis in four coagulation defects

- associated with inherited thrombophilia: A study of 150 families. *Blood* 92: 2353-2358.
- Martinez-Frias, M. L., Rodriguez-Pinilla, E., Prieto, L. (1997) Prenatal exposure to salicylates and gastroschisis: a case-control study. *Teratology* 56: 241-243.
- Maslovitz, S., Many, A., Landsberg, J. A., Varon, D., Lessing, J. B., Kupferminc, M. J. (2005) The safety of low molecular weight heparin during labor. *J Matern Fetal Neonatal Med* 17: 39-43.
- Mathur, R., Kailasam, C., Jenkins, J. (2007) Review of the evidence base of strategies to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Fertil* 10: 75-85.
- Meinardi, J. R., Middeldorp, S., De Kam, P. J., Koopman, M. M., Van Pampus, E. C., Hamulyák, K., Prins, M. H., Büller, H. R., Van Der Meer, J. (1999) Increased risk for fetal loss in carriers of the factor V Leiden mutation. *Ann Intern Med* 130: 736-739.
- Merriman, L., Greaves, M. (2006) Testing for thrombophilia: an evidence based approach. *Postgrad Med J* 82: 699-704.
- Mezzesimi, A., Florio, P., Reis, F. M., D'aniello, G., Sabatini, L., Razzi, S., Fineschi, D., Petraglia, F. (2007) The detection of anti-beta2-glycoprotein I antibodies is associated with increased risk of pregnancy loss in women with threatened abortion in the first trimester. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 133: 164-168.
- Michiels, J. J., Hamulyák, K. (1998) Laboratory diagnosis of hereditary thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 24: 309-320.
- Miletich, J. P. (1990) Laboratory diagnosis of protein C deficiency. *Sem Thromb Haemost* 16: 169-176.
- Mitic, G., Kovac, M., Jurisic, D., Djordjevic, V., Ilic, V., Salatic, I., Spasic, D., Novakov Mikic, A. (2011) Clinical Characteristics and Type of Thrombophilia in Women with Pregnancy-Related Venous Thromboembolic Disease. *Gynecol Obstet Invest Epub* ahead of print.
- Miyakis, S., Lockshin, M. D., Atsumi, T., Branch, D. W., Brey, R. L., Cervera, R., Derksen, R. H., De Groot, P. G., Koike, T., Meroni, P. L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P. G., Krilis, S. A. (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4: 295-306.
- Moll, S., Ortel, T. L (1997) Monitoring warfarin therapy in patients with lupus anticoagulants. *Ann Intern Med* 127: 177-185.
- Morikawa, M., Yamada, T., Yamada, T., Shimada, S., Koyama, T., Cho, K., Minakami, H. (2010) Pregnancy-induced antithrombin deficiency. *J Perinat Med* 38: 379-385.
- Mtiraoui, N., Zammiti, W., Fekih, M., Hider, S., Almawi, W. Y., Mahjoub, T. (2007) Lupus anticoagulant and antibodies to beta 2-glycoprotein I, annexin V, and cardiolipin as a cause of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 88: 1458-1461.

- Nash, M. J., Camilleri, R. S., Kunka, S., Mackie, I. J., Machin, S. J. Cohen, H. (2004) The anticardiolipin assay is required for sensitive screening for antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2: 1077-1081.
- Nielsen, H. S., Christiansen, O. B. (2005) Prognostic impact of anticardiolipin antibodies in women with recurrent miscarriage negative for the lupus anticoagulant. *Hum Reprod* 20: 1720-1728.
- Nobel, L. S., Kutteh, W. H., Lashey, N., Franklin, R. D., Herrada, J. (2005) Antiphospholipid antibodies associated with recurrent pregnancy loss: prospective, multicenter, controlled pilot study comparing treatment with low-molecular-weight heparin versus unfractionated heparin. *Fertil Steril* 83: 684-690.
- Nowak-Göttl, U., Kosch, A., Schlegel, N. (2003) Neonatal thromboembolism. *Sem Thromb Haemost* 29: 227-234.
- Oger, E., Lacut, K., Le Gal, G., Couturaud, F., Guénet, D., Abalain, J. H., Roguedas, A. M., Mottier, D., Group, Edith Collaborative Study (2006) Hyperhomocysteinemia and low B vitamin levels are independently associated with venous thromboembolism: results from the EDITH study: a hospital-based case-control study. *J Thromb Haemost* 4: 793-799.
- Ogunyemi, D., Cuellar, F., Ku, W., Arkel, Y. (2003) Association between inherited thrombophilias, antiphospholipid antibodies, and lipoprotein A levels and venous thromboembolism in pregnancy. *Am J Perinatol* 20: 17-24.
- Oku, K., Atsumi, T., Amengual, O., Koike, T. (2008) Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Sem Thromb Haemost* 34: 335-339.
- Opatrny, L., David, M., Kahn, S. R., Shrier, I., Rey, E. (2006) Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metaanalysis. *J Rheumatol* 33: 2214-2221.
- Osinbowale, O., Ali, L., Chi, Y.W. (2010) Venous thromboembolism: a clinical review. *Postgrad Med* 122: 54-65.
- Out, H. J., Van Vliet, M., De Groot, P. G., Derksen, R. H. (1992) Prospective study of fluctuations of lupus anticoagulant activity and anticardiolipin antibody titre in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 51: 535-537.
- Pabinger, I., Kyrle, P. A., Speiser, W., Stoffels, U., Jung, M., Lechner, K. (1990) Diagnosis of protein C deficiency in patients on oral anticoagulant treatment: comparison of three different functional protein C assays. *Thromb Haemost* 63: 407-412.
- Palomo, I., Segovia, F., Ortega, C., Pierangeli, S. (2009) Antiphospholipid syndrome: a comprehensive review of a complex and multisystemic disease. *Clin Exp Rheumatol* 27: 668-677.
- Pangborn, M. C. (1942) Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *J Biol Chem* 143: 247.

- Papanikolaou, E. G., Tournaye, H., Verpoest, W., Camus, M., Vernaev, V., Van Steirteghem, A., Devroey, P. (2005) Early and late ovarian hyperstimulation syndrome: early pregnancy outcome and profile. *Hum Reprod* 20: 636-641.
- Parazzini, F., Acaia, B., Faden, D., Lovotti, M., Marelli, G., Cortelazzo, S. (1991) Antiphospholipid antibodies and recurrent abortion. *Obstet Gynecol* 77: 854-858.
- Parke, A. L., Wilson, D., Maier, D. (1991) The prevalence of antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortion, women with successful pregnancies, and women who have never been pregnant. *Arthritis Rheum* 34: 1231-1235.
- Pasquali, J.-L., Poindrom, V., Korganow, A.-S., Martin, T. (2008) The antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 381-845.
- Patnaik, M. M., Moll, S. (2008) Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 14: 1229-1239.
- Pattison, N. S., Chamley, L. W., Birdsall, M., Zanderigo, A. M., Liddell, H. S., Mcdougall, J. (2000) Does aspirin have a role in improving pregnancy outcome for women with the antiphospholipid syndrome? A randomized controlled trial. *Am J Obst Gynecol* 183: 1008-1012.
- Pattison, N. S., Chamley, L. W., Mckay, E. J., Liggins, G. C., Butler, W. S. (1993) Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical associations. *Br J Obstet Gynaecol* 100: 909-913.
- Pengo, V., Biasiolo, A., Bison, E., Chantarangkul, V., Tripodi, A., (Fcsa), Italian Federation of Anticoagulation Clinics (2007) Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I activity. *Thromb Res* 120: 127-133.
- Pengo, V., Ruffatti, A., Iliceto, S. (2006) The diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *J Pathophysiol Haemost Thromb* 35: 175-180.
- Pengo, V., Ruffatti, A., Legnani, C., Gresele, P., Barcellona, D., Erba, N., Testa, S., Marongiu, F., Bison, E., Denas, G., Banzato, A., Padayattil, J. S., Iliceto, S. (2010) Clinical course of high risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 8: 237-242.
- Pengo, V., Thiagarajan, P., Shapiro, S. S., Heine, M. J. (1987) Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood* 70: 69-76.
- Pengo, V., Tripodi, A., Reber, G., Rand, J. H., Ortel, T. L., Galli, M., De Groot, P. G. (2009) Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 7: 1737-1740.
- Perry, S. L., Ortel, T.L. (2003) Clinical and laboratory evaluation of thrombophilia. *Clin Chest Med* 24: 153-170.
- Persijn, L., Decavele, A., Schouwers, S., Devreese, K. (2011) Evaluation of a new set of automated chemiluminescence assay for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I

- antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* [Epub ahead of print].
- Pichler, E., Pichler, L. (2008) The neonatal coagulation system and the vitamin K deficiency bleeding - a mini review. *Wien Med Wochenschr* 158: 385-395.
- Pierangeli, S. S., De Groot, P. G., Dlott, J., Favaloro, E., Harris, E. N., Lakos, G., Ortel, T., Meroni, P. L., Otomo, K., Pengo, V., Tincani, A., Wong, R., Roubey, R. (2011) 'Critical' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th international congress on antiphospholipid antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus* 20: 182-190.
- Pihusch, R., Buchholz, T., Lohse, P., Rubsamen, H., Rogenhofer, N., Hasbargen, U., Hiller, E., Thaler, C. J. (2001) Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 46: 124-131.
- Preston, F. E., Rosendaal, F. R., Walker, I. D., Briët, E., Berntorp, E., Conard, J., Fontcuberta, J., Makris, M., Mariani, G., Noteboom, W., Pabinger, I., Legnani, C., Scharrer, I., Schulman, S., Van Der Meer, F. J. (1996) Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 348: 913-916.
- Rabe, T., Ludwig, M., Luxembourg, B., Bauersachs, R. (2009) Thrombophilie in der Gynäkologie und Geburtshilfe. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 6: 156-164.
- Rai, R. (2000) Obstetric management of antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity* 15: 203-207.
- Rai, R., Cohen, H., Dave, M., Regan, L. (1997) Randomized controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ* 314: 253-257.
- Rai, R., Regan, L. (2002) Antiphospholipid syndrome in pregnancy: a randomized controlled trial of treatment. *Obstet Gynecol* 100: 1354.
- Rai, R. S., Clifford, K., Cohen, H., Regan, L. (1995) High prospective fetal loss rate in untreated pregnancies of women with recurrent miscarriage and antiphospholipid antibodies. *Hum Reprod* 10: 3301-3304.
- Rance, A., Emmerich, J., Fissinger, J. N. (1997) Anticardiolipin antibodies and recurrent thromboembolism. *Thromb Haemost* 77: 221-222.
- Raziel, A., Kornberg, Y., Friedler, S., Schachter, M., Sela, B. A., Ron-El, R. (2001) Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *AJRI* 45: 65-71.
- Reber, G., Arvieux, J., Comby, E., Degenne, D., De Moerloose, P., Sanmarco, M., Potron, G. (1995) Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. The Working Group on Methodologies in Haemostasis from

- the GEHT (Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose). *Thromb Haemost* 73: 444-452.
- Reber, G., Boehlen, F., De Moerloose, P. (2008) Technical aspects in laboratory testing for antiphospholipid antibodies: is a standardisation an impossible dream? *Sem Thromb Haemost* 34: 340-346.
- Reber, G., De Moerloose, P. (2004) Anti-beta2-glycoprotein I antibodies-when and how should they be measured? *Thromb Res* 114: 527-531.
- Regan, L., Rai, R. (2002) Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 55: 163-180.
- Rey, E., Kahn, S. R., David, M., Shrier, I. (2003) Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 361: 901-908.
- Rezende, S. M., Simmonds, R. E., Lane, D. A. (2004) Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* 103: 1192-1201.
- Reznikoff-Etievant, M. F., Cayol, V., Carbonne, B., Robert, A., Coulet, F., Milliez, J. (2001) Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 108: 1251-1254.
- Reznikoff-Etievant, M. F., Cayol, V., Zou, G. M., Abuaf, N., Robert, A., Johanet, C., Milliez, J. (1999) Habitual abortions in 678 healthy patients: investigation and prevention. *Hum Reprod* 14: 2106-2109.
- Ridker, P. M., Miletich, J. P., Buring, J. E., Ariyo, A. A., Price, D. T., Manson, J. E., Hill, J. A. (1998) Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Ann Intern Med* 128: 1000-1003.
- Robert, J. M., Macara, L. M., Chalmers, E. A., Smith, G. C. (2002) Inter-assay variation in antiphospholipid antibody testing. *BJOG* 109: 348-349.
- Roberts, C. P., Murphy, A. A. (2000) Endocrinopathies associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 18: 357-362.
- Rombos, A., Evangelopoulou-Katsiri, E., Leventakou, A., Voumvourakis, K., Triantafyllou, N., Papageorgiou, C. (1990) Serum IgG and IgM anticardiolipin antibodies in neurological diseases. *Acta Neurol Scand* 81: 243-245.
- Rosborough, T. K., Shepherd, M. F. (2004) Unreliability of international normalized ratio for monitoring warfarin therapy in patients with lupus anticoagulant. *Pharmacotherapy* 24: 838-842.
- Rosendorff, A., Dorfman, D. M. (2007) Activated protein C resistance and factor V Leiden: a review. *Arch Pathol Lab Med* 131: 866-871.
- Roubey, R. A. (2010) Risky business: the interpretation, use, and abuse of antiphospholipid antibody tests in clinical practice. *Lupus* 19: 440-445.

- Ruffatti, A., Olivieri, S., Tonello, M., Bortolati, M., Bison, E., Salvan, E., Facchinetti, M., Pengo, V. (2008) Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost* 6: 1693-1696.
- Ruffatti, A., Tonello, M., Cavzzana, A., Bagatella, P., Pengo, V. (2009) Laboratory classification categories and pregnancy outcome in patients with primary antiphospholipid syndrome prescribed antithrombotic therapy. *Thromb Res* 123: 482-487.
- Ruiz-Irastorza, G., Hunt, B. J., Kamashta, M. A. (2007) A systematic review of secondary thromboprophylaxis in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis Care Res* 57: 1487-1495.
- Ruiz-Irastorza, G., Kamashta, M. A. (2008) Lupus and pregnancy: ten questions and some answers. *Lupus* 17: 416-420.
- Said, J. M., Ignjatovic, V., Monagle, P. T., Walker, S. P., Higgins, J. R., Brennecke, S. P. (2010) Altered reference ranges for protein C and protein S during early pregnancy: Implications for the diagnosis of protein C and protein S deficiency during pregnancy. *Thromb Haemost* 103: 984-988.
- Sailer, T., Zoghalmi, C., Kurz, C., Rumpold, H., Quehenberger, P., Panzer, S., Pabinger, I. (2006) Anti-beta2-glycoprotein I antibodies are associated with pregnancy loss in women with the lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 95: 796-801.
- Salemink, I., Blezer, R., Willems, G. M., Galli, M., Bevers, E., Lindhout, T. (2000) Antibodies to beta2-glycoprotein I associated with antiphospholipid syndrome suppress the inhibitory activity of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 84: 653-656.
- Sanmarco, M., Boffa, M.-C. (2009) Antiphosphatidylethanolamine antibodies and the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 18: 920- 923.
- Sanson, B. J., Friederich, P. W., Simoni, P., Zanardi, S., Hilsman, M. V., Girolami, A., Ten Cate, J. W., Prins, M. H. (1996) The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C- and protein S- deficient women. *Thromb Haemost* 75: 387-388.
- Sanson, B. J., Lensing, A. W., Prins, M. H., Ginsberg, J. S., Barkagan, Z. S., Lavenne-Pardonge, E., Brenner, B., Dulitzky, M., Nielsen, J. D., Boda, Z., Turi, S., Mac Gillavry, M. R., Hamulyák, K., Theunissen, I. M., Hunt, B. J., Büller, H. R. (1999) Safety of low-molecular-weight-heparin in pregnancy: a systematic review. *Thromb Haemost* 81: 668-672.
- Santamaría, A., Mateo, J., Oliver, A., Menéndez, B., Souto, J. C., Borrell, M., Soria, J. M., Tirado, I., Fontcuberta, J. (2001) Risk of thrombosis associated with oral contraceptives of women from 97 families with inherited thrombophilia: high risk of thrombosis in carriers of the G20210A mutation of the prothrombin gene. *Haematologica* 86: 965-971.

- Sarig, G., Younis, J. S., Hoffman, R., Lanir, N., Blumenfeld, Z., Brenner, B. (2002a) Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* 77: 342-347.
- Sarig, G., Younis, J. S., Hoffman, R., Lanir, N., Blumenfeld, Z., Brenner, B. (2002b) Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* 77: 342-347.
- Schaefer, C., Spielmann, H. (2001) *Arzneiverordnung in Schwangerschaft und Stillzeit*. 6. Auflage. Urban & Fischer Verlag. München. 32-35; 162-164.
- Segal, J. B., Brotman, D. J., Necochea, A. J., Emadi, A., Samal, L., Wilson, L. M., Crim, M. T., Bass, E. B. (2009) Predictive Value of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A in Adults With Venous Thromboembolism and in Family Members of Those With a Mutation: A Systematic Review. *JAMA* 301: 2472-2485.
- Seligsohn, U., Lubetsky, A. (2001) Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 344: 1222-1231.
- Sherer, Y., Gorstein, A., Fritzler, M. J., Shoenfeld, Y. (2004) Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 34: 501-537.
- Shi, W., Chong, B. H., Hogg, P. J., Chesterman, C. N. (1993) Anticardiolipin antibodies block the inhibition by β 2-glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets. *Thromb Haemost* 70: 342-345.
- Silver, R. K., Macgregor, S. N., Sholl, J. S., Hobart, J. M., Neerhof, M. G., Ragin, A. (1993) Comparative trial of prednisone plus aspirin versus aspirin alone in the treatment of anticardiolipin antibody-positive obstetric patients. *Am J Obst Gynecol* 169: 1411-1417.
- Simmelink, M. J., Derksen, R. H., Arnout, J., De Groot, P. G. (2003) A simple method to discriminate between β 2-glycoprotein I- and prothrombin-dependent lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost* 1: 740-747.
- Simpson, J. L., Larson, S. A., Chesney, C., Lanley, M. R., Metzger, B., Aarons, J., Holmes, L. B., Jovanovic-Peterson, L., Knopp, R., Mills, J. L. (1998) Lack of association between antiphospholipid antibodies and first trimester spontaneous abortion: prospective study of pregnancies detected within 21 days of conception. *Fertil Steril* 69: 814-820.
- Slone, D., Siskind, V., Heinonen, O. P. (1976) Aspirin and congenital malformations. *Lancet* 1: 1373-1375.
- Souza, S. S., Ferriani, R. A., Pontes, A. G., Zago, M. A., Franco, R. F. (1999) Factor V Leiden and factor II G20210A mutations in patients with recurrent abortion. *Hum Reprod* 14: 2448-2450.

- Steck, T. B. S., Marzusch, K. (1977) Strategien zur Abortprophylaxe bei einer Vorgeschichte mit wiederholten Aborten. *Fertilität* 13: 7-13.
- Stegnar, M. (2010) Review: Thrombophilia screening - at the right time, for the right patient, with a good reason. *Clin Chem Lab Med* 48: 105-113.
- Stein, P. D., Coleman, R. E., Gottschalk, A., Saltzman, H. A., Terrin, M. L., Weg, J. G. (1991) Clinical, laboratory roentgenographic, and electrographic findings in patients with acute pulmonary embolism and no pre-existing cardiac or pulmonary disease. *Chest* 100: 598-603.
- Stephenson, M. D., Ballem, P. J., Tsang, P., Purkiss, S., Ensworth, S., Houlihan, E., Ensom, M. H. (2004) Treatment of antiphospholipid antibody syndrome (APS) in pregnancy: a randomized pilot trial comparing low molecular weight heparin to unfractionated heparin. *J Obstet Gynaecol Can* 26: 729-734.
- Stiefelhagen, P. (2000) Thrombose ABC. Erstaufgabe 2000. Urban& Vogel. München. 11-13; 52- 53.
- Swadźba, J., Iwaniec, T., Szczeklik, A., Musiał, J. (2007) Revised classification criteria for antiphospholipid syndrome and the thrombotic risk in patients with autoimmune diseases. *J Thromb Haemost* 5: 1883-1889.
- Szczepanski, M., Bauer, A., Gardas, A., Duchinski, T. (1998) Antiphospholipid antibodies and lipoprotein(a) in women with recurrent fetal loss. *Int J Gynecol Obstet* 61: 39-44.
- Tait, R. C., Walker, I. D., Perry, D. J., Islam, S. I., Daly, M. E., McCall, F., Conkie, J. A., Carrell, R. W. (1994) Prevalence of antithrombin deficiency in the health population. *Br J Haematol* 87: 106-112.
- Takeya, H., Mori, T., Gabazza, E. C., Kuroda, K., Deguchi, H., Matura, E., Ichikawa, K., Koike, T., Susuki, K. (1997) Anti- β 2-glycoprotein (β 2GPI) monoclonal antibodies with lupus anticoagulant-like activity enhance the β 2GPI binding to phospholipids. *J Clin Invest* 99: 2260-2268.
- Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., Mcshane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N., Winchester, R. J. (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277.
- Thaler, M., Buhl, A., Welter, H., Schreiegg, A., Kehrel, M., Alber, B., Metzger, J., Luppa, P. B. (2009) Biosensor analyses of serum autoantibodies: application to antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Anal Bioanal Chem* 393: 1417-1429.
- Tincani, A., Allegri, F., Sanmarco, M., Cinquini, M., Taglietti, M., Balestrieri, G., Koike, T., Ichikawa, K., Meroni, P., Boffa, M. C. (2001) Anticardiolipin antibody assay: a methodical analysis for a better consensus in routine determinations. *Thromb Haemost* 86: 575-583.
- Triplett, D. A. (1993) Antiphospholipid and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 117: 78-88.

- Unander, A. M., Norberg, R., Hahn, L., Arfors, L. (1987) Anticardiolipin antibodies and complement in ninety-nine women with habitual abortion. *Am J Obst Gynecol* 156: 114-119.
- Urbanus, R. T., Derksen, R. H. M. W., De Groot, P. (2008) Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev* 22: 93-105.
- Urbanus, R. T., Siegerink, B., Roest, M., Rosendaal, F.R., De Groot, P. G., Algra, A. (2009) Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case control study. *Lancet Neurology* 8: 998-1005.
- Uthman, I., Khamashta, M. (2005) Ethnic and geographical variation in antiphospholipid (Hughes) syndrome. *Ann Rheum Dis* 64: 1671-1676.
- Van Os, G. M. A., Urbanus, R. T., Agar, C., Meijers, J. C. M., De Groot, P. G. (2010) Antiphospholipid syndrome: current insights into laboratory diagnosis and pathophysiology. *Haemost* 30: 139-143.
- Vasse, M. (2008) Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb Haemost* 100: 548- 556.
- Vetter, K. (1995) Wo sind die Indikationen der low-dose-Aspirintherapie heute? *Perinat Med* 7: 51-53.
- Villalta, D., Alessio, M. G., Tampoia, M., Da Re, A., Stella, S., Da Re, M., Tozzoli, R., Bizzaro, N. (2009) Accuracy of the first fully automated method for anti-cardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibody detection for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 21-27.
- Vinatier, D., Dufour, P., Cosson, M., Houpeau, J. L. (2001) Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 96: 37-50.
- Von Landenberg, P., Von Landenberg, C., Schölmerich, J., Lackner, K. J. (2001) Antiphospholipid syndrome. Pathogenesis, molecular basis and clinical aspects. *Med Klin* 96: 331-342.
- Von Wolff, M., Strowitzki, T. (2005) Recurrent miscarriages - a multifactorial disease. *Gynäkol Endokrinol* 3: 7-17.
- Vora, S., Shetty, S., Ghosh, K. (2008) Thrombophilic dimension of recurrent fetal loss in Indian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 19: 581-584.
- Wada, H., Usui, M., Sakuragawa, N. (2008) Hemostatic abnormalities and liver diseases. *Sem Thromb Haemost* 34: 772-778.
- Wahl, D. G., Guillemin, F., De Maistre, E., Perret-Guillaume, C., Lecompte, T., Thibaut, G. (1998) Meta-analysis of the risk of venous thrombosis in individuals with antiphospholipid antibodies without underlying autoimmune disease or previous thrombosis. *Lupus* 7: 15-22.

- Warkentin, T. E., Levine, M. N., Hirsh, J., Horsewood, P., Roberts, R. S., Gent, M., Kelton, J. G. (1995) Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med* 332: 1330-1335.
- Wassermann, A., Neisser, A., Bruck, C. (1906) Eine serologische Reaktion bei Syphilis. *DMW* 32: 745.
- White, R. H., Keenan, C. R. (2009) Effects of race and ethnicity on the incidence of venous thromboembolism. *Thromb Res* 123: S11-17.
- Wong, C. K., White, H. D. (2007) Direct antithrombins: mechanisms, trials, and role in contemporary interventional medicine. *Am J Cardiovasc Drugs* 7: 249-257.
- Wrmsby, M. L., Sten-Linder, M., Bremme, K. (2000) Primary habitual abortions are associated with high frequency of Factor V Leiden mutation. *Fertil Steril* 74: 987-991.
- Yamazaki, M., Asakura, H., Jokaji, H., Saito, M., Votani, C., Kumabashiri, J, Morishita, E., Aoshima, K., Ikeda, T., Matsuda, T. (1994) Plasma levels of lipoprotein(a) are elevated in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *Thromb Haemostasis* 71: 424-427.
- Younis, J. S., Brenner, B., Ohel, G., Tal, J., Lanir, N., Ben-Ami, M. (2000) Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first- as well as second-trimester recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 43: 31-35.
- Zammiti, W., Mtiraoui, N., Hidar, S., Fekih, M., Almawi, W. Y., Mahjoub, T. (2006) Antibodies to beta2-glycoprotein I and annexin V in women with early and late idiopathic recurrent spontaneous abortions. *Arch Gynecol Obstet* 274: 261-265.
- Zotz, R. B., Sucker, C., Gerhardt, A. (2008) Thrombophilia in pregnancy-venous thromboembolism, fetal loss, preeclampsia, intrauterine growth restriction. *Haemost* 28: 455-465.

10. Danksagung

Bedanken möchte ich mich beim Institut für Transfusionsmedizin des Zentrums für Diagnostik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf dafür, dass es mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit anzufertigen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Dr. med. K. Gutensohn für seine sehr gute Betreuung und ständige Unterstützung. Er trug im Wesentlichen dazu bei, dass diese Arbeit gelingen konnte.

Für die Betreuung und Hilfe in Fachfragen der Immunologie und Rheumatologie möchte ich mich bei Herrn Dr. med. T. Krieger bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt den Mitarbeiterinnen des AescuLabors im Bereich der Hämostaseologie, Frau M. Hofbauer, Frau S. Jeschek und Frau L. Georgieva. Sie haben mir immer gerne geholfen und zu einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen. Vor allem Frau Hofbauer hat sich jederzeit der Studie angenommen und diese mit ihrem Fachwissen unterstützt.

Für den Beitrag in der Datenextraktion in Medat möchte ich einen Dank an Herrn H. Klages aussprechen.

Für die Hilfe in der Statistik danke ich Herrn Dipl. Wi.-Math. J. F. Kersten.

Beim Team des AescuLabors, des Endokrinologikums und der Gerätehersteller möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich schließlich noch bei meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben.

11. Lebenslauf

Entfällt aus Datenschutzgründen.

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an anderen Hochschulen zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: