

# Se upp med bildning av mikropartiklar vid legionärsjuka!

Trombocytfunktionen kan vara bättre än vad trombocytvärdet visar

**Legionärsjuka kan ge upphov till aktivering av trombocyter, som leder till bildande av mikropartiklar och trombocytopeni. Patienter med höga nivåer av mikropartiklar har bättre trombocytfunktion än vad trombocytvärdet visar. Här beskrivs två fall där detta medförde trombotisering i filtren som användes vid central veno-venös hemofiltration, trots att patienterna behandlades med heparin. Efter byte till lågmolekylärt heparin minskade trombotiseringen.**

Legionella är namnet på en familj av bakterier som ger upphov till två olika typer av sjukdomar: lunginflammation (legionärsjuka) och influensa (pontiacfeber). Legionärsjuka är en allvarlig form av lunginflammation med hög feber, frossa, muskelsmärter, huvudvärk, hosta och andningssvårigheter [1]. Nedsatt immunförsvår, rökning och ålder är riskfaktorer för att drabbas av legionärsjuka.

Legionella pneumophila är en intracellulär patogen som finns i vattensamlingar, sjöar och mark. Bakterien är så liten att den kan följa med inandningsluften i form av aerosol och på så sätt nå ut i alveolerna. För att L pneumophila skall tillväxa in vivo krävs det att den tas upp av makrofager eller monocyter. Denna fagocytos är beroende av komplementreceptorerna CR1 och CR3 på makrofagytan och C3-fragment på bak-

terieytan [2]. Det är därför viktigt för bakterien att kunna aktivera det humana komplementsystemet.

L pneumophila kan åstadkomma komplementaktivering via flera olika mekanismer. Lipopolysackarider från L pneumophila aktiverar komplementsystemet via både den klassiska och alternativa vägen. Aktiveringen via den klassiska vägen kan induceras av antikroppar som normalt finns i serum hos friska individer [3], men det finns också en antikroppsoberoende bindning av C1q till L pneumophila [4]. En annan möjlig aktiveringsväg är lektin-vägen som via »mannan binding lectin» (MBL) känner igen kolhydrater på mikroorganismer [5]. C3-deposition på bakterieytan kan även ske via den alternativa vägen i komplementsystemet [6].

Humana trombocyter har både C1q- och Fc-receptorer. Aktivering via dessa receptorer ger upphov till trombocytaktivering och aggregation [7-9]. Det terminala komplexet i komplementsystemet (C5b-C9-komplexet) kan också aktivera trombocyter och ge upphov till mikropartikelbildning [10]. Aktiverade trombocyter elimineras snabbt från blodbanan [11], vilket medför att alla dessa komplementmedierade effekter kan ge upphov till trombocytopeni.

## Mätmetoder och utrustning

De vanliga cellräknarna på sjukhuslaboratorierna kan inte detektera mikropartiklar. Vi har istället använt oss av flödescytometri, FACS, vilket är en metod som är väl lämpad för kliniskt bruk, för att studera mikropartikelbildning hos två patienter med L pneumophila-infektion. FITC-märkta hönsantikroppar mot fibrinogen, p-selektin, IgG och von Willebrand-faktor användes för flödescytometrianalyserna (Bipool AB, Umeå).

Trombocytantal mättes med hjälp av en Coulter STKS cellräknare (Coulter Diagnostics, Hialeah, FL, USA).

C3 och C3d analyserades immunologiskt med en Beckman Array nefelometer (Beckman Instruments, Brea, CA, USA). Efter PEG (polyetylen glykol)-precipitering mättes C3d i överfasen med en polyklonal anti-C3d-an-

tikropp (DAKO A/S, Danmark). Totalkomplement, klassisk och alternativ väg, analyserades med modifierad CH<sub>50</sub>-metod [12].

Proverna analyserades med hjälp av en Epics Profile XL-MCL flödescytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) [13].

## Första fallet 73-årig man

Patient 1 var en 73-årig man som behandlades med heparin och warfarin på grund av en trombos i sinus sagittalis och sinus transversus. Han fick också betametason och ranitidin. Under vårdtiden på neurologkliniken duschade han och drack vatten. Då han efter en tid utvecklade feber och hosta överfördes han till infektionsklinik.

Fem dagar senare hade han utvecklat en pneumoni med uttalad dyspné och ett pO<sub>2</sub> på 6,3 kPa. Han överfördes till intensivvårdsavdelningen där han behandlades med antibiotika (inklusive erytromycin). Ett par dagar senare kunde man med fluorescerande antikroppar påvisa förekomst av L Pneumophila i trakealsekret. L pneumophila-antigen påvisades även i urin.

Patientens laboratorievärden var: CRP 357 mg/l (referensvärde <10); leukocyter 3,3×10<sup>9</sup>/l (4,0-9,0); trombocyt-tal <10×10<sup>9</sup>/l (150-400) (Figur 2); protrombinkomplex 38 procent (70-130); antitrombin III 58 procent (80-120); fibrinogen 7,3 g/l (2,0-3,6); APTT (aktiverad partiell tromboplastintid) 40 s (25-36).

Patienten var mycket svår att syrsätta, trots 100 procent syrgas, och behandlades därför även med NO (kväveoxid), upp till 40 ppm. pO<sub>2</sub> låg trots optimal respiratorisk terapi på ungefär 5 kPa. Patienten utvecklade också njursvikt och behandlades med central veno-venös hemofiltration, CVVH, och heparininfusion.

Trots heparinbehandlingen och de låga trombocytvärdena var det en hel del problem med trombotisering av filtren till CVVH-apparaten. Man prövade därför att använda sig av lågmolekylärt heparin istället för heparin, vilket resulterade i att man därefter ej behövde byta filtren på grund av trombotisering. Patienten försämrades dock successivt trots

## Författare

ANDERS LARSSON

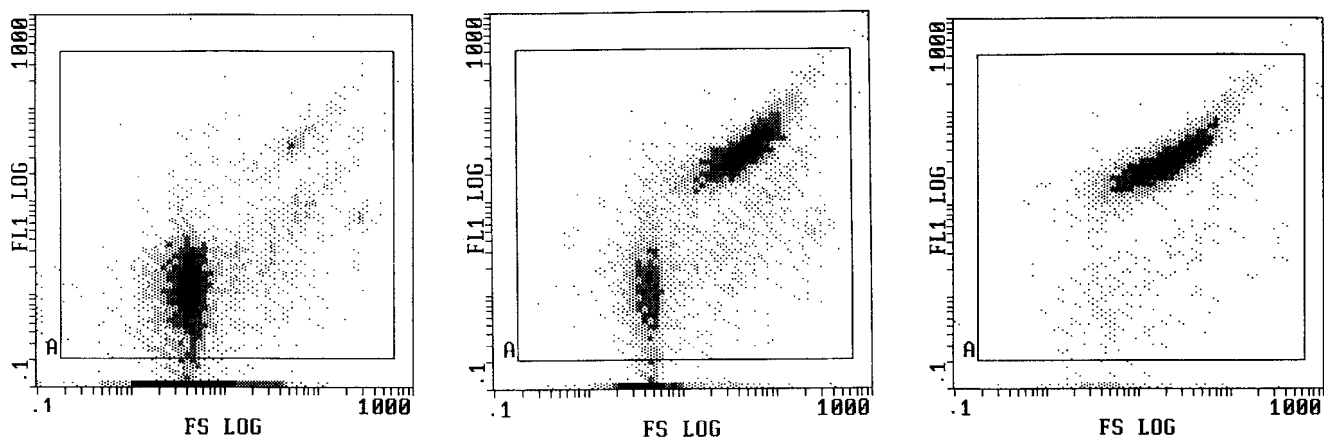
avdelningen för klinisk kemi

BO NILSSON

avdelningen för klinisk immunologi och transfusionsmedicin

MATS ERIKSSON

anestesi- och intensivvårdskliniken; samtliga Akademiska sjukhuset, Uppsala.



**Figur 1.** Mikropartiklar från patient 1 (till vänster), patient 2 (mitten) och från en icke infekterad patient (till höger). Trombocyter och mikropartiklar identifieras med hjälp av storlek (x-axel) och en fluorescerande anti-trombocyt-antikropp (y-axel). I bilden till höger ses nästan bara normalstora trombocyter – som en distinkt grupp, medan man i de båda andra figurerna kan se rikligt med mikropartiklar nedanför och något till vänster om den ursprungliga trombocytpopulationen.

behandlingen, och avled en vecka efter att han överförts till IVA på grund av pneumoni och dyspné. Obduktion bekräftade den kliniska diagnosen.

### Fall två man med njurproblem

Patient 2 är en 49-årig man med grav arterioskleros (Leriche's syndrom och renovaskulär hypertension). Han hade tidigare opererats med en aorto-femoralaft och en graft till höger njure. I efterförloppet hade det varit problem med restenoser. Han hade i perioder behandlats med dialys under de senaste åren. Patienten kom in till sjukhuset då han skulle genomgå en angiografisk undersökning av njurgraften. Undersökningen visade en stenosis för vilken han stentbehandlades, varefter han skrevs ut från sjukhuset med furosemid, warfarin och blodtrycksänkande terapi i kombination. En månad senare togs han in igen på grund av pneumoni och njursvikt. Tillståndet försämrades kraftigt och han överfördes till IVA då man misstänkte septisk shock.

På IVA lades patienten i respirator och CVVH-behandling inleddes. Inicialt behandlades han med cefuroxim med tillägg av erytromycin nästa dag. Med fluorescerande antikroppar påvisades förekomst av *L pneumophila* i trakealsekret och med hjälp av odling påvisades *Legionella* serotyp 8 i trakealsekret. Under vårdtiden byttes warfarin ut mot heparin, som antikoagulantia, för att förhindra stopp i filtren till CVVH-apparaten.

Laboratorieprov visade: trombocytantal  $30 \times 10^9/l$  (150–400) (Figur 2); leukocyter  $22,0 \times 10^9/l$  (4,0–9,0); protrombinkomplex 43 procent (70–130); antitrombin III 55 procent (80–120); fibrinogen 8,9 g/l (2,0–3,6); APTT 33 s (25–36).

Även denna patient var svår att sätta och fick behandling med NO under fyra dygn. Han svarade mycket bra

på denna behandling (upp till 20 ppm NO i 90 procent  $O_2$ ). Patientens tillstånd förbättrades och patienten kunde överföras till en vanlig avdelning.

### Trombocytaktivering och bildning av mikropartiklar

Vi jämförde andelen positiva trombocyter/mikropartiklar med specifik antikropp i förhållande till en icke-specifik antikropp. Detta gjordes för att minska effekterna av de höga mikropartikelnivåerna på resultaten. Metoden mäter den totala fluorescensen per trombocyt eller mikropartikel. Om mikropartikeln är för liten så kommer den inte att identifieras som positiv trots att den är aktiverad. Detta gör att det är svårt att jämföra prov från patienter med höga nivåer av mikropartiklar med ett kontrollmaterial bestående av friska individer med mycket låga nivåer av mikropartiklar.

Bägge patienterna hade ökad andel fibrinogen- p-selektin- och von Willebrand-faktor-positiva trombocyter (Tabell I). Vi fann ingen ökning av andelen IgG-positiva trombocyter då vi jämförde med en icke-specifik IgY-antikropp. Patienten med den största andelen mikropartiklar hade lägre procent fibrinogen- p-selektin- och von Willebrand-faktor-positiva trombocyter. Detta beror på den höga andelen mikropartiklar i dessa prov.

**Tabell I.** Procent positiva trombocyter med olika antikroppar.

Antikropp	Patient 1	Patient 2
Anti-fibrinogen	6,9	13,9
Anti-p-selektin	14,9	24,0
Anti-vWF	6,6	40,9
Anti-IgG	0,9	1,45
Ospecifikt IGY	1,0	1,7

En FITC-märkt anti-trombocyt-antikropp användes för att identifiera trombocyter och mikropartiklar hos dessa två patienter och en frisk kontroll (Figur 1a–c).

Bägge patienterna hade mycket höga nivåer av mikropartiklar. Patienten med den högsta andelen mikropartiklar (Figur 1a) dog bara något dygn efter att provet togs. Mindre än 10 procent av trombocyterna hos denna patient hade normal storlek. Som jämförelse ses en anesteserad, icke-septisk patient (Figur 1c).

### Trombocytal, APTT och komplementkonsumtion

Båda patienterna utvecklade trombocytopeni. Patient 1 hade trombocytvärden  $< 10 \times 10^9/l$  fyra av sex dagar, medan patient 2 hade som lägst  $30 \times 10^9/l$ .

Patient 1 hade en klar komplementkonsumtion med sänkta nivåer av totalkomplement, klassisk väg, och ökade nivåer av C3d (Tabell II). Patient 2 hade under dag fyra och fem lägre nivåer av totalkomplement, klassisk väg, och lätt ökade nivåer av C3d i förhållande till dag sex och sju. Detta talar för en komplementkonsumtion under dag fyra och fem. Ingen påverkan på totalkomplement, alternativ väg, sågs hos patienterna.

Målsättningen är att ha en APT-tid på mellan 40 och 60 s under pågående CVVH. Båda patienterna behandlades med heparin intravenöst i stigande koncentrationer, men trots doser på upp till 90 000 enheter/dygn så steg ej APTT över 40 s. Då patient 2 förbättrades kliniskt och trombocytopenin avtog, steg APTT.

### Legionärsjuka drabbar i första hand nedsatta

Legionärsjuka är en allvarlig form av lunginflammation. Den drabbar i första hand individer med nedsatt immunförsvar, men är mängden bakterier som in-

**Tabell II.** Nivåer av C3d och totalkomplement, klassisk väg, hos de två patienterna. Referensvärde för totalkomplement, klassisk väg 80–120 procent, och för C3d/C3 kvoten <5,1 ?? = ej analyserat.

Dag	Patient 1		Patient 2	
	Klassisk väg	C3d/C3	Klassisk väg	C3d/C3
4	43	9,3	85	5,8
5	45	9,0	78	5,4
6	57	8,5	100	4,1
7	–	–	99	45

andas tillräckligt stor så kan även fullt friska individer utveckla legionärsjuka [1]. Infektionen sprids via system som innehåller ljummet vatten och kan bilda aerosoler. Aerosolen gör att bakterieinnehållande droppar kan nå ner i lungorna. I alveolerna tas bakterierna upp av makrofager, i vilka de kan föröka sig.

L pneumophila aktiverar det humana komplementsystemet både via den klassiska och den alternativa vägen. Att ha komplementfragment på bakterieytan är i regel negativt för bakterier eftersom detta i regel medför att bakterien tas upp av makrofager och bryts ner. För L pneumophila är detta en viktig del i dess förökning. C3-fixeringen verkar vara mycket specifik då C3 bara binder till ett enda protein på bakterieytan [5]. Efter att den C3-beklädda bakterien bundits till komplementreceptorerna CR1 och CR3 så fagocyteras bakterien.

Fagocytos av L pneumophila skiljer sig från övrig fagocytos och kallas för »coiling phagocytosis» [14]. Fagosomerna som innehåller bakterien smälter inte ihop med lysosomer utan bakterien får möjlighet att föröka sig i dessa fagosomer, och slutligen leder det till att cellen dör.

Vi har tidigare visat att komplementaktivering ger upphov till kraftig mikropartikelbildning [7]. Mikropartiklar bildas av trombocytaggregat i samband med trombocytaggregering. Dessa mikropartiklar är hemostatiskt mycket aktiva men de är för små för att man skall kunna mäta dem med de cellräknare som normalt finns på sjukhusen. Man har funnit stegrade nivåer av mikropartiklar hos patienter med TIA-attacker och multiinfarkt demens [15]. Patienter med höga nivåer av mikropartiklar har en bättre trombocytfunktion än vad som framgår av trombocytvärdet.

Man har i en studie visat på en bättre korrelation mellan mängden mikropartiklar och blödningsproblem än mellan trombocyttalen och blödningsproblem hos patienter med autoimmun trombocytopeni [16].

Vi har använt oss av flödescytometri för att studera trombocytaggregering och mikropartikelbildning hos två patienter med legionärsjuka. Båda patienterna ut-

vecklade trombocytopeni på grund av sjukdomen. Detta berodde på trombocytaggregering och en mycket uttalad mikropartikelbildning. Andelen mikropartiklar var mycket högre än vad vi tidigare har sett hos patienter med gramnegativ sepsis [17]. Patienten med den mest uttalade mikropartikelbildningen avled. Vi har tidigare i en djurexperimentell modell sett att höga nivåer av mikropartiklar var associerade med en ökad mortalitet [18]. I samband med att patient 2 tillfrisknade så steg också trombocyttalet.

Båda patienterna behandlades med heparin intravenöst på grund av CVVH-terapi. Trots mycket höga heparindoser så erhöles ingen förlängning av APT-tiden. Varför patienterna inte svarade på heparinbehandlingen beror troligen på trombocytaggregeringen och mikropartikelbildningen. Vid trombocytaggregering frisätts trombocytfaktor 4 (PF4), vilken binder till heparin och hämmar heparinets effekter. Mikropartiklarna erbjuder också en koagulationsaktiv yta, vilken förkortar APT-tid och »dilute simplastin time», även i frånvaro av heparin [19].

### Lågmolekylärt heparin kan vara värt att pröva

Bytet från heparin till lågmolekylärt heparin minskade trombotiseringen i CVVH-filtren, vilket talar för att lågmolekylärt heparin effektivare förhindrade trombotiseringen. Detta skulle kunna bero på att lågmolekylärt heparin inte i samma grad binder till mikropartiklarna. Då det rör sig om endast två patienter så kan man ej dra några generella slutsatser, men det kan vara värt att pröva att byta till lågmolekylärt heparin om APT-tiden inte stiger i samband med heparinbehandling hos denna typ av patienter.

Bägge patienterna behandlades med NO. Detta kan ha en positiv effekt hos L pneumophila-infekterade patienter då NO-radikaler är baktericida för legionellabakterier i laboratorieförsök [20].

Komplementaktivering spelar en viktig roll för tillväxten av L pneumophila och sannolikt för trombocytopenin. Komplementsystemet skulle även kunna orsaka andra symtom hos dessa pati-

enter. För närvarande pågår en utveckling av komplementhämmare som läkemedel [21, 22]. Det förefaller troligt att komplementhämmare skulle kunna minska både tillväxten av L pneumophila in vivo och de kliniska symtomen.

### Referenser

- Bernander S, Kallings I. Parasit hos människa och amöba: Sänkt varmvattentemperatur gynnar legionellabakterierna. *Läkartidningen* 1998; 40: 4340-4.
- Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of L pneumophila is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* 1987; 166: 1377-89.
- Mintz CS, Schultz DR, Arnold PI, Johnson W. L pneumophila lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect Immun* 1992; 60: 2769-76.
- Mintz CS, Arnold PI, Johnson W, Schultz DR. Antibody-independent binding of complement component C1q by L pneumophila. *Infect Immun* 1995; 63: 4939-43.
- Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, Ezekowitz RA. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 29-35.
- Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of L pneumophila and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med* 1990; 172: 1201-10.
- Lindahl T, Larsson A. C1q binding to platelets induced by monoclonal antibodies and immune complexes – a flow cytometric analysis. *Platelets* 1993; 4: 73-7.
- Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombin activity. *J Biol Chem* 1988; 263: 18205-12.
- Nilsson UR, Nilsson B. Simplified assays of hemolytic activity of the classical and alternative pathways. *J Immunol Methods* 1984; 72: 49-59.
- Lindahl TL, Festin R, Larsson A. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: An improved method for detection of platelet activation. *Thrombosis and Haemostasis* 1992; 68: 221-5.
- Horwitz MS. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 1984; 36: 27-33.
- Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE et al. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res* 1993; 72: 295-304.
- Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med* 1992; 119: 334-45.
- Larsson A, Lundahl T, Eriksson M, Lundkvist K, Lindahl T. Endotoxin induced platelet microvesicle formation measured by flow cytometry. *Platelets* 1996; 7: 153-8.
- Eriksson M, Nelson D, Nordgren A, Larsson A. Increased platelet microvesicle formation is associated with mortality in a porcine model of endotoxemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 42: 551-7.
- Howard MA, Coghlan M, David R, Fuller SL. Coagulation activities of plasma microparticles. *Thromb Res* 1988; 50: 145-56.