

IAKH-Workshop „Perioperatives Management der Gerinnungsstörung“

Workshop 2^{*,1}

M. Schöler und T. Frietsch

Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. K. van Ackern)

Im Workshop 2 wurden folgende Geräte zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion vorgestellt:

- Multiplate® Analyzer der Firma Dynabyte GmbH, München, durch Klaudia Köppen
- PFA-100® Analyzer der Firma Dade Behring, Eschborn, durch Dr. Erich Kunzmann.

Multiplate® Analyzer
der Firma Dynabyte GmbH, München

Messprinzip

Die Multiplate®-Technologie ist eine Weiterentwicklung der Impedanz-Aggregometrie, wie sie 1979 von Cardinal beschrieben wurde. Es werden 300 μ l mit Thrombininhibitor oder Lithium-Heparin antikoaguliertes Vollblut verwendet. Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgt somit aus dem Vollblut bei physiologischem Kalziumspiegel. Die Messzelle bietet in einem Einwegsystem zwei unabhängige Messeinheiten. Neben den Messelektroden enthält diese einen Magnetrührer. Das Blut und die Reagenzien müssen in mehreren Schritten in die Messzelle pipettiert werden. Es stehen verschiedene Aktivatoren zur Verfügung (Abb. 1 und 2):

- ASPITEST: Detektion von Aspirin® und anderen Cyclooxygenase-Inhibitoren
- ADPTEST: ADP-induzierte Aggregation
- ADP+PGTEST: ADP-induzierte Aggregation + Inhibitor Prostaglandin E1
- COLTEST: Globale Thrombozytendiagnostik mit Collagen-Aktivierung

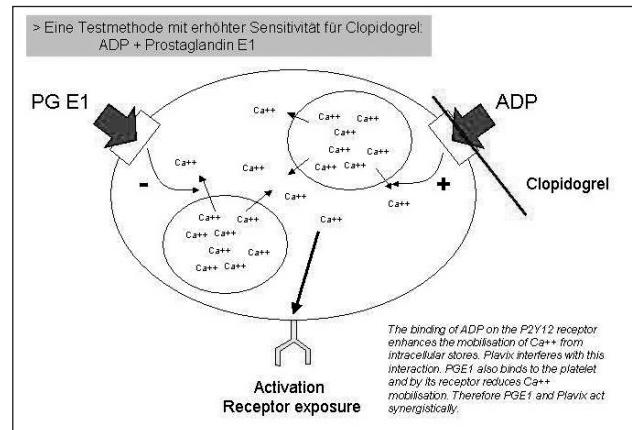


Abb. 2: Mit freundlicher Genehmigung der Firma Dynabyte GmbH, München.

- RISTOTEST: Von-Willebrand-abhängige Thrombozyten-Aggregation
- TRAPTEST: Aktivierung mittels TRAP-6 (noch nicht erhältlich)
- Einsatz beliebiger Aktivatoren und Inhibitoren zur Modulation der Thrombozytenaktivierung bei Forschungsanwendungen.

Die Thrombozyten heften sich an die zwei Elektroden an und verändern den elektrischen Widerstand (Abb. 3). Es wird eine Aggregationskurve erstellt und die Parameter Area under the curve (AUC), Velocity und Aggregation ausgewertet (Abb. 4).

Auf den 5 Messkanälen können die verschiedenen Tests parallel durchgeführt oder mehrere Blutproben simultan analysiert werden. Die elektronische Pipettierung vereinfacht und standardisiert den Einsatz des Systems. Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse ist in das Gerät integriert.

Indikation

Das Multiplate®-System eignet sich besonders zum Erfassen der Wirkung von durch Thrombozytenaggregationshemmer wie ASS, Thienopyridin-Derivate und Gilla/IIIb-Inhibitoren induzierten Thrombozytenfunktionsstörungen

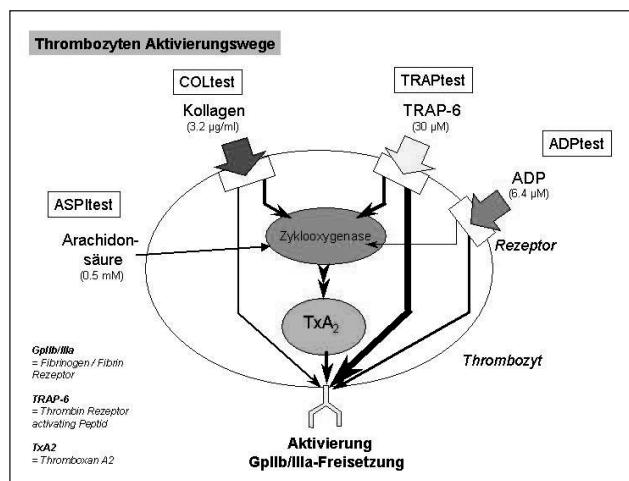


Abb. 1: Mit freundlicher Genehmigung der Firma Dynabyte GmbH, München.

* Rechte vorbehalten

¹ Es besteht kein Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindung mit den Firmen, deren Produkte in dem Artikel genannt sind, oder einer anderen Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen. Die Präsentation des Themas erfolgt aus den im Workshop vermittelten Informationen und frei zugänglicher Literatur, ist unabhängig und die Darstellung der Inhalte produktneutral.

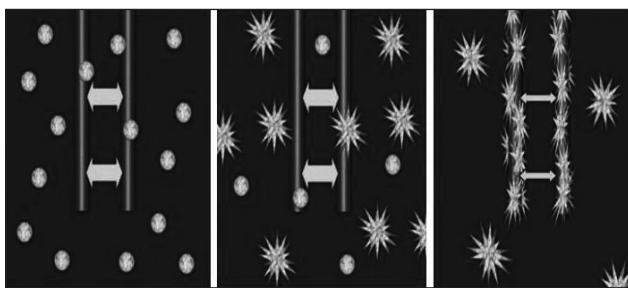


Abb. 3: Schematischer Ablauf der Impedanzaggregometrie.
Mit freundlicher Genehmigung der Firma Dynabyte GmbH, München.

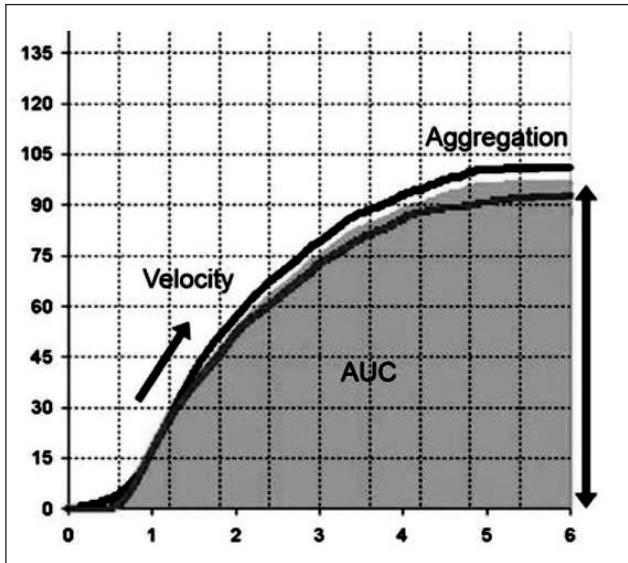


Abb. 4: Messparameter.
Mit freundlicher Genehmigung der Firma Dynabyte GmbH, München.

► [1] und nur in speziellen Bereichen zum intraoperativen Gerinnungsmonitoring.

Die Möglichkeit, beliebige Aktivatoren und Inhibitoren zur Modulation der Thrombozytenaktivierung in beliebigen Konzentrationen einsetzen zu können, macht das System für Anwendungen in der Forschung interessant.

Benötigtes Material

Es werden 300µl mit Thrombininhibitor oder Lithium-Heparin antikoaguliertes Vollblut benötigt.

Mögliche Fehler

Da durch den Anwender mehrere Arbeitsschritte durchgeführt werden müssen, sind Anwenderfehler bzw. Fehler beim Pipettieren sicher die Hauptfehlerquelle. Weiter kann ein bedeutender Einfluss der Präanalytik, und zwar besonders durch die Blutentnahme, aber auch durch den Transport angenommen werden. Der Hämatokrit hat keinen bedeutenden Einfluss auf die Messung.

Validierung, Zertifizierungsmöglichkeiten

Die Entwicklung des Multiplate®-Systems erfolgt von den Entwicklern der ROTEG®- / ROTEM®- und PiCT®-Technolo-

gie. Durch die zum Patent angemeldete "Multiple Electrode Aggregometry" wird bei jeder Messung eine Doppelbestimmung durchgeführt und das Ergebnis überprüft. Zwischen jeder Messung erfolgt eine elektronische Kontrolle des Messsystems. Mittels flüssiger Kontrollmaterialien wird die Funktionalität der Messzellen sichergestellt. Die Validierung in Bezug auf die klinische Relevanz der Messergebnisse ist noch unzureichend, da das Verfahren noch relativ neu auf dem Markt ist. So bestehen z.B. noch keine allgemein anerkannten Cut-off-Werte zur Diagnostik von Non-Respondern auf Thrombozytenaggregationshemmer wie ASS, Thienopyridin-Derivate und GIIa/IIIb-Inhibitoren.

Integrationsmöglichkeit in Laborsoftware / Online-fähigkeit

Die Multiplate®-Auswertesoftware ist Windows XP-basiert. Der Anschluß eines Druckers ist möglich.

Kosten

Informationen zu den Kosten sind beim Hersteller z.B. unter der Internetpräsenz <http://www.multiplate.net/deutsch/home/home.htm> zu erfragen.

Logistik

Eine Messung benötigt – nach etwas Übung inklusive der Pipettierung – laut Herstellerangaben wie auch in der Demonstration im Workshop 10 bis 15 Minuten. Dabei entfallen 3 Minuten auf die Inkubationszeit und 6 Minuten auf die Messzeit. Auf den fünf Kanälen eines Gerätes sind daher bis zu 30 Tests pro Stunde möglich. Die elektronische Pipettierung vereinfacht und standardisiert den Einsatz des Systems. Die Bedienung anhand der interaktiven Benutzeroberfläche ist leicht erlernbar. Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse ist in das Gerät integriert, der Platzbedarf gering.

Das Gerät eignet sich somit für den Einsatz als Point-of-Care-Test in der Anästhesie oder auf der Intensivstation. Der Einsatz im Zentrallabor wird durch die notwendige Verarbeitung der Blutproben innerhalb von 30-180 Minuten nach Blutentnahme limitiert. Zum Einfluß der Verwendung einer Rohrpost gibt es keine Daten, allerdings ist eine Verfälschung der Messergebnisse wie bei anderen Thrombozytenfunktionstestungen zu erwarten. Auch die Verwendung von mit Thrombininhibitor oder Lithium-Heparin antikoaguliertem Blut, also speziellen Blutentnahmeröhrchen, könnte bei der Implementierung dieses Messverfahrens zu Problemen führen.

PFA-100® Analyzer der Firma Dade Behring, Eschborn

Messprinzip

PFA-100® ist ein Analysesystem, in dem der Prozess der Thrombozytenadhäsion und -aggregation *in vitro* simuliert wird (Abb. 5). In der Einmalmesszelle wird die mit 3,8% Citrat antikoagulierte Vollblutprobe aus dem Proben-

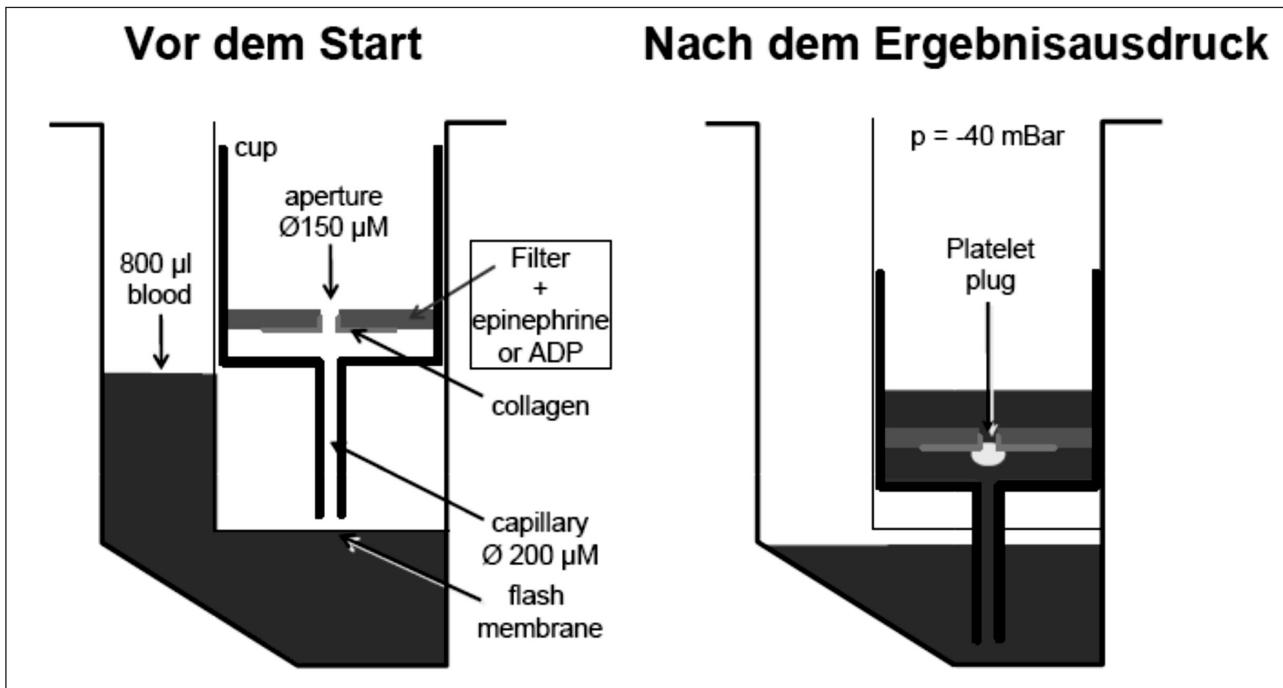


Abb. 5: Das PFA-100®-Testprinzip. Mit freundlicher Genehmigung der Firma Dade Behring, Eschborn.

► reservoir durch eine Kapillare und die Öffnung einer mit Kollagen beschichteten Membran aspiriert, wo die Thrombozyten hohen Scherkräften ausgesetzt sind. Es wird die Verschlusszeit der Apertur (Closure Time, CT) bestimmt. Die Membran ist zusätzlich mit weiteren physiologischen Agonisten, Epinephrin oder ADP, beschichtet. Während des Tests kommt es zur Anlagerung der Thrombozyten an der Kollagen-beschichteten Membran. Ähnlich der Aggregometrie kommt es nun zur Aktivierung der Thrombozyten und bei Kontakt mit Agonisten, wie ADP oder Epinephrin, zur Freisetzung der Granulainhaltsstoffe. Anschließend erfolgt die Aggregatbildung durch Adhäsion der Thrombozyten. In einem Testdurchlauf kann eine Blutprobe in beiden Messzellen Kollagen/Epinephrin und Kollagen/ADP gleichzeitig gemessen werden.

Indikation

Das PFA-100®-System eignet sich vor allem, in Verbindung mit der Anamnese, zur präoperativen Gerinnungsdiagnostik, da milde Formen der von-Willebrand-Erkrankung oder durch Thrombozytenaggregationshemmer induzierten Thrombozytenfunktionsstörungen erkannt werden können [2,3]. Weiter kann es zur Kontrolle nach DDAVP-Gabe oder der Überwachung der ASS-Sekundärprophylaxe nach Herzinfarkt eingesetzt werden.

Die Society on Thrombosis and Haemostasis hat einen aktuellen Review zum Einsatz des PFA-100®-Systems veröffentlicht [4], der allerdings besonders aus Deutschland kritisiert wurde [5,6].

Benötigtes Material

Es werden 800 µl mit 3,8% Citrat antikoaguliertem Vollblut benötigt.

Mögliche Fehler

Aufgrund der sehr einfachen Bedienbarkeit sind Anwenderfehler sehr unwahrscheinlich. Die Blutprobe wird außerhalb des Gerätes in die Messzelle pipettiert, anschließend die Messzelle im Karussell platziert und die Messung gestartet. Entscheidend ist die Präanalytik: Die Blutentnahme sollte ohne langes Stauen in Sarstedt-Monovetten® oder BD-Vacutainer® mit 3,8%iger gepufferter Na-Citrat-Lösung erfolgen. Durch ein geändertes Vorgehen, z.B. durch die Verwendung von Butterfly-Systemen, können sich die Referenzbereiche verschieben. Der Hersteller empfiehlt daher die Erstellung laborinterner Grenzwerte. Die Aussagekraft ist bei Thrombozytenzahlen unter 100.000/µl oder einem Hämatokrit unter 30% deutlich eingeschränkt. Nicht geeignet ist es für das Monitoring der Antikoagulation mit Clopidogrel.

Validierung, Zertifizierungsmöglichkeiten

Da das PFA-100®-System schon einige Zeit auf dem Markt ist, gibt es etliche Studien zur Validierung und Erstellung von Referenzbereichen, allerdings meist mit sehr kleinen Patientenzahlen. Die größte Studie zu diesem Thema an insgesamt mehr als 10.000 Patienten wurde von Kunzmann im Rahmen des Workshops vorgestellt. Koscielny et al. veröffentlichten 2004 ihr Konzept zur präoperativen Gerinnungsdiagnostik und ein Behandlungskonzept bei primären Hämostasestörungen [2,7]. Sie untersuchten 5.649 Patienten, von denen 628 in der Anamnese, klinischen Untersuchung oder im Fragebogen zum Blutungsrisiko auffielen. Aus dieser Gruppe hatten 256 ein pathologisches Testergebnis in einem der durchgeföhrten Tests: PFA, Blutungszeit, vWF:Ag, aPTT, Quick, Thrombozytenzahl. Der PFA-100® mit der COL/EPI-Messzelle ►

► konnte 97,7% davon identifizieren und 52 von 54 Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung erkennen. Damit errechneten die Autoren eine Sensitivität von 90,8%, einen positiven Vorhersagewert von 81,8% und einen negativen Vorhersagewert von 93,4% für diese Messzelle. Die Autoren entwickelten daraufhin ein therapeutisches Stufenkonzept mit DDAVP, Tranexamsäure, Thrombozytenkonzentraten und Faktor-VIII-Konzentrat, welches mit dem PFA-100® überwacht wurde. Sie konnten damit im Vergleich zu einer historischen Vergleichsgruppe die Rate an Bluttransfusionen unter die Gruppe ohne Blutgerinnungsstörungen senken, einhergehend mit Kosteneinsparungen gegenüber der präoperativ nicht behandelten Gerinnungsstörung.

Integrationsmöglichkeit in Laborsoftware / Online-fähigkeit

Die Integration in Laborsoftware ist möglich. Eine Schnittstelle RS232 ist vorhanden. Ein Drucker ist in das Gerät integriert.

Kosten

Informationen zu den Kosten sind beim Hersteller z.B. unter der Internetpräsenz <http://www.dadebehring.com> zu erfragen.

Logistik

Die Bedienung anhand der interaktiven Benutzeroberfläche ist leicht erlernbar. Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse ist in das Gerät integriert, der Platzbedarf gering.

Das Gerät eignet sich somit für den Einsatz in der präoperativen Gerinnungsdiagnostik in einer Prämedikationsambulanz oder einem speziellen Gerinnungslabor.

Da die Verwendung der Rohrpost nicht empfohlen wird und die Verarbeitung der Blutproben innerhalb von 15-120/240 Minuten nach Blutentnahme geschehen sollte, ist der

Einsatz im Zentrallabor limitiert. Auch die Verwendung von mit 3,8% Citrat antikoaguliertem Blut, also speziellen Blutentnahmeröhrchen, könnte bei der Implementierung dieses Messverfahrens zu Problemen führen.

Literatur

1. **Toth O, et al.** Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006;96(6):781-788.
2. **Koscielny J, et al.** A practical concept for preoperative identification of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10(3):195-204.
3. **Franchini M.** The platelet-function analyzer (PFA-100) for evaluating primary hemostasis. *Hematology* 2005;10(3):177-181.
4. **Hayward CP, et al.** Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006;4(2):312-319.
5. **Koscielny J, Kiesewetter H, von Tempelhoff GF.** More on: platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006;4(6):1426-1427; discussion 1428-1434.
6. **Kratzer MA, Kretschmer V.** Platelet function analyzer (PFA)-100(R) closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function - a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2006;4(6):1429-1431.
7. **Koscielny J, et al.** A practical concept for preoperative management of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10(2):155-166.

Korrespondenzadresse:

Michael Schöler
Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Universitätsklinikum Mannheim
Theodor-Kutzer-Ufer 1 - 3
68167 Mannheim
Deutschland
E-Mail: michael.schoeler@anaes.ma.uni-heidelberg.de