

Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Eine heimliche Begegnung mit der dritten Art

Für die Prüfung der Thrombozytenfunktion sind inzwischen zahlreiche Technologien verfügbar. Die mitunter komplexe Präanalytik und Analytik hielt viele Labore bisher von einer Einführung ab, doch die hier vorgestellten Systeme sind einfach zu bedienen und durchwegs routinetauglich.

Bei einer Blutung laufen komplizierte Vorgänge innerhalb weniger Minuten ab, die zu einem dauerhaften Verschluss des Lecks führen: Zunächst kontrahiert sich das Gefäß, dann aggregieren die Thrombozyten zu einem Pfropfen, dem Thrombus (primäre Hämostase), und schließlich entsteht ein Blutgerinnsel, das den lockeren Thrombus stabilisiert (Fibrinbildung). Die Trennung in drei Phasen ist eher didaktischer Natur, denn zwischen ihnen bestehen vielfältige Wechselwirkungen. So fördert Thrombin (Faktor II) die Thrombozytenaggregation; umgekehrt beschleunigen aktivierte Thrombozyten die Gerinnselbildung. Als großes Plasmaprotein hat ferner der Willebrand-Faktor eine wesentliche Funktion bei der Anheftung von Thrombozyten an freigelegte Kollagenfibrillen der Gefäßwand.

Nur die Zählung der Thrombozyten (Referenzbereich 150.000 bis 350.000 pro Mikroliter), eventuell ergänzt durch die Analyse von Größe und Form, gehört zur Routinediagnostik im medizinischen Labor. Daraus erhält man allerdings so gut wie keine Auskunft über Funktionsstörungen, wie sie zum Beispiel bei angeborenen Thrombopathien oder Schmerzmittelinnahme vorkommen.

Probenvorbereitung

Diese Lücke wird seit langem beklagt und muss nun mit zunehmender Verordnung aggregationshemmender Medikamente wie Clopidogrel, Prasugrel oder Acetylsalicylsäure dringend geschlossen werden. Naturgemäß lässt sich der komplexe Prozess (Plättchenaktivierung, Anlagerung an

die verletzte Gefäßwand, Aggregation und Thrombusstabilisierung) außerhalb des Körpers nicht völlig naturgetreu nachbilden. Die Qualität der Probenvorbereitung hat hier einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der Untersuchung. Deshalb muss die Wahl der Antikoagulanzen und Puffersysteme sowie die Mischung und Lagerung der Probe exakt nach Herstellerangaben erfolgen.

Bei der Thrombozytenaggregation nach Born (z. B. APACK 4 S plus, s.u.) wird zur Messung plättchenreiches Plasma aus Citratblut eingesetzt (15 Min. 1.500 x g), die anderen vier hier vorgestellten Systeme messen direkt in Vollblut, das mit Citrat, Hirudin, Heparin oder synthetischen Reagenzien ungerinnbar gemacht wurde. Hier entfällt also die Zentrifugation.

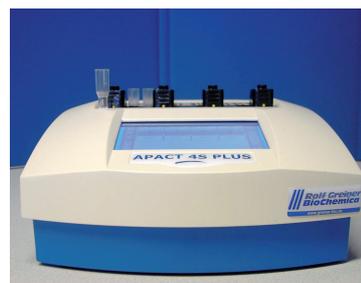
APACT 4 S plus

➤ Turbidimetrische Analyse der Thrombozytenaggregation für das Hochdurchsatzlabor

- ✓ einfache Bedienung und hohe Flexibilität
- ✓ stabile Reagenzien, RiliBÄK-konforme Kontrollen
- ✓ Messzeiten von 30 bis 3.600 Sek. frei programmierbar
- ✓ modular erweiterbar bis auf 24 Messkanäle
- ✓ auch bei niedrigen Thrombozytenzahlen gute Ergebnisse

... und das alles bei Listenpreisen unter 1,50 Euro pro Test

**Rolf Greiner
BioChemica**



Rolf Greiner BioChemica GmbH • Bahnhofstraße 32 • 65558 Flacht • Telefon 06432/95120 • www.greiner-bio.de

Patientennahe Analytik

Ein Probenversand über weite Strecken ist in der Labordiagnostik meist unproblematisch, bei der Thrombozytenfunktionsprüfung stellt die Empfindlichkeit der Probenmaterialien dagegen eine gewisse logistische Herausforderung dar. Am günstigsten ist es, wenn die Analyse möglichst nah am Patienten durchgeführt wird.

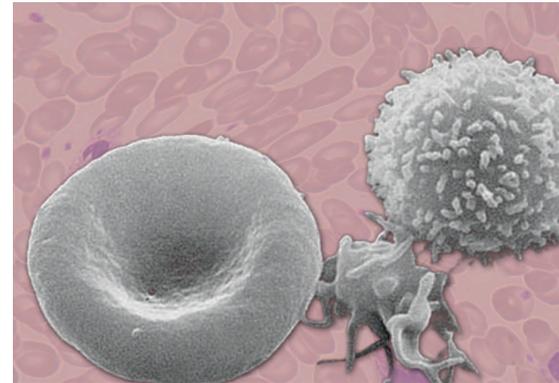
Das Verify Now ist ein klassisches Point-of-Care-Gerät (POC) mit Einwegküvetten und Fertigreagenzien, bei dem Probenvorbereitung und Pipettierungen entfallen. Die anderen Vollblut-Systeme eignen sich wegen des fehlenden Zentrifugationsschrittes ebenfalls für den patientennahen Einsatz, erfordern aber Pipettierungsschritte (PFA nur Probe, Multiplate zusätzlich Reagenz), so dass sie nicht unter die strikte POC-Definition fallen.

Testverfahren

Es gibt inzwischen eine Vielzahl unterschiedlicher Technologien und Geräte zur Messung der Thrombozytenfunktion und primären Hämostase. Auf S. 189 werden Geräte mit gut vergleichbaren Features tabellarisch aufgeführt. Weitere hersteller-spezifische Angaben finden sich auf den

Seiten 182 und 186-191. Alle hier ausgewählten Systeme sind für das Routinelabor verfügbar und geeignet.

Zu beachten sind allerdings die unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten für einzelne Schritte der primären Blutstillung und Thrombozytenaggregation. Die Auswahl muss deshalb gezielt nach den jeweiligen diagnostischen Anforderungen erfolgen. Zwei der acht vorgestellten Systeme erfassen beispielsweise die Bindungsproteine von-Willebrand-Faktor (PFA-100) bzw. Fibrinogen (ROTEM[®] delta) im Vollblut. So lässt sich die Funktion spezifischer Thrombozytenrezeptoren oder die Festigkeit der Gerinnselbildung abschätzen. Die anderen Systeme verfolgen dagegen den Prozess der Thrombozytenaggregation, wobei die unterschiedlichen Detektionssysteme (Elektroden, optische Messung, beadverstärkte Messung) spezifische Auswirkungen auf das Ergebnis haben können. Neben den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Daten zur Performance dieser Systeme bezüglich Reproduzierbarkeit, Messbereich, Einfluss- und Störgrößen müssen in Zukunft Studien mit klinischen Endpunkten verstärkt beachtet werden.



Neben den roten und weißen Blutkörperchen zirkulieren als dritte Zellart die Blutplättchen (Thrombozyten, Mitte) im peripheren Blut. Sie dienen dem Wundverschluss und spielen eine Rolle bei Thrombosen und Entzündungen.

Aggregometrische Methoden

Aus historischen Gründen gilt die Messung nach Born als Goldstandard. Detektiert wird hierbei die Abnahme der Lichtdurchlässigkeit nach Zugabe eines Thrombozytenaktivators wie Kollagen oder Adenosindiphosphat (ADP). Um das erforderliche plättchenreiche Plasma aus Citrat-Vollblut zu gewinnen, muss die Probe zentrifugiert werden. Deshalb ist die Methode mit relativ hohem technischen und zeitlichen Aufwand verbunden.

Point-of-Care Gerinnungsdiagnostik



ROTEM[®] delta – Wissen wie die Blutung gestoppt wird

- Schnelle Differentialdiagnose bei akuten Blutungen infolge von Gerinnungsstörungen
- Erlaubt Monitoring & Kontrolle von Therapien
- ROTEM[®]-basierte Algorithmen führen zu reduziertem Verbrauch von Blutprodukten
- Ermöglicht verbesserte Patientenversorgung
- Bietet signifikante Kostenreduktion



Besondere Merkmale:

- Einfache & sichere Handhabung
- „Touch Screen“ Bildschirmbedienung
- Automatische Pipette & vier Messkanäle
- Erste Ergebnisse innerhalb von 5 bis 10 Minuten
- NEU: Einmalreagenzien für eine schnelle Diagnostik
- Flexible Software für Datenübertragung; LIS-Anbindung
- ROTEM[®] Trolley für den mobilen Einsatz
- Bewährte Technologie: Rotations-Thromboelastometrie in über 400 Publikationen beschrieben

Ideal geeignet für sowohl den patientennahen Bereich als auch das Labor, bietet das ROTEM[®]-System eine Differentialdiagnose für das Blutungsmanagement und verhilft zur gezielten Therapie und sicherem Monitoring.

Tem International GmbH – München – www.rotem.de – info@tem-international.de – Tel. 089 / 4542 9517

tem[®]

Die Systeme AFACT 4 S Plus und Verify Now nutzen mit der Turbidimetrie ein in der Labordiagnostik bewährtes optisches Messprinzip für die Trübungsmessung. Es leitet sich von der Born-Methode ab, erlaubt jedoch eine automatisierte und schnelle Bestimmung der Thrombozytenaggregation im Vollblut. In den Messzellen des Verify Now befinden sich zur Signalverstärkung fibrinogen-beschichtete Teilchen (Beads), an die die Thrombozyten binden.

Das Multiplate-System ist von der optischen Dichte des Vollbluts völlig unabhängig; es misst die Widerstandsänderung zwischen zwei Elektroden in der Vollblutprobe (Impedanzaggregometrie). Aktivierte Thrombozyten verklumpen direkt an den Elektroden, sodass der elektrische Widerstand in der Probe ansteigt.

Erweiterte Diagnostik

Das PFA-100 misst die primäre Hämostasekapazität und imitiert dabei ein verletztes Blutgefäß (s. S. 191): Dazu wird die Blutprobe durch ein Loch in einer mit Kollagen und Aktivatoren beschichteten Membran gesaugt. Beim Durchfließen haften die Thrombozyten an und verschließen die Öffnung. Gemessen wird die „in vitro Blutungszeit“ bis zum Verschluss, die u.a. Aussagen über die Funktion des Willebrand-Faktors erlaubt.

Mit der Thromboelastometrie im ROTEM® delta erfasst man den Beitrag der Thrombozyten zur Gerinnelbildung und die Stabilität des Blutgerinnsels. Hier spielt also die Fibrinvernetzung des neu gebildeten Thrombus (einschließlich Faktor XIII) eine Rolle. Auch dieses Gerät verwendet Vollblut und ist patientennah einsetzbar. Sein Anwendungsgebiet ist vor allem das Management akuter schwerer Blutungen bei Operationen, im Schockraum und auf der Intensivstation. Bei Patienten, die unter Thrombozytenhemmern stehen, liefert dieses Verfahren normale Werte.



Multiplate



Instrumentation Laboratory GmbH
Martina Leplatoni
Klausnerring 4
85551 Kirchheim
Tel. 089/90907-0
info@il-ger.de
www.il-ger.de

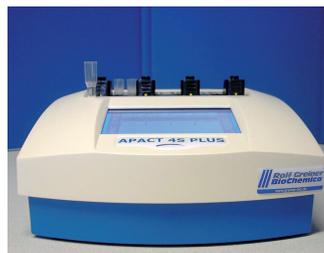


VerifyNow®



Keller Medical GmbH, Isabell Henke
Wiesbadener Weg 2a
65812 Bad Soden a. Ts.
Tel. 06196/56163-0
info@keller-medical.de
www.keller-medical.de
www.accumetrics.com

AFACT 4 S Plus



Rolf Greiner BioChemica GmbH
Kurt Appel
Bahnhofstraße 32, 65558 Flacht
Tel. 06432/9512-0
appel.k@greiner-bio.de
www.greiner-bio.de



PFA-100



Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
Dr. Erich Kunzmann
Ludwig-Erhard-Str. 12
65760 Eschborn
Tel. 06196/7713-1111
DiagnosticsDeutschland.healthcare@siemens.com
www.siemens.com/diagnostics

	Instrumentation Laboratory GmbH	Keller Medical GmbH POCT-Diagnostik	Rolf Greiner BioChemica GmbH	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
Vorgestelltes System	Multiplate	VerifyNow	APACT 4 S Plus	PFA-100
Gerätemaße (HxBxT) / Gewicht	10 x 30 x 47 cm / 11 kg	24 x 23 x 16,5 cm / 1,8 kg	14 x 25 x 32,5 cm / 5,3 kg	38 x 23 x 36 cm / 11 kg
Probenmaterial/-stabilität	Vollblut / getestet bis 3h	Citrat-Vollblut / 4h	3,8% Citrat-Vollblut / 4h	3,8% Citrat-Vollblut / 4h
Messprinzip	Impedanzaggregometrie (Messung der Widerstandsänderung)	Turbidimetrie (Messung der Lichtdurchlässigkeit)	Turbidimetrie (Messung der Lichtdurchlässigkeit)	"in vitro-Blutungszeit" (Messung der Verschlusszeit der Matrix-Öffnung)
Reagenzien/Tests ¹	ASPItest (AA); COLtest (K); ADPtest / ADPtest HS (ADP); TRAPtest (TRAP); RISTOtest (R)	Asprin-Assay (AA); P2Y12-Assay (ADP+PGE1, TRAP) GPIIb/IIIa-Assay (TRAP)	Collagen, ADP, Epinephrin, Arachidon Acid, TRAP, Risto	COL/EPI-; COL/ADP- und INNOVANCE PFA P2Y (ADP/PGE1)-Messzellen
Reagenzienkonzept / Zertifizierung	Einwegmesszellen mit integr. Doppelmessung, Reagenzien lyophilisiert / CE-markiert	gebrauchsfertige Reagenzien-Einmalkassetten (Unit-use), Flüssigkontrollen verfügbar, CE IVD zertifiziert	Lyophilisierte Reagenzien, Flüssigkontrollen verfügbar, zertifiziert nach CE/IVD	Unit-use Reagenzien / System und Messzellen CE-zertifiziert
Anwendungsbereiche (1: Monitoring der Wirksamkeit; 2: Nachweis/Prüfung; 3: Qualitätskontrolle) ²	1: ASS, P2Y12-Inhibitoren (C, P, T) GPIIb/IIIa-Inhibitoren; 2: Thrombozytenfunktionsstörungen; funkt. HIT-Diagnostik; 3: Thrombozytenkonzentrat	1: ASS, P2Y12-Inhibitoren (C, P, T), GPIIb/IIIa-Inhibitoren (Abciximab, Eptifibatide, Tirofiban); 2: Thrombozytenfunktionshemmer; 3: zweistufige QK	1: ASS, P2Y12-Inhibitoren (C, P, T) GPIIb/IIIa-Inhibitoren; 2: Thrombozytenfunktionsstörungen; HIT-Diagnostik; Thrombozytenkonzentrat	1+2: ASS, C, P, T; 2: primäre Hämostase unter Scherkräften (Einflussfaktoren vWF, Thrombozytenfunktion), GPIIb/IIIa-Inhibitoren, DDAVP-Effekt
Testdauer (Messzeit in Min.) / Messkanäle	10 / 5 (parallel verwendbar)	2-5 je nach Test / 1	5-10 je nach Anwenderwunsch / 4-24	5 / 1
Probe-/Reagenz volumen (in µl)	300 / 20 (RISTOtest: 12 / 50)	nicht relevant	200 / 20	800 / 20 (Startlösung)
Kontrollmaterial für RiliBäk verfügbar	ja / elektronische Kontrolle durch das System	ja / elektronische und flüssige Standards	ja / flüssig	nein / elektronische Kontrolle durch das System
IT-Anbindung (Data Manager, Laborinformationssysteme)	in Vorbereitung	Anbindung an POCT-Datenmanagement (z. B. Conworx, Aegis POC) mögl.	2x RS 232C / USB-Schnittstelle / LAN-Anschluss	RS 232 - unidirektional
Gerätepreis (netto)	16.950 Euro	7.220 Euro	11.152 Euro	11.600 Euro
Listenpreis pro Test (netto)	5,00-6,00 Euro	18,00-41,00 Euro	1,08-1,22 Euro	10,85-12,50 Euro
Datenanalyse/-speicherung ³	automatische Speicherung als Grafik oder xml-Format	Ausgabe in ARU, PRU oder % Hemmung; automat. Speicherung im Gerät; Ausdruck oder Übertragung an PC mögl.	anwenderspezifischer Befundausdruck / automatische Datenspeicherung in Tagesordner	Ausgabe Verschlusszeit, Befundung über ind. eingegebene Entscheidungsgrenzen, Speicherung der letzten 50 Ergebnisse
Zubehör (im Lieferumfang)	elektronische Pipette, Drucker	elektronische Testkassette, Pflegemittel	komplettes System, kein Zubehör erforderlich	Drucker
Sonstiges	offenes System, Programmierung eigener Tests möglich, Referenzbereiche für Kinder verfügbar	echtes POCT-Gerät für den Einsatz direkt im Katheterlabor, Neuroradiologie oder Anästhesie	kostengünstige und bewährte Methode zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation bei großen Probenaufkommen	geringer Arbeitsaufwand durch kostengünstige Unit-use Reagenzien, besonders bei geringeren Durchsätzen
Besonderheiten	nachgewiesene klinische Prädiktivität für thrombotische Ereignisse, schwere Blutungen, Transfusionsbedarf herzchirurgischer Interventionen; Messzelle mit reduziertem Volumen (175 µl Vollblut) für Forschungszwecke verfügbar	keine Probenvorbereitung, kein Pipettieren; minimales Handling durch direktes Aufsetzen des Blutröhrchens; sehr einfache Plättchenfunktionstests möglich	System ist bis auf 24 Messkanäle erweiterbar (modulare Bauweise), Messzeiten von 30 bis zu 3600 Sek. frei programmierbar, Messempfindlichkeit von min. 30.000 bis max 680.000 Thrombozyten pro µl	ideales System für präoperatives Screening von in der Blutungsanamnese auffälligen Patienten; Monitoring der Effektivität von DDAVP

Die Tabelle basiert auf Herstellerangaben und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und Richtigkeit.

¹ AA: Arachidonsäure; K: Kollagen; TRAP: thrombin receptor activating peptide-6; ADP: Adenosindiphosphat; HS: high sensitivity; R: Ristocetin; P2Y12: ADP-Rezeptor

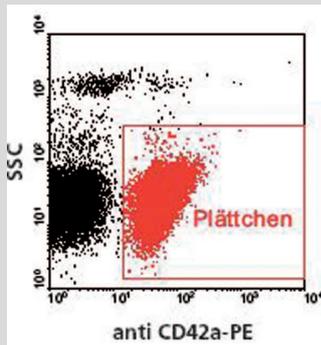
² C: Clopidogrel; P: Prasugrel; T: Ticlopidine; ASS: Acetylsalicylsäure/Aspirin; vWF: Von-Willebrand-Faktor; DDAVP: Desmopressin; HIT: Heparin-induzierte Thrombozytopenie

³ ARU: aspirin response unit; PRU: P2Y12 reaction unit

BD Biosciences



Die Durchflusszytometrie ist die in der Hämostaseologie am vielseitigsten verwendbare Methodik. Sie ermöglicht einerseits die zuverlässige Differentialdiagnostik angebo-



Thrombozyten-Detektion im Vollblut nach Erythrozytenlyse und Markierung mit anti-CD42a-PE im BD FACSCanto™ II.

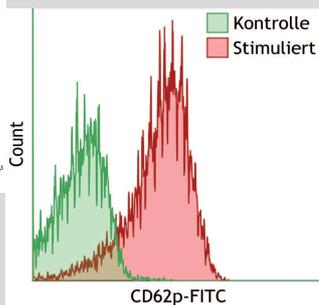
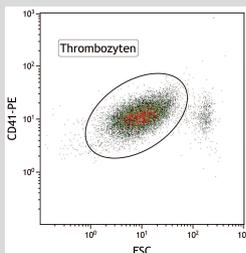
Aus: Durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozytenfunktion von Prof. Kehrel und Dr. Brodde (Münster), Broschüre über die Marketingabteilung anzufordern (s.u.).

rener und erworbener Thrombozytopathien, andererseits lassen sich durch Erfassung von Aktivierungszustand, funktioneller Kapazität der Thrombozyten, Assoziation von Thrombozyten mit Leukozyten und die Erfassung zellulärer Mikropartikel von Thrombozyten und Leukozyten, wertvolle Hinweise auf thromboembolische Erkrankungen erhalten. Daneben ist die Wirkung antithrombozytärer Medikamente präzise analysierbar. Messungen von Vorgängen auf der Plasmazellmembran und innerhalb der Zelle gehören zum Spektrum. Die gezielte Erfassung intrazellulärer Schritte der Signalübertragung wird in Zukunft an Bedeutung gewinnen. Zusätzlich können junge Thrombozyten mit hohem mRNA Gehalt von reifen Thrombozyten unterschieden werden. Im Gegensatz zur Aggregometrie, die einen Kontakt zwischen Thrombozyten erfordert, ist eine durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozyten auch bei Patienten mit einer Thrombozytopenie sinnvoll durchführbar.

Kontaktinformation

Becton Dickinson • Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg • Tel. 06221/305-240 • Christina_Borlein@europe.bd.com

Beckman Coulter



Marker X-Med	Value
All (Kontrolle)	0.21
All (Stimuliert)	6.32

Bestimmung des Aktivierungsgrades aktivierter Thrombozyten aus unfiziertem Patientenvollblut mit CD62P (gegen unstimulierte Kontrolle) am Coulter Navios.

Gemäß Protokollen von PD Dr. Mario Koks, Beckman Coulter; Kontaktinfo zur Anforderung des Protokollhandbuchs s.u.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen von Thrombozyten gewinnen zunehmend an klinischer Bedeutung. Neben morphologischen Veränderungen können so Antigenmuster der Thrombozyten immu-

im Vordergrund. Zudem können Therapien mit Aggregationshemmern mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen überwacht werden.

Kontaktinformation

Beckman Coulter • Europark Fichtenhain B 13 • 47807 Krefeld • Tel. 02151 333-5 • www.beckmancoulter.com

Durchflusszytometrie

Einen gänzlich anderen analytischen Zugang eröffnet die gezielte Untersuchung von Einzelzellen mittels Durchflusszytometrie. Bei diesem Verfahren durchlaufen mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Thrombozyten einen Laserstrahl. Mittlerweile stehen mehrere Marker und Assays zur Verfügung, mit denen sich insbesondere die Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten analysieren lassen.

Anhand unterschiedlicher Streulicht- und Fluoreszenzsignale kann man Gesamtmenge und Aktivierungszustand der Zellen bestimmen und verschiedene Zelltypen wie reife und unreife Thrombozyten unterscheiden. Darüber hinaus erlaubt die Durchflusszytometrie den Nachweis angeborener Thrombozytenfunktionsstörungen, z. B. dem Bernard Soulier Syndrom oder der Glanzmann Thrombasthenie.

Im Vergleich zu den auf den vorhergehenden Seiten beschriebenen Thrombozytenfunktionsanalysen lässt sich eine durchflusszytometrische Untersuchung jedoch nicht am Patientenbett durchführen. Das Verfahren ist relativ aufwändig und kostenintensiv, andererseits aber auch hoch sensitiv und spezifisch. Bereits sehr geringe Mengen an Blutplättchen reichen aus, um eine primäre oder sekundäre Thrombozytenfunktionsstörung nachzuweisen. So eignet sich die Methode auch für Messungen an Patienten mit stark ausgeprägtem Thrombozytenmangel oder bei Blutproben von Kleinkindern. 🌸



Prof. Dr. med. Michael Spannagl
Klinikum der Universität München

Hämostaseologie
michael.spannagl@med.uni-muenchen.de