

Originalarbeit/Original Paper

Überwachung der Clopidogrel-Therapie mit Hilfe der Mehrfach-Elektroden Plättchen-Aggregometrie

Monitoring of clopidogrel treatment by multiple electrode platelet aggregometry

Tobias Behr¹, Werner Behr^{2,*} und Wolfgang von Scheidt¹

¹ I. Medizinische Klinik, Herzzentrum Augsburg-Schwaben, Klinikum Augsburg, Augsburg, Deutschland

² Institut für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Umwelthygiene, Klinikum Augsburg, Augsburg, Deutschland

Zusammenfassung

Mangelndes Ansprechen auf Clopidogrel ist eine Hauptursache für Komplikationen nach Implantation eines Koronarstents. Mehrfach-Elektroden Plättchen-Aggregometrie (MEA) mit Hilfe des Multiplate®-Systems scheint eine geeignete Methode für die Kontrolle der Clopidogrel-Therapie zu sein. Wir validierten die Methode, indem wir MEA-Messungen aus Hirudinblut bei folgenden Gruppen durchführten: 150 gesunde Testpersonen, um die MEA-Referenzbereiche festzulegen; 75 hämatologische Patienten mit Anämie/Thrombopenie, um den Einfluss von Hämatokrit (Hk) und Thrombozytenzahl auf die MEA-Werte zu bestimmen; 1005 Patienten nach perkutaner Koronarintervention (PCI) und Verabreichung einer 600 mg-Clopidogrel-loading-dose, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter klinischen Bedingungen zu testen. Unterschiedliche Methoden bei Blutgewinnung und Transport beeinflussen die MEA-Werte nicht, wenn die Probe vor der Messung 30 Minuten ruhig liegt. Die Analyse muss innerhalb von 3 Stunden nach Blutentnahme erfolgen. Bei Patienten mit einem Hk $\leq 0,30$ L/L oder Thrombozyten $\leq 100/\text{nL}$ sind keine zuverlässigen Ergebnisse möglich. Ein Ansprechen auf Clopidogrel ist anzunehmen, wenn der ADP-Wert den unteren Referenzbereich (Männer: 32 U, Frauen: 46 U) unterschreitet. Da die Clopidogrel-loading-dose auch zur Abnahme des Thrombin-Rezeptor-Activating Peptid (TRAP)-Wertes führt, kann der Responder-Status nur eindeutig festgelegt werden, wenn der TRAP-Wert

> 20 U und das TRAP/ADP-Verhältnis > 3 sind. Das Clopidogrel-Monitoring sollte in den ersten 24 Stunden nach PCI erfolgen, auch wenn ca. 12% der Ergebnisse unklar sind und kontrolliert werden müssen. Zusammenfassend ist die MEA-Messung bei Beachtung der präanalytischen Bedingungen und des Blutbildes eine geeignete Methode, um eine Clopidogrel-Response zu erkennen. Um eine valide Beurteilung zu gewährleisten, sollte der TRAP-Test gleichzeitig durchgeführt werden.

Schlüsselwörter: Clopidogrel; Impedanz-Aggregometrie; Mehrfach-Elektroden Plättchen-Aggregometrie (MEA); Multiplate®; Therapie-Monitoring; Thrombozytenaggregation.

Abstract

Low responsiveness to clopidogrel is an important cause of adverse events after coronary stenting. Multiple electrode platelet aggregometry (MEA) measured by the Multiplate® system seems to be suitable for monitoring clopidogrel treatment. We validated this method by analyzing hirudin blood samples from 150 healthy volunteers to establish reference ranges of the MEA tests, from 75 hematologic patients with anemia or thrombopenia to determine the dependence of MEA values on hematocrit (HCT) and platelet count, and from 1005 patients after percutaneous coronary intervention (PCI) and 600 mg clopidogrel loading-dose to test the reproducibility of the results under clinical conditions. It was found that MEA results are not affected by the different methods of blood withdrawal and sample transport, if the blood is kept at rest for 30 min before measuring. Measuring must be performed within 3 h after blood withdrawal. It was found that MEA results are not valid in patients with HCT ≤ 0.30 L/L or platelets $\leq 100/\text{nL}$. Because clopidogrel loading also causes a decrease of thrombin receptor activating peptide (TRAP) values, clopidogrel responsiveness, defined by ADP values under the lower reference level (men: 32 U, women: 46 U), can only reliably be classified if the TRAP value is > 20 U and the TRAP/ADP ratio > 3 . Clopidogrel monitoring should be performed within 24 h after PCI, despite the risk of unclear results in approximately 12%. In summary, by concentrating on preanalytical conditions and blood count, MEA is suitable to detect clopidogrel response.

*Korrespondenz: Dr. Werner Behr, Institut für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Umwelthygiene, Klinikum Augsburg, Stenglinstraße 2, 86156 Augsburg, Deutschland
Tel.: +821/400-2752
Fax: +821/400-2756
E-Mail: werner.behr@klinikum-augsburg.de

The TRAP test should be performed simultaneously to allow a valid assessment.

Keywords: clopidogrel; impedance aggregometry; multiple electrode platelet aggregometry (MEA); Multiplate™; platelet aggregation; therapy monitoring.

Einleitung

Die stetige Weiterentwicklung der Stent-Technologie hat dazu geführt, dass das akute Koronarsyndrom (ACS) und die chronische koronare Herzkrankheit (KHK), deren Inzidenz in Deutschland ca. 3% bis 4% beträgt, heute in vielen Fällen durch perkutane Koronarintervention (PCI) behandelt werden können [1, 2]. Pro Jahr werden in Deutschland ca. 250.000 Koronarstents implantiert [2]. Trotz der in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie [2] vorgeschriebenen dualen Plättchenhemmung mit Azetylsalicylsäure und dem ADP-Rezeptor-Antagonisten Clopidogrel kommt es bei 0,5% bis 1% der Patienten nach Stentimplantation zur Stentthrombose, die bei 10% bis 11% der Patienten zum Tod führt [3, 4]. Als Hauptursache für diese Komplikation wird die bei einem Teil der Patienten unzureichende Wirkung von Clopidogrel genannt [5].

Der Goldstandard für die Messung der durch Clopidogrel oder andere Thienopyridine hervorgerufenen Thrombozyten-Aggregationshemmung ist die Lichttransmissions-Aggregometrie (LTA) nach Born [6], die jedoch schwer standardisierbar, aufwändig und nur in einer limitierten Anzahl von Laboratorien durchführbar ist [7].

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden bzw. Geräte zur Messung der Thrombozytenfunktion entwickelt, die teils auch zur Point-of-Care-Testung (POCT) geeignet sind [8, 9]. Unter diesen Verfahren hat sich die Mehrfach-Elektroden Plättchen-Aggregometrie (MEA) mit dem „Multiple Platelet Function Analyzer“ (Multiplate®, Dynabyte, München) als besonders einfache, schnelle und vergleichsweise kostengünstige Methode erwiesen [10]. Sie beruht auf der von Cardinal und Flower entwickelten Vollblut-Impedanzaggregometrie [11], bei der die in Ruhe athrombogenen Thrombozyten nach Aktivierung an Elektroden anhaften und somit eine Zunahme des Widerstandes bewirken. Im Gegensatz zu dem seit 20 Jahren vor allem in den USA etablierten Chrono-Log-Aggregometer (Havertown, PA, USA), bei der eine wiederverwendbare, nach jeder Messung aufwändig zu reinigende Messzelle eingesetzt wird, erfolgt beim Multiplate®-Test die Analyse in einer Einweg-Messzelle, wobei bei jeder Messung eine Doppelbestimmung durchgeführt und das Ergebnis software-gesteuert überprüft wird. Da kein Zentrifugationsschritt erforderlich ist und das Gerät über eine computergesteuerte elektronische Pipette verfügt, ist das Multiplate®-System POCT-tauglich. Die Testdurchführung ist infolge der software-unterstützten Bedienung einfach, das Ergebnis liegt nach ca. 10 min vor. Der Preis pro Messung beträgt 5 bis 7 Euro.

Erste Untersuchungen zeigten, dass die Ergebnisse der MEA mit denen der LTA gut übereinstimmen [12] und die

Methode offensichtlich geeignet ist, Clopidogrel-Low-Responder zu erkennen [13]. Noch nicht ausreichend untersucht ist bisher, welche präanalytischen Voraussetzungen für eine valide Messung erfüllt sein müssen, inwieweit Hämatokrit und Thrombozytenzahl die Messwerte beeinflussen, ab welchem Cut-off-Wert von einer unzureichenden Clopidogrel-Wirkung gesprochen werden kann (=Low-Responder), wann der optimale Messzeitpunkt nach der PCI ist und wie die Reproduzierbarkeit der Werte im praktischen Einsatz ist.

Material und Methoden

Durchführung der MEA-Messungen

Das Blut wurde mit einer Sarstedt Monovette®, r-Hirudin/2,6 mL, (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aus einer Armvene entnommen und anschließend – soweit nicht anders beschrieben – mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur ruhig gelagert. Die MEA-Messungen wurden innerhalb von 120 Minuten nach Blutentnahme gemäß den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. In der Einweg-Messzelle befinden sich zwei paarweise angeordnete hochleitfähige silberbeschichtete Kupferdrähte. Zwischen jedem Paar fließt unabhängig voneinander ein Wechselstrom. Durch die Anhaftung und Aggregation der Thrombozyten nach entsprechender Aktivierung erhöht sich der elektrische Widerstand zwischen den Sensordrähten. Die Zunahme des elektrischen Widerstands wird kontinuierlich gemessen und als Kurve über die Zeit aufgezeichnet. Die Fläche unter der Aggregationskurve („Area Under the Curve“=AUC) wird in frei gewählte „Aggregation Units“ (=U) umgerechnet. Die „Aggregation Units“ stellen somit ein Maß für die Thrombozytenaggregation nach Zugabe des Aktivators dar und erlauben eine Einschätzung der Wirksamkeit bestimmter Thrombozyten-Aggregationshemmer. Es wurden immer folgende zwei Aktivoren eingesetzt:

1. ADP (0,2 mM) zur Detektion der Wirkung von Thienopyridinen.
2. Thrombin-Rezeptor-Activating-Peptide (TRAP) (1 mM) zum Erkennen einer zusätzlichen Wirkung von GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten und zur Beurteilung der globalen Thrombozyten-Aggregationsfähigkeit.

Präanalytische Einflussfaktoren

Da in einer Klinik das Personal bezüglich der Blutentnahme unterschiedlich geübt ist, wurde untersucht, ob ein etwaiger Einfluss von Scherstress auf die Thrombozyten die MEA-Messung beeinflusst. Hierzu wurde bei 20 Blutspendern auf zwei unterschiedliche Arten Blut entnommen: Ein Arm wurde mittels einer Blutdruckmanschette so gestaut, dass der Staudruck deutlich über dem diastolischen Blutdruck lag. Nach mindestens 3 Minuten Stauung wurde mit einer 21G Kanüle eine Blutprobe entnommen. Am anderen Arm wurde nur so leicht und kurz gestaut, dass eine Blutentnahme mit einer 19G Kanüle möglich war.

Da laut Herstellerangaben die MEA-Messungen mit ADP bzw. TRAP als Aktivatoren frühestens nach einer 30-minütigen Lagerung bei Raumtemperatur durchgeführt werden sollen, wurde geprüft, welchen Einfluss die Art der Lagerung auf die Messwerte hat. Bei 16 Blutspendern wurden jeweils zwei Röhrchen Hirudin-Blut entnommen. Das eine Röhrchen wurde vor der Messung 30 Minuten erschütterungsfrei gelagert (=Ruhelagerung), das andere 30 Minuten auf einen Rollenmischer gelegt bzw. umhergetragen und gelegentlich über Kopf gemischt. Damit sollen die üblichen Transportbedingungen von Laborproben simuliert werden.

Um zu prüfen, inwieweit ein Rohrpostversand die Messwerte beeinflusst, wurden von 20 Testpersonen jeweils zwei Röhrchen Hirudin-Blut entnommen. Die eine Probe wurde sofort erschütterungsfrei gelagert, während die andere einem ca. 30 Sekunden dauernden Rohrpostversand unterzogen wurde. Nach 30 Minuten Ruhelagerung der zweiten Probe wurden aus beiden Röhrchen die MEA-Messungen durchgeführt.

Erstellung von Referenzbereichen

Referenzbereiche für den ADP- und TRAP-Test wurden mit Hilfe von 92 Thrombozytenspendern und 58 gesunden Labormitarbeitern des Klinikums Augsburg (75 Männer und 75 Frauen, Alter: 19 bis 66 Jahre; Mittelwert [MW]=40 Jahre) erstellt. Durch Befragung wurde ausgeschlossen, dass die Testpersonen in den letzten 10 Tagen plättchenhemmende Medikamente eingenommen hatten oder an Erkrankungen litten, welche die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen.

MEA-Werte nach Verabreichung der Clopidogrel-Loading-dose

Von Januar 2008 bis Juli 2009 wurden bei 1139 Patienten, die einen Koronarstent erhielten, MEA-Messungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verabreichung der Loading-dose von 600 mg Clopidogrel durchgeführt. In Ausnahmefällen, z.B. bei zusätzlicher Gabe von GPIIb/IIIa-Antagonisten, erfolgte die Messung in den folgenden Tagen unter einer 75 mg Erhaltungsdosis. 134 Patienten, bei denen der TRAP-Wert oder die TRAP/ADP-Ratio wiederholt zu niedrig waren oder deren Werte im Graubereich lagen oder wegen einer Anämie oder Thrombopenie nicht sicher beurteilbar waren, wurden ausgeschlossen, so dass letztendlich 1005 Patienten in die Auswertung eingingen.

Abhängigkeit der MEA-Werte von Hämatokrit und Thrombozytenzahl

Um die Abhängigkeit zwischen Thrombozytenzahl bzw. Hämatokrit (Hk) und den MEA-Werten zu überprüfen, wurde bei 100 gesunden Testpersonen der Korrelationskoeffizient für die entsprechenden Daten berechnet. Da Thrombozytenfunktionsteste bei niedrigen Thrombozyten-, aber auch Hk-Werten, häufig nicht verwertbare Ergebnisse liefern, wurden MEA-Messungen bei 75 anämischen und/oder thrombopenischen Patienten der hämatologisch-onkologi-

schen Ambulanz, die keine Thienopyridine oder GPIIb/IIIa-Antagonisten einnahmen, durchgeführt.

Reproduzierbarkeit der MEA-Messungen

Da das Multiplate®-Gerät über fünf identische Messkanäle verfügt, wurde Hirudin-Blut einer Testperson im Abstand von 15 Minuten auf allen fünf Kanälen von einem Untersucher insgesamt fünfmal hintereinander gemessen, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Messkanälen zu ermitteln. Um die Schwankungsbreite der Messwerte innerhalb eines Zeitraums von 30 bis 270 Minuten nach Blutentnahme zu erfassen, wurde Hirudin-Blut von fünf Blutspendern je 9-mal gemessen, wobei pro Testperson immer derselbe Messkanal verwendet wurde.

Da aus Stabilitätsgründen kein Kontrollmaterial für die MEA-Messungen zur Verfügung steht, wurde die Inter-Assay-Variabilität mit Blut von fünf Probanden bestimmt, die sich über einen Zeitraum von 18 Monaten ca. 30-mal zur Blutentnahme zur Verfügung stellten.

Bei 291 Stent-Patienten, die nach Verabreichung der Clopidogrel-Loading-dose eine adäquate Thrombozytenaggregationshemmung zeigten, wurden in den folgenden Tagen zum Teil mehrmals die Multiplate®-Analysen kontrolliert, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im klinischen Betrieb zu beurteilen. Bei 17 Patienten war die Überprüfung des Responder-Status auch noch einige Wochen später anlässlich eines erneuten Klinikaufenthaltes möglich.

Statistische Methoden

Mittelwert, Median, Standardabweichung und Variationskoeffizient wurden nach den üblichen Formeln berechnet. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen präanalytischen Bedingungen wurde der Einstichproben-t-Test mit zweiseitiger Fragestellung verwendet. Um die TRAP-Werte der Referenzpersonen und der Patienten nach Loading-dose hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes zu bewerten, wurde der Zweistichproben-t-Test eingesetzt. Wenn der Chi-Quadrat-Anpassungstest zum Niveau 0,1 keine Normalverteilung der Daten ergab, wurde stattdessen der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Präanalytische Einflussfaktoren

Die Ergebnisse der MEA-Messungen (Tabelle 1) nach verschieden starker Venenstauung und bei Verwendung von Kanülen mit unterschiedlichem Lumen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Blutgewinnungsverfahren.

Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, dass die Probenröhrchen während der mindestens 30 Minuten Wartezeit vor der Messung erschütterungsfrei gelagert werden müssen, da bei gelegentlicher Durchmischung, wie sie im Rahmen des

Tabelle 1 Einfluss von Venenstauung und Kanüldurchmesser auf die Ergebnisse der MEA-Messungen.

n = 20	ADP-Test		TRAP-Test	
	geringe Stauung 19G Kanüle	starke Stauung 21G Kanüle	geringe Stauung 19G Kanüle	starke Stauung 21G Kanüle
Mittelwert, U	83,3	81,2	117,2	114,5
Min/max Werte, U	44–117	34–113	78–134	90–141
Variationskoeffizient, %	19,8	22,0	12,8	14,4
	n.s.		n.s.	

Transportes erfolgt, oder bei Lagerung auf einem Rollentischer niedrigeren Werte gemessen wurden.

Die MEA-Werte der 20 Hirudin-Blutproben, die vor Ruhelagerung mit der Rohrpost verschickt wurden, unterschieden sich nicht von den Werten aus parallel entnommenen Proben, die unmittelbar nach Entnahme erschütterungsfrei gelagert wurden (Mittelwerte der Messung mit/ohne Rohrpostversand: ADP-Test 70,5/70,3 U; TRAP-Test 104,8/105,6 U).

Erstellung von Referenzbereichen und Festlegung des Cut-off-Wertes für Responder

Die Referenzbereiche bei Männern und Frauen unterschieden sich sowohl beim ADP- wie auch beim TRAP-Test signifikant voneinander, so dass eine geschlechtsabhängige Auswertung erforderlich war (Abbildung 2).

Während die Verteilung der Messwerte beim TRAP-Test einer Standard-Normalverteilung unterliegt, folgen die Messwerte für den ADP-Test einer logarithmischen Normalverteilung. Da für die Festlegung des Cut-off-Wertes zwischen Low-Respondern und Respondern die untere Grenze des ADP-Tests entscheidend ist, wurde für diese das 95%-Konfidenzintervall berechnet.

Es ergeben sich folgende Referenzbereiche (Konfidenzintervalle in Klammern):

	ADP-Test [U]	TRAP-Test [U]
Männer:	35 (32–38)–114	68–134
Frauen:	50 (46–53)–132	79–151

Beim Monitoring der Wirkung von Thienopyridinen ist daher der Zielbereich für den ADP-Wert bei Männern <32 U, bei Frauen <46 U (=Responder). Bei ADP-Werten >38 bzw. >53 U werden die Patienten als „Low-Responder“ eingestuft. Bei Patienten mit ADP-Werten im Konfidenzintervall (=„Graubereich“) sollte keine Zuordnung vorgenommen, sondern eine Kontrolluntersuchung empfohlen werden.

Abhängigkeit der MEA-Werte von Hämatokrit und Thrombozytenzahl

Bei 100 Blutspendern wurden die Messergebnisse des ADP- und TRAP-Tests mit der Thrombozytenzahl und dem Hk-Wert korreliert. Die Thrombozyten lagen zwischen 174 und 480/nL, die Hk-Werte zwischen 0,36 und 0,54 L/L. Zwischen ADP- bzw. TRAP-Werten und der Thrombozytenzahl fand sich auf dem Niveau $p=0,01$ ein linearer, positiver Zusammenhang (Korrelationskoeffizient $r=0,462$ bzw. $0,353$), zwischen Hk und ADP- bzw. TRAP-Werten eine schwache negative lineare Beziehung ($r=-0,284$ bzw. $-0,264$).

Die 75 hämatologisch-onkologischen Patienten ohne Einnahme von Thienopyridinen wurden abhängig von Hk- und Thrombozytenwert in vier Gruppen eingeteilt. Die Ergebnisse der MEA-Messungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

In Gruppe 1 lagen alle MEA-Werte deutlich unterhalb der Referenzbereiche. Bei 20/21 Patienten war das TRAP/ADP-Verhältnis <3 (0–2,74; MW 1,46). Ein Patient zeigt eine

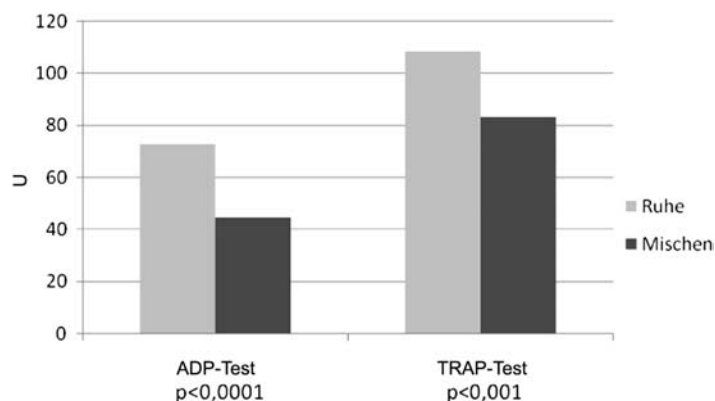


Abbildung 1 Ergebnisse der MEA-Messungen bei 16 gesunden Probanden nach Ruhelagerung und bei Lagerung mit gelegentlicher oder ständiger Durchmischung.

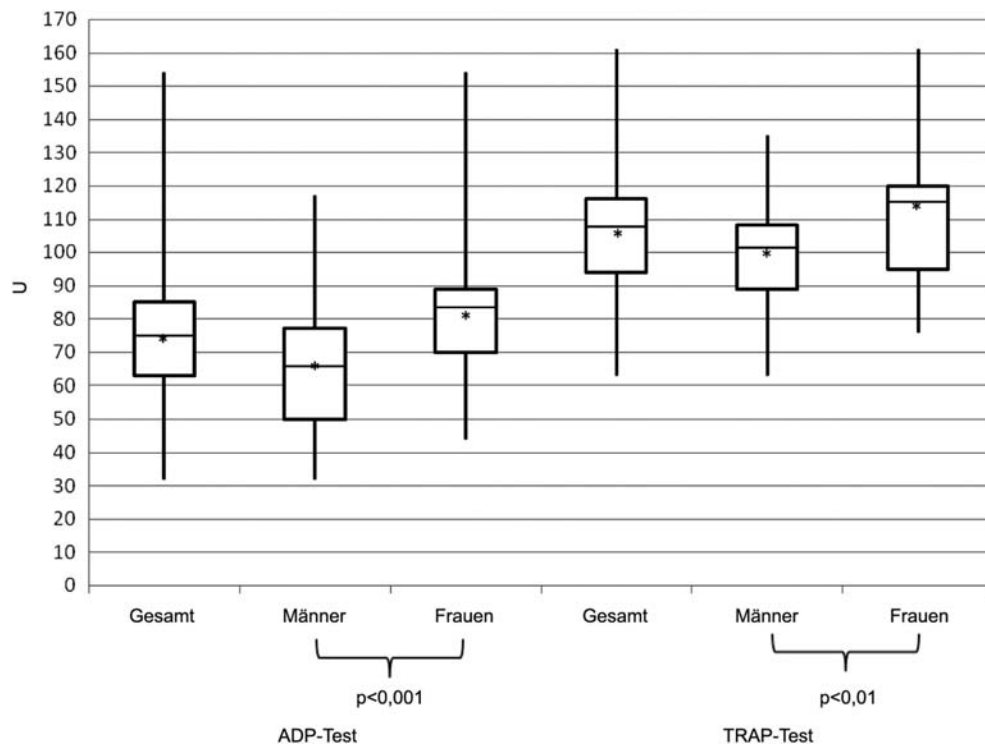


Abbildung 2 Ergebnisse der MEA-Messungen bei 150 gesunden Testpersonen (je 75 Männer und Frauen). Der waagerechte Strich gibt den Mittelwert an, der Stern den Median.

Responder-Konstellation (TRAP/ADP=30/3). In Gruppe 2 waren 5/7 TRAP-Werte < 20 U. Ein Patient hatte ein TRAP/ADP-Verhältnis < 3 , ein Patient unauffällige Werte. In Gruppe 3 hatten nur 10/26 Patienten unauffällige Werte, drei Patienten erfüllten die Kriterien für einen Responder-Status. Bei neun Patienten war das TRAP/ADP-Verhältnis < 3

(1,46–2,88; MW 1,99) und bei vier lagen die Werte im Graubereich. Uneinheitlich verhielten sich die MEA-Werte in Gruppe 4: Während 13/21 Patienten Werte im Referenzbereich hatten, zeigten zwei Patienten die für einen Responder-Status typische Konstellation. Sechs Patienten wiesen ein TRAP/ADP-Verhältnis < 3 auf.

Tabelle 2 MEA-Werte bei Patienten mit Anämie und/oder Thrombopenie ohne Einnahme von Thienopyridinen.

Patientengruppen		ADP-Werte MW Min/max [U]	TRAP-Werte MW Min/max [U]
Gruppe 1, n=21			
Hk $\leq 0,30$ L/L und Thrombozyten $\leq 100/\text{nL}$		8,9	16,0
Hk: 0,21–0,30 L/L	MW 0,27	1/23	1/49
Plt: 8–99/nL	MW 45,6		
Gruppe 2, n=7			
Hk $> 0,30$ L/L und Thrombozyten $\leq 100/\text{nL}$		12,7	30,3
Hk: 0,31–0,41 L/L	MW 0,34	2/50	5/114
Plt: 20–80/nL	MW 44,0		
Gruppe 3, n=26			
Hk $\leq 0,30$ L/L und Thrombozyten $> 100/\text{nL}$		42,5	72,3
Hk: 0,22–0,30 L/L	MW 0,28	10/81	19/146
Plt: 104–506/nL	MW 213		
Gruppe 4, n=21			
Hk $> 0,30$ L/L und Thrombozyten $> 100/\text{nL}$		53,3	85,6
Hk: 0,31–0,35 L/L	MW 0,33	20/124	51/123
Plt: 110–608/nL	MW 259		

Aus diesen Ergebnissen wurden folgende Konsequenzen gezogen:

1. Der Multiplate®-Test ist bei einer Thrombozytenzahl $\leq 100/\text{nL}$ nicht verwendbar.
2. Da bei Thrombozytenzahlen $> 100/\text{nL}$, aber Hk-Werten $\leq 0,30 \text{ L/L}$ nur 10/26 Patienten (=38%) Werte im Referenzbereich hatten und bei 3/26 Patienten ohne Thienopyridin-Einnahme eine Responder-Konstellation gefunden wurde, sollte auch ein Hk $\leq 0,30$ ein Ausschlusskriterium für den Test sein.
3. Bei Hk-Werten zwischen 0,31 und 0,35 L/L und Thrombozytenwerten $> 100/\text{nL}$ waren bei 13/21 Patienten die Ergebnisse im Referenzbereich. Bei 2/21 Patienten lag auch ohne Thienopyridin-Einnahme eine Responder-Konstellation vor (TRAP/ADP: 79/25 und 38/12). MEA-Ergebnisse in diesem Hk-Bereich sind daher v.a. bei erniedrigten ADP-Werten mit Vorbehalt zu werten und vor allem bei einem TRAP/ADP-Verhältnis von knapp > 3 kontrollbedürftig.
4. Für die Beurteilung der Thienopyridin-Wirkung muss das Ergebnis des TRAP-Tests mit herangezogen werden. Bei TRAP-Werten $< 20 \text{ U}$ oder bei einem TRAP/ADP-Verhältnis < 3 sollten trotz ADP-Werten im Responderbereich keine Aussagen zur Thienopyridin-Wirkung gemacht werden, da vermutlich keine regulären Messbedingungen vorliegen.

MEA-Werte nach Verabreichung der Clopidogrel-Loading-dose von 600 mg

887 (88,3%) der 1005 Patienten wurden aufgrund der oben genannten Kriterien als Clopidogrel-Responder eingestuft. 118 Patienten (11,7%) wiesen unter der Standard-Clopidogrel-Therapie ADP-Werte im Referenzbereich auf und waren demnach Clopidogrel-Low-Responder (CLR). 885 (88,1%) der 1005 Stent-Patienten konnten bei der ersten Messung eindeutig bzgl. ihrer Clopidogrel-Response bewertet werden. Von den übrigen 121 wurden 99 bei der 2. Messung, 16 bei der 3. Messung und 6 bei der 4. Messung zweifelsfrei einem Responder- bzw. Low-Responder-Status zugeordnet. Somit ergibt die Messung zu einem frühen Zeitpunkt nach Stentimplantation im Regelfall eindeutige Befunde.

Aus den in Tabelle 3 zusammengestellten Werten ist ersichtlich, dass auch die TRAP-Werte der Patienten nach

Stentimplantation und Einnahme der Loading-dose im Vergleich zum Referenzkollektiv signifikant ($p < 0,001$) niedriger sind.

Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen bei Patienten mit initial nicht eindeutig beurteilbaren MEA-Werten

121 der 1005 Patienten (=12%) hatten bei der Erstmessung ein TRAP/ADP-Verhältnis < 3 und/oder einen TRAP-Wert $< 20 \text{ U}$ bzw. ADP-Werte im Graubereich. Die Kontrolluntersuchungen ergaben bei 87 einen Responder-, bei 34 (=28,1%) einen Low-Responder-Status. Bei 30/34 CLR wurde das unzureichende Ansprechen auf Clopidogrel innerhalb von sieben Tagen (MW 2,9), bei den restlichen vier Patienten erst nach sieben und mehr Tagen festgestellt.

Reproduzierbarkeit der MEA-Messungen

Die Variationskoeffizienten (Vk) für die Messung einer Probe (ADP 76,7 U; TRAP 128,5 U) an allen fünf Kanälen lagen beim ADP-Test zwischen 5,1% und 15,1% (MW 8,7) und beim TRAP-Test zwischen 4,4% und 8,0% (MW 6,8). Für die Vk der Präzision in Serie (ADP-Test: $n=5$; TRAP-Test: $n=9$; Messung an einem einzigen Kanal) ergaben sich beim ADP-Test Werte von 5,4% bis 16,6% (MW 11,4), beim TRAP-Test Werte von 5,4% bis 10,7% (MW 9,0). Da es bereits 180 Minuten nach der Blutentnahme beim ADP-Test zu einem deutlichen Absinken der Werte kommt, wurden bei diesem Test nur die ersten fünf Messungen ausgewertet (Abbildung 3). Für die Präzision von Tag zu Tag wurden beim ADP-Test Vk-Werte zwischen 11,6% und 23,0% (MW 16,4) gemessen, beim TRAP-Test zwischen 9,3% und 14,0% (MW 11,1), wobei diese Ergebnisse zusätzlich durch die intraindividuelle Variabilität der Messwerte beeinflusst werden.

Bei 291 Koronarstent-Patienten mit adäquater Thrombozytenfunktionshemmung unter 75 mg Clopidogrel/d wurden während des stationären Aufenthaltes Kontrolluntersuchungen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Messungen im klinischen Betrieb zu beurteilen. Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, ob das Ergebnis bei Patienten, die bei der Erstmessung als Clopidogrel-Responder beurteilt wurden, bei einer späteren Messung eindeutiger gewesen wäre.

Tabelle 3 ADP- und TRAP-Werte der Clopidogrel-Responder und -Low-Responder.

	Responder		Low-Responder	
	Männer n=635	Frauen n=252	Männer n=94	Frauen n=24
ADP-Test				
Mittelwert, U	11,8	13,6	52,5	61,8
Min/max Werte, U	1–31	1–44	36–151	50–87
TRAP-Test				
Mittelwert, U	62,9	71,7	97,7	104,8
Min/max Werte, U	21–128	22–138	48–154	82–138

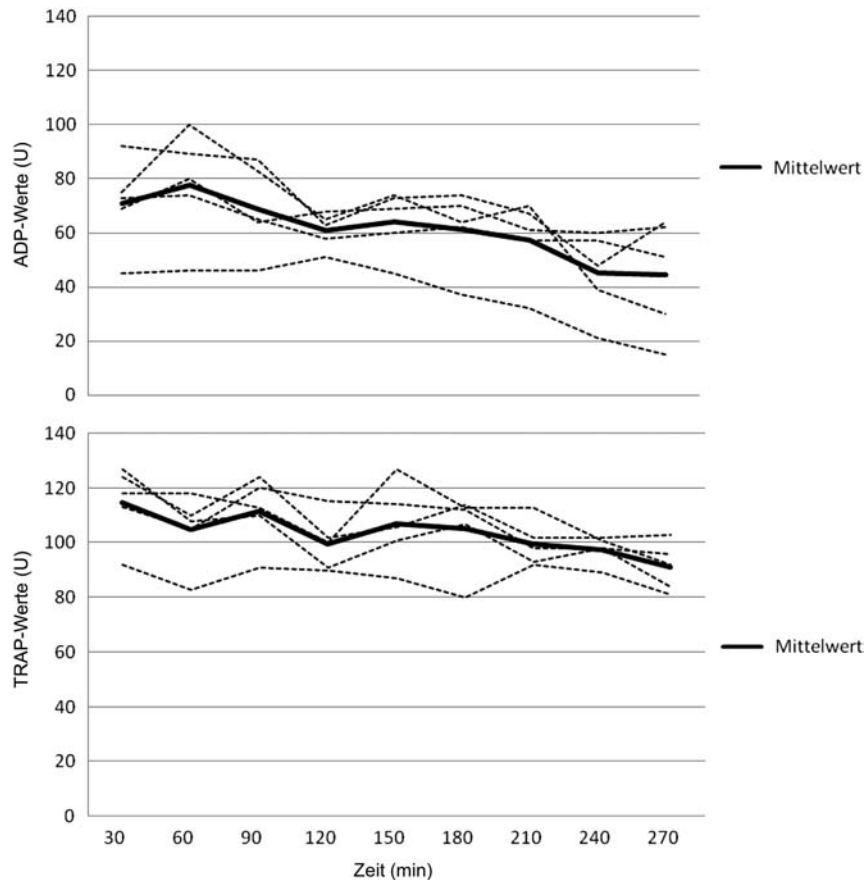


Abbildung 3 Abhängigkeit der ADP- und TRAP-Werte vom Zeitpunkt der Messung nach der Blutentnahme.

Wie oben festgelegt, ist die Beurteilung des Responder-Status umso zweifelsfreier, je höher der TRAP-Wert und das Verhältnis TRAP/ADP sind.

Nur 75 Patienten (25,8%) wiesen bei der Kontrolle der MEA-Messungen eindeutige Ergebnisse auf. 198 Patienten (68,0%) hatten bei den Folgemessungen Messergebnisse, die zwar ebenfalls eindeutig auf einen Responder-Status hindeuteten, jedoch keine zweifelsfreie Beurteilung erlaubten. Bei 17 Patienten (5,8%) hingegen konnten bei den Folgemessungen keine eindeutigen Aussagen zum Responder-Status gemacht werden. Ein Patient war anfänglich Clopidogrel-Responder, wies aber bei der Folgemessung einen Low-Responder-Status auf. Bei den 17 Patienten, bei denen die Kontrolluntersuchung 29 bis 475 Tage (MW 213) später erfolgte, konnte in allen Fällen der Responder-Status bestätigt werden, wobei die Werte mit Korrelationskoeffizienten von 0,790 für ADP und 0,734 für TRAP gut übereinstimmten.

Diskussion

Das Multiplate®-System wurde primär als POCT-Methode entwickelt und wird derzeit vor allem eingesetzt, um bei Patienten mit perioperativen Gerinnungsstörungen die Thrombozytenfunktion schnell und patientennah beurteilen zu können [14]. Der Einsatz dieses Geräts im Zentrallabor

eines Klinikums ist eher die Ausnahme, ermöglicht aber die Nutzung des Mess-Systems durch verschiedene klinische Fachgebiete und sichert eine gleichbleibende Qualität, da die Messungen von qualifiziertem Personal durchgeführt werden. Wenn MEA-Tests an einer zentralen Stelle erfolgen, muss geklärt sein, inwieweit präanalytische Faktoren, wie variierende Abnahme- und Transportbedingungen, Verzögerungen bei der Durchführung der Messungen u.ä., die Ergebnisse beeinflussen können. Bislang liegen dazu fast keine Untersuchungen vor [15].

Um den die Thrombozyten aktivierenden Scherstress zu vermeiden, soll für Messungen der Thrombozytenfunktion die Vene zur Blutentnahme nicht oder nur kurz gestaut und eine möglichst weitlumige Kanüle verwendet werden, was im klinischen Alltag nur schwer sicherzustellen ist. Unsere Untersuchungen ergaben, dass die Technik der Blutentnahme die MEA-Messungen nicht beeinflusst. Auch der Versand der Hirudin-Röhrchen mit einer Rohrpostanlage erscheint problemlos. Voraussetzung ist in allen Fällen, dass die Blutprobe vor der Messung mindestens 30 Minuten erschütterungsfrei liegt. Permanentes oder auch nur gelegentliches Durchmischen während der Lagerung führt zu signifikant niedrigeren MEA-Werten, was auch von anderen Untersuchern festgestellt wurde [15]. Offensichtlich sind die Thrombozyten zumindest in den ersten 30 Minuten nach Blutentnahme refraktär und erholen sich in dieser Zeit nur bei Ruhelage- rung [7].

Wie unsere Ergebnisse zeigen, nehmen die AUC-Werte beim ADP- wie auch beim TRAP-Test spätestens 90 Minuten nach Blutentnahme kontinuierlich ab, wobei die ADP-Werte deutlich schneller absinken als die TRAP-Werte. Die unterschiedliche Stabilität der Messgrößen bedeutet, dass bei zu später Messung ein dadurch bedingter falsch-niedriger ADP-Wert bei einem noch relativ hohen TRAP-Wert einen Responder-Status vortäuschen kann. Folglich ist ein zuverlässiges Thienopyridin-Monitoring nur möglich, wenn die MEA-Messung möglichst umgehend nach der 30 minütigen Ruhelagerung und spätestens, wie auch vom Hersteller angegeben, innerhalb von 180 Minuten nach Blutentnahme erfolgt.

Messungen der Thrombozytenfunktion sind aufgrund der leichten Aktivierbarkeit und Labilität der untersuchten Zellart im Vergleich zu anderen Laboruntersuchungen störanfällig, schwer standardisierbar und durch eine hohe Impräzision charakterisiert [7, 8, 16–18]. Beim Multiplate®-System werden für die Intra-Assay-Variabilität V_k-Werte zwischen 3,9% und 19,9% angegeben [10, 12, 16]. Wir fanden in Abhängigkeit vom Messkanal beim ADP-Test Variationskoeffizienten zwischen 9,2% und 16,4% und beim TRAP-Test zwischen 3,3% und 7,8%. Bei Berücksichtigung aller Messkanäle betrug der V_k für den ADP-Test 12,1% und den TRAP-Test 7,2%. Der relativ hohe V_k beim ADP-Test in unserer Messreihe ist dadurch bedingt, dass die 60 Minuten nach Blutentnahme gemessenen Werte im Mittel deutlich höher lagen als die 30- und 90-Minutenwerte (siehe Abbildung 3). Offensichtlich ist zu diesem Zeitpunkt die Rekonstitution der intrazellulären Speicher wieder weitgehend abgeschlossen [7], sodass die Plättchen eine maximale Aggregationsfähigkeit zeigen, bevor es erneut – diesmal infolge der Plättchenalterung – zu einem anfangs langsamen, später verstärkten Absinken der Aggregationsfähigkeit kommt. Beim TRAP-Test ist dieses Phänomen nicht erkennbar. Der ideale Zeitpunkt der ADP-Messung für die Kontrolle der Thienopyridinwirkung wäre daher 60 Minuten nach der Blutentnahme, was auch für die optische Aggregometrie empfohlen wird [7]. Da im klinischen Alltag eine derartige Terminierung der Messung nicht realisierbar ist, untersuchten wir die Reproduzierbarkeit der Methode unter diesen Bedingungen. Bei ca. 94% der Patienten, die bei der Erstmessung als Clopidogrel-Responder beurteilt wurden, konnte das Ergebnis bei der Kontrolluntersuchung in den folgenden Tagen bestätigt werden. Bei ca. 6% ergab die Zweitmessung ein nicht-eindeutiges Ergebnis. Nur bei einem von 291 Patienten wurde bei der Kontrolle abweichend vom Erstbefund ein Low-Responder-Status diagnostiziert, wobei dies durch eine fehlende Compliance bedingt sein könnte.

Wie auch andere Arbeitsgruppen [19–21] feststellten, kommt es unter Thienopyridin-Therapie zu einem Absinken der TRAP-Werte. Offensichtlich hemmen nicht nur die GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten, sondern auch die Thienopyridine die TRAP-induzierte Thrombozyten-Aggregation in einem gewissen Umfang, wobei der Haupteffekt, wie unsere Ergebnisse zeigen, nach Verabreichung der Loading-dose festzustellen ist. Dieses Phänomen kann die Beurteilung der Wirksamkeit von ADP-Rezeptor-Antagonisten erschwe-

ren. Analog zu anderen Thrombozytenfunktionstests werden die MEA-Messungen durch Anämie und Thrombopenie beeinflusst [18, 22, 23]. Patienten mit einem Hk $\leq 0,30$ L/L und/oder einer Thrombopenie $\leq 100/nL$ hatten in unseren Untersuchungen auch ohne Einnahme von Thrombozyten-Aggregationshemmern vermehrt erniedrigte MEA-Werte oder Responder-typische Konstellationen. Die Mitbewertung des TRAP-Tests und der TRAP/ADP-Ratio ist daher bei Patienten mit grenzwertigen Hk- und Thrombozytenwerten von großer Bedeutung, da sonst ein niedriger ADP-Wert als Responder-Status fehlinterpretiert werden kann. Nach unseren Ergebnissen ist bei Patienten mit TRAP-Werten ≤ 20 U oder einem TRAP/ADP-Verhältnis ≤ 3 eine zuverlässige Beurteilung der Wirksamkeit einer Thienopyridin-Therapie nicht möglich. 34/118 (=29%) aller CLR wären ohne Mitbewertung des TRAP-Werts fälschlicherweise als Responder beurteilt worden.

Für die Durchführung von Interventionsstudien, bei denen im Falle eines Low-Responder-Status die Therapie entsprechend geändert wird, ist es erforderlich, einen Cut-off-Wert zu definieren, der Responder von Low-Respondern trennt. Wir ermittelten daher bei gesunden Testpersonen Referenzbereiche für die ADP- und TRAP-Werte und fanden bei beiden Tests deutlich höhere Werte für Frauen, was sich auch in unterschiedlichen Cut-off-Werten niederschlug. Geschlechtsabhängige Referenzwerte wurden sowohl mittels MEA- als auch mit der LTA-Testung gefunden [16, 24]. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass Frauen eine erhöhte Plättchen-Grundreaktivität haben, sodass unsere Ergebnisse nicht überraschen [25]. Die Ursache dieser geschlechtsabhängigen Unterschiede dürfte neben dem niedrigeren Hk vor allem hormonell bedingt sein [24, 25].

Da das Risiko einer Stentthrombose vor allem in den ersten fünf Tagen nach PCI besteht [3, 4], sollte die Überprüfung der Clopidogrel-Wirkung in den ersten 24 Stunden nach Gabe der Loading-dose durchgeführt und die Therapie baldmöglichst angepasst werden. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, ist neben der Einhaltung der präanalytischen Bedingungen Folgendes zu beachten: Da bei manifester Anämie und Thrombopenie eine Messung nicht sinnvoll ist, sollte ein aktuelles Blutbild vorliegen. Werden die genannten Kriterien bezüglich der Höhe des TRAP-Wertes und des TRAP/ADP-Verhältnisses nicht erfüllt oder liegen grenzwertige Ergebnisse vor, ist eine Kontrolluntersuchung indiziert.

Unsere Untersuchungen ergaben, dass bei ca. 12% der Patienten teils mehrmalige Kontrollen bis zum Vorliegen eines eindeutigen Ergebnisses erforderlich sind. Trotz der damit verbundenen Patientenbelastung und Mehrkosten erscheint dies sinnvoll, da fast 30% der Patienten mit kontrollbedürftigen Erstbefunden bei der Wiederholungsmessung Clopidogrel-Low-Responder waren. Somit ist der Anteil der CLR in dieser Gruppe fast dreimal so hoch wie im Gesamtkollektiv.

Wie die vorliegenden Daten zeigen, kann im klinischen Routinebetrieb bei Beachtung der oben aufgeführten Voraussetzungen die Clopidogrel-Wirkung nach Stentimplantation durch MEA-Messung mit Hilfe des Multiplate®-Systems überprüft werden. In einer prospektiven Interventionsstudie

wurde nachgewiesen, dass durch die MEA-gesteuerte Therapieoptimierung nach PCI die Rate an Low-Respondern und die Zahl der kardiovaskulären Ereignisse, wie Tod aufgrund kardialer Ursache, nicht-fataler Myokard-Infarkt, nicht-fataler Schlaganfall, deutlich vermindert werden kann [26].

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. Hansgeorg Ruf für seine wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Interessenkonflikt

Alle Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Ruß M, Cremer J, Krian A, Meinertz T, Werdan K, Zerkowski HR. Differenzialtherapie der chronischen koronaren Herzkrankheit. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:253–61.
2. Bonzel T, Erbel R, Hamm CW, Levenson B, Neumann FJ, Rupprecht HJ, et al. Leitlinie Perkutane Koronarinterventionen (PCI). *Clin Res Cardiol* 2008;97:513–47.
3. Wenaweser P, Rey C, Eberli FR, Togni M, Tüller D, Locher S, et al. Stent thrombosis following bare-metal stent implantation: success of emergency percutaneous coronary intervention and predictors of adverse outcome. *Eur Heart J* 2005;26:1180–7.
4. Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, Abrecht L, Vaina S, Morger C, et al. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. *Lancet* 2007;369:667–78.
5. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Panizza R, et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2312–7.
6. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927–9.
7. Budde U. Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. *J Lab Med* 2002;26:564–71.
8. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, et al. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clin Chem* 2005;51:957–65.
9. Calatzis A. Vollblutverfahren zur Erfassung der primären Hämostase. *J Lab Med* 2007;31:239–47.
10. Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006;96:781–8.
11. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980;3:135–58.
12. Sibbing D, Braun S, Jawanski S, Schomig A, Kastrati A, von Beckerath N. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 2008;99:121–6.
13. Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehili J, Vogt W, Schömig A, et al. Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:849–56.
14. Görlinger K, Jambor C, Hanke A, Dirkmann D, Adamzik M, Hartmann M, et al. Perioperative Coagulation Management and Control of Platelet Transfusion by Point-of-Care Platelet Function Analysis. *Transfus Med Hemother* 2007;34:396–411.
15. Jambor C, Weber C, Gerhardt K, Preibisch D, Zwissler B. Point of care measuring of platelet aggregation with the novel impedance aggregometer Multiplate – the optimal preanalytical conditions required. *DAK* 2007 4.6.8.
16. Seyfert UT, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets* 2007;18:199–206.
17. Ivandic BT, Schlick P, Staritz P, Kurz K, Katus HA, Giannitsis E. Determination of clopidogrel resistance by whole blood platelet aggregometry and inhibitors of the P2Y₁₂ receptor. *Clin Chem* 2006;52:383–8.
18. Klouche M. Diagnostic methods for platelet function analysis. *Transfus Med Hemother* 2007;34:20–32.
19. Johnson A, Dovlatova N, Heptinstall S. Multiple electrode aggregometry and P2Y₁₂ antagonists. *Thromb Haemost* 2008;99:1127–9.
20. Schuhmann CG, Sohn HY, Schiele T, Leibig M, Lison S, Klauss V, et al. Erhöhte individuelle Thrombozytenreagibilität ist ein Risikofaktor für das Vorliegen einer verminderten Clopidogrel-Response im Multiplate Assay. *Clin Res Cardiol* 2009;98(Suppl1):V1680.
21. Spannagl M, Jambor C. Baseline platelet reactivity as determined by TRAP-6 induced aggregation in whole blood is related to the rate of NON-responsiveness to clopidogrel. *Blood* 2008;112:5362.
22. Levine P. The effect of thrombocytopenia on the determination of platelet aggregation. *J Clin Pathol* 1976;65:79–82.
23. Schambeck CM. PFA-100®: Globaltest der primären Hämostase? *J Lab Med* 2002;26:557–62.
24. Haque SF, Matsubayashi H, Izumi S, Sugi T, Arai T, Kondo A, et al. Sex difference in platelet aggregation detected by new aggregometry using light scattering. *Endocr J* 2001;48:33–41.
25. Zuern CS, Lindemann S, Gawaz M. Platelet function and response to aspirin: gender-specific features and implications for female thrombotic risk and management. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:295–306.
26. Behr T, Kuch B, Behr W, von Scheidt W. Publikation in Vorbereitung.