

Probleme der Probenaufbereitung bei der Heparinbestimmung

J. Kußmann¹, H. Trobisch²

¹ Chirurgische Klinik des Ferdinand-Sauerbruch-Klinikums Wuppertal (Direktor Prof. Dr. H.-J. Streicher)

² Institut für Laboratoriumsmedizin an den Städt. Kliniken Duisburg, Kalkweg (Leiter Prof. Dr. H. Trobisch)

Zusammenfassung:

Die in vitro-Freisetzung von Heparinantagonisten bei der Plasmaaufbereitung zur Heparinbestimmung kann Ursache für falsch-negative Ergebnisse besonders im sogenannten Heparin-low-dose-Bereich sein.

Zwei Methoden zur Plasmaaufbereitung wurden verglichen. Die in vitro-PF_a-Freisetzung konnte um 70% im Vergleich zu der im Test (Heparin-low-dose-Test/Boehringer Mannheim) angegebenen Aufbereitungsmethode reduziert werden, wenn das Blut sofort nach Entnahme gekühlt und in einer Kälzentrifuge ein plättchenarmes Plasma gewonnen wurde. Die Plasmaheparinaktivität im plättchenarmen Plasma war vor allem im niedrigen Aktivitätsbereich signifikant höher als im Vergleichsplasma. Durch sofortige Kühlung des gewonnenen Citratblutes und durch Aufbereitung zu einem plättchenarmen Plasma in einer Kälzentrifuge können durch in vitro-Freisetzung von PF_a bedingte falsch-negative Analyseergebnisse bei der Heparinbestimmung weitgehend vermieden werden.

Schlüsselwörter:

Plasmaheparinaktivität – Heparinantagonisten – Plasmaaufbereitung

Summary:

In vitro release of heparin-antagonists during preparation of plasmasamples for heparin determination by amidolytic assays might be responsible for false-negative results especially in the so called low-dose-range.

Two different methods of plasmaderivation were tested. In vitro PF_a release could be reduced by 70%, when blood samples were immediately put on ice when drawn and a plateletpoor plasma was prepared by chill-centrifugation when compared with the method given in the assay instruction. Plasma heparin activity in platelet poor plasma was significantly higher in heparin low dose range compared with the controls. To avoid false negative results in the low heparin activity range, citrated blood should be kept on ice when drawn and be centrifuged at 4°C to obtain a platelet poor plasma.

Keywords:

Plasma heparin activity – heparinantagonists – plasma derivation

Einleitung

Durch die Einführung der chromogenen Substrate in die Gerinnungsdiagnostik wurde es möglich, geringe Heparinaktivitäten im Plasma, wie sie bei der Anwendung von niedrig dosiertem Heparin in der Thromboseprophylaxe auftreten, zu bestimmen. Je niedriger jedoch die zu messenden Heparinaktivitäten sind, desto größer ist die Gefahr der Verfälschung des Meßergebnisses durch Störfaktoren. Mögliche Fehlerquellen sind eine Heparinkontamination der Probe oder eine in vitro-Freisetzung von Heparinantagonisten.

Anhand der im folgenden dargestellten Untersuchungen soll gezeigt werden, inwieweit Probengewinnung bzw. Probenaufbereitung die meßbare Plasmaheparinaktivität beeinflussen können.

Material und Methodik

Sämtliche Patienten standen unter kontinuierlicher intravenöser Heparinapplikation (10000–30000 IE Heparin/24 Std.). Die Blutentnahme erfolgte mit Citrat-Monovetten

(Sarstedt, 0,5 ml Natriumcitratlösung 0,106 mol/l + 4,5 ml Blut). Pro Patient wurden 6 Monovetten entnommen.

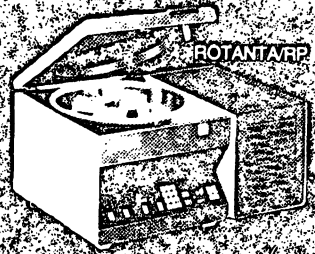
Probenaufbereitung: Je drei Monovetten wurden nach der Blutentnahme 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend in einer normalen Laborzentrifuge 10 min bei 3000 U/min (ca. 2000 g) zentrifugiert. Die Temperatur der Proben betrug 20–28°C. Die übrigen 3 Monovetten wurden sofort nach Entnahme in Eiswasser gekühlt und nach 30 min in einer Kälzentrifuge (+4°C) 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert.

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl erfolgte mit dem Coulter-Counter, Plättchenfaktor 4 wurde mit einem Radioimmunoassay (Abbott-RIA) bestimmt.

Die Heparinaktivität wurde mit dem Heparin-low-dose-Test (Boehringer Mannheim) bestimmt. Dabei wird der Probe eine definierte Menge Thrombin im Überschuß zugesetzt. Eine dem Komplex (Heparin-Antithrombin III) äquimolare Menge Thrombin wird inaktiviert, das restliche Thrombin wird durch die Spaltung des chromogenen Substrats Chromozym® TH gemessen (1). Das Meßergebnis wird als Rest-Thrombin-Aktivität (RTA) in Prozent

Drehzahlstabilität, Präzision, Reproduzierbarkeit verschiedener Laufprogramme, Störanfälligkeit, Laufruhe und Geräuscharmut, leichte Wartung und lange Lebensdauer sind Forderungen, die an Kühlzentrifugen gestellt werden.

HETTICH hat diesen Forderungen Rechnung getragen und Labor-Zentrifugen entwickelt und gebaut, deren sämtliche Funktionen



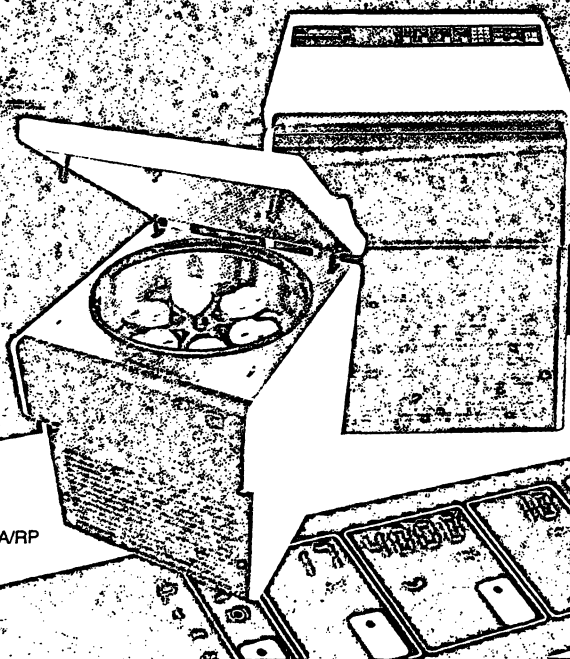
Mikroprozessor-gesteuert

ablaufen. Drehzahl, Laufzeit, Bremskraft, drehzahlgeführte An- und Auslaufzeiten und Temperatur werden über eine 10er-Tastatur eingegeben und während der gesamten Einschaltzeit der Zentrifuge überwacht.

Über Programmtasten können 99 Programme gespeichert und abgerufen werden. Die in das wasser- und staubdichte Eingabefeld integrierten Leuchtziffern und Di-oden geben über den Funktionszustand der Zentrifugen ständig Auskunft.

Wie alle Zentrifugen von HETTICH sind auch die ROTANTA/RP, ROTIXA/RP, ROTIXA/RP sowie die ROTO SILENTA/RP nach den neuesten Erkenntnissen der Zentrifugentechnik gefertigt und mit den international geforderten Sicherheitseinrichtungen ausgerüstet.

In Verbindung mit einem umfangreichen Programm an Schleuderköpfen, Gehäusen und Gestellen aus dem labo-system leisten HETTICH-Zentrifugen in Labor und Klinik Außergewöhnliches. Bitte fordern Sie ausführliche Informationen an!



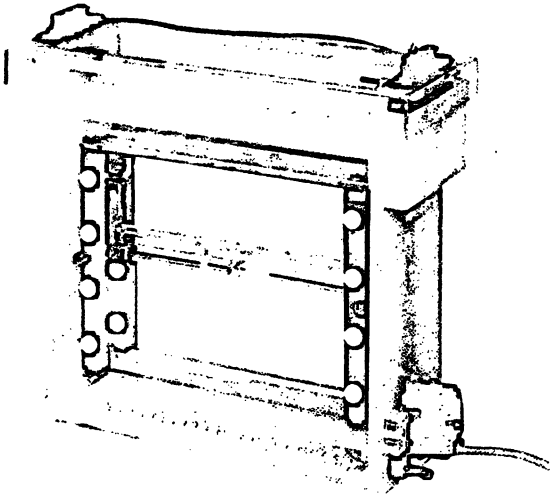
ROTIXA/P
ROTIXA/RP
ROTO SILENTA/RP

Hettich
ZENTRIFUGEN

Postfach 4255 · D-7200 Tuttlingen
Telefon (074 61) 705-0

Diagnostik von Nierenerkrankungen durch Elektrophorese

DESAGA bietet die ideale Geräteausrüstung
für die vertikalen und horizontalen Techniken.



DESAPHOR VA

Für alle vertikalen Slab-Gel-Elektrophoresen: Optimales Zubehör für Gradientgele und zweidimensionale Elektrophorese. Trennstrecken von 110–300 mm. Multiple Probenverarbeitung für hohen Probenanfall in der Routine.

DESAPHOR VC

Für die klassische Rundgel-Elektrophorese und für die erste Dimension. Polymerisationsständer für gleichzeitiges und reproduzierbares Gießen von 12 Röhrchengelen.

DESAPHOR HE

Für alle horizontalen Elektrophorese-Techniken in Agarose, Agar, Polyacrylamid und Stärkegel.

DESAPHOR HF

Für die horizontale Isoelektrische Fokussierung mit Spannungen bis 6000 V und der neuen hochwirksamen Keramik-Kühlplatte, sowie für die horizontale Elektrophorese.

DESATRONIC Netzgeräte

Große Auswahl: Spannung bis 6000 V, Strom bis zu 1000 mA, Leistung bis 200 W. Besonders empfehlenswert das leistungsstarke Netzgerät DESATRONIC 500 V/400 mA speziell für Elektrophoresen in SDS-Gelen.

DESATRONIC IT Integrator/Timer

Das Meß- und Steuergerät für reproduzierbares Arbeiten.

Gradient Controller

mit Computerregelung für die Herstellung reproduzierbarer, präziser Gradientgele.



DESAGA

DESAGA GmbH, Postfach 101969
D-6900 Heidelberg 1,
Telefon: 062 21/81013

SCHOTT
GRUPPE

XVI

Verunsichert?

inch oder cm
läßt die Entfernung
unbeeindruckt,

HbA_{1c} oder HbA₁
die Stoffwechsellaage
unbeeinflußt.

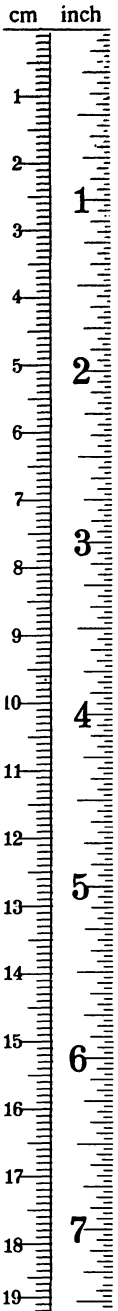
HbA₁ ist das metrische Maß
der **Langzeitkontrolle**
Ihrer Diabetiker oder
wollen Sie umrechnen?

GLYC-AFFIN – die affinitätschromatographische Methode der Wahl zur Erfassung aller **GHb's** oder **Glycoproteine**, auch bei abnormen Hämoglobinmustern oder Temperaturproblemen.

Auch hier sind wir
innovativ und haben den
Vorsprung.

FAST Hb TEST SYSTEM
mit
ALDIMIN ELIMINATOR
VERIFICATOR

und **Glyc-Affin** gibt es für
20 und 100 Bestimmungen.



Bezug und Information durch:

panchem
ges.f.chemische produkte mbh
Schloßstraße 3 D-8751 Kleinwallstadt
Postfach 50 Tel. 06022/21005
Telex 04188144 panc-d

Pat.-Nr.	RTA in %		Thrombozyten/nl		PF ₄ ng/ml	
	4000 U/min 4°C 20 min	3000 U/min 25–28°C 10 min	4000 U/min 4°C 20 min	3000 U/min 25–28°C 10 min	4000 U/min 4°C 20 min	3000 U/min 25–28°C 10 min
1	12	18	3,0	40,0	31	148
	12 $\bar{x}$ = 12	16 $\bar{x}$ = 17,3	2,0	34,0	44	153
	12	18	4,0	41,0	39	139
2	4	6	4,0	53,0	53	174
	4 $\bar{x}$ = 4,7	8 $\bar{x}$ = 6,7	1,0	51,0	44	177
	6	8	4,0	59,0	48	169
3	22,7	47,2	3,0	62,0	36	153
	25 $\bar{x}$ = 24,2	45,5 $\bar{x}$ = 43,8	4,0	40,0	47	169
	25	38,6	4,0	54,0	53	161
4	73,9	86,4	3,0	56,0	48	172
	73,9 $\bar{x}$ = 73,9	89,1 $\bar{x}$ = 87,3	4,0	53,0	65	172
	73,9	86,4	3,0	67,0	71	185
5	56,8	90,9	2,0	71,0	42	168
	56,8 $\bar{x}$ = 55,9	95,4 $\bar{x}$ = 92,4	1,0	65,0	44	153
	54,0	90,9	5,0	62,0	54	171
6	54,0	95,4	4,0	64,0	53	188
	54,0 $\bar{x}$ = 54,0	95,4 $\bar{x}$ = 93,5	4,0	68,0	36	192
	54,0	90,0	2,0	82	32	193
7	4,3	8,7	1,0	53	71	156
	6,5 $\bar{x}$ = 5,0	8,7 $\bar{x}$ = 9,2	6,0	82	59	147
	4,3	10,2	2,0	71	46	161
			$\bar{x}$ = 3,1 S $\pm$ 1,4	$\bar{x}$ = 58,5 S $\pm$ 13,1	$\bar{x}$ = 47,3 S $\pm$ 11,8	$\bar{x}$ = 166,6 S $\pm$ 15,2

Abb. 1

angegeben. Die Heparinaktivität ist umgekehrt proportional der Rest-Thrombin-Aktivität.

Ergebnisse

Nach Probenaufbereitung mit Zentrifugation von 10 min bei 3000 U/min in der normalen Laborzentrifuge ohne Kühlung wurde eine höhere RTA gemessen als bei der Probenaufarbeitung mit Kühlung der Citratblutproben in Eiswasser und Zentrifugation von 20 min bei 4000 U/min in der Kühlzentrifuge. Der Unterschied war größer bei hoher RTA Pat.-Nr. 4, 5, 6, als bei niedriger RTA Pat.-Nr. 1, 2, 3, 7 (Abb. 1). Die Thrombozytenzahl bei der Aufarbeitung in der Normalzentrifuge betrug im Mittel 58,5 Thrombozyten/nl ($s = 13,1$), bei der Aufarbeitung in der Kühlzentrifuge wurden 3,1 Thrombozyten/nl ($s = 1,4$) gemessen. Die entsprechenden Werte für den Plättchenfaktor 4 waren 166,6 ng/ml ($s = 15,2$) in der normalen Laborzentrifuge und 47,3 ng/ml ($s = 11,8$) in der Kühlzentrifuge.

Diskussion

Von Sutor et al. (2) wurde 1976 eine lagerungszeitabhängige Verkürzung der PTT im Blut heparinisierter Patienten beschrieben. Diese Verkürzung war nur bei Lagerung des Vollbluts, nicht jedoch bei Lagerung des sofort nach der Entnahme abzentrifugierten Plasmas zu beobachten. Die Autoren führten dieses Phänomen auf die zellulären Blutbestandteile zurück. Vor allem die Blutplättchen können einen potenten Heparininhibitor, den Plättchenfaktor 4, freisetzen. Theoretisch reicht die Menge PF₄ der Thrombozyten von 1 ml Blut aus, um 20 IE Heparin zu neutralisieren. Bei der Heparinbestimmung kommt es also darauf an, die PF₄-Freisetzung so gering wie möglich zu halten.

Wie Teien (3) zeigen konnte, läßt sich durch unmittelbare Kühlung des Blutes nach Entnahme die PF₄-Freisetzung deutlich reduzieren. In unseren Versuchen konnten wir zeigen, daß durch sofortige Kühlung des Citratblutes und durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge 20 min bei etwa 3000 g (4000 U/min) die Herstellung eines thrombozytenarmen Plasmas gelingt. Bei dieser Arbeitsweise konnte die PF₄-Konzentration im Vergleich zur bisher empfohlenen Arbeitsweise im Mittel um 70% reduziert werden. Entsprechend ließ sich im PF₄-armen Plasma vor allem im sogenannten low-dose-Bereich (Pat.-Nr. 4, 5, 6) eine deutlich niedrigere RTA, d.h. eine höhere Heparinaktivität als im Vergleichsplasma messen.

Durch Aufarbeitung des Citratblutes zur Heparinbestimmung unter sofortiger Kühlung nach Blutentnahme und Herstellung eines plättchenarmen Plasmas lassen sich durch in vitro-PF₄-Freisetzung bedingte falsch-negative Ergebnisse weitgehend vermeiden.

Schrifttum:

1. BARTL, K., DORSCH, E., LILL, H., ZIEGENHORN, J.: Determination of the biological activity of heparin by use of a chromogenic substrate. *Thrombos. Haemostas.* 42, 1446 (1979).
2. SUTOR, A. H., SCHORN, P.: PTT-Bestimmung im Kindesalter, Normalwerte und Veränderungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. *Klin. Päd.* 188, 499 (1976).
3. TEIEN, A. N., LIE, M., ABILDGAARD, U.: Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate of activated factor X. *Thromb. Res.* 8, 413 (1976).

Anschrift der Verfasser:

Dr. J. Kußmann
Chir. Klinik des Ferdinand-Sauerbruch-Klinikums Wuppertal
Arrenberger Str. 20–56
5600 Wuppertal 1
Prof. Dr. H. Trobisch
Institut für Laboratoriumsmedizin
der Städt. Kliniken