

# Klinische Erfahrungen mit einer Heparin-unempfindlichen Thromboplastinzeitbestimmung auf der Basis von Thromborel®

Clinical observations on determining prothrombin time not influenced by heparin on the basis of Thromborel®

M. Heins<sup>1</sup>, W. Withold<sup>1</sup>, R. Behnke<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universität Düsseldorf

<sup>2</sup>Abteilung für Kardiologie der Universität Düsseldorf

## Zusammenfassung:

Untersucht wurde der Einfluß verschiedener Rekonstitutionsmedien auf die Thromboplastinzeitbestimmung mit einem humanen Plazenta-Thromboplastin am Kugelkoagulometer KC 10. Das Reagens wurde mit Aqua bidest. (Methode A), mit der Polybren-Puffer Lösung ZO (2 Heparin-inhibierende IE/ml) (Methode B) und der Polybren-Puffer Lösung ZP (4 Heparin-inhibierende IE/ml) (Methode C) rekonstituiert. Bei 127 Patienten ohne Heparintherapie ergab sich mit A im Vergleich zu B und C eine gute Korrelation bei Angabe in Prozent ( $r = 0,993$  bzw.  $0,996$ ), in International Normalized Ratio (INR) ( $r = 0,995$  bzw.  $0,988$ ) und in Prothrombin-Ratio ( $r = 0,995$  bzw.  $0,988$ ). Der International Sensitivity Index (ISI) änderte sich nur unwesentlich und lag mit A bei 1,09, mit B bei 1,04 und mit C bei 1,07. Bei 6 von 84 Patienten unter Heparintherapie (7%) sahen wir mit B, verglichen mit A, eine prozentuale Zunahme des Quickwertes, bezogen auf den Ausgangswert, von 20 bis 72%; bei 9 von 84 Patienten (11%) zeigte sich mit C, verglichen mit A, eine Erhöhung von 20 bis 88%. Für die Überprüfung der Heparinempfindlichkeit wurden ein Normalplasmapool, das Plasma eines Marcumapatienten im oberen und eines im mittleren therapeutischen Bereich mit Heparin versetzt. A, B, C und ein rekombinantes Thromboplastin wurden auf ihre Heparinempfindlichkeit überprüft, wobei C am heparinunempfindlichsten war. Die Impräzision in Serie ( $n = 20$ ) für drei verschiedene Kontrollplasmen bei Angabe in Prozent Quick lag für A bei 2,3 bis 4,8%, für B bei 2,3 bis 4,4%, für C bei 0 bis 2,1%; die Impräzision von Tag zu Tag ( $n = 20$ ) lag für A bei 4,3 bis 5,0% für B bei 3,6 bis 3,9% und für C bei 2,3 bis 4,2%.

## Schlüsselwörter:

Humanes Plazenta-Thromboplastin – Kugelkoagulometer – Heparin – Thromboplastinzeit – INR – Prothrombin-Ratio

## Summary:

We examined the influence of different solutions for resuspending a lyophilized placental thromboplastin on the prothrombin time employing the ball coagulometer KC 10. The solutions used were doubly distilled water (method A) as well as two polybren buffer solutions, namely ZO (2 heparin-neutralizing IE/ml; method B) and ZP (4 heparin-neutralizing IE/ml; method C). In 127 patients without heparin therapy there was a strong functional relationship between the values obtained by A and those obtained by B and C, respectively ( $r = +0.995 [A - B]$  and  $+0.996 [A - C]$  if values are given as a percent of normal activity;  $r = +0.995 [A - B]$  and  $+0.988 [A - C]$  if values are given as International Normalized Ratio [INR];  $r = +0.995 [A - B]$  and  $+0.988 [A - C]$  if values are given as prothrombin ratio). There were only slight differences in the International Sensitivity Index (ISI) (1.09 for method A; 1.04 for method B; 1.07 for method C). Given the percent values obtained with method A as 100%, 6 of 84 patients treated with heparin showed an increase of the values obtained with method B of more than 20% (up to 72%) whereas 9 of 84 patients exhibited an increase of the values obtained with method C of more than 20% (up to 88%). To further characterize the heparin sensitivity of the different methods a plasma

*pool from apparently healthy persons as well as plasma samples from patients treated with coumarin derivatives (values of thromboplastin time in the middle and upper range of the therapeutic interval) were spiked with heparin. Comparing method A, B and C as well as a recombinant thromboplastin method, method C proved to be less influenced by heparin than the other methods. Employing three control plasma samples with different assigned values, intra-assay imprecision (n = 20) ranged from 2.3% to 4.8% (for A), 2.3% to 4.4% (for B) and 0% to 2.1% (for C); inter-assay imprecision (n = 20) was 4.3% to 5.0% (for A), 3.6% to 3.9% (for B) and 2.3% to 4.2% (for C).*

**Keywords:**

*Human placenta thromboplastin – ball coagulometer – heparin – prothrombin time – INR – prothrombin ratio*

## Einführung

Die wichtigsten Indikationen für die Thromboplastinzeitbestimmung nach Quick sind die Überwachung von Patienten unter oraler Therapie mit Cumarinderivaten sowie die Erfassung von Faktorenmangelzuständen bei Leberparenchymenschäden und Vitamin K-Mangel (1). Da eine hochdosierte Heparintherapie (32.500 bis 45.000 IE/24 h) ebenfalls zu einer Verminderung des Quick-Wertes führen kann, ist in diesen Fällen die Interpretierbarkeit des Quick-Wertes hinsichtlich obengenannter Fragestellungen eingeschränkt. Wünschenswert ist daher die Verfügbarkeit von Reagenzien zur Thromboplastinzeitbestimmung, die sich durch Heparinunempfindlichkeit auszeichnen.

In dieser Studie wurde der Einfluß dreier verschiedener Rekonstitutionsmedien auf die Heparinempfindlichkeit eines humanen Plazentathromboplastins anhand eines zufällig ausgewählten Patientenkollektivs einer Universitätsklinik untersucht.

## Material und Methoden

### *Plasmaproben*

Blutproben wurden durch Venenpunktion mittels Vacutainerröhrchen entnommen (1 Teil gepufferte Natriumcitratlösung [0,129 mol/l], 9 Teile Vollblut). Nach 15minütiger Zentrifugation bei ca. 2000 x g und Raumtemperatur und der Abtrennung des Citratplasmas erfolgte eine zweite Zentrifugation zum Erhalt von thrombozytenarmem Plasma. Alle Patientenproben wurden innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme oder innerhalb von 4 Wochen nach Lagerung bei -20° C analysiert.

### *Geräte*

Kugelkoagulometer KC 10 (Amelung, Lemgo).

### *Reagenzien*

Thromborel S® (Charge: 505426A); Puffer ZO (2 Heparin-inhibierende IE/ml) (Charge: PG 49300); Puffer ZP (Hepin®, 4 Heparin-inhibierende IE/ml); Charge: PG 49301); Kalibrierplasmen (Charge: 24751); Kontroll-Plasma N (Charge: 502733); Pathoplasma I (Charge: 502874); Pathoplasma II

(Charge: 502965); Marcumarplasma 1 (Charge 10492); Marcumarplasma 2 (Charge: 270193); Behringwerke Marburg, Innovin® (Charge: TSF-12); Baxter Unterschleißheim. Heparin (Liquemin® N 25.000, Charge: 26721); Roche.

### *Patientenproben*

Untersucht wurden 213 Patientenproben von Patienten mit und ohne Marcumartherapie. Nach Bestimmung der Heparinkonzentration, der PTT, der Thrombinzeit und den vorhandenen klinischen Angaben erfolgte die Einteilung in ein Kollektiv mit und ein Kollektiv ohne Heparintherapie. Zwei Patienten, bei denen keine Zuordnung möglich war, wurden ausgeschlossen.

### *Messung und Kalibration*

Die Rekonstitution des Humanen Plazenta-Thromboplastins (Thromborel S®) erfolgte mit Aqua bidest. (Methode A), mit Polybren-Puffer ZO (Methode B) und Polybren-Puffer ZP (Methode C). Das auf der Basis eines rekombinanten „human tissue factor“ beratende Thromboplastin (Innovin®) wurde mit Aqua bidest. gelöst und zum Vergleich der Heparinempfindlichkeit eingesetzt. Für die vier Thromboplastine wurde mit Kalibrierplasmen dreier verschiedener Aktivitätskonzentrationen eine eigene Bezugskurve zur Umrechnung in prozentuale Aktivität erstellt. Alle Messungen wurden am KC 10 in Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Ermittlung der INR diente der vom Hersteller ermittelte „International Sensitivity Index (ISI)“. Er betrug für das humane Plazenta-Thromboplastin für A 1,09, für B 1,04, für C 1,07 und für das rekombinante Thromboplastin 0,84 bei Messung am KC 10. Untersucht wurden 84 Patienten mit und 127 Patienten ohne Heparintherapie.

Zur Überprüfung der Heparinempfindlichkeit dienten Plasmen von 2 Patienten unter Marcumartherapie und ein Poolplasma von 10 gesunden Probanden. Mit Liquemin® 25000 wurde in 0,9% NaCl eine Heparinverdünnungsreihe von 0 bis 40 IE/ml in Schritten zu 5 IE/ml erstellt. 9 Teile Plasma wurden mit 1 Teil der Heparinverdünnungsreihe versetzt, so daß sich eine Plasmaverdünnungsreihe von 0 bis 4 IE/ml Heparin in Schritten zu 0,5 IE/ml ergab.

Die Impräzision in Serie wurde mit 20 Einzelbestimmungen mit Kontrollplasma N (100% Quick), Pathoplasma I (25% Quick) und Pathoplasma II (12% Quick) bestimmt. Für die Impräzision von Tag zu Tag dienten 4 Einzelbestimmungen an 5 Tagen.

### Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung beim Methodenvergleich erfolgte nach der Methode von Passing und Bablok (2).

### Ergebnisse

Für Patienten ohne Heparintherapie ergaben sich mit Methode B im Vergleich zu Methode A fast die selben Gerinnungszeiten ( $A [x]$  versus  $B [y]$ ):  $y [s] = 1,000 \times [s] + 0,300$ ,  $r = 0,988$ ), während sie mit Methode C etwas länger lagen ( $A [x]$  versus  $C [y]$ ):  $y [s] = 1,0479 \times [s] + 0,0907$ ,  $r = 0,988$ ). Bei Patienten unter Heparintherapie ergaben sich mit B im Vergleich zu A kürzere Gerinnungszeiten ( $A [x]$  versus  $B [y]$ ):  $y [s] = 0,9355 \times [s] + 0,8726$ ,  $r = 0,973$ ). Noch ausgeprägter war die Verkürzung der Gerinnungszeit bei Einsatz von C ( $A [x]$  versus  $C [y]$ ):  $y [s] = 1,000 \times [s] + 0,5000$ ,  $r = 0,969$ ).

Die Prothrombin-Ratio lag bei Patienten ohne Heparintherapie bei B etwas niedriger als bei A ( $A [x]$  versus  $B [y]$ ):  $y [\text{ratio}] = 0,9583 \times [\text{ratio}] + 0,0321$ ,  $r = 0,995$ ), bei C war sie

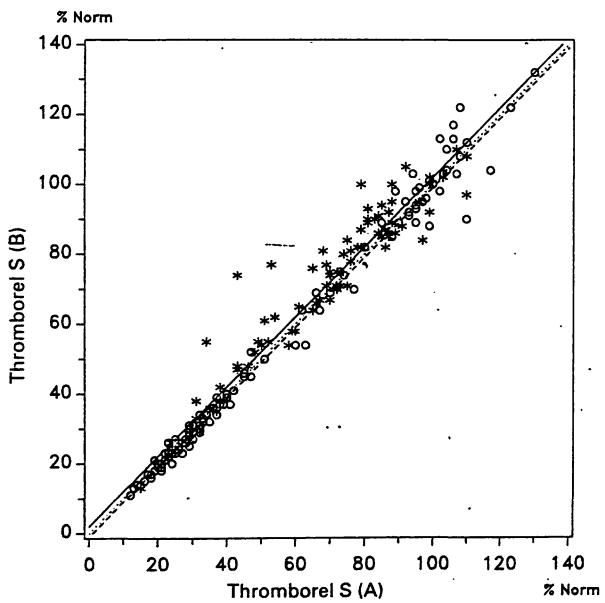


Abb. 1: Einfluß verschiedener Rekonstitutionsmedien auf die Thromboplastinzeitbestimmung. Ein humanes Plazenta-Thromboplastin (Thromborel®) rekonstituiert mit A (Aqua bidest.) und B (Puffer ZO). Auswertung nach Passing-Bablok:

127 Patienten ohne Heparintherapie (---o---):  $y [\%] = 1,000 \times [\%] - 1,000$ ;  $r = 0,993$  (95% Konfidenz Interval: Steigung: 1,000; 1,0196, x-Achsenabschnitt: -1,4510; -1,000).

84 Patienten mit Heparintherapie (---\*---):  $y [\%] = 1,000 \times [\%] + 2,000$ ;  $r = 0,955$  (95% Konfidenz Interval: Steigung: 0,9655; 1,0698, x-Achsenabschnitt: 2,2674; 4,3966).

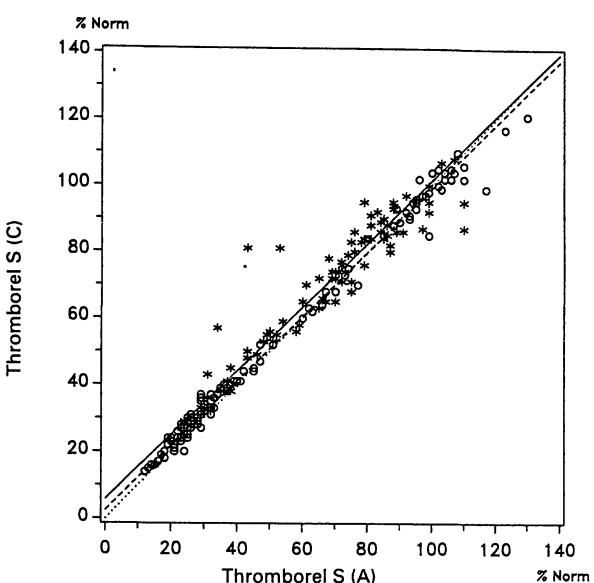


Abb. 2: Einfluß verschiedener Rekonstitutionsmedien auf die Thromboplastinzeitbestimmung. Ein humanes Plazenta-Thromboplastin (Thromborel®) rekonstituiert mit A (Aqua bidest.) und C (Puffer ZP). Auswertung nach Passing-Bablok:

127 Patienten ohne Heparintherapie (---o---):  $y [\%] = 0,9655 \times [\%] + 2,5172$ ;  $r = 0,996$  (95% Konfidenz Interval: Steigung: 0,9512; 0,9831, x-Achsenabschnitt: 1,6441; -3,0732).

84 Patienten mit Heparintherapie (---\*---):  $y [\%] = 0,9574 \times [\%] + 5,7979$ ;  $r = 0,943$ ; (95% Konfidenz Interval: Steigung: 0,9000; 1,0000, x-Achsenabschnitt: 3,0000; 9,7000).

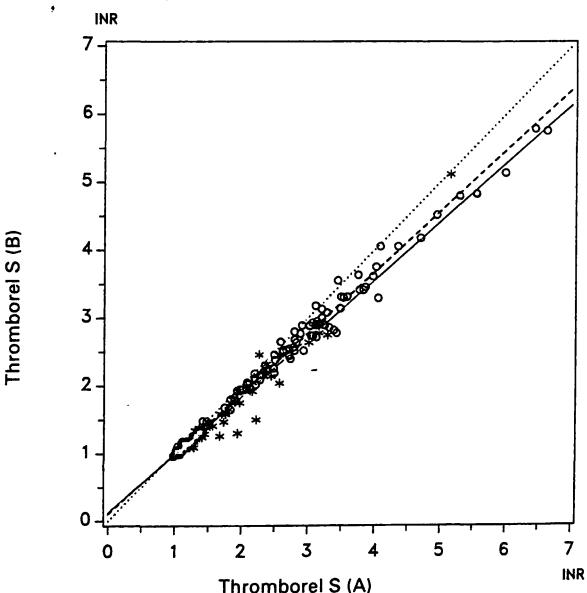


Abb. 3: Einfluß verschiedener Rekonstitutionsmedien auf die Thromboplastinzeitbestimmung. Ein humanes Plazenta-Thromboplastin (Thromborel®) rekonstituiert mit A (Aqua bidest.) und B (Puffer ZO). Auswertung nach Passing-Bablok:

127 Patienten ohne Heparintherapie (---o---):  $y [\text{INR}] = 0,8934 \times [\text{INR}] + 0,1016$ ;  $r = 0,995$  (95% Konfidenz Interval: Steigung: 0,8763; 0,9101, x-Achsenabschnitt: 0,0730; -0,1337).

84 Patienten mit Heparintherapie (---\*---):  $y [\text{INR}] = 0,8571 \times [\text{INR}] + 0,1250$ ;  $r = 0,974$ ; (95% Konfidenz Interval: Steigung: 0,8154; 0,9123, x-Achsenabschnitt: 0,0532; 0,1807).

im Vergleich zu A fast gleich (A [x] versus C [y]:  $y$  [ratio] =  $0,9919 \times [ratio] + 0,0083$ ,  $r = 0,988$ ). Im Kollektiv unter Heparintherapie ergaben sich für B (A [x] versus B [y]:  $y$  [ratio] =  $0,9057 \times [ratio] + 0,0750$ ,  $r = 0,973$ ) wie auch für C gegenüber A (A [x] versus C [y]:  $y$  [ratio] =  $0,9548 \times [ratio] + 0,0376$ ,  $r = 0,969$ ).

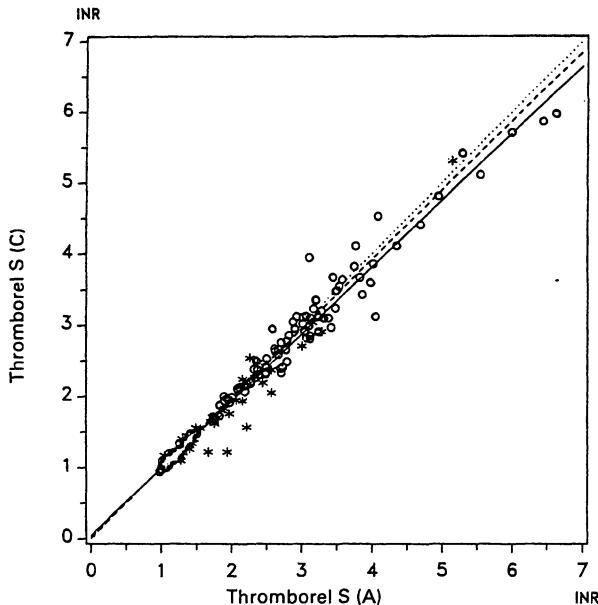


Abb. 4: Einfluß verschiedener Rekonstitutionsmedien auf die Thromboplastinzeitbestimmung. Ein humanes Plazenta-Thromboplastin (Thromborel®) rekonstituiert mit A (Aqua bidest.) und C (Puffer ZP). Auswertung nach Passing-Bablok:

127 Patienten ohne Heparintherapie (—o—):  $y$  [INR] =  $0,9745 \times [INR] + 0,0263$ ;  $r = 0,988$  (95% Konfidenz Interval: Steigung: 0,9479; 1,000, x-Achsenabschnitt: 0,0100; -0,0668).

84 Patienten mit Heparintherapie (—\*—):  $y$  [INR] =  $0,9412 \times [INR] + 0,0476$ ;  $r = 0,971$ ; (95% Konfidenz Interval: Steigung: 0,8743; 1,0000, x-Achsenabschnitt: 0,0300; 0,1363).

Tab. 1: Präzision in Serie ( $n=20$ ). Humanes Plazenta-Thromboplastin rekonstituiert mit Aqua bidest. (A) sowie mit zwei Heparin-neutralisierenden Puffern ZO (B) und ZP (C).

| Kontrollmaterial | Einheit  | VK (%) |     |     |
|------------------|----------|--------|-----|-----|
|                  |          | A      | B   | C   |
| Kontrollplasma N | Sekunden | 1,1    | 1,0 | 1,2 |
| Pathoplasma I    | Sekunden | 3,7    | 2,9 | 1,4 |
| Pathoplasma II   | Sekunden | 1,5    | 1,5 | 1,5 |
| Kontrollplasma N | (%)      | 2,3    | 2,3 | 2,1 |
| Pathoplasma I    | (%)      | 4,8    | 4,4 | 1,7 |
| Pathoplasma II   | (%)      | 3,0    | 3,5 | 0,0 |

Die Ergebnisse für Quick und INR sind in Abbildung 1 bis 4 dargestellt. Von den Patienten unter Heparintherapie zeigten 7% (6/84) unter B eine Zunahme des Quicks um 20% oder mehr im Vergleich zu A, während es bei Messung mit C 11% (9/84) waren. In Tabelle 1 ist die Präzision in der Serie und in Tabelle 2 die Präzision von Tag zu Tag dargestellt.

Poolplasma von 10 gesunden Probanden (Abb. 5), Plasma von einem Patienten mit Marcumartherapie im obe-

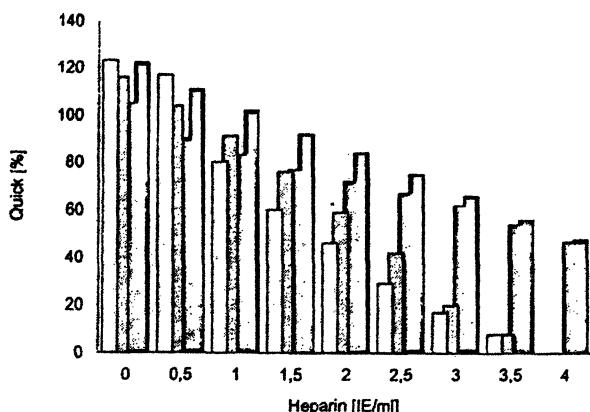


Abb. 5: Einfluß von Heparin auf die Thromboplastinzeitbestimmung von einem Poolplasma 11 gesunder Probanden. Bestimmung des Quickwertes mit Humanem Plazenta-Thromboplastin unterschiedlicher Heparinempfindlichkeit (A □, B ▨, C ▨), sowie mit einem rekombinanten Thromboplastin ▨ (A: Thromborel S rekonstituiert in Aqua bidest.; B: Thromborel S rekonstituiert in Puffer ZO; C: Thromborel S rekonstituiert in Puffer ZP).

ren (Abb. 6) und im mittleren therapeutischen Bereich (Abb. 7) diente zum Vergleich der Heparinempfindlichkeit.

Tab. 2: Präzision von Tag zu Tag (5 Tage;  $n=20$ ). Humanes Plazenta-Thromboplastin rekonstituiert mit Aqua bidest. (A) sowie mit zwei Heparin-neutralisierenden Puffern ZO (B) und ZP (C).

| Kontrollmaterial | Einheit  | VK (%) |     |     |
|------------------|----------|--------|-----|-----|
|                  |          | A      | B   | C   |
| Kontrollplasma N | Sekunden | 2,1    | 1,6 | 1,4 |
| Pathoplasma I    | Sekunden | 4,0    | 3,0 | 2,6 |
| Pathoplasma II   | Sekunden | 4,8    | 2,6 | 3,1 |
| Kontrollplasma N | (%)      | 4,3    | 3,6 | 2,3 |
| Pathoplasma I    | (%)      | 4,4    | 3,9 | 3,0 |
| Pathoplasma II   | (%)      | 5,0    | 3,9 | 4,2 |

## Diskussion

Die Thromboplastinzeitbestimmung nach Quick hat in der Routinediagnostik einen hohen Stellenwert. Mit den meisten Thromboplastinen werden neben Faktorenmangelzuständen des Extrinsic-Systems auch die Wirkung von Heparin auf die Faktoren II und X erfaßt. Dieser Effekt wird von vielen Ärzten geschätzt, da der Gerinnungsbefund damit auch die Heparinwirkung am Patienten wider-spiegelt. Für bestimmte Fragestellungen, z.B. bei Patienten mit Sepsis, Patienten mit Lebersynthesestörungen oder Patienten mit Marcumar®-bei gleichzeitiger Heparintherapie ist die alleinige Erfassung der Faktorenmangelzustände ohne den Einfluß von Heparin wünschenswert.

In der Vergangenheit konnten diese Anforderungen nicht genügend berücksichtigt werden. Zwar sind verschiedene Heparin-unempfindliche Thromboplastinpräparatien beschrieben worden (3, 4, 5), die sich jedoch durch den Nachteil einer unzureichenden Faktorenempfindlichkeit oder eines deutlich von 1,0 abweichenden ISI-

Wertes auszeichneten. Außerdem bestand die Möglichkeit, die Heparinwirkung durch Zugabe von Protamin zur Probe aufzuheben, so daß das Thromboplastinreagens beibehalten werden konnte. Doch war die Dosierung des Protamins in erster Linie von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Da ein Überschuß von Protamin seinerseits gerinnungshemmend wirkt, ist die Wahl der geeigneten Protaminkonzentration kritisch. Eine weitere neue Möglichkeit ist die enzymatische Spaltung des Heparins durch Heparinase (6).

Mit der hier dargestellten Heparinneutralisierung durch die beiden Polybren-Puffer ZO und ZP hat der Untersucher die Möglichkeit, für ein bestimmtes Patienten-

kollektiv ohne Wechsel des Thromboplastins nach entsprechender Rekonstitution und Kalibration, den Quickwert unbeeinflußt von Heparin zu bestimmen.

Patienten unter Cumarintherapie sind erst nach zwei Wochen stabil oral antikoaguliert (7), wobei der Abfall des Quick-Wertes in den ersten Tagen überwiegend den Abfall der Faktor VII-Aktivität widerspiegelt. Bei hoher Aufsättigungsdosis mit Marcumar® führt dies in den ersten Tagen durch die ebenfalls kurze Halbwertszeit von Protein C zu einem hyperkoagulablen Zustand des Patienten, so daß eine überlappende Therapie mit Heparin und Cumarinderivaten notwendig sein kann. In dieser Situation sollte zur Überprüfung des Einflusses der Cumarintherapie auf den Prothrombinkomplex konsequenterweise der beste Heparin-neutralisierende Puffer (ZP) gewählt werden, wobei als Nebeneffekt eine höhere analytische Präzision erreicht wird.

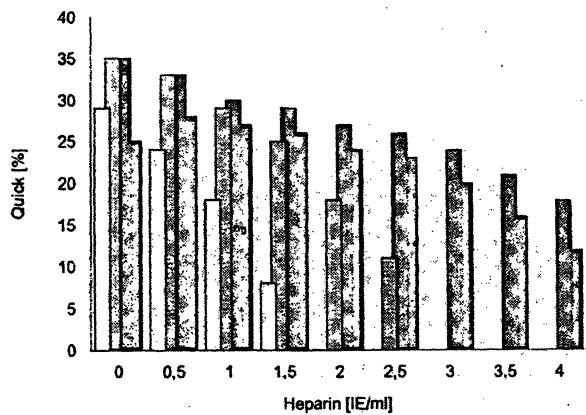


Abb. 6: Einfluß von Heparin auf die Thromboplastinzeitbestimmung von einem Marcumarplasma des Patienten 1. Bestimmung des Quickwertes mit Humanem Plazenta-Thromboplastin unterschiedlicher Heparinempfindlichkeit (A □, B ▨, C ▨), sowie mit einem rekombinanten Thromboplastin ▨ (A: Thromborel S rekonstituiert in Aqua bidest.; B: Thromborel S rekonstituiert in Puffer ZO; C: Thromborel S rekonstituiert in Puffer ZP).

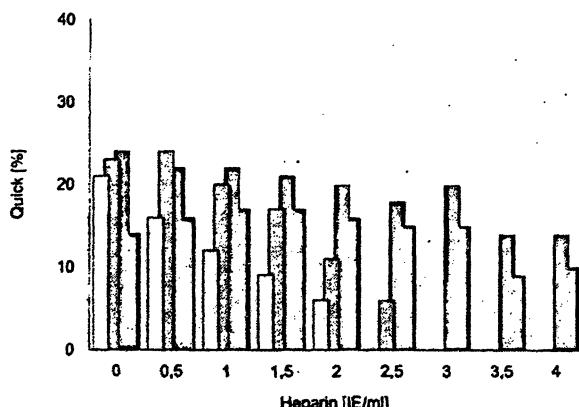


Abb. 7: Einfluß von Heparin auf die Thromboplastinzeitbestimmung von einem Marcumarplasma des Patienten 2. Bestimmung des Quickwertes mit Humanem Plazenta-Thromboplastin unterschiedlicher Heparinempfindlichkeit (A □, B ▨, C ▨), sowie mit einem rekombinanten Thromboplastin ▨ (A: Thromborel S rekonstituiert in Aqua bidest.; B: Thromborel S rekonstituiert in Puffer ZO; C: Thromborel S rekonstituiert in Puffer ZP).

#### Literatur:

1. White, G.C.; Marder, V.J.; Colman, R.W.; Hirsh, J.; Salzman, E.W. (1987): Approach to the Bleeding Patient. In: Hemostasis and Thrombosis (Colmann, R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J.; Salzman, E.W., eds.). J. B. Lippincott Company, Philadelphia, pp 1048 - 1060
2. Passing, H.; Bablok, W.J. (1983): Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709 - 720
3. Tayler, N.; Exner, T. (1987): Studies for various thromboplastins used for the prothrombin test. Aust. J. Med. Lab. Sci 8, 4 - 6
4. Hohenwarter, W.; Mayr, H.; Wimmer, E.; Lang, H. (1990): Immunoplastin® HIS am Kugelkoagulometer KC. Berichte der ÖGK 13, 126 - 129
5. Hellstern, P.; Anders, C.U.; Oberfrank, K.; Faller, B.; Spaett, A. (1992): Heparinempfindlichkeit von Thromboplastinen zur Bestimmung der Thromboplastinzeit. Klin. Lab. 38, 183 - 188
6. Kolde, H.J.; Teijidor, L. (1993): Enzymatische Entfernung von Heparin aus Citratplasma. Lab. med. 17, 226
7. Spranger, F.; Zuborn, K.-H.; Bruhn, H.D. (1993): Kontrolle der oralen Antikoagulantientherapie durch Messung des Plasmaspiegels von Prothrombinfragment F1+2. In: Perspektiven in der Hämostaseologie (Keller, F., ed.). Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, Germany, pp 52 - 55

#### Danksagung:

Wir danken Frau H. Dauwitz und Frau S. Schmitz für ihre ausgezeichnete technische Assistenz.

#### Anschrift des Verfassers:

Dr. med. Michael Heins  
Institut für Klinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
Moorenstraße 5  
40225 Düsseldorf