

Minimalanforderungen zur Gewinnung von Citratplasma für hämostaseologische Analysen

I. Witt, H. Beeser, G. Müller-Berghaus

Die Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung hat eine Arbeitsgruppe ins Leben gerufen, die sich mit der Standardisierung der hämostaseologischen Analytik befaßt. Diesem „Komitee zur Standardisierung der hämostaseologischen Analytik“ gehören Vertreter interessierter Fachgesellschaften und Herstellerfirmen von Diagnostika für die Hämostaseologie an. Wichtige Ziele des Komitees sind die Erarbeitung von Konsensmethoden und von Minimalanforderungen an hämostaseologische Tests.

Die Richtigkeit eines Laborbefundes ist von zahlreichen Faktoren abhängig, unter denen die Präanalytik eine entscheidende Rolle spielt. Die Präanalytik umfaßt: Patientenvorbereitung, Materialidentifizierung, Gewinnung des Untersuchungsmaterials sowie Transport und Aufbewahrung der Proben.

Während die Analytik im Labor relativ zuverlässig kontrolliert werden kann, ist der Einfluß von Fehlern in der Präanalytik auf das Analysenergebnis oft schwer erkennbar. Die Ergebnisse von hämostaseologischen Untersuchungen werden in besonderem Maße von Fehlern in der Präanalytik beeinflusst. Deshalb ist die Einhaltung bestimmter Bedingungen unbedingt erforderlich.

Unter diesem Gesichtspunkt hat das „Komitee zur Standardisierung der hämostaseologischen Analytik“ der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) die Minimalanforderungen bei der Probengewinnung für hämostaseologische Analysen zusammengestellt. Sie stehen in Einklang mit der DIN-Norm 58 905 Teil 1, die vom Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN (Deutsches Institut für Normung e.V.) unter Mitwirkung von Vertretern der GTH erarbeitet wurde.

Die Anforderungen an die Präanalytik wurden bewußt so gewählt, daß einerseits eine störungsfreie

hämostaseologische Analytik gewährleistet ist, andererseits die Einhaltung der Bedingungen auch in der klinischen Routine möglich ist.

Der Anforderungskatalog ist gedacht für die Routineanalysen und nicht für Spezialanalysen. Für Analysen mit speziellen Fragestellungen sind die optimalen Bedingungen noch nicht alle vollständig evaluiert und müssen jeweils dem entsprechenden Bestimmungsparameter angepaßt werden.

Anwendungsgebiet

Diese Minimalanforderungen sind notwendig für die Blutentnahme und Plasmagewinnung zur Durchführung von hämostaseologischen Tests wie Thromboplastinzeit (TPZ), INR-TPZ, aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT), Thrombinzeit, Fibrinogenbestimmung, Faktorenbestimmungen und für andere hämostaseologische Methoden, bei denen Citratplasma als Probe verwendet wird, wenn keine speziellen Vorschriften zur Probengewinnung vorliegen, z. B. für Fibrinolyse-Parameter.

Blutentnahme und Plasmagewinnung

Patientenvorbereitung

Blutentnahme möglichst nüchtern oder nach leichtem Frühstück ohne Fettaufnahme (auch keine Milch).

Anmerkung: Bei Streß, körperlicher Anstrengung und Blutabnahme beim nicht liegenden Patienten können Aktivierungen des Hämostasesystems auftreten.

Probennahme

Zur Blutentnahme sind speziell für hämostaseologische Untersuchungen vorgesehene Einmalspritzen aus Kunststoff und Einmalkanülen mit inerten Oberflächen oder Vakuinabnahmesysteme zu verwenden, um Kontaktaktivierung zu vermeiden. Die Punktionsnadel ist zur Vermeidung von mechanischer Hämolyse ausreichend weit zu wählen. Die ideale Weite liegt zwischen 21 und 19 gauge.

Anschriften der Autoren:

Komitee zur Standardisierung der hämostaseologischen Analytik

Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Bad Nauheim.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Irene Witt, Universität Freiburg i. Br. und Gemeinschaftspraxis- Labormedizin, Bismarckallee 10, 79098 Freiburg

Für pädiatrische Patienten können auch 23 gauge Nadeln verwendet werden. Butterfly-Nadeln sind besonders geeignet.

Durch Blutentnahme artifiziell erzeugte hämolytische Plasmen sind für hämostaseologische Untersuchungen nicht geeignet.

- Die Blutentnahme ist venös, vorzugsweise am Arm vorzunehmen. Bei pädiatrischen Patienten kann auch aus anderen Venen entnommen werden.
- Ein kontinuierlicher Blutfluß muß gewährleistet sein; dies wird meistens durch einen Stau zwischen systolischem und diastolischem Druck erreicht. Die Dauer der Stauung darf höchstens 1 min betragen. Bei Abnahme mehrerer Blutproben sollte die Abnahme der Probe für hämostaseologische Untersuchungen mit dem zweiten Röhrchen erfolgen. Wurde an einem Arm erfolglos punktiert, sollte der Stauvorgang nicht am selben, sondern am anderen Arm wiederholt werden. Notfalls muß der Stauvorgang distal von der Erstpunktion vorgenommen werden.
- Die Punktion ist direkt und streng intravenös durchzuführen, um eine Beimengung von Gewebsflüssigkeit zu verhindern und damit eine Aktivierung des Hämostasesystems zu vermeiden. Sofern eine venöse Punktion nicht möglich ist, kann notfalls Blut aus einem Katheter entnommen werden. Dabei ist durch Abziehen und Verwerfen einer ausreichenden Blutmenge (ca. $3 \times$ Kathetervolumen, insgesamt 5–10 ml) eine Verdünnung durch Infusionslösungen zu vermeiden. Die Testergebnisse bedürfen dann einer sehr kritischen Bewertung. Bei mit Heparin beschichteten oder gepflegten Kathetern sind Heparin empfindliche Tests ohne Aussagekraft. Selbst durch vorheriges Abziehen von 20 ml Blut sind Beimengungen von Heparin häufig nicht zu vermeiden.
- Das Verhältnis der Volumenanteile Antikoagulanzen zu Blut ist genau einzuhalten. Bei einem Hämatokritwert zwischen 0,25 und 0,60 wird 1 Volumenteil steriler Natriumcitratlösung (0,11 mol/l) mit 9 Volumenteilen Blut gemischt. Bei einem Mischungsverhältnis von Citrat zu Blut unter 1 + 11 werden falsche Werte ermittelt. Bei Hämatokritwerten außerhalb der angegebenen Grenzen ist eine Korrektur vorzunehmen, bei derbei erhöhtem HTK die Volumenanteile an Na-Citrat vermindert und bei erniedrigtem HTK erhöht werden.
- Die Spritze wird bis zur Markierung mit Blut gefüllt. Nach Entfernen der Kanüle ist der Kolben der Spritze sofort bis zum Anschlag anzuziehen. Blut und Antikoagulanzen werden unmittelbar nach der Entnahme ohne Schaumbildung durch 5 maliges Hin- und Hergleiten der entstandenen Luftblase gemischt.

Plasmagewinnung

- Möglichst unmittelbar, spätestens aber nach 1 Stunde, ist das Citratblut in einem verschlossenen Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff bei mindestens $2500 \times g$ 15 min lang bei einer Temperatur des Zentrifugeninnenraumes zwischen 15 °C und 25 °C zu zentrifugieren.
 - Das Citratplasma wird unter strenger Schonung des „buffy coat“ abpipettiert und in ein weiteres, nicht zu großes Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff überführt und verschlossen bei 18 °C bis 22 °C aufbewahrt.
- Bei Entnahme der zu analysierenden Probe aus einem Primärgefäß, muß sichergestellt sein, daß die Entnahme aus dem mittleren Bereich der Plasmaschicht erfolgt (genügend Abstand zum buffy coat und zur Oberfläche).
- Die Untersuchung der Probe ist innerhalb von 4 Stunden nach der Blutentnahme vorzunehmen, sofern nicht für bestimmte Bestandteile und Methoden, kürzere (z.B. Faktor VIII-Aktivität) oder längere (z.B. Antithrombin III-Aktivität) Haltbarkeitsgrenzen bestehen.
 - Wenn die Aktivität eines Parameters durch Einfrieren der Probe nicht verändert wird und eine Bestimmung innerhalb der vorgeschriebenen Zeit nach der Blutentnahme nicht durchgeführt werden kann, wird die Probe in dem verschlossenen Sekundärröhrchen aus Kunststoff unmittelbar nach der ersten Zentrifugation nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Probe wird unter sorgfältiger Trennung vom Sediment in ein für Tieftemperaturen geeignetes Kunststoffröhrchen überführt, verschlossen und sofort bei mindestens -65 °C in einem Kältebad (bevorzugt flüssiger Stickstoff oder Trockeneis/Aceton-Gemisch) schockgefroren. Die Probe wird bei mindestens -70 °C aufbewahrt.
 - Eingefrorene Proben werden bis zum vollständigen Auftauen 5–10 min bei $37 \pm 0,5$ °C inkubiert und anschließend gemischt. Die Probe wird 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann sofort untersucht. Dabei ist darauf zu achten, daß sich eventuelle Kryopräzipitate vollständig aufgelöst haben. Eine einmal aufgetaute Probe darf für hämostaseologische Analysen nicht wieder eingefroren werden.

Probentransport

- Sofern die Untersuchung der Probe nicht vor Ort durchführbar ist, sollte das Blut oder Plasma schnell transportiert und zügig aufgearbeitet werden. Ist das Testergebnis nicht plausibel, so ist eine Überprüfung mit einer vor Ort entnommenen Blutprobe unerlässlich.

- Beim Transport von nichtgefrorenen Proben ist darauf zu achten, daß die Proben bis zur Analyse keiner höheren Temperatur als 25 °C ausgesetzt werden.

Literatur

1. Beeser H, Fischer J (1987) Hämostasologie. In: INSTAND-Schriftenreihe Band 5, Qualitätssicherung im Medizinischen Laboratorium. (K.-G. v. Borovitzky, R Merten, UP Merten, eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona. pp. 635–654
2. Einer G, Zawta B (1991) Präanalytikfibel, Kooperation von Arzt und Labor. 2. Aufl., J. A. Barth Verlag, Leipzig, Heidelberg
3. Thomson JM (1982) Blood collection and preparation: preanalytical variation. In: ECAT Assay procedures, A Manual of Laboratory Techniques. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities of the Commission of the European Communities. (J. Jespersen, RM Bertina, F Haverkate, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. pp. 13–20
4. Thomson JM (1991) Specimen collection for blood coagulation testing. In: Laboratory haematology (JA Koepke, ed.) 2. Ed., Churchill Livingstone, New York, pp. 313
5. National Committee for Clinical Standards (1980) Collection, transport and preparation of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays: Approved guideline. NCCLS document H21-A, Villanova PA
6. Müller-Berghaus C, Dati F, Ammer H, Becker U, Beeser H, Hellstern P, Keller F, Kienast J, Köhler M, Kolde H.-J, Kühne D, Lang H, Müller-Beisenhirtz W, Patscheke H, Schramm W, Seifried E, Spanuth E, Witt I and Witt P Komitee zur Standardisierung der hämostaseologischen Analytik: Aufgaben und Ziele. *Lab. med.* 18: 337–338, 1994