Forum 6 - Plasmatische Gerinnungs-Diagnostik bei Azidose

Fragestellung

Die Tatsache, dass der pH einer Blut- oder Plasma-Probe den Gerinnungsstatus beeinflusst [3], wird hier weiter untersucht.
Nachdem bereits die *präanalytischen pH-Werte* von Citratlösungen im Forum 2, eine mögliche Standardisierung des pH im Forum 3 sowie die *intraanalytischen pH-Werte* von Plasma-Gerinnungstests im Forum 5 besprochen wurden, sollen nun zusammenfassend mögliche Einflüsse einer Azidose, und zwar *prä- und intraanalytisch* auf die Plasma-Gerinnungstests bearbeitet werden.

Methodik

Die Untersuchungen wurden im Labor der Firma menal in Emmendingen (GLP/GCP zertifiziert) vorgenommen, eine Ausnahme bildeten lediglich die Messungen an den Siemens-Geräten im Labor MVZ Clotten (Freiburg).

Es kamen 5 Probanden (E♂, K♂, K♂, W♀, Z♂) zur Untersuchung. Die Blutabnahme erfolgte über die Punktion der Vena cubitalis mit einem Butterfly-System, dessen Schlauch stark verkürzt und an einen Vacutainer-Adapter angeschlossen wurde.

Auf diese Weise war es möglich, die jeweils 5 Entnahme-Röhrchen eines Herstellers (Terumo nur 4 Röhrchen) durch schnellen Wechsel innerhalb von ca. 10 min über das jeweilige Vakuum-System der Röhrchen zu füllen. Alle Röhrchen wurden anschließend sofort durchmischt und dann zentrifugiert.

Folgende Röhrchen kamen zum Einsatz:

- Becton-Dickinson, Vacutainer 2,7 mL (“gepuffertes” Citrat 0,109 M)
- Greiner bio-one, Vacuette 3,0 mL (“gepuffertes” Citrat 3,2%)
- Sarstedt, S-Monovette 3,0 mL (Na_3Citrat 0,106 M)
- Terumo, Venosafe 3,6 mL („gepuffertes“ Citrat 0,109 M, 3.2%).

Nach dem Abpipettieren und Zusammenfügen in ein einziges Gefäß wurden auf diese Weise zwischen 13,5 und 15 ml Blut entnommen, entsprechend 14,9 und 16,5 ml Citrat-Blut bzw. 8,9 bis 9,9 ml Citrat-Plasma nach Zentrifugation.

Dieses Gesamtvolumen war erforderlich, da die verschiedenen Geräte folgende Volumina benötigen.

Für die Messung von PT, aPTT und Fib-C:
Stago, STA-R-evolution, 300 µl
IL, ACL TOP 500, 270 µl
Siemens, BCS-XP und CA 7000, 1 500 µl Für die Messung von PT und aPTT:
Merlin, Kugel Koagulometer MC10 plus, 150 µl Für die Messung von pH und pCO_2:
IL, GEM 3000, 135 µl
Gesamtvolumen 2 355 µl

Da insgesamt 3 Präparationen zur Untersuchung kamen (s. u.), wurden also gut 7 000 µl benötigt, dazu waren aus Sicherheitsgründen die ca. 9 ml erforderlich.

Die 3 Präparationen waren:

- Normal
- Dilution (Plasma 1 + 1 mit 0,9 % NaCl (1 : 2) verdünnt)
- Azidose (3,0 ml Plasma + 40 µl 1 M HCl): Plasma-BE -13 mmol/l (genau -13,1 mmol/l)

Als Geräte kamen folgende Gerinnungsgeräte sowie ein Blutgas-Analysator zum Einsatz:

- Firma menal in Emmendingen: Stago STA-R-evolution, Merlin Kugel Koagulometer MC10 plus, Instrumentation Laboratory (IL) ACL TOP 500, IL GEM 3000.
- MVZ Clotten in Freiburg: Siemens BCS-XP und CA 7000.

Somit kamen insgesamt zur Untersuchung:

Citrat-Plasma von 5 Probanden, hergestellt mit jeweils 4 verschiedenen Entnahme-Systemen (Becton-Dickinson, Greiner bio-one, Sarstedt, Terumo) und 3 verschiedenen Präparationen (Normal, Dilution, Azidose), also insgesamt 60 Proben.

Für die Gerinnungs-Diagnostik kamen die gleichen Reaktionslösungen zum Einsatz, wie sie bereits im Forum 5 untersucht wurden.

Alle Blutentnahmen wurden am gleichen Tag vorgenommen und alle Untersuchungen wurden am Folge-Tag durchgeführt. Die Lagerung der Plasmaproben erfolgte grundsätzlich im Kühlschrank bei 4 °C.

Ergebnisse und Interpretationen

Bei den folgenden Abbildungen wurden die Ergebnisse (Ordinate) immer gegenüber dem mechanischen Verfahren des STA-R-evolution (Stago) (Abszisse) aufgetragen.

PT (INR)

Der Vergleich (Abb. 1 - 3) der mit den 4 Geräten erhobenen Messwerten für die Prothrombinzeit (PT, INR) ist in Relation zum mechanischen Verfahren (STA-R-evolution, Stago) dargestellt. Da sich keine Unterschiede bezüglich der 4 verschiedenen Entnahme-Systeme ergeben haben, wurden diese nicht gesondert dargestellt (Kommentar siehe unten).

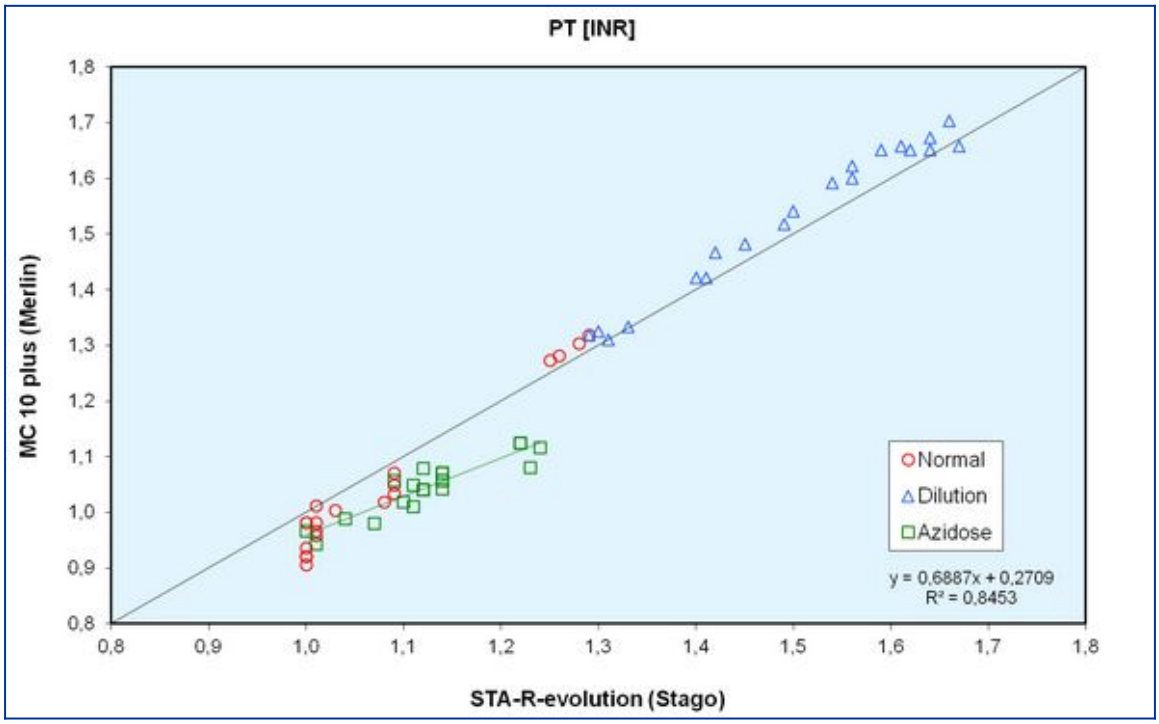

Abbildung 1

Es ist offensichtlich, dass sich die beiden mechanischen Verfahren (STA-R-evolution und MC 10 plus) praktisch nicht unterscheiden. Alle Werte liegen fast auf der Identitätsgeraden. Bei den aziden Proben aber treten deutliche Unterschiede auf, dargestellt durch eine gesondert berechnete, lineare Funktion. Die Interpretation kann nur lauten: Bei der PT zeigt das Stago-Gerät (STA-R-evolution) für die Azidose im Vergleich zum MC10 plus (Merlin) eine Gerinnungshemmung, also Zunahme der INR. Die umgekehrte Interpretation, also das MC10 plus zeigt eine Zunahme der Gerinnung, also Abnahme der INR, wäre unrealistisch.

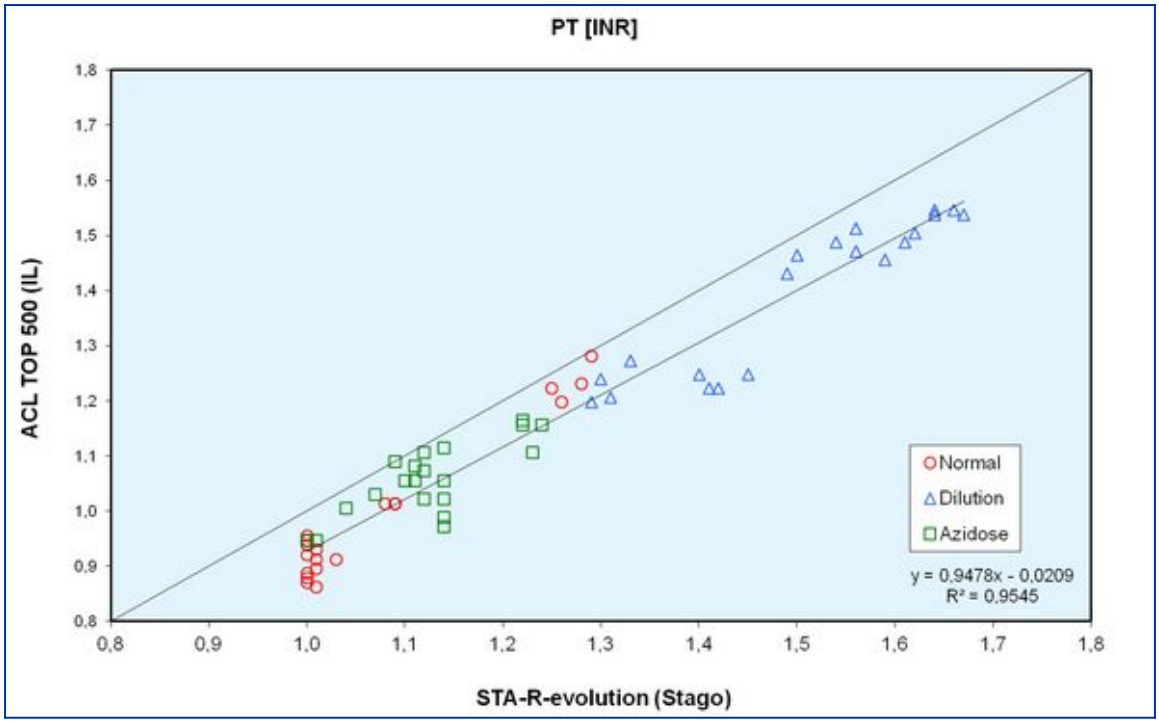

Abbildung 2

Der Vergleich (Abb. 2) zwischen der optischen Messung auf dem IL-Gerät (ACL TIOP 500) und der mechanischen Clott-Messung auf dem Stago-Gerät (STA-R-evolution) zeigt, dass die Messwerte des IL-Gerätes systematisch, parallel unterhalb der STA-R-evolution-Messreihe liegen. Eine Abweichung zu den Normalwerten fällt bei den aziden Proben nicht auf.

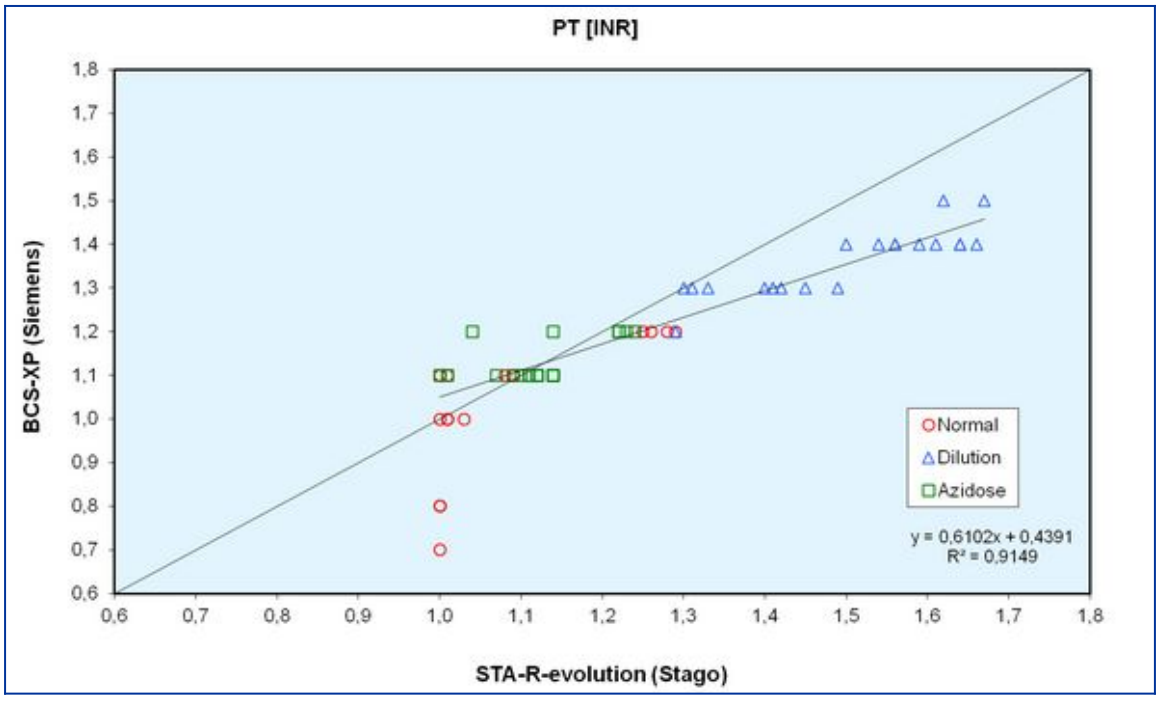

Abbildung 3

Der Vergleich (Abb. 3) zwischen dem photometrischen Siemens- (BCS-XP) und der mechanischen Clot-Messung des Stago-Gerätes (STA-R-evolution) zeigt,

dass alle Werte gemessen mit dem Siemens-Gerät systematisch von der Messreihe auf dem STA-R-evolution abweichen. Die berechnete Gerade ist ohne zwei offensichtliche Ausreißer ermittelt. Eine Abweichung zu den Normalwerten bei den aziden Proben fällt nicht auf.

aPTT (s)

Der Vergleich der mit den 4 Geräten erhobenen Messwerte für die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), angegeben in Sekunden (s), erfolgt in den folgenden 3 Abbildungen in Relation zum mechanischen Clotting-Verfahren (Stago, STA-R-evolution).

Da sich keine Unterschiede bezüglich der 4 verschiedenen Entnahme-Systeme ergeben haben, wurden diese nicht gesondert dargestellt (Kommentar siehe unten).

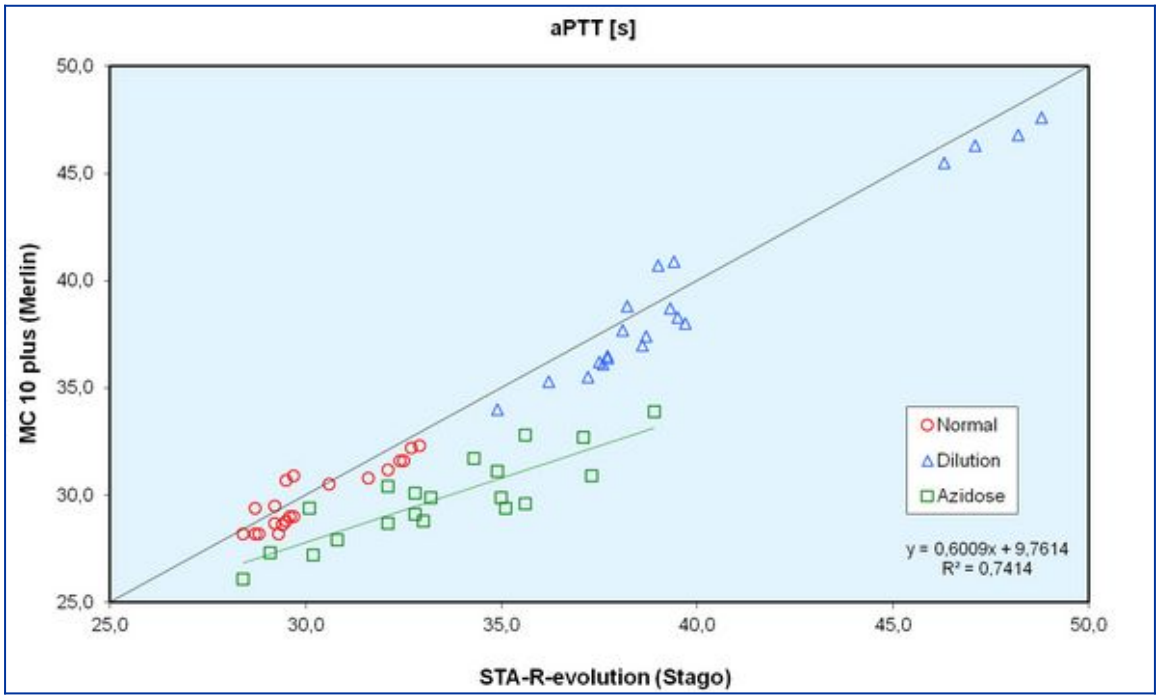

Abbildung 4

Die durchgeführten mechanischen Verfahren (STA-R-evolution und MC 10 plus) unterscheiden sich offensichtlich nicht (Abb. 4). Alle Messwerte liegen auf der berechneten Geraden. Bei den azidotischen Proben treten deutliche Unterschiede auf. Die Messwerte der azidotischen Plasmaproben sind in grün dargestellt.

Bei der aPTT misst das Stago-Gerät für die azidotischen Proben im Vergleich zum MC10 plus eine Gerinnungshemmung, also Zunahme der aPTT in Sekunden. Die umgekehrte Interpretation, also die MC10 plus-Messungen zeigen eine Zunahme der Gerinnungszeit, also Abnahme der aPTT in Sekunden, wäre unrealistisch.

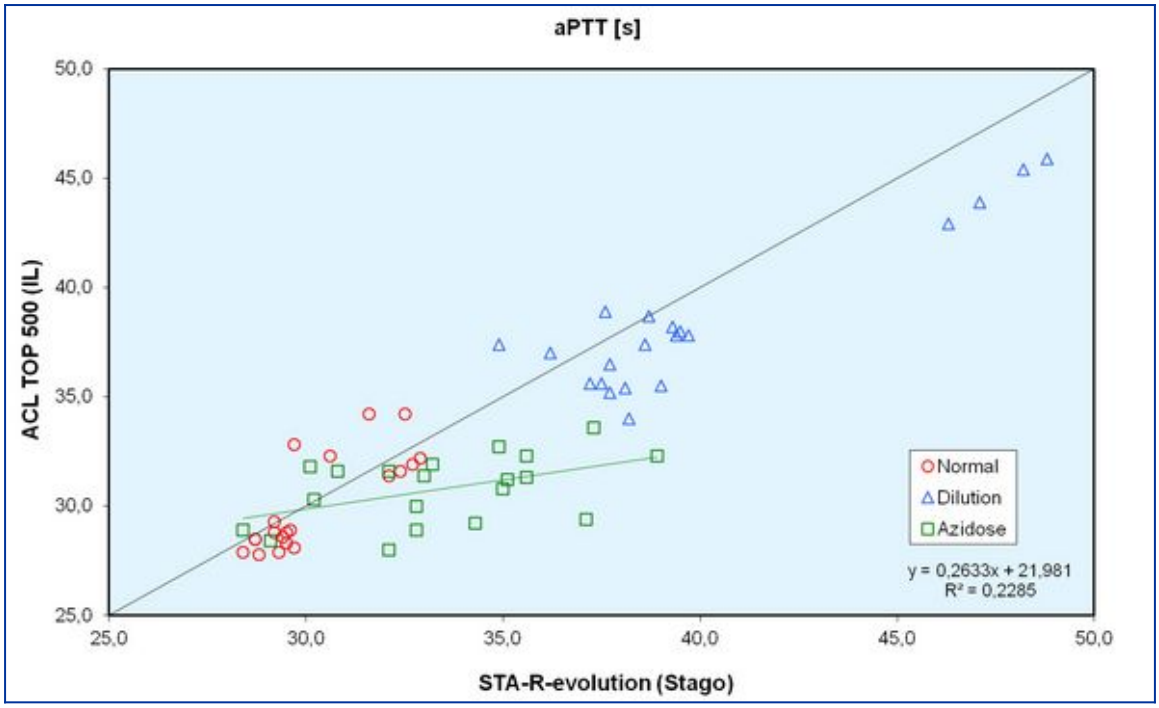

Abbildung 5

Beim Vergleich (Abb. 5) der photometrischen Messungen auf dem IL-Gerät (ACL TOP 500) zeigt sich gegenüber den mechanischen Messungen auf dem STA-R-evolution-Gerät nur eine mäßige Übereinstimmung bezüglich der aPTT. Auffallend ist auch hier, dass bei den azidotischen Plasmen deutliche Messwert-Unterschiede auftreten. Die Messwerte und die Berechnungsgerade sind grün dargestellt. Bei der aPTT wird im STA-R-evolution-Gerät für die azidotischen Plasmen im Vergleich zum IL-Gerät eine Gerinnungshemmung gefunden, also Zunahme der aPTT in Sekunden. Die umgekehrte Interpretation, also das IL-Gerät zeigt eine Zunahme der Gerinnung, also Abnahme der aPTT in Sekunden, wäre unrealistisch.

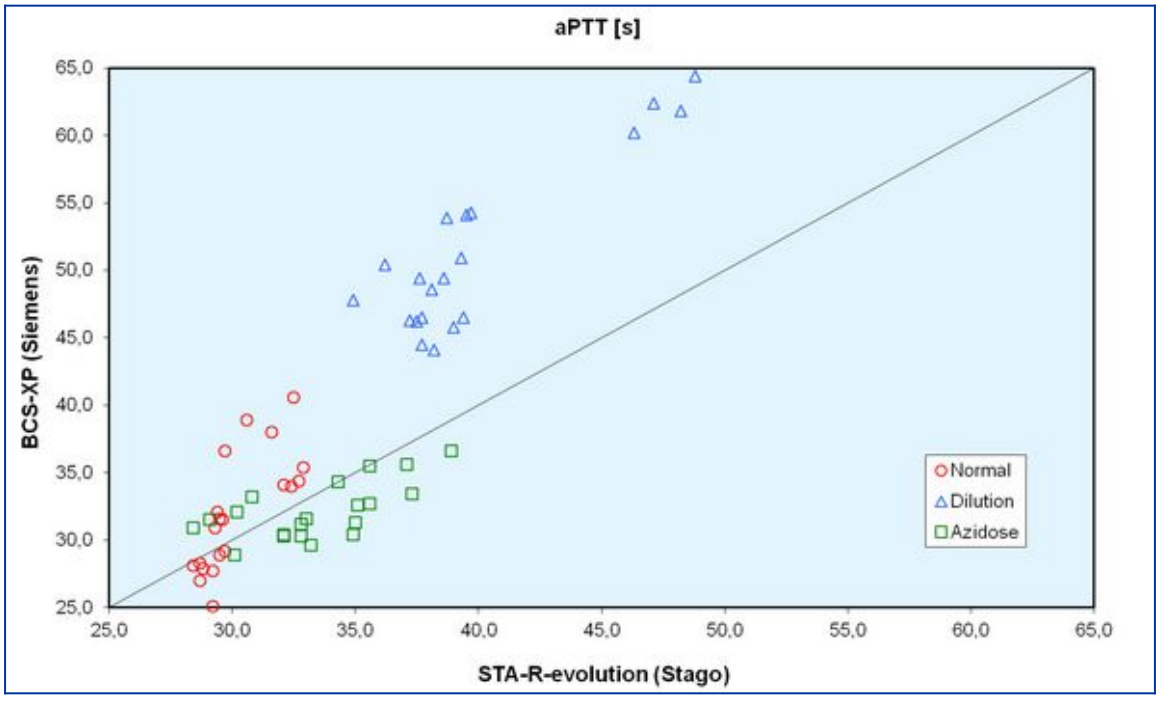

Abbildung 6

Beim Vergleich des photometrischen Siemens-Gerätes (BCS-XP) mit dem mechanischen Stago-Gerät (STA-R-evolution) (Abb. 6) zeigt sich eine sehr schlechte Übereinstimmung bezüglich der aPTT im Sinne einer deutlichen Verlängerung der aPTT in Sekunden beim Siemens-Gerät. Für die Dilution zeigt das Siemens-Gerät bei der aPTT im Vergleich zum Stago-Gerät eine Gerinnungshemmung, also Zunahme der aPTT in Sekunden. Die umgekehrte Interpretation, also das Stago-Gerät zeigt für die Dilution eine Zunahme der Gerinnung, also Abnahme der aPTT in Sekunden, wäre unrealistisch. Auffallend ist auch hier, dass bei den azidotischen Proben deutliche Unterschiede auftreten.

Fibrinogen-Konzentration (Fib-C, g/L)

Der Vergleich der mit den 3 Geräten erhobenen Messwerte für die Fibrinogen-Konzentration (Fib-C), angegeben in g/L, erfolgt in den folgenden 2 Abbildungen immer in Relation zum mechanischen Verfahren (Stago, STA-R-evolution). Da sich keine Unterschiede bezüglich der 4 verschiedenen Entnahme-Systeme ergeben haben, wurden diese nicht gesondert dargestellt (Kommentar siehe unten).

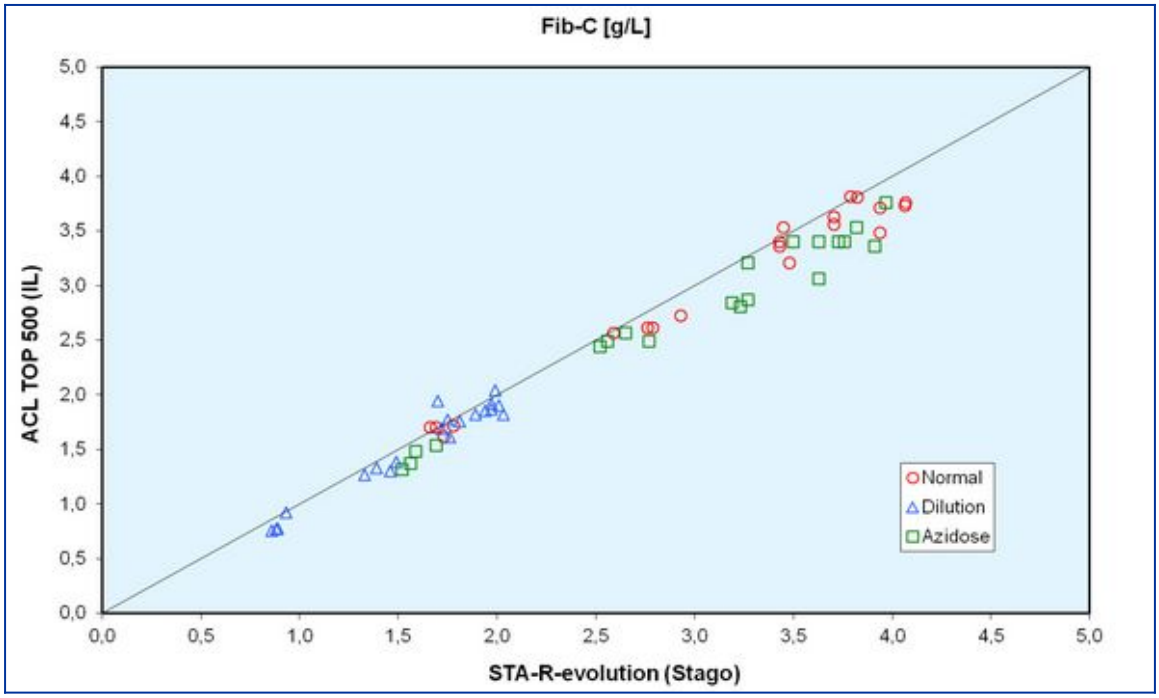

Abbildung 7

Die Messwerte der zwei gegenüber gestellten Geräte (Abb. 7) zeigen große Übereinstimmung. Auch die azidotischen Plasmen zeigen keine Abweichungen gegenüber den „Normal-Plasmen“.

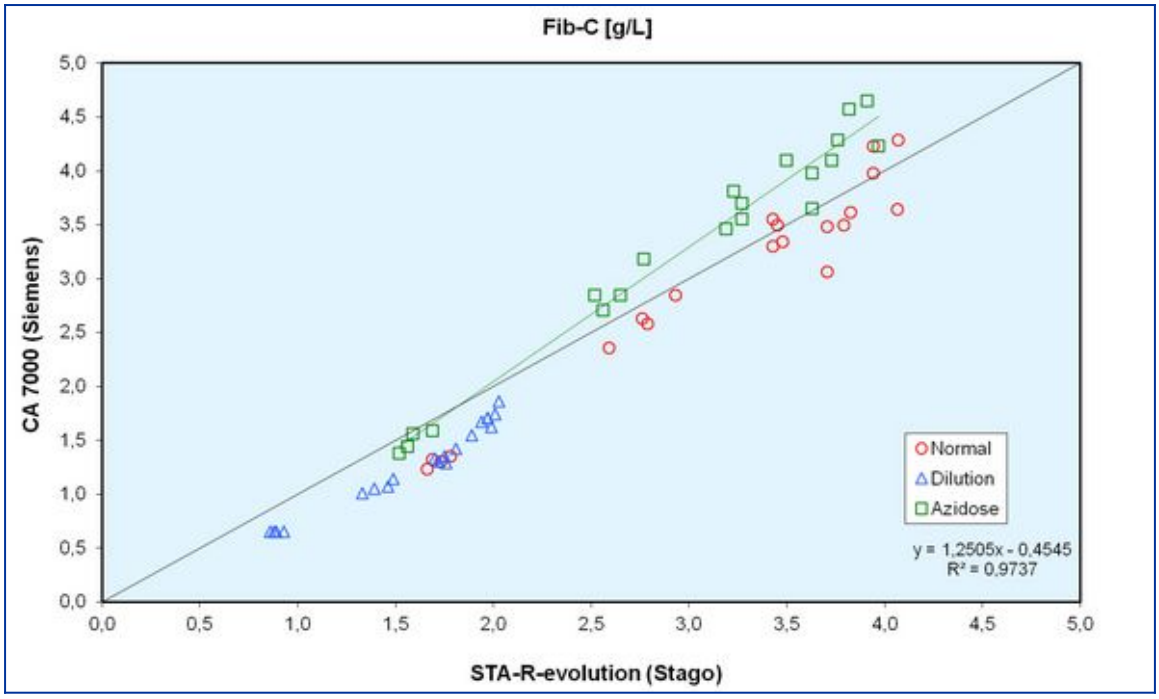

Abbildung 8

Die photometrische Messung auf dem Siemens-Gerät und das mechanische Clott-Verfahren auf dem STA-R-evolution-Gerät zeigen ähnliche Ergebnisse (Abb. 8). Eine systematische Abweichung der Messwerte für die azidotischen Plasmen deutet sich an. Die in grün dargestellte Messreihe ergibt die Berechnungsgerade, die eine Abweichung zu den Normalplasmen aufweist.

Fibrinogen-Konzentration (Fib-C, g/L): Ist- gegen Soll-Wert

Der Vergleich der mit den 3 Geräten erhobenen Messwerte für die Fibrinogen-Konzentration (Fib-C), dargestellt als Ist- gegen den Sollwert jeweils in g/L, erfolgt in den folgenden 3 Abbildungen (Abb. 9 - 11). Diese Darstellung wurde möglich, weil für jedes Gerät der Sollwert aus der vorgegebenen Verdünnung von 1 : 2 aus dem zuvor gemessenen Wert erhalten werden konnte.

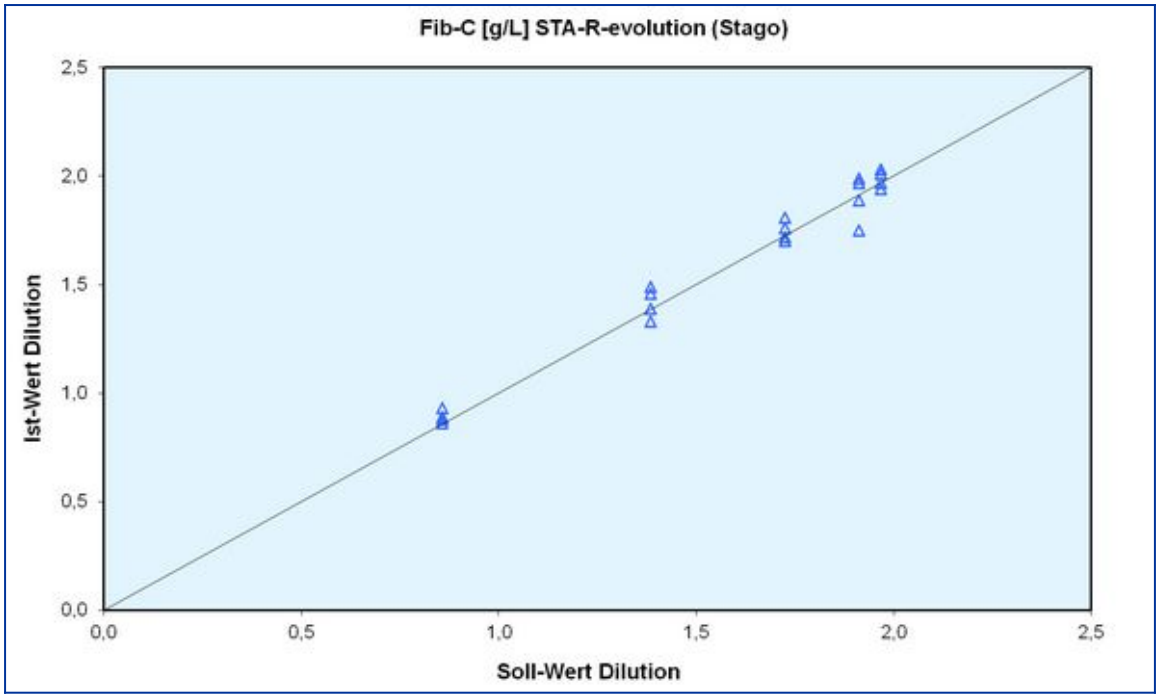

Abbildung 9

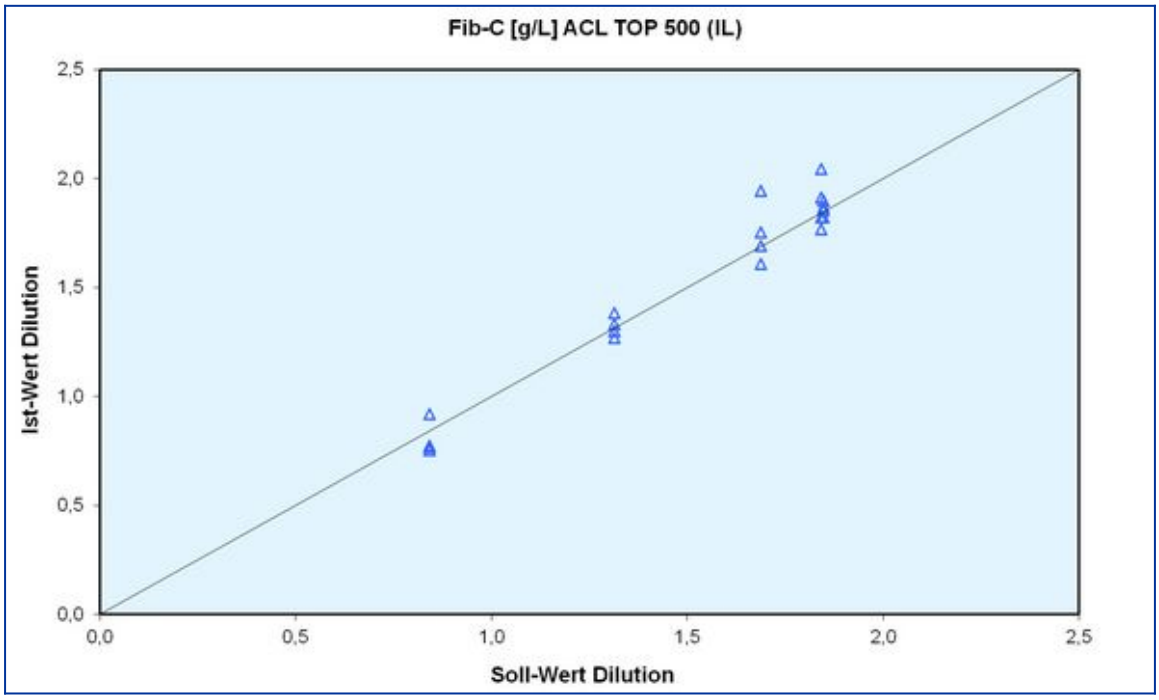

Abbildung 10

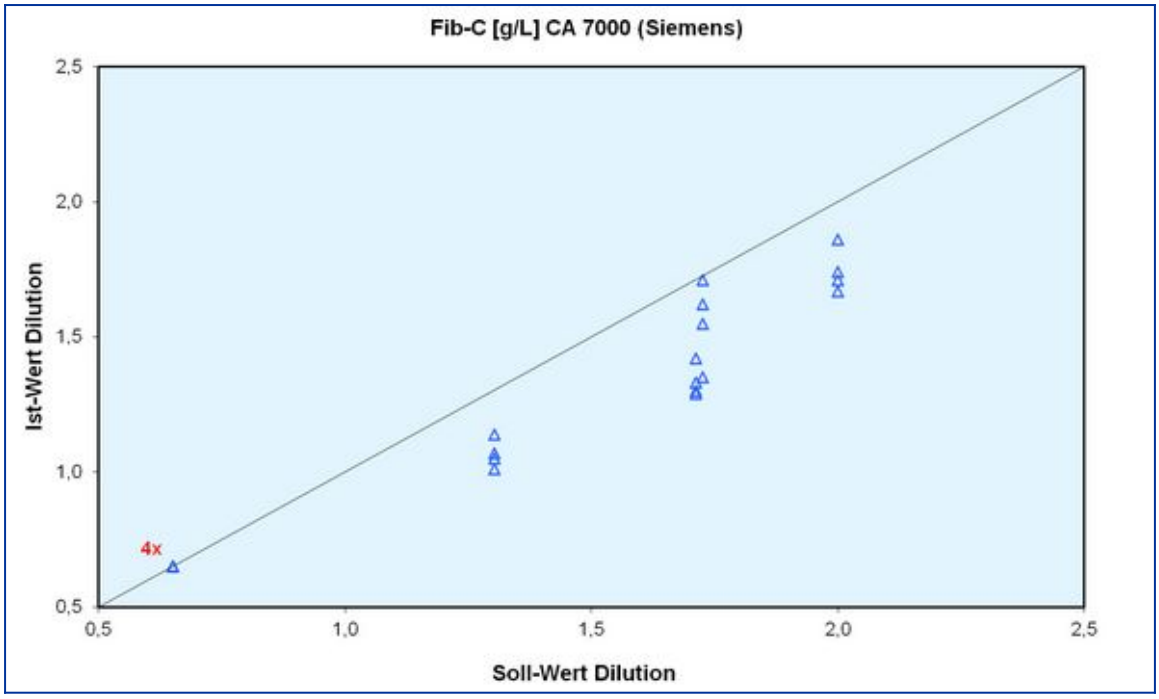

Abbildung 11

Die Messwerte für die Berechnung der Fibrinogen-Konzentration ergeben für die auf dem STA-R-evolution von Stago und ACL TOP 500 von IL gute Übereinstimmung (Abb. 9 und 10). Die Messwerte gemessen am Siemens CA 7000 ergeben eine große Streuung und Abweichung von der Idealkennlinie (Abb. 11).

Diskussion

Das Ziel dieser Untersuchung bestand in der Überprüfung, ob folgende prinzipielle Forderung erfüllt ist: Der ursprüngliche, in vivo-pH-Status einer Plasmaprobe muss durch das prä-analytische Blutabnahmesystem und das intra-analytische Verfahren unbedingt erhalten bleiben. Alle durch Azidose oder Alkalose bedingten Störungen des Gerinnungs-Status sollten diagnostisch erfasst werden können.

Beispielsweise muss es möglich sein, die Azidose bedingte, lebensbedrohliche Gerinnungsstörung eines Polytrauma-Patienten zu erfassen und nicht etwa zu negieren.

Dazu wurden Azidose-Proben mit einem Blut-BE von -15 mmol/l (Plasma-BE -13 mmol/l) mit Normal-Proben verglichen. Wie zu erwarten [3] kommt es zu einer Gerinnungshemmung mit Zunahme der PT (INR) und Verlängerung der aPTT (s) ohne nennenswerten Einfluss auf die Fibrinogen-Konzentration (g/L). Diese Befunde werden allerdings nur von einem der beiden mechanischen Geräte erfasst, dem STA-R-evolution von Stago (s.u.). Die beiden optisch-photometrischen Verfahren registrieren diese Befunde nicht. Die Erklärung hierfür dürfte vermutlich in der Tatsache liegen, dass bei dem Stago-Gerät die

3 Reagenzien im Vergleich zu denjenigen von IL (19,7 mmol/l/pH) und Siemens (24 mmol/l/pH) im Mittel die niedrigsten Pufferkapazitäten (8,7 mmol/l/pH) aufweisen (Forum 5). Je höher die Pufferkapazität des Reagenz desto größer die Gefahr, dass der pH-Wert des Plasma-Reagenz-Gemisches „normiert“ und damit die azidotische Vorgeschichte des Plasmas „weggepuffert“ wird.

Nachtrag (26.11.2014)
Wenn nur das mechanische Stago-Gerät (STA-R-evolution), nicht aber das mechanische Merlin-Gerät (MC 10 plus) die Azidose erfasst, kann die Ursache *nicht* an den Reagenzien liegen, weil bei dieser Untersuchung auch beim Merlin-Gerät die Original-Stago-Reagenzien verwendet wurden.

Ein Zusammenhang zwischen dem gemessenen pCO_2 und damit dem pH und der Änderung der PT oder aPTT (nicht dargestellt) konnte nicht hergestellt werden.

Die Vermutung, dass die 4 verschiedenen Entnahme-Systeme infolge unterschiedlicher pH-Werte zu unterschiedlichen Ergebnissen führen könnten (Forum 3), haben sich nicht bestätigt und wurden daher nicht gesondert dargestellt. Offensichtlich sind die durch die Entnahme-Systeme bedingten pH-Unterschiede zu gering: Bei den Normal-Plasmen beträgt der pH-Mittelwert 7,61 für das Entnahme-System mit reinem Citrat bei einem pCO_2 von 23 mmHg (n = 5) im Vergleich zu einem mittleren pH-Wert von 7,51 beim pCO_2 von 25 mmHg für die Entnahme-Systeme mit „gepuffertem“, d.h. saurem Citrat (n = 15), weil sich die BE-Werte nur wenig unterscheiden (-0,2 vs. -3,5 mmol/L). Bei den verdünnten Proben nehmen die BE-Werte im Sinne einer Dilutions-Azidose deutlich ab (-12 vs. -14 mmol/l), die pH-Werte bleiben aber praktisch konstant (7,61 vs. 7,52), weil die Werte des pCO_2 etwa halbiert werden (11 vs. 12 mmHg). Erwartungsgemäß haben die Entnahme-Systeme bei den azidotischen Proben keinen nennenswerten Einfluss mehr auf die pH- und pCO_2-Werte.

Als erster Nebenbefund wurde die Veränderung der Plasma-Gerinnung bei verdünnten Proben (1 : 2 mit NaCl 0,9 %) untersucht. Es wurde immer eine deutliche Gerinnungshemmung, also Zunahme der PT (INR) und der aPTT (s) gemessen. Dies ist deshalb zu erwähnen, weil dieser zu erwartende Befund in der Literatur beschrieben ist [1, 6]. Der allerdings auch beschriebene gegenteilige Befund, also eine dilutionsbedingte Gerinnungsförderung [2, 4], dürfte damit vermutlich methodisch bedingt sein.

Als zweiter Nebenbefund wurde ein Methodenvergleich zwischen den photometrischen Verfahren der Plasma-Gerinnungs-Diagnostik (IL, Siemens) einerseits und den mechanischen Verfahren andererseits (Stago, Merlin) vorgenommen. Diese Ergebnisse sind, bezogen auf die Normal- und Dilutions-Proben bemerkenswert:

Bei der PT zeigen die beiden photometrischen Verfahren mehr oder weniger deutliche Abweichungen zum mechanischen Verfahren STA-R-evolution. Bei

der aPTT fallen die Unterschiede sehr viel deutlicher aus, insbesondere bei Messungen auf dem Siemens-Gerät, das eine erhebliche Verlängerung der aPTT aufweist. Bei der Fibrinogen-Konzentration hingegen sind die Unterschiede zwischen mechanischem und photometrischem Verfahren minimal (IL) oder geringfügig (Siemens).

Als dritter Nebenbefund soll die „harte“ Prüfung eingestuft werden, nämlich Vergleich der Fibrinogen-Konzentration der verdünnten mit der unverdünnten Probe (Ist gegen Soll).

Diese Prüfung wird sowohl vom STA-R-evolution (Stago) als auch vom ACL TOP 500 (IL) optimal bestanden. Das Siemens-Gerät (CA 7000) liefert weitgehend nicht zufriedenstellende Ergebnisse. Es darf vermutet werden, dass der sehr atypische pH-Wert des Reagenz (Multifibren, pH = 7,9) dafür verantwortlich sein könnte (Forum 5). Schon in einer früheren Untersuchung [5] wurde gezeigt, dass das Gerät CA 7000 eine Fibrinogen-Konzentration von 1,64 g/L statt 1,93 g/L (STA-R-evolution) bzw. eine von 3,13 statt 3,69 g/L (Tabelle 1 und Abb. 2 [5]) bestimmt, also eine systematische Unterschätzung von 15 % gegenüber dem STA-R-evolution. Hier allerdings beträgt die Unterschätzung – im mittleren Konzentrationsbereich – bis zu knapp 25 % (1,29 statt 1,71 g/L) gegenüber dem STA-R-evolution.

Zusammenfassung

- Wie zu erwarten zeigen azidotische Plasma-Proben mit einem BE von -13 mmol/l eine Gerinnungshemmung mit Zunahme der PT (INR) und Verlängerung der aPTT (s) ohne nennenswerten Einfluss auf die Fibrinogen-Konzentration (g/L). Diese Befunde werden allerdings nur von einem mechanischen Gerät erfasst, dem STA-R-evolution (Stago), nicht von den photometrischen Geräten ACL TOP 500 (IL) und BCS-XP (Siemens).
- Die Vermutung, dass Entnahme-Systeme infolge unterschiedlicher pH-Werte zu unterschiedlichen Gerinnungswerten führen könnten, hat sich nicht bestätigt.
- Verdünnte Plasma-Proben (1 : 2 mit NaCl 0,9 %) zeigen eine deutliche Gerinnungshemmung, also Zunahme der PT (INR) und der aPTT (s).
- Der Methodenvergleich zur Plasma-Gerinnungs-Diagnostik zwischen den photometrischen Verfahren (IL, Siemens) und den mechanischen Verfahren (Stago, Merlin) geht zu Gunsten der mechanischen Verfahren aus: Bei der PT zeigen die beiden photometrischen Verfahren (ACL TOP 500, BCS-XP) mehr oder weniger deutliche Abweichungen zum mechanischen Verfahren STA-R-evolution. Bei der aPTT fallen die Unterschiede sehr viel deutlicher aus, insbesondere beim Siemens-Gerät. Bei der Fibrinogen-Konzentration hingegen sind die Unterschiede zwischen mechanischem und photometrischem Verfahren minimal (IL)

oder geringfügig (Siemens).
- Die Messung der Fibrinogen-Konzentration in verdünnten im Vergleich zu unverdünnten Proben (Ist gegen Soll) gelingt sowohl beim STA-R-evolution (Stago) als auch beim ACL TOP 500 (IL) optimal, während das Siemens-Gerät (CA 7000) nur unzureichende Ergebnisse liefert.

Literatur

1. Egli GA, Zollinger A, Seifert B, Popovic D, Pasch T, Spahn DR:
   Effect of progressive haemodilution with hydroxylethyl starch, gelatin and albumin on blood coagulation.
   Br J Anaesth 1997; 78: 684 - 689
2. Iselin BM, Willimann PF, Seifert B, Casutt M, Bombeli T, Zalunardo MP, Pasch T, Spahn DR:
   Isolated reduction of haematocrit does not compromise in vitro blood coagulation.
   Br J Anaesth 2001; 87: 246 - 249
3. Meng, ZH, Wolberg AS, Monroe DM, Hoffmann M:
   The effect of temperature and pH on the activity of factor VIIa:
   Implications for the efficacy of high-dose factor VIIa in hypothermic and acidotic patients.
   J Trauma 2003; 55: 886 – 891
4. Ruttmann TG, James MF, Wells KF:
   Effect of 20% in vitro haemodilution with warmed buffered salt solution and cerebrospinal fluid on coagulation.
   Br J Anaesth 1999; 82: 110 - 111
5. Solomon C, Cadamuro J, Ziegler B, Schöchl H, Varvenne M, Sørensen B, Hochleitner G, Rahe-Meyer N:
   A comparison of fibrinogen measurement methods with fibrin clot elasticity assessed by thromboelastometry, before and after administration of fibrinogen concentrate in cardiac surgery patients.
   Transfusion 2011; 51: 1695 - 1706
6. Tobias MD, Wambold D, Pilla MA, Greer F:
   Differential effects of serial hemodilution with hydroxyethylstarch, albumin, and 0.9% saline on whole blood coagulation.
   J Clin Anesth 1998; 10: 366 - 371

Danksagung

Den Mitarbeiterinnen der Firma menal gebührt großer Dank für die professionelle und zuverlässige Durchführung der Probenvorbereitung und Messungen. Die Firma Instrumentation Laboratory (Kirchheim) hat freundlicherweise den Gerinnungsautomaten ACL TOP 500 inklusive aller Reagenzien und Kalibratoren sowie den Blutgas-Analysator GEM 3000 zur Verfügung gestellt. Die Firma Stago Deutschland (Düsseldorf) hat für den vor Ort vorhandenen Gerinnungsautomaten STA-R-evolution alle erforderlichen

Reagenzien und Kalibratoren zur Verfügung gestellt. Die Entnahme-Röhrchen wurden von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Sarstedt (Nümbrecht) und Terumo (Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Erwähnte Firmen

menal (Emmendingen)
MVZ Clotten (Freiburg)
Instrumentation Laboratory (Kirchheim)
Stago Deutschland (Düsseldorf)

Anmerkung

Diese Untersuchung wurde auf Veranlassung der CitrISO GbR (Umkirch) durchgeführt.