

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kommissarischer Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Reinauer

**Vergleichbarkeit der Methoden zur Bestimmung der Aktivierten Partiellen
Thromboplastinzeit und der Resistenz gegen aktiviertes Protein C**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

GÜNTHER KAPPERT

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M. A.,
Dekan
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Reinauer
Korreferent: Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	<i>EINLEITUNG</i>	1
1.1	Einführung	1
1.2	Methodisches Prinzip der APTT	2
1.3	Diagnostische Bedeutung der APTT	3
1.4	Modifikation der APTT zur Bestimmung der APC-Resistenz.....	4
1.5	Ziel dieser Arbeit	5
2	<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	6
2.1	Probenmaterial	6
2.2	Reagenzien	6
2.2.1	Kontrollplasmen	6
2.2.2	APTT-Reagenzien	7
2.2.3	Faktorenmangelplasmen	7
2.2.4	Heparin	7
2.2.5	Chromogene Anti-F Xa-Bestimmung	7
2.2.6	Reagenzien zum Screening auf die F V Leiden-Mutation.....	7
2.3	Geräte	8
2.4	Methoden	8
2.4.1	Vergleich verschiedener APTT-Reagenzien	8
2.4.1.1	BFA - optomechanische Detektionsmethode	9
2.4.1.2	BCT – photometrische Detektionsmethode.....	10
2.4.1.3	Chromogene Bestimmung der Anti-F Xa-Aktivität.....	10
2.4.2	Bestimmung der APC-Resistenz.....	10
2.4.2.1	Coatest APC Resistance ohne F V-MP-Vorverdünnung.....	10
2.4.2.2	Coatest APC Resistance mit F V-MP-Vorverdünnung.....	11
2.4.2.3	ProC APC	11
2.4.2.4	Akzelerin-Inaktivierungs-Test.....	12
2.4.2.5	Immunochrom APC Response	13
2.4.2.6	Plasmaverdünnung einer F V Leiden-homozygoten Patientin mit Poolplasma.....	14
2.5	Statistische Auswertung.....	14
2.5.1	Referenzbereiche.....	14
2.5.2	Signifikanz P für unterschiedliche Referenzbereiche.....	14
3	<i>ERGEBNISSE</i>	15
3.1	Zum Vergleich verschiedener Methoden der APTT-Bestimmung.....	15
3.1.1	Referenzbereiche.....	15
3.1.2	Präzision in Serie	18
3.1.3	Präzision von Tag zu Tag	19
3.1.4	Faktormangelempfindlichkeit der APTT-Reagenzien	20
3.1.5	Heparinempfindlichkeit der einzelnen APTT-Reagenzien	27
3.1.6	Empfindlichkeit gegenüber Lupusantikoagulantien.....	33
3.1.7	Methodenvergleich nach Passing-Bablok	37
3.2	Zum Vergleich verschiedener Bestimmungsmöglichkeiten der APC-Resistenz	45
3.2.1	Referenzbereiche.....	45

3.2.2	Kalibrationen	46
3.2.3	Präzision in Serie (n=10).....	47
3.2.4	Präzision von Tag zu Tag (n=2*5)	49
3.2.5	Heterozygotie für Faktor V Leiden	50
3.2.6	Verdünnungsreihe: Plasma einer F V Leiden-homozygoten Patientin mit Poolplasmas ...	51
3.2.7	Störfaktor Lupusantikoagulantien	54
4	DISKUSSION	56
4.1	Methodische Unterschiede der APTT	56
4.1.1	Phospholipide.....	56
4.1.2	Oberflächenaktivator.....	56
4.1.3	Analysator.....	57
4.2	Bisherige Ansätze einer Standardisierung	58
4.2.1	Versuch der Normierung der Referenzbereiche: APTT-Ratio und APTT-Quotient	58
4.2.2	Versuche der Normierung der Überwachung der Heparintherapie	59
4.2.3	Verwendung der APTT zum Nachweis von Lupusantikoagulantien.....	61
4.3	Möglichkeiten der Standardisierung in der Zukunft.....	62
4.4	Anwendbarkeit der Modifikation der APTT zur Diagnostik der APC-Resistenz	63
5	ZUSAMMENFASSUNG	66
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
7	ABKÜRZUNGEN	76
8	DANKSAGUNG	78

1 Einleitung

1.1 Einführung

Seit dem Beginn des 20. Jahrhunderts ist es möglich geworden, Patienten auf den Zustand ihrer Blutgerinnung (Hämostase) zu untersuchen. Dies geschah zunächst durch die in vivo Blutungszeit (DUKE 1912), später durch in vitro Analysen am Citratplasma. Obwohl schon seit den dreißiger Jahren die Thromboplastinzeit nach QUICK (1935) und seit den sechziger Jahren die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) nach PROCTOR und RAPAPORT (1961) routinemäßig und auch zum Screening eines jeden neu aufgenommenen Patienten durchgeführt werden, finden sich bisher nur Ansätze einer Standardisierung der hämostaseologisch-diagnostischen Methoden. Das bisher erfolgreichste Beispiel ist die International Normalised Ratio (INR), welche die Thromboplastinzeit für stabil oral antikoagulierte Patienten standardisiert.

Trotz der bisherigen Versuche, ebenfalls bei der APTT zu einer Vereinheitlichung zu gelangen, kann von einer vergleichbaren Bestimmung in unterschiedlichen Laboratorien auch heute nicht geredet werden. Dies lässt sich besonders gut an einem Ringversuchsergebnis verdeutlichen: (Tabelle 1)

Tabelle 1 Auswertung eines Ringversuchs zur APTT durch das Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium e. V. (INSTAND e. V.)

Die APTT-Quotienten der Proben 11 und 12 wurden berechnet, indem die APTT der Probe 11 bzw. 12 durch die APTT der Probe 13 geteilt wurde.

Methoden	Probe	Zielwert	Zielbereich	Kollektiv			Bestehensquote	
				MW	VK	Anzahl	Probe	gesamt
Pathromtin (Behring)	SL 11	2,41	2,20-2,62	2,43	5,81	157	88,6%	83,4%
	12	1,82	1,68-1,96	1,82	4,79		93,0%	
weitere Methoden	11	2,03	1,74-2,32	2,03	9,30	155	87,8%	85,2%
	12	1,48	1,34-1,62	1,48	5,87		94,9%	
Actin FS (Dade), APTT FS (Sigma)	11	2,52	2,19-2,85	2,50	8,91	89	88,8%	85,4%
	12	1,65	1,56-1,74	1,65	3,66		92,2%	
Actin FSL (Dade), Platelin LS (Organon)	11	1,58	1,43-1,73	1,58	6,27	64	90,7%	97,5%
	12	1,40	1,32-1,48	1,40	3,62		92,2%	
APTT-SP (IL)	11	1,57	1,42-1,72	1,59	5,63	33	94,0%	84,8%
	12	1,34	1,23-1,45	1,35	5,51		91,0%	
Pathromtin (Behring), Alexin (Sigma), Thrombosil I (Ortho)	11	2,10	1,80-2,40	2,11	9,57	41	85,4%	80,5%
	12	1,57	1,40-1,74	1,57	7,07		87,9%	
Clot PTT (Nobis), SynthASil (Ortho)	11	1,69	1,48-1,90	1,72	7,96	44	91,0%	86,4%
	12	1,42	1,30-1,54	1,42	5,77		91,0%	
STA-APTT-Koalin (Roche)	11	1,67	1,46-1,88	1,70	8,30	28	85,8%	85,7%
	12	1,31	1,20-1,42	1,33	5,01		92,9%	
DAPTTIN (Immuno)	11	1,50	1,33-1,67	1,52	7,10	19	89,5%	89,5%
	12	1,45	1,36-1,54	1,45	3,82		100%	

Hierbei wurden drei Proben in die teilnehmenden Laboratorien versandt, die diese mit ihrer routinemäßig verwendeten Methoden analysierten. In der Darstellung der Messergebnisse wurde der Versuch einer Standardisierung unternommen, indem die Gerinnungszeiten der beiden untersuchten Proben auf eine dritte (Probe 13)

bezogen und die daraus entstehenden Quotienten gebildet wurden, trotzdem unterscheiden sich die Ergebnisse der einzelnen Methoden erheblich: Liegt der Mittelwert der Ratio der am kürzesten messenden Methode bei 1,52 für Probe 11 bzw. 1,33 für Probe 2, so liefert Pathromtin SL 2,43 bzw. 1,82. Würden die APTT in Sekunden verglichen, wären die Unterschiede noch größer.

Wenn man die APTT in zwei verschiedenen Laboratorien bestimmt, kann dies zu unterschiedlichen Resultaten führen. Durch das Ergebnis einer APTT-Messung lässt sich nicht auf das Resultat einer anderen Methode schließen, eine einfacher Umrechnungsfaktor existiert nicht. Für den Kliniker bestehen daher große Probleme eine APTT ermittelt in einem fremden Labor korrekt zu interpretieren. Durch Evaluation verschiedener Reagenzien und Analyser versucht diese Arbeit daher, die Möglichkeit und die Grenzen einer Vergleichbarkeit verschiedener APTT-Methoden darzustellen.

1.2 Methodisches Prinzip der APTT

PROCTOR und RAPAPORT (1961) entwickelten die von LANGDELL et al. (1953) vorgestellte partielle Thromboplastinzeit zur aktivierten partiellen Thromboplastin (APTT) weiter: Hierbei wird Citratplasma mit partiellen Thromboplastinen und einem Oberflächenaktivator bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Zeit bestimmt, die von der Zugabe einer CaCl_2 -Lösung bis zur Entstehung eines Fibrinclots vergeht.

Die heute verwendeten Methoden der APTT unterscheiden sich hinsichtlich der Art und der Menge des benutzten Thromboplastins und des Oberflächenaktivators, der Inkubationsdauer, der CaCl_2 -Konzentration des Startreagenzes und der Detektionsmethode der Fibrinclotbildung.

Als partielle Thromboplastine werden gerinnungsaktive Phospholipide (PL) bezeichnet, welche aus Thrombozyten, Gewebezellen (z. B. humane Plazenta) und Erythrozyten sowie aus Pflanzen (z. B. Sojabohnen) gewonnen werden und denen im Gegensatz zu den Thromboplastinen, welche bei der Prothrombinzeit eingesetzt werden, der Proteinanteil (Tissue factor) fehlt. Sie dienen als Ko-Faktoren bei Teilschritten der plasmatischen Gerinnung. (siehe Abbildung 1)

Als Oberflächenaktivatoren finden Kollagen und cerebrosidähnliche Substanzen (TANS et al. 1982), aber auch Glas, Kaolin, Celit, Ellagsäure und Dextransulfat (VAN DER GRAAF et al. 1982) Verwendung. Durch ihre negative Ladung binden sie die Faktoren XII (F XII) und XI (F XI) sowie Präkallikrein und HMW-Kininogen, wobei diese Proenzyme in ihre aktive Form umgewandelt werden. (siehe Abbildung 1)

Die Vielzahl der Detektionmöglichkeiten reicht von manuellen Ansätzen (KOLLER 1948) über semiautomatisierte elektromechanische Methoden (SCHNITGER und GROSS 1954) und dem Kugelkoagulometer bis zu vollautomatisch arbeitenden optomechanischen (z. B. BFA) und photometrischen Analysen (BCT): Beim BFA wird die Leuchtkraft einer Wolframlampe kontinuierlich angepasst, um an einer Fozelle eine konstante Spannung zu erzeugen. Im Strahlengang wird der entstehender Fibrinclot durch einen rotierenden Magnetprüher zentriert, durch dessen Bewegung sich die Fozellenspannung verändert. Das Messzeitende wird durch Abweichung dieser Spannung vom Ausgangswerte um einen bestimmten Schwellenwert definiert. Der BCT hingegen arbeitet im Sinne eines Filterphotometers bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Extinktion wird über einen bestimmten Zeitraum detektiert und die so gewonnene Kurve über zuvor definierte Algorithmen ausgewertet. Durch im Strahlengang befindliche Farbfilter lässt sich die Wellenlänge des verwendeten Lichtes verändern. Dies hat den Vorteil, dass neben koagulometrischen auch chromogene und immunoturbidimetrische Teste an diesen Geräten durchgeführt werden können.

- Angeborener Faktorenmangel
 - F VIII-Mangel: Hämophilie A, von Willebrand-Jürgens Syndrom
 - F IX-Mangel: Hämophilie B
 - selten: F XI- und F XII-Mangel, Mangel an Präkallikrein und an HMWK, Mangel an Faktoren der gemeinsamen Endstrecke des In- und Extrinsic-Systems.
- Erworbener Faktorenmangel
 - Kombiniertes F II-, F VII-, F IX- und F X-Mangel bei Vitamin K-Defizit oder oraler Antikoagulation mit Cumarinen
 - Kombiniertes Faktorenmangel bei verminderter Lebersyntheseleistung aufgrund einer Hepatopathie oder physiologisch beim Neugeborenen
- Gerinnungsinhibitoren (Antikörper gegen einzelne Gerinnungsfaktoren)
- Fibrinogenmangel, Dysfibrinogenämie, Fibrinogenspaltprodukte (wobei die APTT jedoch hierauf sehr unempfindlich reagiert)
- Lupusantikoagulantien (Antiphospholipidantikörper, welche phospholipidabhängige Gerinnungsteste verlängern)
- Therapie mit Antikoagulantien (Heparin, Hirudin)

Meist bedeutet eine verlängerte APTT ein Blutungsrisiko für den Patienten, jedoch im Falle der Lupusantikoagulantien und des F XII-Mangels eine Neigung zu Thromboembolien.

In einigen Fällen findet sich auch eine verkürzte APTT, die allerdings meist auf eine falsche Abnahmetechnik (langer venöser Stau, kleinelumige Kanüle, starkes Aufspritzen des Blutes und Füllung des Gerinnungsröhrchen als erstes direkt nach der Punktion) zurückzuführen ist. Als weitere mögliche Ursachen kommen gemäß BRINKHOUS und DOMBROSE (1980) in Frage:

- postoperativ
- akuter Zustand nach venösen Thromboembolien
- Entzündungsreaktionen
- letztes Drittel der Schwangerschaft
- hormonelle Kontrazeption
- Zustand nach Myokardinfarkt

Die verkürzte APTT wird zu den Hyperkoagulabilitätsphänomenen gerechnet, auch kann sie ein erhöhtes Risiko für Thromboembolien bedeuten und kennzeichnet ebenfalls die erste Phase einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC).

1.4 Modifikation der APTT zur Bestimmung der APC-Resistenz

1993 beschrieb DAHLBÄCK zum ersten Mal die Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC-Resistenz) als Ursache einer familiären Thrombophilie. Diese ist zu 90% durch eine Punktmutation G1692A in Exon 10 des Gens von F V bedingt. Hierdurch wird an der Position 506 Arginin durch Glutamin ersetzt (A506G) und dadurch eine wichtige Protein-Ca-Spaltungsstelle im F Va zerstört. Diese Mutante wurde nach dem niederländischen Ort ihrer Erstbeschreibung als Faktor V Leiden oder als Faktor-VQ⁵⁰⁶ benannt. (BERTINA et al. 1994) Die APC-Resistenz stellt die mit Abstand häufigste Ursache für eine hereditäre Thrombophilie dar. In der europäischen Normalbevölkerung beträgt die Prävalenz eines heterozygoten FV-Leiden 2%-7%. Wird ein Patientenkollektiv mit positiver Thromboseanamnese betrachtet, steigerte sich diese sogar auf ungefähr 20% bis 30%. Das Thromboserisiko erhöht sich bei einem Patienten mit einem heterozygoten F V-

Leiden um den Faktor 7 im Vergleich zu einem Probanden mit Wildtyp. Homozygote Patienten zeigen sogar ein 50- bis 100-fach höheres Risiko. (ROSENDAAL et al. 1995) Besonders gefährlich wird es für Patienten, wenn die FV-Leiden-Mutation mit anderen Risikofaktoren für eine Thrombose zusammentrifft. Zu erwähnen sind hier besonders ein zusätzlicher Protein C- (KOELEMAN et al. 1995), Protein S- (ZÖLLER et al. 1995), AT-Mangel (VAN BOVEN et al. 1996) sowie Immobilisation und operative Eingriffe. Auch ist das Risiko für heterozygote Frauen unter hormoneller Kontrazeption um insgesamt das 30-fache gesteigert. (VANDENBROUCKE et al. 1994)

Als Tests zur Bestimmung der APC-Resistenz und damit zum Screening auf ein Faktor V Leiden kommen verschiedene Modifikationen der APTT zum Einsatz. Daher werden in dieser Studie diese Assays vergleichend untersucht.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Es sollen acht Reagenziensätze zur Bestimmung der APTT an zwei verschiedenen Analysatoren hinsichtlich Referenzbereich, Präzision, Empfindlichkeit für Mangel an Faktor VIII, IX, XI und XII, für Heparin und für Lupusantikoagulantien evaluiert werden. Diese Methoden werden an Hand von Patienten mit und ohne Heparintherapie verglichen werden. Mittels dieser Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf die Möglichkeit einer Vereinheitlichung der Analysenergebnisse der APTT gezogen werden. Außerdem sollen vier unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der APC-Resistenz, wovon drei Modifikationen der APTT darstellen, hinsichtlich Referenzbereich, Präzision, Verhalten in der Verdünnungsreihe und Störfaktoren (Lupusantikoagulantien) evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Durch Venenpunktion gewonnene Blutproben wurden mit 0,129 mol/l Natriumcitratlösung versetzt (1 Teil Natriumcitratlösung, 9 Teile Venenblut). Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 3256 g und Raumtemperatur erfolgte die Abtrennung des Citratplasmas. Dieses wurde dann nochmals 20 Minuten bei gleichen Bedingungen zentrifugiert, um ein weitgehend thrombozytenfreies Plasma zu gewinnen, und anschließend innerhalb von 30 Minuten bei -70°C tiefgefroren. Vor der Messung wurde das tiefgefrorene Plasma in einem Wasserbad 5 Minuten auf 37°C erwärmt und dann innerhalb der nächsten Stunde untersucht.

Zur Bestimmung des Referenzbereichs wurden Plasmaproben von 50 offenbar gesunden Probanden (31 Frauen und 19 Männern im Alter von 21 bis 65 Jahren) eingesetzt.

Zum Methodenvergleich am BFA diente Plasma von 99 Patienten unter UF-Heparintherapie (30 weiblich, 69 männlich, im Alter von 7 bis 86 Jahren) und von 82 Patienten mit einer verlängerten APTT ohne Heparinabgabe (31 weiblich und 51 männlich, im Alter von 22 bis 83 Jahren). Zum Vergleich verschiedener APTT-Reagenzien an BFA und BCT wurden Proben von 80 heparinisierten Patienten (48 männliche und 32 weibliche, im Alter von 8 bis 83 Jahren) und Proben von 53 nicht heparinisierten Patienten mit verlängerter APTT (36 männliche und 17 weibliche, im Alter von 23 bis 92 Jahren) untersucht. Der Vergleich von DAPTTIN gegen Pathromtin am BFA wurde mittels Proben von 43 Patienten unter UF-Heparintherapie (20 männliche und 23 weibliche, im Alter von 25 bis 80 Jahren) und Proben von 48 Patienten mit anderen Ursachen für ihre verlängerte APTT (33 männliche und 15 weibliche, im Alter von 19 bis 87 Jahren) geführt.

Zur Untersuchung der Heparinempfindlichkeit von Pathromtin diente Citratplasma von 32 Patienten unter Therapie mit Liquemin (einem UFH) (17 männlichen und 15 weiblichen Geschlechts in Alter von 34 bis 86 Jahren).

Bezüglich der Untersuchung zur Empfindlichkeit auf Lupusantikoagulantien wurde Plasma von 20 Patienten mit pathologischem DRVVT (14 weibliche und 6 männliche, im Alter von 20 bis 59 Jahren, keine Antikoagulation) untersucht. Außerdem wurde Plasma eines männlichen Patienten (35 Jahre) für eine Verdünnungsreihe verwendet, welcher eine hohe Konzentration an Lupusantikoagulantien aufwies.

Citratplasma von 12 offensichtlich gesunden Spendern (3 Männern und 9 Frauen im Alter von 23 bis 49) wurde wie oben verarbeitet und vor dem Tieffrieren gepoolt.

Zur Untersuchung der Methoden zur Bestimmung der APC-Resistenz wurde der Normbereich an Hand von 50 Plasmaproben von 13 männlichen und 37 weiblichen Probanden im Alter von 20 bis 56 Jahren ermittelt, welche offensichtlich gesund und ohne APC-Resistenz waren. Weiter wurde Plasma von 3 F V Leiden-heterozygoten Probandinnen im Alter von 23 bis 41 Jahren und einer homozygoten F V Leiden-Trägerin untersucht.

Als Poolplasma diente auch hier das oben beschriebene Poolplasma.

2.2 Reagenzien

2.2.1 Kontrollplasmen

Kontrollplasma N, Chargen-Nr. 502746, 502752, 502758,

Kontrollplasma P, Chargen-Nr. 512617, 512621, Behringwerke AG, Marburg.

Verify, Chargen-Nr. 102612, Organon Teknika, Eppelheim.

2.2.2 APTT-Reagenzien

Pathromtin, Chargen-Nr. 502230,
Pathromtin SL, Chargen-Nr. 9410-1A,
Neothromtin, Chargen-Nr. 501667, Behringwerke AG, Marburg.
DAPTTIN, Chargen-Nr. 6V4L000, Immuno GmbH, Heidelberg.
SynthASil, Chargen-Nr. DEV 94045, Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, USA.
Sigma APTT, Chargen-Nr. 025H6080, Sigma-Aldrich VertriebsGmbH, Deisenhofen.
Actin FSL, Chargen-Nr. FSL-96C, Baxter, Unterschleißheim.
Platelin SL, Chargen-Nr. 103613, Organon Teknika, Eppelheim.
APTT-L, Chargen-Nr. 0990416, Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim.

Besondere Chargen für die Bestimmung von Faktoren- und Heparinempfindlichkeit:
DAPTTIN, Chargen-Nr. 6V4L000, Immuno GmbH, Heidelberg.
Pathromtin, Chargen-Nr. 502079, Behringwerke AG, Marburg.

Besondere Chargen für die Untersuchung auf die Empfindlichkeit gegen
Lupusantikoagulantien:
Pathromtin, Chargen-Nr. 502079, Behringwerke AG, Marburg.

Calciumchloridlösung 0.020 mmol/l, Sigma-Aldrich VertriebsGmbH, Deisenhofen.
Calciumchloridlösung 0.025 mmol/l, Behringwerke AG, Marburg.

2.2.3 Faktorenmangelplasmen

F VIII-Mangelplasma, Chargen-Nr. 4854000,
F IX-Mangelplasma, Chargen-Nr. 4951000,
F XI-Mangelplasma, Chargen-Nr. 4E4A000,
F XII-Mangelplasma, Chargen-Nr. 4251000, Immuno GmbH, Heidelberg.

2.2.4 Heparin

Liquemin 5000 U/ml, Chargen-Nr. 34641, Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-
Wyhlen.

2.2.5 Chromogene Anti-F Xa-Bestimmung

Berichrom Heparin, Chargen-Nr. 34611, Behringwerke AG, Marburg.

2.2.6 Reagenzien zum Screening auf die F V Leiden-Mutation

Chromogenix, Mölndal, Schweden: Coatest APC Resistance, Art.-Nr. 41115, Chargen-
Nr. X1922

Enthält : APTT-Reagenz, Chargen-Nr. X1695
APC/CaCl₂, 21mg, Chargen-Nr. X1696
V-DEF Plasma, Art.-Nr. 41407, Chargen-Nr. CHX158.

Behringwerke AG, Marburg: ProC APC, Best.-Nr. NCOY
Enthält: Pathromtin SL, Best.-Nr. OQGS, Chargen-Nr. 95-7-11
APC Reagent, Chargen-Nr. 01
ProC Kalibrator, Best.-Nr. NCOZ, Chargen-Nr. 28194
ProC Kalibrator I, Chargen-Nr. 95-4-03A
ProC Kalibrator II, Chargen-Nr. 96-3-12A
ProC Kontrollplasma, Best.-Nr. NCOY, Chargen-Nr. 05

ProC Faktor-V-Mangelplasma, Best.-Nr. NCTF, Chargen-Nr. 95-6-06.

Reagenzien zur Bestimmung der Akzelerininaktivierung

Organon Teknika, Eppelheim: Platin SL, Best.-Nr. 52162, Chargen-Nr. 103613

Behringwerke AG, Marburg: Barbitol-Pufferlösung, Best.-Nr. OTXM, Chargen-Nr. 506273

Immuno GmbH, Heidelberg: F V-Mangelplasma, Art. Nr. 5134006, Chargen-Nr. 454A.

Immuno GmbH, Heidelberg: Immunochrom APC-Response-Reagent-Kit, Chargen-Nr. 0S4B000,

Enthalt: F VIII-Verdünnungspuffer, Chargen-Nr. 9Y4B1S0

Reagenz A, Chargen-Nr. 7M4B2S0

Reagenz B, Chargen-Nr. 7L4D1S0,

APC-Reagenz, Chargen-Nr. 7R4B2S0,

F VIII-Substrat 10µmol, Chargen-Nr. 8M4B1S0,

F VIII-Reaktionspuffer, Chargen-Nr. 914A2S0,

APC Response Control Normal.

2.3 Geräte

Behring Fibrintimer A (BFA), Behringwerke AG, Marburg.

Behring Coagulation Timer (BCT), Behringwerke AG, Marburg.

2.4 Methoden

2.4.1 Vergleich verschiedener APTT-Reagenzien

Die APTT wird bestimmt, indem zunächst Citratplasma bei 37°C mit Phospholipiden und einem Oberflächenaktivator inkubiert wird. Anschließend wird die Zeit von CaCl₂-Zugabe bis zur Entstehung eines Fibrinclots gemessen. In der vorliegenden Arbeit kamen acht verschiedene Reagenzien zur Anwendung, welche sich durch den Ursprung ihrer Phospholipide und ihren Oberflächenaktivator sowie durch die Inkubationsdauer unterschieden. (Tabelle 2) Diese wurden auf einem optomechanisch (BFA) und die Reagenzien der Firma Behring zusätzlich auf einem photometrisch (BCT) arbeitenden Analyser verwendet.

Tabelle 2 Zusammensetzung der untersuchten APTT-Reagenzien

Die untersuchten Methoden zur Bestimmung der APTT verwendeten partielle Thromboplastine menschlicher, tierischer, pflanzlicher und synthetischer Herkunft sowie unterschiedliche anorganische Materialien als Oberflächenaktivator.

Reagenz	Hersteller	Ursprung der Phospholipide	Oberflächenaktivator
Pathromtin	Behring	Humane Plazenta	Kaolin
Pathromtin SL	Behring	Sojabohnen	Kolloidale Kieselerde
Neothromtin	Behring	Sojabohnen	Ellagsäure
DAPTTIN	Immuno	Hochgereinigt: Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin, Phosphatidyl- ethanolamin, Phosphatidylsäure, Cholesterin	Kaolin, Sulfatid
APTT Sigma	Sigma	Kaninchenhirn	Ellagsäure
SynthASil	Ortho Diagnostics	synthetisch	Kolloidales Silikat
Actin FSL	Dade	Kaninchenhirn, Sojabohnen	Ellagsäure
APTT-L	Instrumentation Laboratory	Rinderhirn	Kieselgur
Platelin SL	Organon	Sojabohnen	Siliziumdioxid

2.4.1.1 BFA - optomechanische Detektionsmethode

Dieser Analyser pipettiert 100µl Probe und 100µl des APTT-Reagenzes in eine Küvette. Nach Inkubation bei 37°C wird 100µl CaCl₂-Lösung hinzugegeben und die Messung gestartet. Zur Detektion des Fibrinclots durchstrahlt eine Wolframlampe die Küvette. Deren Lichtstärke wird kontinuierlich abgepasst, um zunächst für eine konstante Spannung an einer Fozelle zu sorgen. Ein Metallrührer in der Küvette wird durch ein von außen angelegtes Magnetfeld in Rotationsbewegung gebracht und zentriert dabei das entstehende Gerinnsel in den Strahlengang. Dieser Clot erzeugt durch seine Bewegung eine Oszillation der auf die Fozelle auftreffenden Lichtstärke und führt somit zu Veränderungen der elektrischen Spannung der Fozelle. Wenn diese einen festgelegten Schwellwert überschreitet, ist das Ende der Messung erreicht. Neben dem verwendeten Reagenz unterscheiden sich die verwendeten Methoden durch die Inkubationszeit, die CaCl₂-Konzentration des Startreagenzes und den eingestellten Schwellwert zur Fibrinclotdetektion. (Tabelle 3)

Tabelle 3 Testsettings auf dem BFA

Reagenz	Inkubationszeit	CaCl ₂ -Konzentration	Schwellwert
Pathromtin	112 s	25 mmol/l	391 mV
Pathromtin SL	112 s	25 mmol/l	391 mV
Neothromtin	112 s	25 mmol/l	391 mV
DAPTTIN	120 s	25 mmol/l	195 mV
APTT Sigma	180 s	20 mmol/l	195 mV
SynthASil	180 s	25 mmol/l	195 mV
Actin FSL	180 s	20 mmol/l	195 mV
APTT-L	300 s	25 mmol/l	195 mV
Platelin SL	180 s	25 mmol/l	195 mV

2.4.1.2 BCT – photometrische Detektionsmethode

An diesem Gerät wurden die von Behring hergestellten Reagenzien Pathromtin, Pathromtin SL und Neothromtin untersucht. 50µl der Probe und 50µl des APTT-Reagenzes wurden jeweils schon im Pipettor auf 37°C erwärmt und in die Messküvette abgegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 120 Sekunden bei 37°C wurde 50µl CaCl₂-Lösung (25 mmol/l) zugegeben und die Messung gestartet. Dabei wurde die Extinktion eines Lichtstrahles durch die Küvette bei 405 nm für 120 Sekunden aufgezeichnet. Die gewonnene Kurve wurde durch einen Auswertalgorithmus analysiert. Beim Verfahren "fixed absorbance" (Pathromtin SL und Neothromtin) wird eine Baseline durch das Extinktionsminimum definiert und Abweichungen hiervon um einen bestimmten Schwellenwert (100 mE) als Gerinnungseintritt und damit Messzeitende gesehen. Beim Pathromtin wurde durch den Auswertalgorithmus "drifting Baseline" das Messzeitende festgestellt, wenn ein plötzlicher Anstieg über den Schwellenwert (140 mE) das Ende der Messung signalisiert. Die Baselinie wird bei dieser Art der Auswertung bei schwachen Änderungen der Extinktion mit verschoben.

2.4.1.3 Chromogene Bestimmung der Anti-F Xa-Aktivität

Die Anti-F Xa-Aktivität wurde am BCT untersucht. Dazu wurde 15 µl Citratplasma mit 15 µl AT III-Reagenz und 150 µl F Xa-Reagenz für eine Minute bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 30µl Substrat-Reagenz wurde die Extinktionskinetik bei einer Wellenlänge von 405nm bestimmt und mittels der zuvor gewonnenen Kalibration an sechs Plasmen mit einer Heparinkonzentration von 0 IE/ml, 0,1 IE/ml, 0,25 IE/ml; 0,5 IE/ml; 0,75 IE/ml und 1 IE/ml in die Anti-F Xa-Aktivität umgerechnet. Der Test beruht auf dem Prinzip, dass das Heparin der Probe durch Dextransulfat freigesetzt wird. Dieses dient als Ko-Faktor des Antithrombin, welches sich im Reagenz im Überschuss befindet. Dieses hemmt den F Xa teilweise. Der verbleibende F Xa setzt nach der Inkubation ein chromogenes Substrat um, dessen entstehender Farbstoff eine Extinktionsänderung bei 405 nm verursacht.

2.4.2 Bestimmung der APC-Resistenz

2.4.2.1 Coatest APC Resistance ohne F V-MP-Vorverdünnung

Am BFA wurden 100 µl Probenplasma mit 100 µl Chromogenix PTT-Reagenzes für 300 Sekunden inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl CaCl₂ (25 mmol/l) wurde die Messung gestartet. Die zweite Testung unterschied sich nur durch Art des Startreagenzes: 100 µl der von Chromogenix gelieferten Mischung aus APC- und CaCl₂-Lösung. (Tabelle 4) Der Quotient aus der zweiten Messzeit durch die erste bezeichnet die APC-Resistenz:

$$\text{APC-Resistenz} = \frac{\text{APTT mit Zusatz von APC (APTC)}}{\text{APTT ohne Zusatz von APC}}$$

Diese lässt sich nach einem Vorschlag von Behring durch die APC-Resistenz eines Poolplasmas gesunder Spender ohne F V Leiden-Mutation, teilen, sodass man die normierte APC-Resistenz erhält.

$$\text{normierte APC-Resistenz} = \frac{\text{APC-Resistenz (Patient)}}{\text{APC-Resistenz (Pool)}}$$

Tabelle 4 Setting: Coatest APC Resistance ohne F V-MP-Vorverdünnung

	Test 1 ohne APC-Zugabe	Test 2 mit APC-Zugabe
Plasmaprobe	100 µl	100 µl
PTT-Reagenz	100 µl	100 µl
Inkubation	300 s	300 s
CaCl ₂	100 µl	
APC/CaCl ₂ -Mischung		100 µl
Messung	max. 240 s	max. 240 s

2.4.2.2 Coatest APC Resistance mit F V-MP-Vorverdünnung

Am BCT wurden 10 µl des zu untersuchenden Plasmas mit 40 µl des FV-MP von Chromogenix vorverdünnt. Nach Zugabe von 50 µl Chromogenix PTT-Reagenzes wurde für 300 Sekunden inkubiert und anschließend durch Zugabe von 50 µl CaCl₂ (25 mmol/l) die Messung gestartet. Die Extinktion bei 405 nm wurde für 240 s detektiert und die Messung mittels des schon bereits erwähnten Algorithmus „fixed absorbens“ ausgewertet. Dieser legt das Ende der Messung auf den Zeitpunkt fest, an dem die gemessene Extinktion um 60 mE von der Baseline abweicht. Auch hier unterschied sich die zweite Messung nur durch die Art des Startreagenzes: 50 µl des Gemisches aus APC- und CaCl₂-Lösung. (Tabelle 5) APC-Resistenz und normierte APC-Resistenz werden wie unter 2.4.2.1 berechnet. Zusätzlich wurde durch eine Zweipunktkalibration an Hand der APTC mit dem von Behring gelieferten Kalibratorreagenzien lässt sich die *APC-Sensitivität* feststellen.

Tabelle 5 Setting: Coatest APC Resistance mit F V-MP-Vorverdünnung

	Test 1 ohne APC-Zugabe	Test 2 mit APC-Zugabe
Plasmaprobe	10 µl	10 µl
F V-MP	40 µl	40 µl
PTT-Reagenz	50 µl	50 µl
Inkubation	300 s	300 s
CaCl ₂	50 µl	
APC/CaCl ₂ -Mischung		50 µl
Messung	max. 240 s	max. 240 s

2.4.2.3 ProC APC

Ähnlich wie unter 2.4.2.1 wurden zwei Messungen am BCT durchgeführt. Diesmal jedoch diene ProC F V-MP zur Vorverdünnung und Pathromtin SL zur Inkubation. Die Messung wurde mit 25 mmolarer CaCl₂-Lösung bzw. dem ProC APC Reagenz

gestartet. (Tabelle 6) Zur Bestimmung des Messzeitendes diente diesmal der Algorithmus „drifting baseline“, dessen Schwellenwert bei 60 mE eingestellt war. APC-Resistenz, die normierten APC-Resistenz und die APC-Sensitivität wurden ermittelt

Tabelle 6 Setting: ProC APC

	Test 1 ohne APC-Zugabe	Test 2 mit APC-Zugabe
Plasmaprobe	10 µl	10 µl
FV-MP	40 µl	40 µl
Platelin SL	50 µl	50 µl
Inkubation	120 s	120 s
CaCl ₂	50 µl	
ProC APC Reagenz		50 µl
Messung	max. 240 s	max. 240 s

2.4.2.4 Akzelerin-Inaktivierungs-Test

2 µl der Citratplasmaprobe wurden am BCT mit 38 µl Barbitol-Pufferlösung und 40 µl F V-MP vorverdünnt und mit 40 µl Platelin SL für 420 s inkubiert. Die Messung startete mit der Zugabe von 40 µl des APC/CaCl₂-Reagenzes von Chromogenix. (Tabelle 8) Das Ende der Messung wurde mittels des Algorithmus „fixed absorbens“ bei Überschreitung der Baseline um 100 mE detektiert.

Die Umrechnung in Prozent der Akzelerininaktivierung erfolgt an Hand der von HINZT et al. (1995) vorgeschlagenen Kalibrationskurve: Diese wird ermittelt, indem fünfmal hintereinander Poolplasma gesunder Spender gemessen wurde. (Tabelle 7) Bei diesen Messungen unterschied sich jedoch der APC-Gehalt des Startreagenzes. Das bedeutet, für den Kalibrationspunkt 100% wurde das APC/CaCl₂-Reagenz, für 50% eine 1+1-Mischung dieses Reagenzes mit einer 25mmolaren CaCl₂-Lösung usw. verwendet. Für 0% wurde nur die CaCl₂-Lösung ohne APC benutzt. Der Gehalt an APC/CaCl₂-Reagenz entspricht also der Akzelerininaktivierung des Kalibrationspunktes.

Tabelle 7 Mischungsverhältnisse des verwendeten Startreagenz zur Bestimmung einer Kalibration für die Akzelerininaktivierung in Prozent

Akzelerininaktivierung	APC/CaCl ₂ -Reagenz	CaCl ₂ -Lösung
100%	100 Teile	-
50%	50 Teile	50 Teile
20%	20 Teile	80 Teile
10%	10 Teile	90 Teile
0%	-	100 Teile

Tabelle 8 Setting: Akzelerininaktivierungstest

Akzelerin-Inaktivierungs-Test	
Plasmaprobe	2 µl
Barbital-Puffer	38 µl
F V-MP	40 µl
Platelin SL	40 µl
Inkubation	420 s
APC/CaCl ₂ -Mischung	40 µl
Messung	maximal 240 s

2.4.2.5 Immunochem APC Response

Bei der von IMMUNO entwickelten APC-Response wird der Quotienten aus der Extinktionsänderung zweier chromogener Teste berechnet. Diese ist von der Anti-F VIII-Aktivität abhängig, wobei bei einem Testansatz diese durch den Zusatz von APC in den Testansatz verstärkt ist. Allerdings trifft dies nur für den Fall zu, dass kein F V Leiden vorliegt, da bei der Inaktivierung von F VIIIa F V als Co-Faktor des APC fungiert. Diese Co-Faktor-Funktion des noch nicht aktivierten F V soll beim F V Leiden vermindert sein. (SHEN und DAHLBÄCK 1995; THORELLI et al. 1999)

$$\text{APC-Response} = \frac{\text{Extinktionsänderung ohne Zusatz von APC}}{\text{Extinktionsänderung mit Zusatz von APC}}$$

Auch diese wurde durch die Bildung des Quotienten mit der Response eines Poolplasmas normiert.

$$\text{normierte APC-Response} = \frac{\text{APC-Response (Patient)}}{\text{APC-Response (Pool)}}$$

Dabei dient die verdünnte Plasmaprobe als Quelle von F VIII und Protein S und wird mit F IXa, F X, PL, Ca²⁺ und Spuren von Thrombin in An- bzw. Abwesenheit von gereinigtem APC inkubiert. Die Aktivität an F Xa, durch F VIIIa aktiviert, wird nach Umwandlung eines chromogenen Substrats in p-Nitroanilin durch die kinetische Messung der Extinktion bei 405 nm bestimmt. Durch die Anwesenheit von APC wird F VIIIa teilweise inaktiviert, sodass bei einem gesunden Probanden dadurch ein verlangsamter Reaktionsablauf festgestellt werden sollte.

Abbildung 3 ▶ Reaktionsablauf von Immunochem APC Response

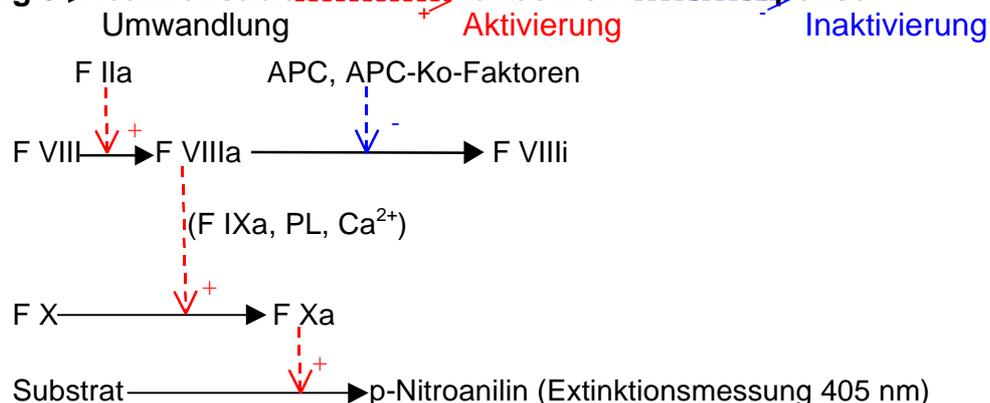


Tabelle 9 Setting: Immunochrom APC Response

Inhalt		ohne APC	mit APC
Plasmaprobe		2 µl	2 µl
Verdünnungs- puffer	3,4 g/l Imidazol, 5,85 NaCl, 0,2% Albumin, pH 7,4	38 µl	18 µl
APC-Reagent	APC, Albumin	-	20 µl
Reagent A	PL, Albumin	40 µl	40 µl
Inkubation		120 s	120 s
Reagent B	F IXa, F X, Ca ²⁺ , Albumin, F IIa	40 µl	40 µl
Inkubation		300 s	300 s
Substratpuffer	Na ₂ EDTA, NaCl, 2 µmol/ml FX, 0,002 µmol/ml NAPAD	200 µl	200 µl
Lag Phase		20 s	20 s
Messdauer		60 s	60 s

2.4.2.6 Plasmaverdünnung einer F V Leiden-homozygoten Patientin mit Poolplasma

Citratplasma einer F V Leiden-homozygoten Patientin wurde im Verhältnis 0+5, 1+4, 2+3, 3+2, 4+1 und 5+0 mit Poolplasma vermischt. Dieses wurde anschließend innerhalb einer Stunde mit den oben erwähnten Testen gemessen.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für WINDOWS, Release 10.0.7, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA

2.5.1 Referenzbereiche

Das Referenzkollektiv wurde mit dem Lilliefors-Test auf die Verteilung hin überprüft. Die Referenzbereiche verschiedener Methoden wurden durch das 5. und 95. Perzentil der Resultate eines Normalkollektives festgelegt.

2.5.2 Signifikanz P für unterschiedliche Referenzbereiche

Die Signifikanz P für die Hypothese, dass die Resultate zweier Methoden am gleichen Kollektiv unterschiedlich sind, wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Zum Vergleich verschiedener Methoden der APTT-Bestimmung

3.1.1 Referenzbereiche

Zur Bestimmung der Referenzbereiche der einzelnen Methoden an BCT (Tabelle 10) and BFA (Tabelle 11) wurde tiefgefrorenes Plasma von 50 offensichtlich gerinnungsgesunden Personen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und innerhalb von 30 Minuten gemessen. Als Unter- bzw. Obergrenze des Referenzbereich wurde das 5. bzw. 95. Perzentil festgelegt. Mittels dieses Verfahren ermitteln ebenfalls die Hersteller die Referenzbereiche in den Reagenzinformationen.

Die kürzesten Gerinnungszeiten lieferten Reagenzien mit Ellagsäure als Aktivator (Neothromtin am BCT, APTT Sigma, Actin FSL), die längste APTT wiesen die kaolinhaltigen Reagenzien (Pathromtin und DAPPTIN) und das kieselgurhaltige APTT-L-Reagenz auf. SynthASil hingegen, welches als Aktivator Silikate benutzt, weist eine kurze Gerinnungszeit auf. (Abbildung 4) Der Effekt einer kürzeren APTT bei der Anwendung von Ellagsäure wurde auch schon durch HELLSTERN (1989) beschreiben.

Auffallend ist auch die Abhängigkeit der Referenzbereich vom verwendeten Analyser: So liefert der BCT bei allen dem auf ihm getesteten Reagenzien kürzere Gerinnungszeiten als der BFA. Besonders deutlich wird dies beim Neothromtin mit einem Unterschied der Mediane von fast 5 Sekunden.

Mit Hilfe des Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben (Tabelle 12) konnte gezeigt werden, dass sich die Referenzbereiche im Allgemeinen mit sehr hoher Signifikanz unterscheiden. Ausnahmen bilden die Methoden mit etwa gleichen arithmetischem Mittelwert.

Auch wurde für die Methodenergebnisse die APTT-Ratio und deren 5. bis 95. Perzentil berechnet. Die APTT-Ratio entspricht dabei der gemessenen APTT durch den Mittelwert des jeweiligen Referenzkollektives. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede in der Spannbreite des so gewonnen Referenzbereichs. Auffallend ist hier besonders das Verhalten von Neothromtin, welches am BCT den engsten (Spannbreite = 0,190), am BFA hingegen den weitesten Bereich liefert. (Spannbreite = 0,292) Allein durch die Verwendung eines anderen Analysators hat sich die Spannbreite des Referenzbereiches um 54% erweitern. Bei den anderen Methoden liegt diese Spannbreite zwischen 0,206 und 0,270.

Mit Hilfe des Lilliefors-Testes konnte für alle Methoden mit Ausnahme des Pathromtin am BCT und des SynthASil am BFA gezeigt werden, dass die Resultate des Referenzkollektives nicht normalverteilt waren. ($\alpha > 0,05$) Trotzdem entsprachen sich arithmetische Mittelwerte und Median weitgehend, einziger auffallender Unterschied zwischen dem 5. –95. Perzentil- und dem 2s-Bereich (Bereich von zwei Standardabweichungen der Stichprobe um den Mittelwert) war im Falle des DAPPTIN am BFA zu sehen: 34,64 s - 42,75 s standen 34,04 s – 50,00 s gegenüber.

Tabelle 10 Methodenabhängige Referenzbereiche am BCT

Verwendete Chargen: Pathromtin - 50 22 30, Pathromtin SL - 9410-1a, Neothromtin - 50 16 67

APTT-Reagenz	Median [s]	5. – 95. Perzentil [s]	Mittelwert [s]	2s-Bereich [s]	5. – 95. Perzentil APTT- Ratio
Pathromtin	36,70	32,35 - 40,30	36,45	29,69 – 43,21	0,886 – 1,106
Pathromtin SL	32,35	27,43 - 35,70	32,08	26,49 – 37,66	0,855 – 1,113
Neothromtin	28,50	25,66 -31,07	28,44	24,34 – 32,55	0,902 – 1,092

Tabelle 11 Methodenabhängige Referenzbereiche am BFA

Verwendete Chargen: Pathromtin - 50 22 30, Pathromtin SL - 9410-1a, Neothromtin - 50 16 67, DAPTTIN - 6V46000, SynthASil - DEV 94045, APTT Sigma - 025h6050, Actin FSL - FSL-96C, Platelin LS - 52162, APTT-L- 990416

APTT-Reagenz	Median [s]	5. – 95. Perzentil [s]	Mittelwert [s]	2s-Bereich [s]	5. – 95. Perzentil APTT- Ratio
Pathromtin	38,25	33,49 - 41,42	37,89	32,60 – 43,19	0,884 – 1,093
Pathromtin SL	33,65	28,64 - 37,01	33,26	27,78 – 38,74	0,887 – 1,134
Neothromtin	33,15	28,48 - 38,11	33,03	26,79 – 37,27	0,862 – 1,154
DAPTTIN	39,90	34,64 - 42,75	39,52	34,04 – 50,00	0,876 – 1,082
SynthASil	31,70	26,30 - 33,96	31,02	25,77 – 36,27	0,848 – 1,095
APTT Sigma	29,35	26,12 - 32,56	29,23	25,20 – 33,25	0,893 – 1,114
Actin FSL	32,50	28,55 - 37,40	32,71	27,04 – 38,39	0,873 – 1,143
Platelin LS	34,00	30,05 - 38,41	33,86	28,23 – 39,49	0,887 – 1,134
APTT-L	37,85	33,34 - 43,21	38,00	31,41 – 44,59	0,877 – 1,137

Abbildung 4 Referenzbereiche der APTT-Methoden an BCT und BFA

Dargestellt sind die Referenzbereiche begrenzt durch das 5. und das 95. Perzentil. Der Median ist als schwarze Linie mit dargestellt.

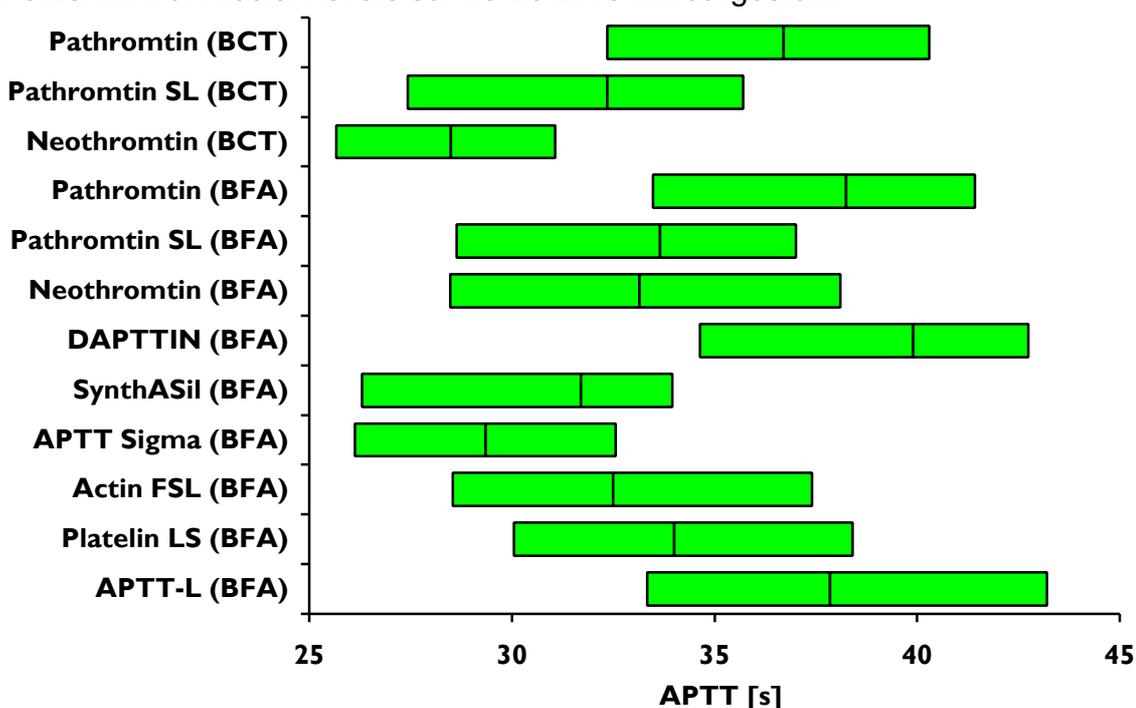


Tabelle 12 Signifikanz P beim Vergleich der APTT-Resultate des Referenzkollektives ermittelt mit dem Wilcoxon-Test

Die Signifikanz P gibt an, mit welcher Fehlerwahrscheinlichkeit die Hypothese abgelehnt werden kann, dass zwei verglichene Methoden eine im Mittel gleiche Dauer der APTT im Referenzkollektiv aufweisen. **Rot** sind die verbundenen Stichproben markiert, wo diese Nullhypothese nicht mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit $\alpha < 5\%$ abgelehnt werden kann.

	Methoden	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
A	Pathromtin BCT	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
B	Pathromtin SL BCT		<0,001	<0,001	<0,001	0,071	<0,001	<0,001	<0,001	0,208	<0,001	<0,001
C	Neothromtin BCT			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,006	<0,001	<0,001	<0,001
D	Pathromtin BFA				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,750
E	Pathromtin SL BFA					0,401	<0,001	<0,001	<0,001	0,167	0,398	<0,001
F	Neothromtin BFA						<0,001	<0,001	<0,001	0,713	0,017	<0,001
G	DAPTTIN BFA							<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,003
H	SynthASil BFA								<0,001	0,001	<0,001	<0,001
I	APTT Sigma BFA									<0,001	<0,001	<0,001
J	Actin FSL BFA										0,001	<0,001
K	Platelin LS BFA											<0,001
L	APTT-L BFA											<0,001

Auffallend sind auch die Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit ermittelten Referenzbereichen und den Herstellerangaben. (Tabelle 13) Besonders deutlich wird dies am Neothromtin und Platelin LS. Allerdings wird von Hersteller nicht erwähnt, an welchem Gerät er den Referenzbereich evaluiert hat. Die Verwendung eines anderen Analysers könnte somit neben dem statistischen Fehler, die unterschiedlichen Bereiche erklären.

Tabelle 13 Vergleich der ermittelten Referenzbereiche zur Empfehlung des Herstellers

Angegeben ist jeweils des 5.- 95. Perzentil der untersuchten Referenzpopulation in Sekunden

APTT-Reagenz	BFA [s]	BCS [s]	Hersteller [s]
Pathromtin	33,49 - 41,42	32,35 - 40,30	28 - 40
Pathromtin SL	28,64 - 37,01	27,43 - 35,70	26 - 36
Neothromtin	28,48 - 38,11	25,66 - 31,07	22 - 35
DAPTTIN	34,64 - 42,75		25 - 47
SynthASil	26,30 - 33,96		
APTT Sigma	26,12 - 32,56		
Actin FSL	28,55 - 37,40		
Platelin LS	30,05 - 38,41		22,6 - 40
APTT-L	33,34 - 43,21		28 - 42

Zusammenfassend konnte also durch die vorliegenden Untersuchungen zum Referenzbereich gezeigt werden, dass der Referenzbereich einer APTT-Methode sowohl von verwendeten Reagenz als auch vom verwendeten Analyser abhängig ist. Da die Resultate des Normalkollektives in der Regel nicht normalverteilt sind, empfiehlt sich die Angabe von Perzentilen zur Festlegung des Referenzbereiches. Auch durch Berechnung einer APTT-Ratio ergibt sich keine einheitliche Referenzbereichsgrenze und damit kein Vorteil gegenüber der Angabe der APTT in Sekunden. In beiden Fällen muss zum APTT-Resultat ebenfalls der Referenzbereich mitgeteilt werden.

3.1.2 Präzision in Serie

Zur Bestimmung der Präzision in Serie wurde Kontrollplasma mit einer normalen sowie mit einer verlängerten APTT 20 mal mit den zu untersuchenden Methoden an BFA und BCT gemessen. Aus diesen Daten wurden Mittelwert, Standardabweichung der Stichprobe (s) und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Wie schon zuvor die Referenzbereiche, so unterschieden sich auch hier die gewonnenen Mittelwerte. Alle gewonnenen VK in Serie für die Präzision im Normalbereich lagen unterhalb von 2,1%. (Tabelle 14) Bei Verwendung eines pathologischen Kontrollplasmas zeigte lediglich Neothromtin am BFA einen VK größer 3%. (Tabelle 15) Zur besseren Übersichtlichkeit erfolgt eine grafische Darstellung des VK in Abbildung 5.

Tabelle 14 Präzision in Serie, Normalbereich, n=20

Als Kontrollplasma diente Kontrollplasma N von Behring, Charge 502746 (markiert mit ¹) und 502752 (markiert mit ²)

APTT-Reagenz	Gerät	Mittelwert	s	VK
Pathromtin ²	BCT	38,85 s	0,74 s	1,90 %
Pathromtin SL ²	BCT	37,23 s	0,25 s	0,67 %
Neothromtin ²	BCT	30,52 s	0,51 s	1,65 %
Pathromtin ²	BFA	38,10 s	0,61 s	1,61 %
Pathromtin SL ²	BFA	38,15 s	0,35 s	0,92 %
Neothromtin ¹	BFA	30,52 s	0,51 s	1,65 %
DAPTTIN ²	BFA	37,34 s	0,25 s	0,69 %
SynthASil ²	BFA	35,35 s	0,71 s	2,02 %
APTT Sigma ²	BFA	32,77 s	0,31 s	0,94 %
Actin FSL ¹	BFA	29,17 s	0,35 s	1,19 %
Platelin LS ¹	BFA	29,30 s	0,28 s	0,97 %
APTT-L ¹	BFA	34,11 s	0,34 s	1,00 %

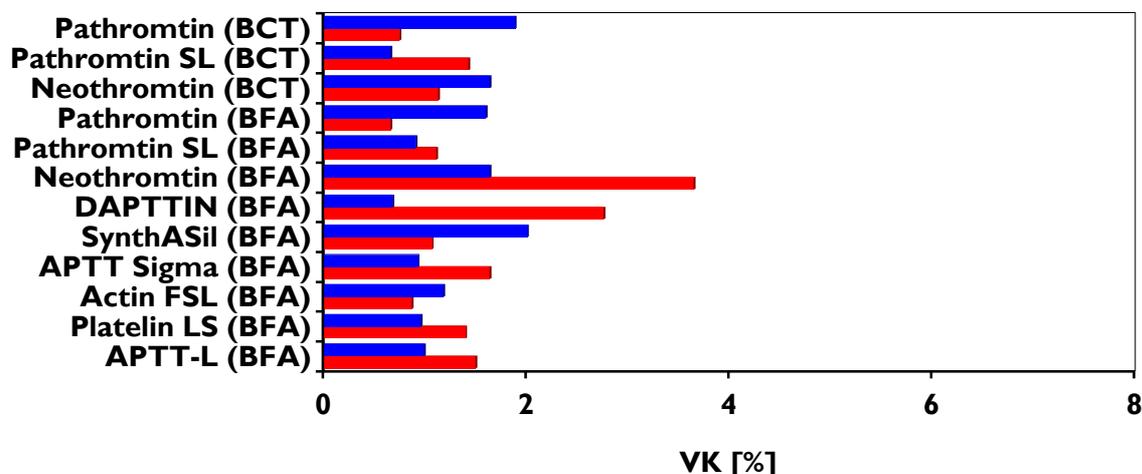
Tabelle 15 Präzision in Serie, pathologischer Messbereich, n=20

Als Kontrollplasma diente Verify von Organon, Charge 102612 (markiert mit ¹) und Kontrollplasma P von Behring, Charge 512612 (markiert mit ²)

APTT-Reagenz	Gerät	Mittelwert	s	VK
Pathromtin ²	BCT	67,08 s	0,51 s	0,76 %
Pathromtin SL ²	BCT	101,40 s	1,46 s	1,44 %
Neothromtin ²	BCT	64,70 s	0,74 s	1,14 %
Pathromtin ²	BFA	69,62 s	0,47 s	0,67 %
Pathromtin SL ²	BFA	105,90 s	1,19 s	1,12 %
Neothromtin ¹	BFA	59,47 s	2,18 s	3,66 %
DAPTTIN ²	BFA	94,43 s	2,62 s	2,77 %
SynthASil ²	BFA	66,92 s	0,72 s	1,08 %
APTT Sigma ²	BFA	67,49 s	1,11 s	1,65 %
Actin FSL ¹	BFA	54,96 s	0,48 s	0,88 %
Platelin LS ¹	BFA	64,45 s	0,91 s	1,41 %
APTT-L ¹	BFA	66,95 s	1,01 s	1,51 %

Abbildung 5 Grafischer Vergleich der Präzision in Serie (n=20)

Blau ist der VK bei Messung eines normalen und rot bei Messung eines pathologischen Kontrollplasmas dargestellt.



3.1.3 Präzision von Tag zu Tag

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgte ebenfalls mittels der normalen und pathologischen Kontrollplasmen des Punktes 3.1.2. Diese wurden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 4 mal mit den zu untersuchenden Methoden an BFA und BCT gemessen. Aus diesen Daten wurden Mittelwert, Standardabweichung der Stichprobe (s) und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Auch hier unterschieden sich die gewonnenen Mittelwerte. Alle gewonnenen VK in Serie für die Präzision im Normalbereich lagen unterhalb von 3,4%. (Tabelle 16) Bei Verwendung eines pathologischen Kontrollplasmas zeigten lediglich Neothromtin am BCT und APTT-L einen VK größer als 5%. (Tabelle 17) Zur besseren Übersichtlichkeit erfolgt eine grafische Darstellung der VK in Abbildung 6.

Tabelle 16 Präzision von Tag zu Tag, normaler Bereich, n=5*4

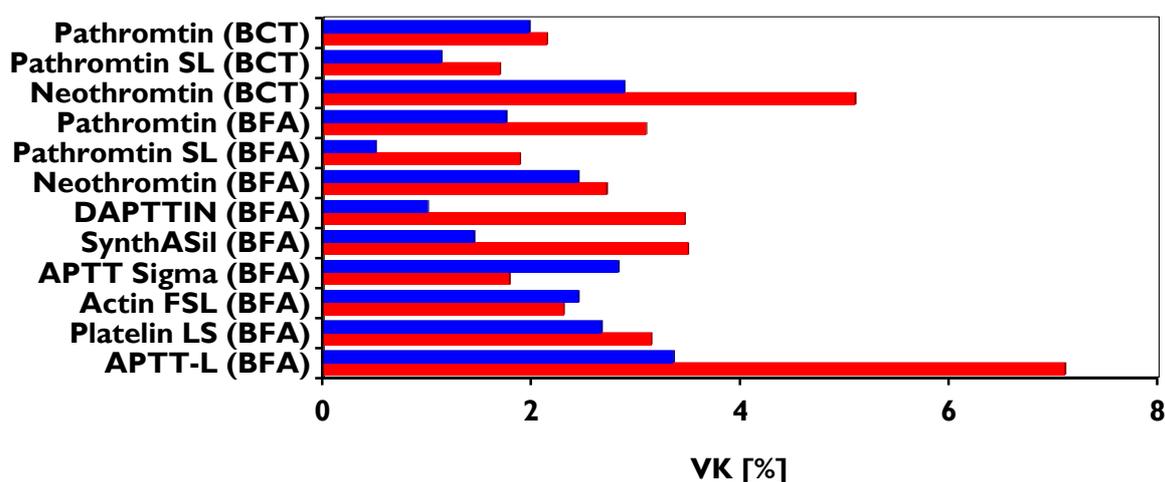
Als Kontrollplasma diente Kontrollplasma N von Behring Chargen 502746 (markiert mit ¹), 502752 (markiert mit ²) und 502758 (markiert mit ³)

APTT-Reagenz	Gerät	Mittelwert	Standardabweichung	VK
Pathromtin ²	BCT	36,02 s	0,71 s	1,98 %
Pathromtin SL ²	BCT	34,05 s	0,39 s	1,14 %
Neothromtin ²	BCT	29,52 s	0,85 s	2,89 %
Pathromtin ²	BFA	36,65 s	0,65 s	1,76 %
Pathromtin SL ²	BFA	35,05 s	0,18 s	0,51 %
Neothromtin ¹	BFA	31,04 s	0,76 s	2,45 %
DAPTTIN ³	BFA	38,10 s	0,39 s	1,01 %
SynthASil ²	BFA	33,04 s	0,48 s	1,45 %
APTT Sigma ²	BFA	29,02 s	0,82 s	2,83 %
Actin FSL ¹	BFA	29,72 s	0,73 s	2,45 %
Platelin LS ¹	BFA	29,87 s	0,80 s	2,67 %
APTT-L ¹	BFA	35,49 s	1,19 s	3,36 %

Tabelle 17 Präzision von Tag zu Tag, pathologischer Bereich n=5*4

Als Kontrollplasma diente Verify von Organon, Charge 102612 (markiert mit ¹) und Kontrollplasma P von Behring, Charge 512617 (markiert mit ²)

APTT-Reagenz	Gerät	Mittelwert	Standardabweichung	VK
Pathromtin ²	BCT	66,73 s	1,44 s	2,15 %
Pathromtin SL ²	BCT	101,30 s	1,73 s	1,70 %
Neothromtin ²	BCT	67,33 s	3,43 s	5,10 %
Pathromtin ²	BFA	72,55 s	2,25 s	3,10 %
Pathromtin SL ²	BFA	105,20 s	1,99 s	1,89 %
Neothromtin ¹	BFA	60,01 s	1,63 s	2,72 %
DAPTTIN ²	BFA	98,29 s	3,41 s	3,47 %
SynthASil ²	BFA	69,20 s	2,42 s	3,50 %
APTT Sigma ²	BFA	64,64 s	1,16 s	1,79 %
Actin FSL ¹	BFA	56,01 s	1,29 s	2,31 %
Platelin LS ¹	BFA	65,47 s	2,06 s	3,15 %
APTT-L ¹	BFA	72,28 s	5,14 s	7,11 %

Abbildung 6 Grafische Darstellung der Präzision von Tag zu Tag im (n=5*4)

Werden die Daten zur Präzision in Serie als auch zur Präzision von Tag zu Tag betrachtet, zeigt sich, dass durch den Einsatz moderner Analysatoren auch bei der Untersuchung von koagulometrischen Testen zu einer guten Präzision kommt. Ein besonderer Vorteil ist es auch, wenn das verwendete Reagenz „ready to use“ angeboten wird. Dies bedeutet, dass es bereits in flüssiger Form vorliegt und nach einer kurzen Inkubation bei RT in den Analyser eingesetzt werden kann. Diese Reagenzien wiesen im Gegensatz zu Neothromtin (lyophilisiertes Reagenz muss mit destilliertem Wasser rekonstituiert werden.) und APTT-L (Oberflächenaktivator muss mit dem restlichen Reagenz vermengt werden.) keine Probleme hinsichtlich ihrer Präzision auf.

3.1.4 Faktormangelempfindlichkeit der APTT-Reagenzien

Vier Verdünnungsreihen aus Poolplasma mit F VIII-, F IX-, F XI- und F XII-Mangelplasma wurden hergestellt, um das Verhalten der APTT-Methoden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu untersuchen, einen Mangel eines Einzelfaktors des intrinsischen Systems zu detektieren. Die Faktorenaktivität des Poolplasmas wurde zuvor am BFA koagulometrisch bestimmt und ergab für F VIII 109,4%, für F IX 112,7%, für F XI 99,9% und für F XII 121,3%. Die Aktivität des Mangelplasmas wurde

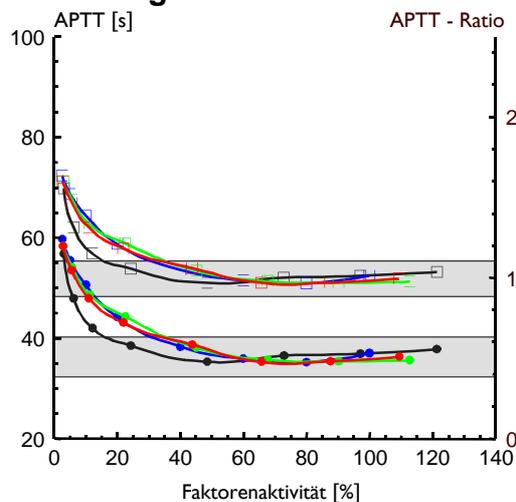
mit 0% festgelegt. Als Verdünnungsstufen wurden Mischungen mit einem Poolplasmaanteil von 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, 5% und 2,5% gewählt, woraus sich durch Multiplikation mit der Faktorenaktivität der Pools die jeweilige Aktivität der Verdünnungsstufe ergab.

Dargestellt ist der Verlauf, welcher APTT und APTT-Ratio (berechnet als gemessene APTT durch Mittelwert des Referenzkollektives) bei Verminderung der Gerinnungsfaktorenaktivität nehmen. (Abbildung 7- Abbildung 11) Dabei stellen die vier unteren Kurven die APTT in Sekunden dar, während die vier oberen die APTT-Ratio wiedergeben. Eingezeichnet ist ebenfalls der Referenzbereich für die APTT und die APTT-Ratio in grau. Das verwendete Mangelplasma ist durch folgende Farben gekennzeichnet: rot Faktor VIII, grün Faktor IX, blau Faktor XI, schwarz Faktor XII

Im Bereich über 50% - 60% Faktorenaktivität erfährt die APTT bei den untersuchten Methoden keine wesentliche Veränderung, ab dann zeigt sich bei weiterer Minderung der Aktivität ein exponentieller Anstieg der APTT.

Pathromtin zeigt sowohl am BCT als auch am BFA einen späteren und auch geringeren Anstieg als im Vergleich zum Pathromtin SL, welches sich als am empfindlichsten für Mangel an allen 4 untersuchten Faktoren darstellt. Bei der Untersuchung von Pathromtin am BFA liegt die APTT für das Poolplasma und damit für die Verdünnungsstufe mit der höchsten Aktivität in der Nähe der unteren Referenzbereichsgrenze. Dies gilt ebenfalls für APTT Sigma, Actin FSL, APTT-L und Platelin LS. Dadurch kann die obere Referenzbereichsgrenze erst nach einer größeren relativen Verlängerung der APTT überschritten werden, als dies bei den Methoden mit Poolplasmawerten nahe dem Median des Referenzbereiches der Fall wäre. Neothromtin, welches hierbei nur am BCT untersucht wurde, zeigte in den einzelnen Verdünnungswerten Unterschiede in der Messung des gleichen Poolplasmas. Außerdem überschreitet die APTT dieses Reagenzes schon bei etwa 70% - 90% Faktorenaktivität die obere Referenzbereichsgrenze, bleibt aber dafür bis zu einer Aktivität von 30% auf einer Höhe. DAPTTIN und Actin FSL zeichnen durch eine im Vergleich zu den anderen Faktormangelempfindlichkeiten verminderten Detektion eines F XII-Mangels aus. Ähnliches gilt nicht so stark ausgeprägt für APTT Sigma und Platelin LS. APTT-L ist beim Nachweis aller vier Faktorenmängel nur wenig sensitiv.

Abbildung 7 Pathromtin BCT



Pathromtin SL BCT

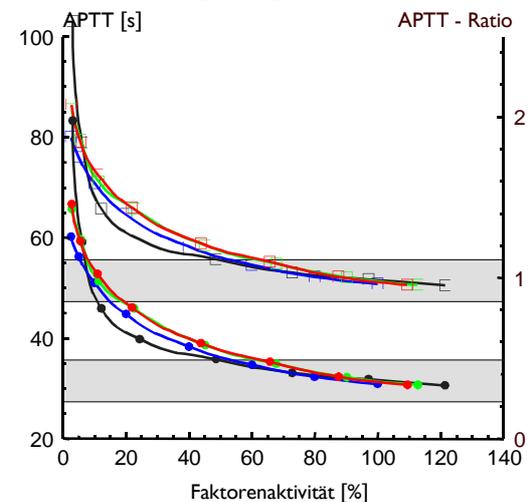
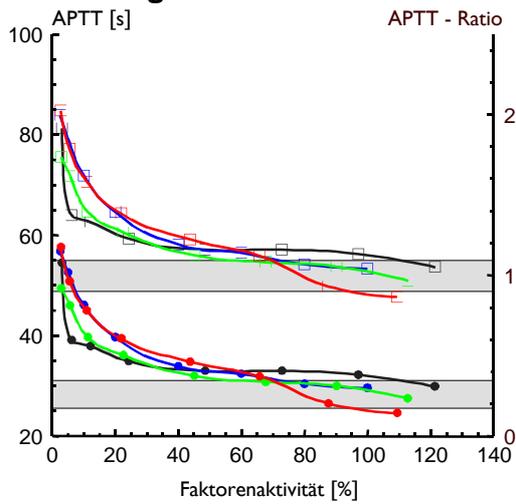


Abbildung 8 Neothromtin BCT



Pathromtin BFA

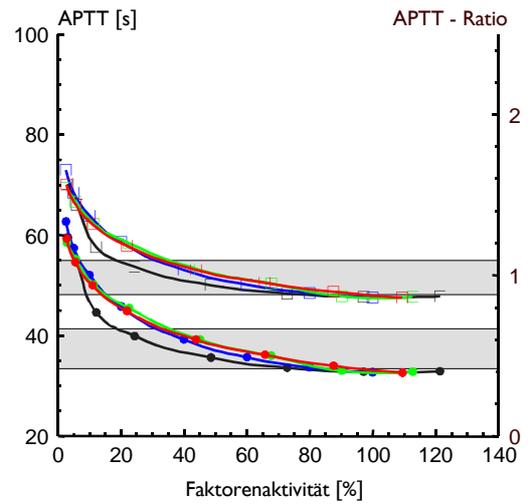
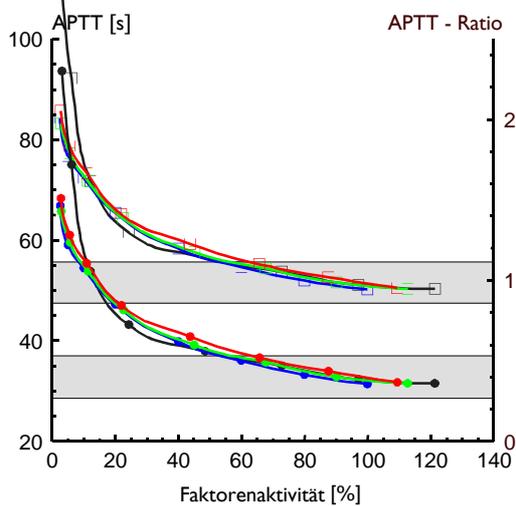


Abbildung 9 Pathromtin SL BFA



DAPTTIN BFA

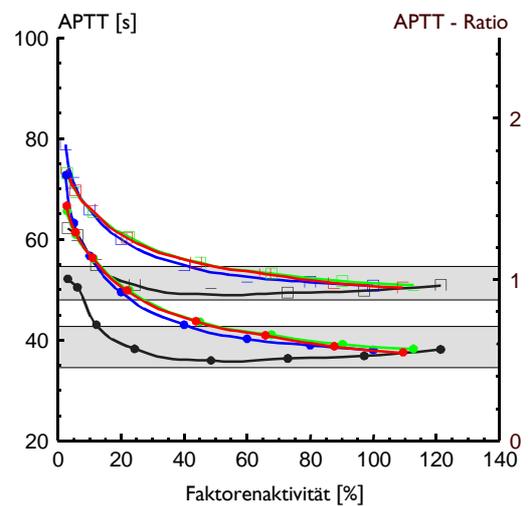
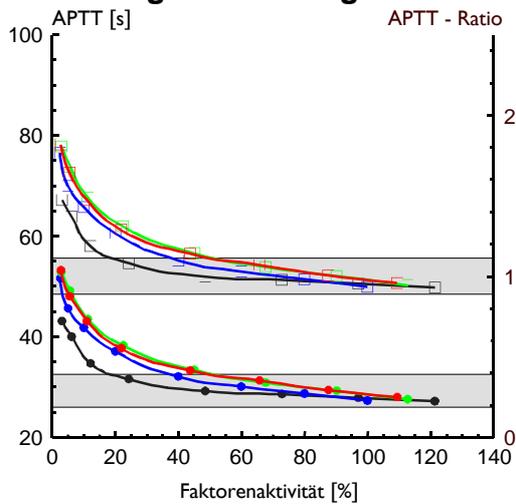


Abbildung 10 APTT Sigma BFA



Actin FSL BFA

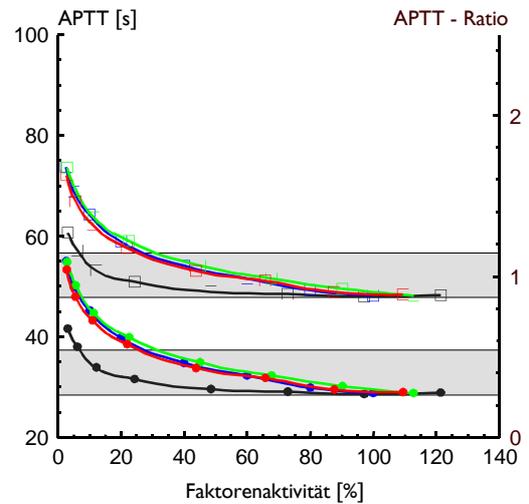
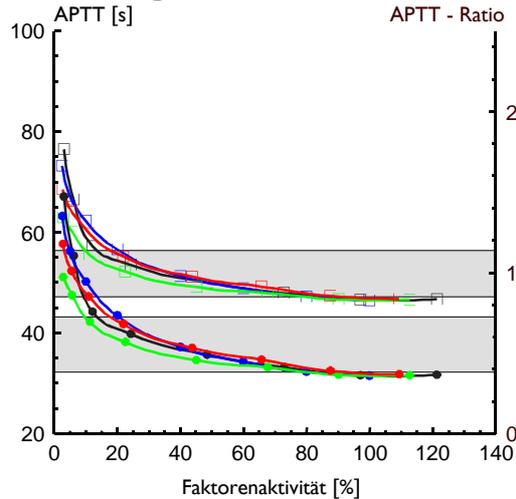
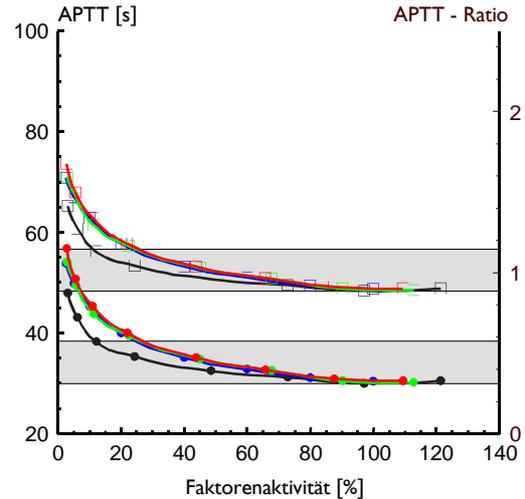


Abbildung 11 APTT-L BFA



Platelin LS BFA



In Abbildung 12 bis Abbildung 19 werden die einzelnen untersuchten Reagenzien hinsichtlich ihre Faktor VIII-, IX-, XI- und XII-Empfindlichkeit vergleichend gegenübergestellt. Das erste Diagramm stellt jeweils dar, um wie viel Prozent die Gerinnungszeit gegenüber der APTT des Poolplasmas verlängert ist, wenn die APTT mit einem Poolplasmaanteil von 40% bzw. von 20% in das Verhältnis zur APTT des Poolplasmas gesetzt wird. Der Referenzbereich der Reagenzien bleibt somit in dieser Art der Darstellung außer acht. Dafür gibt die weitere Abbildung durch **grüne Linien** jeweils an, ab welcher Faktorenaktivität in der obigen Verdünnungsreihe die zuvor ermittelte Obergrenze des Referenzbereiches überschritten wird.

Die größte prozentuale Steigerung der APTT in der Verdünnungsreihe mit F VIII-Mangelplasma (Abbildung 12) erfährt neben Neothromtin am BCT das Pathromtin SL an beiden Analysern. Es folgt Pathromtin am BFA, während für Pathromtin am BCT nur die geringsten Steigerung erreicht werden. Das Mittelfeld (DAPTTIN, APTT Sigma, Actin FSL, APTT-L und Platelin LS) liefert hier vergleichbare Werte. Pathologische Werte erreichen die Methoden unter Verwendung von Neothromtin am BCT bei 66% und unter Verwendung von Pathromtin SL, DAPTTIN und APTT Sigma bei 44% Faktorenaktivität. Diese Grenze wird bei APTT-L erst bei 11% Faktorenaktivität überschritten. (Abbildung 13)

Abbildung 12 F VIII-Empfindlichkeit – prozentuale Veränderung

Der **blaue Balken** stellt die prozentuale Veränderung der APTT bei einer Aktivität von 44% gegenüber dem Poolplasma dar. Der **rote** gibt entsprechend die prozentuale Veränderung bei 22% wieder.

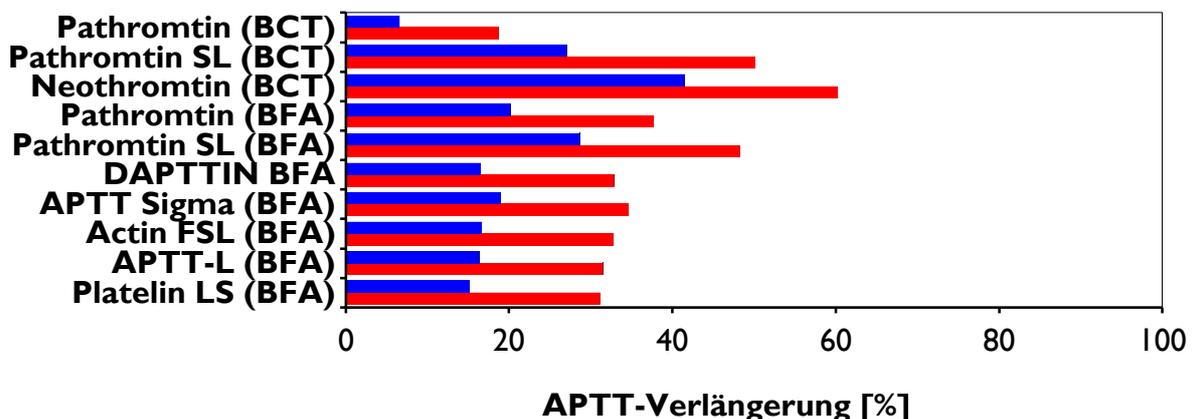
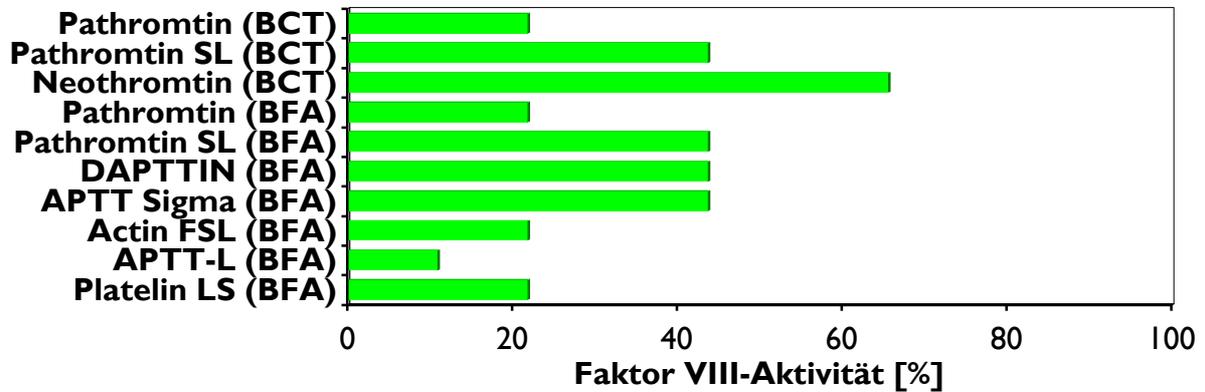


Abbildung 13 F VIII- Empfindlichkeit, höchste F VIII-Aktivität mit APTT außerhalb des Referenzbereiches

Die Länge des grünen Balkens gibt jeweils die höchste F VIII-Aktivität wieder, bei der in der Verdünnungsreihe die jeweilige APTT außerhalb des ermittelten Referenzbereich lag.



Ebenfalls in der Verdünnungsreihe zur Testung der Faktor IX-Empfindlichkeit stellt sich das Pathromtin SL mit einer hohen relativen Veränderung gegenüber dem Analysenergebnis des Pools dar. (Abbildung 14) Auch zeigt Pathromtin eine geringere Steigerung seiner APTT beim F IX-Mangel, wenn der BCT statt des BFA verwendet wird. Die geringsten Steigerungsraten am BCT zeigt wiederum APTT-L. Ein F IX-Mangel wird von Pathromtin SL, Neothromtin, DAPTTIN, APTT Sigma ab 45% Aktivität durch eine pathologische Wertlage angezeigt. (Abbildung 15) APTT-L ist auch hier wieder am unempfindlichsten. Erst unter 6% weist es eine Wertlage im pathologischen Bereich auf.

Abbildung 14 Faktor IX-Empfindlichkeit – prozentuale Veränderung

Der **blaue Balken** stellt die prozentuale Veränderung der APTT bei einer Aktivität von **45%** gegenüber dem Pollplasma dar. Der **rote** gibt entsprechend die prozentuale Veränderung bei **23%** wieder.

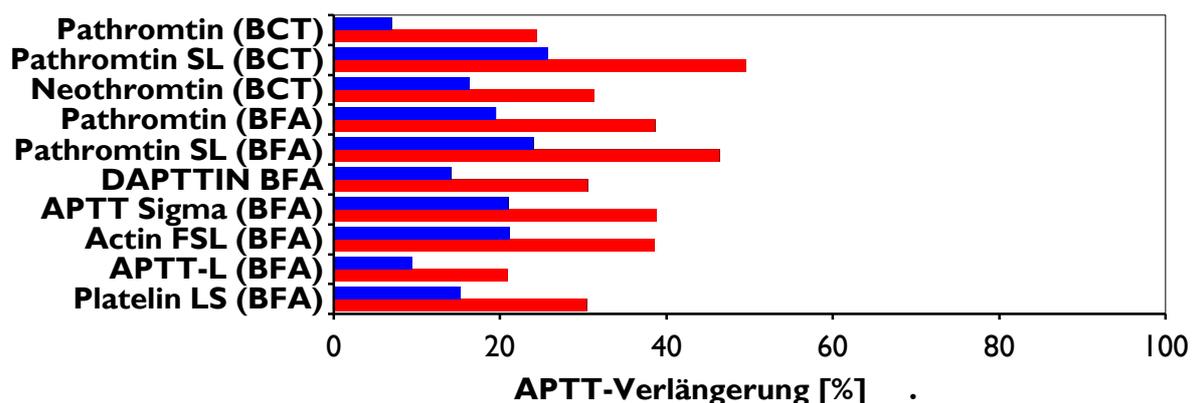
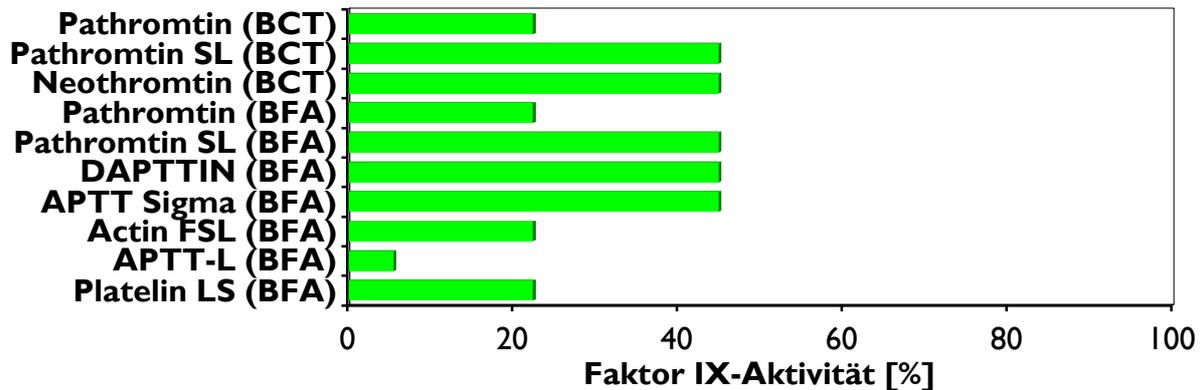


Abbildung 15 F IX- Empfindlichkeit, höchste F VIII-Aktivität mit APTT außerhalb des Referenzbereiches
siehe Abbildung 13



Betrachtet man in der Verdünnungsreihe mit dem F XI-Mangelplasma (Abbildung 16) die relativen Steigerungen gegenüber dem Poolplasma, so ist diese auch hier bei Pathromtin SL am stärksten ausgeprägt, während es bei Pathromtin am BCT zu den geringsten Veränderungen kommt. Am BFA ist Pathromtin jedoch mit den restlichen Methoden vergleichbar.

In Abbildung 17 wird durch Neothromtin eine Minderung der Faktorenaktivität auf 60% durch eine APTT oberhalb des Referenzbereiches angezeigt, während dies bei Pathromtin SL und DAPTTIN erst bei 40% der Fall ist. Mit allen anderen Reagenzien wird der F XI-Mangel erst bei 20% festgestellt.

Abbildung 16 Faktor XI-Empfindlichkeit – prozentuale Veränderung

Der **blaue Balken** stellt die prozentuale Veränderung der APTT bei einer Aktivität von **40%** gegenüber dem Poolplasma dar. Der **rote** gibt entsprechend die prozentuale Veränderung bei **20%** wieder.

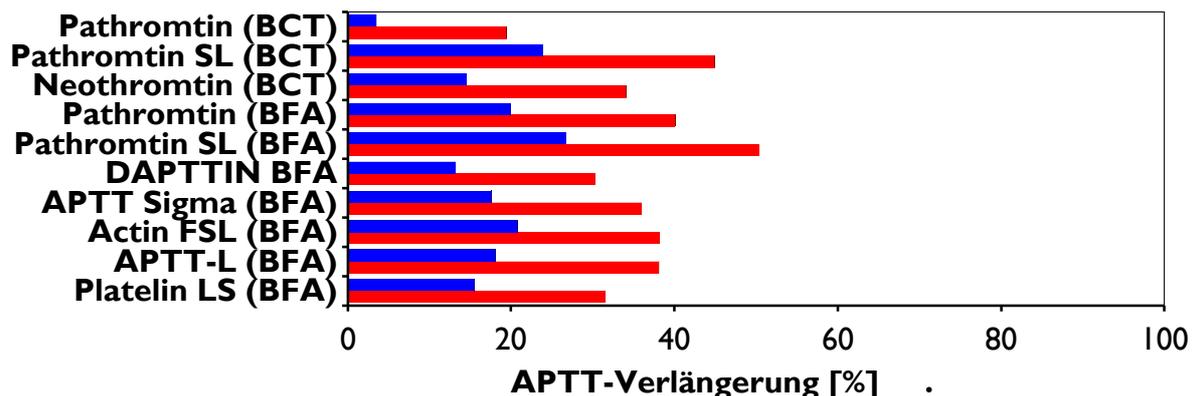
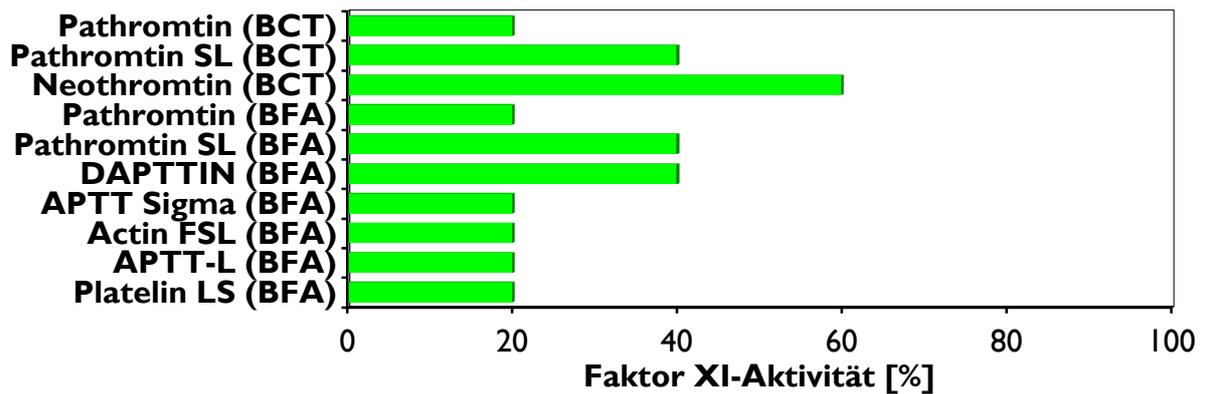


Abbildung 17 F XI- Empfindlichkeit, höchste F VIII-Aktivität mit APTT außerhalb des Referenzbereiches
siehe Abbildung 13



Die Empfindlichkeit für einen F XII-Mangel ist bei den untersuchten APTT-Methoden geringer ausgeprägt als für den Nachweis eines Defizits eines anderen intrinsischen Faktors. (Abbildung 18). Die stärkste Steigerung im Vergleich zum Poolplasma ergibt sich wiederum beim Pathromtin SL. DAPTTIN und Pathromtin am BFA unterscheiden sich in den Verdünnungsstufen 20% und 40% kaum in ihrer APTT vom Poolplasma, während Pathromtin am BFA, Neothromtin am BCT und APTT-L eine relative Verlängerung um 20% in der 20%-Stufe erhalten. Abbildung 19 zeigt, dass Pathromtin SL ab 49% die obere Referenzbereichsgrenze überschreitet. Neothromtin folgt bei 32%. Sehr unempfindlich sind Actin FSL mit pathologischer Wertlage unter 3% und Platelin LS unter 6% F XII-Aktivität.

Abbildung 18 Faktor XII-Empfindlichkeit – prozentuale Veränderung

Der **blaue Balken** stellt die prozentuale Veränderung der APTT bei einer Aktivität von **49%** gegenüber dem Poolplasma dar. Der **rote** gibt entsprechend die prozentuale Veränderung bei **24%** wieder.

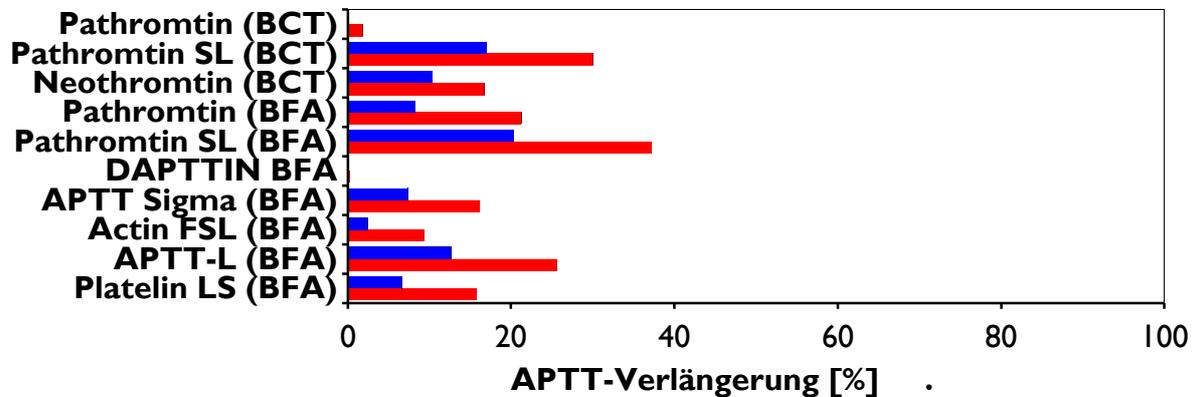
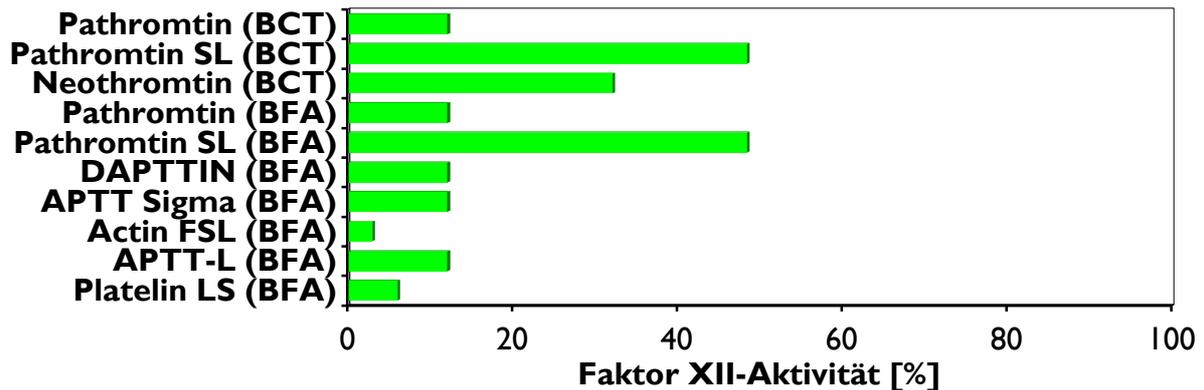


Abbildung 19 F XII- Empfindlichkeit, höchste F XII-Aktivität mit APTT außerhalb des Referenzbereiches

siehe Abbildung 13



Die meisten Reagenzien weisen eine annehmbare Sensitivität für einen isolierten Mangel eines Gerinnungsfaktors des intrinsischen Systems auf. Im Allgemeinen ist die Sensitivität für einen F XII-Mangel niedriger. Da jedoch erst bei ausgeprägtem Mangel an F XII eine klinische Relevanz besteht, ist dies nicht als negativ zu bewerten. Beste Ergebnisse liefert Pathromtin SL an beiden Analysatoren. Im Falle des Pathromtin zeigt sich, dass ein APTT-Reagenz dem verwendeten Detektionsprinzip angepasst sein muss. Das trübe, kaolinhaltige Reagenz erzielt nämlich nur am photometrisch arbeitenden BCT schlechte Ergebnisse. APTT-L kann wegen seiner geringen Sensitivität nicht für den Nachweis eines Faktorenmangels empfohlen werden. Neothromtin ist ebenfalls ungeeignet, da zum einen unpräzise misst, zum anderen ein sehr leichten von einem klinisch relevanten Mangel nicht ausreichend unterscheiden kann.

3.1.5 Heparinempfindlichkeit der einzelnen APTT-Reagenzien

Poolplasma wurde mit einem hochmolekularen Heparin (Liquemin) aufgestockt und die **APTT in Sekunden (blau ●)** und die **APTT-Ratio (rot □)** bestimmt. (Abbildung 20 bis Abbildung 24). Der Referenzbereich ist in grau eingezeichnet.

Pathromtin gemessen am BCT steigt zwar bis zu einer Heparinkonzentration von 0,35 IE/ml linear an, liefert aber bei höheren Werten keine detektierbare Gerinnung. Am BFA hingegen zeigt sich ein linearer Anstieg der APTT bis zur höchsten Aufstockungsstufe von 0,55 IE/ml, die dann einer APTT von 92 s entspricht.

Pathromtin SL am BCT steigt bis 0,35 IE/ml linear an und liefert ab 0,5 IE/ml keine messbare APTT mehr. Am BFA steigt die APTT bestimmt mit diesem Reagenz bis 0,4 IE/ml linear an und liefert ab dann keine messbare APTT.

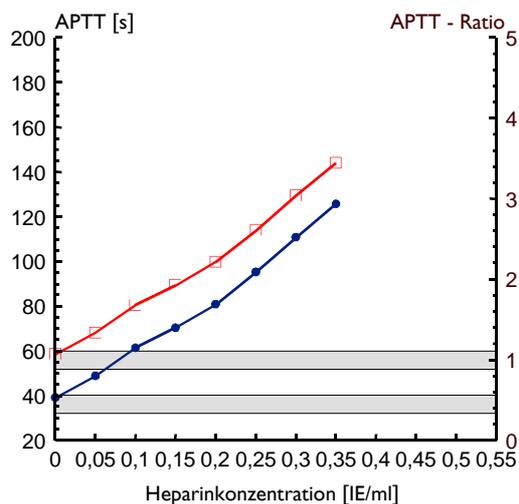
Neothromtin steigt exponentiell an und liefert ab 0,45 IE/ml keine messbare APTT.

DAPTTIN weißt unter allen Reagenzien den geringsten, aber dafür linearen Anstieg auf. Die APTT-Ratio liegt hier bei einer Heparinkonzentration von 0,55 IE/ml erst bei 1,8.

APTT Sigma, Actin FSL und APTT-L zeigen bei den untersuchten UFH-Konzentrationen einen linearen Anstieg und bleiben messbar.

Platelin LS steigt in einer angedeutet S-förmigen Kurve an und verlässt ab 0,4 IE/ml den Messbereich.

Abbildung 20 Pathromtin BCT



Pathromtin SL BCT

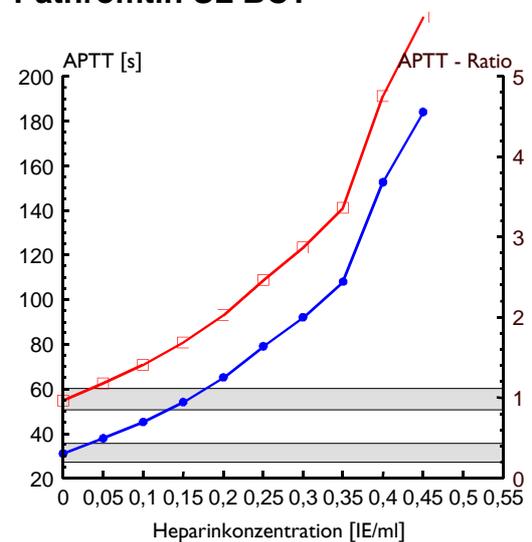
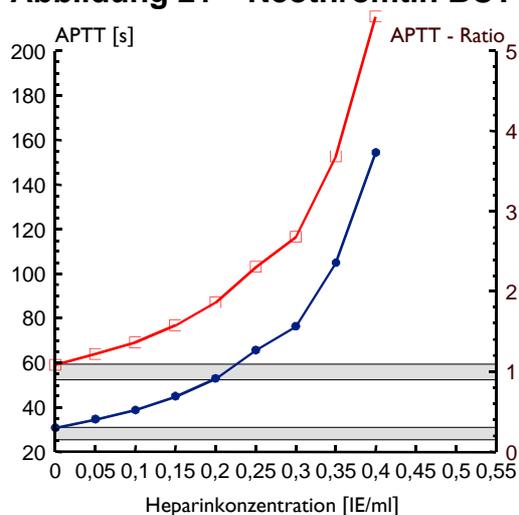


Abbildung 21 Neothromtin BCT



Pathromtin BFA

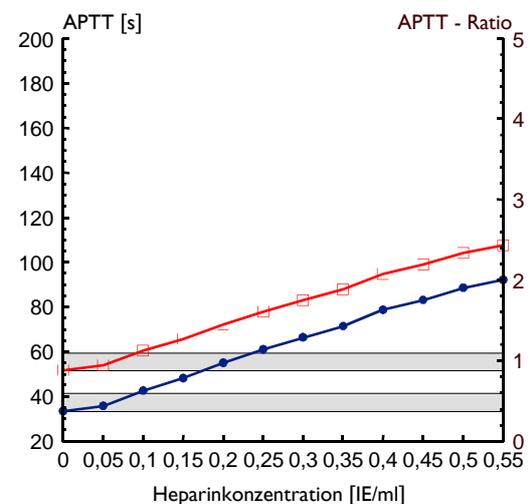
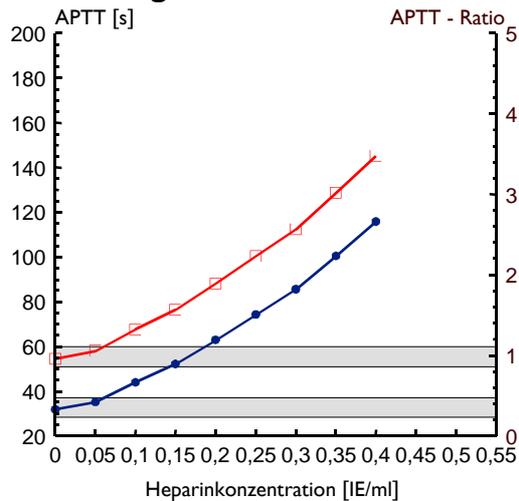
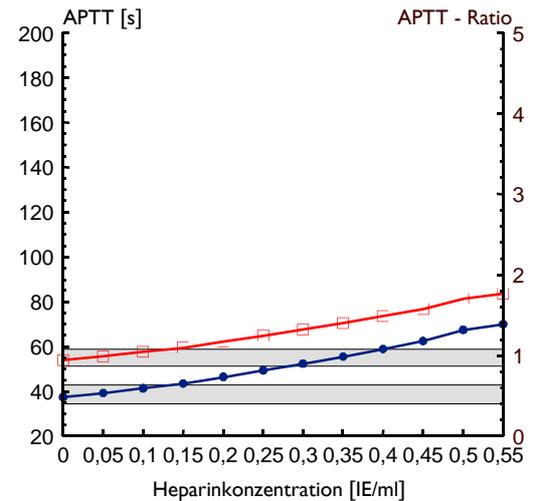
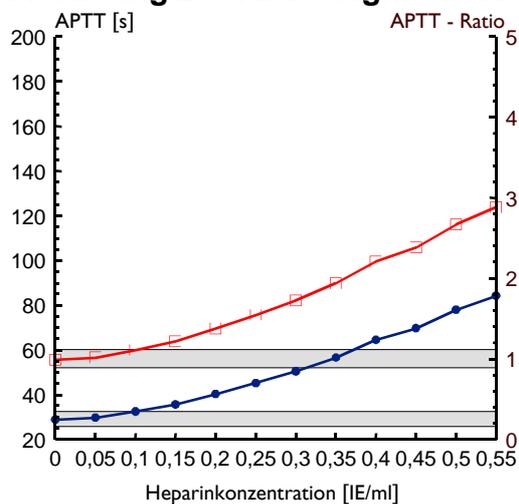
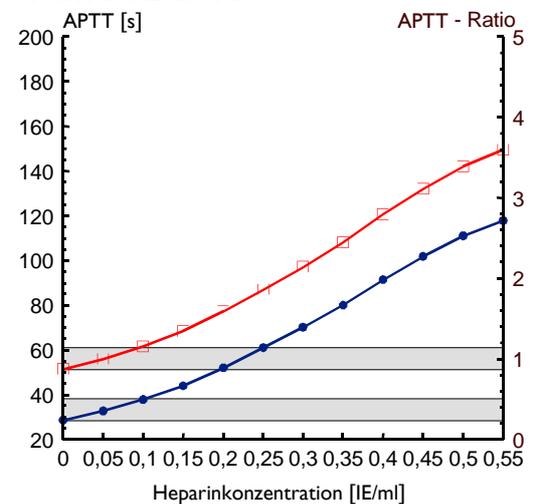
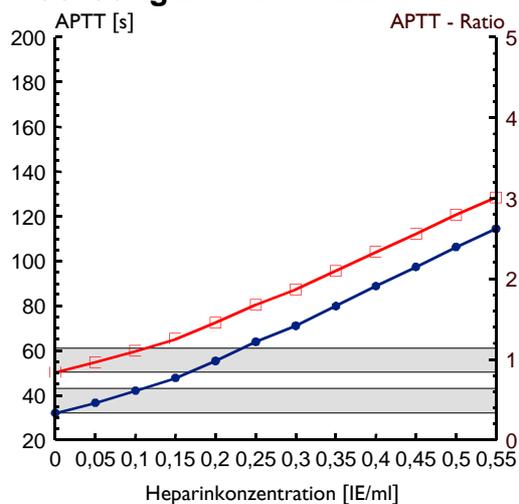
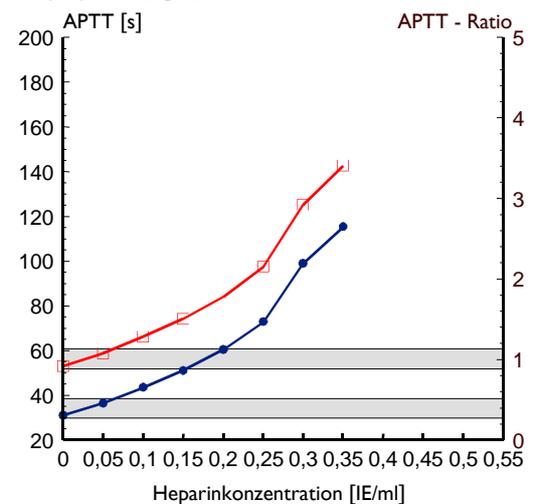


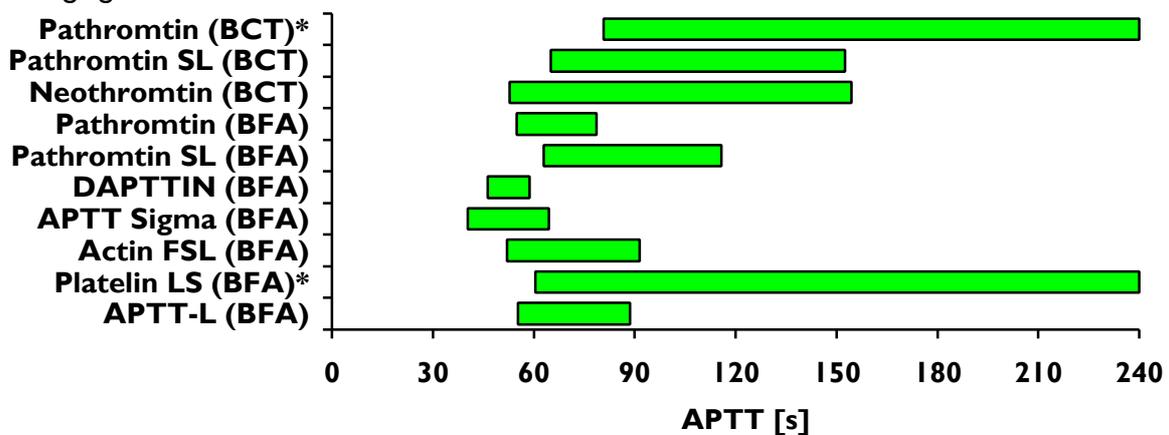
Abbildung 22 Pathromtin SL BFA**DAPTTIN BFA****Abbildung 23 APTT Sigma BFA****Actin FSL BFA****Abbildung 24 APTT-L BFA****Platelin LS BFA**

Experimentelle (CHIU et al. 1977) und klinische Studien (HULL et al. 1986) geben als therapeutischen Bereich für die UFH-Konzentration 0,2 IE/ml bis 0,4 IE/ml an, wenn die Heparinbestimmung mittels Protamintitration erfolgt. In Abbildung 25 ist dargestellt, welcher therapeutische Bereich in Sekunden sich damit für die einzelnen APTT darstellt. Für Pathromtin am BCT und für Platelin SL lässt sich dabei leider keine

Obergrenze für den therapeutischen Bereich festlegen, da bereits bei 0,4 IE/ml UFH-Konzentration die Detektion einer Clotbildung nicht mehr möglich war. Im Gegensatz dazu ist der therapeutische Bereich für die DAPTTIN-Methode nicht breiter als 12,4 s. Alle Methoden liefern unterschiedliche Bereiche, wobei auch noch auffällt, dass Pathromtin am BFA eine wesentlich niedrige Bereichslage aufweist als am BCT.

Abbildung 25 Therapeutische Bereiche beim Einsatz von UF-Heparin

Die therapeutischen Bereiche (definiert als 0,2 IE/ml bis 0,4 IE/ml Heparinplasmakonzentration) wurde an Hand der in Abbildung 20 bis Abbildung 24 dargestellten Verdünnungsreihe ermittelt. Er wird durch grüne Linien dargestellt. Beim Pathromtin am BCT und beim Platelin SL am BFA (markiert mit *) kam es bereits bei 0,4 IE/ml zum Überschreiten der eingestellten maximalen Messdauer, sodass hier nur die untere Grenze des therapeutischen Bereiches angegeben werden kann.



Im klinischen Alltag hingegen wird vielfach als therapeutischer Bereich eine Verlängerung der APTT um das 1,5- bis 2,5-fache eines Basiswertes vor Heparintherapie verwendet. Oftmals steht dieser Basiswert nicht zur Verfügung, dann wird als therapeutischer Bereich das 1,5- bis 2,5-fache der oberen Referenzbereichsgrenze angesehen. Dies Verhalten geht noch auf eine Empfehlung aus der Studie von BASU aus dem Jahre 1972 zurück. Abbildung 26 stellt dar, in weit der Bereich, welcher einer UFH-Konzentration von 0,2 IE/ml bis 0,4 IE/ml entspricht, mit einer APTT-Ratio von 1,5 bis 2,5 zur APTT des Poolplasmas übereinstimmt: Angenähert entsprechen diesem Ideal nur die APTT ermittelt mit Pathromtin am BFA und mit APTT Sigma, sowie bedingt APTT-L. Bei DAPTTIN liegt der therapeutische Bereich niedriger als bei BASU (1972) empfohlen (1,24-1,58). Alle noch nicht an dieser Stelle erwähnten Methoden liegen mit dem Beginn ihres therapeutischen Bereiches unter einer APTT-Ratio von 2,5, schießen aber mit ihrem Ende weit darüber hinaus.

Abbildung 26 Therapeutische Bereiche ausgedrückt als APTT-Ratio

Dargestellt ist der therapeutische Bereich (definiert als 0,2 IE/ml bis 0,4 IE/ml Heparinplasmakonzentration) der APTT-Ratio berechnet als Quotient der APTT der aufgestockten Probe durch die APTT des Poolplasmas. (grüne Balken) Der Bereich 1,5 bis 2,5 ist durch das halbtransparente Rechteck verdeutlicht.

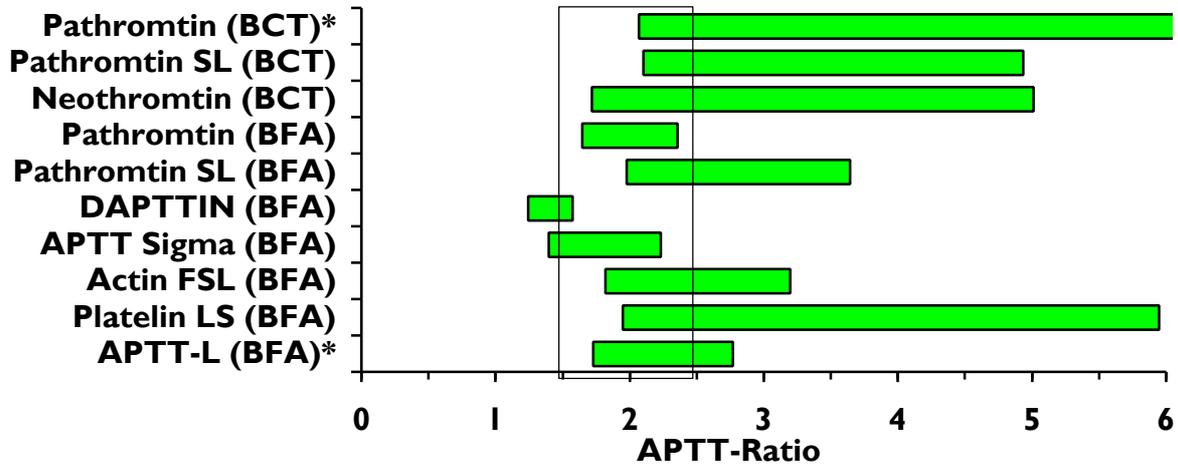
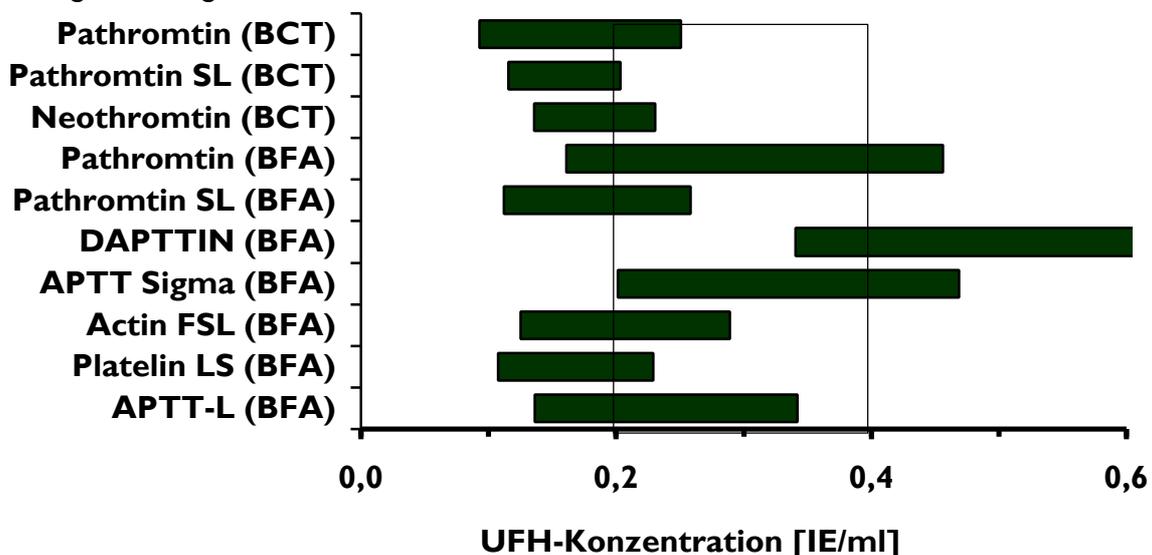


Abbildung 27 zeigt nun umgekehrt, welche Heparinkonzentrationen erreicht würden, wenn für alle Methoden als therapeutischer Bereich die BALU'sche Verlängerung der APTT um die Faktoren 1,5 bis 2,5 im Vergleich zum Pool verwendet werden würde. Zur empfohlenen UFH-Konzentrationen von 0,2 IE/ml bis 0,4 IE/ml würden angenähert nur die Methoden Pathromtin am BFA, APTT Sigma und APTT-L führen. Mittels DAPTTIN würde der Patient zu hoch antikoaguliert, bei allen anderen Methoden wäre die Gerinnungshemmung im Bereich der 1,5- bis 2,5-fachen Verlängerung der Ausgangs-APTT nicht effektiv.

Abbildung 27 1,5- bis 2,5fache Verlängerung der APTT Heparinkonzentration

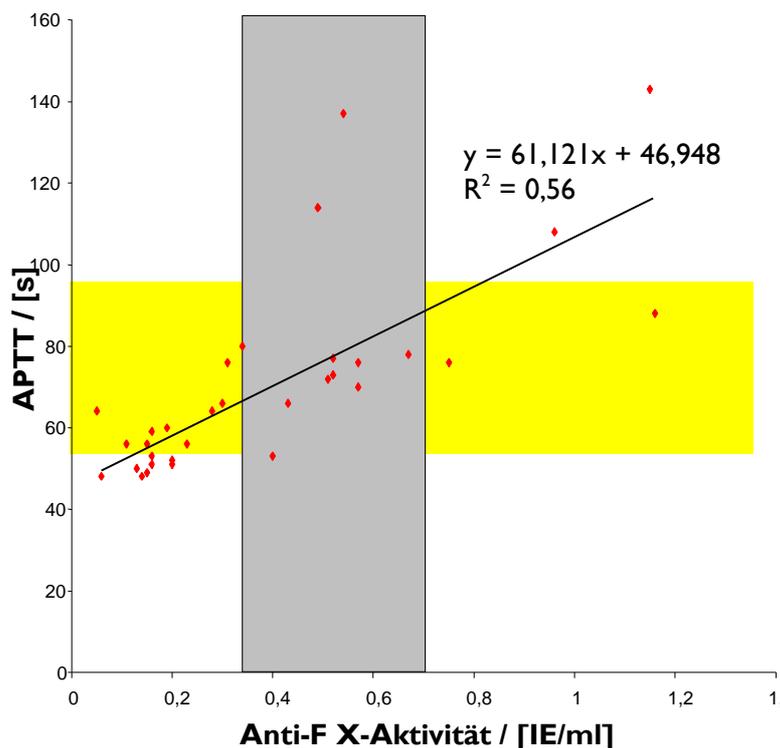
Mittels des Aufstockungsversuchs mit Heparin wurde extrapoliert, welcher UF-Heparinplasmakonzentration eine Verlängerung der APTT um das 1,5- bis 2,5fache entspricht. (dunkelgrüne Balken) Zum Vergleich ist der in der Literatur geforderte Bereich von 0,2 bis 0,4 IE/ml durch ein transparentes Rechteck verdeutlicht. Bei DAPTTIN ließ sich im gemessenen Bereich bis 0,55 IE/ml keine Vergrößerung um das 2,5-fache feststellen.



Schließlich wurde noch das Verhalten von Pathromtin am BFA gegen einen Anti-F Xa-Assay überprüft. Laut HIRSH (1991a) gilt für eine Heparinkonzentration, wenn sie durch einen Anti-F Xa-Assay ermittelt wird, einen anderen therapeutischen Bereich als wenn sie mittels Protamintitration bestimmt wurde. Dieser liegt bei 0,35 IE/ml bis 0,7 IE/ml. In Abbildung 28 ist die Anti-F Xa-Aktivität und die APTT ermittelt mit Pathromtin am BFA von 32 Patienten gegeneinander aufgetragen. Diese Patienten sind intravenös mit Liquemin, einem unfraktionierten Heparin behandelt. Es zeigt sich in dieser Darstellung, dass 8 Patienten im therapeutischen und 8 im subtherapeutischen Bereich beider Methoden liegen. 2 Patienten werden von beiden Methoden als übertherapiert dargestellt. Allerdings weisen 9 Patienten mit APTT im therapeutischen Bereich hierfür eine zu geringe und 2 eine zu hohe Anti-F Xa-Aktivität auf. Bei 2 Patienten mit einer therapeutischen Anti-F Xa-Aktivität zeigen zwei eine APTT über und einer eine APTT unter dem therapeutischen Bereich. Da Bestimmtheitsmaß R^2 ist gleich 0,56.

Abbildung 28 In vivo heparinisierte Plasmen (n=32)

APTT ermittelt mit Pathromtin gegen die gemessene Anti-F Xa-Aktivität: Der therapeutische Bereich der APTT mit dem 1,5- bis 2,5-fachen der oberen Referenzbereichsgrenze ist in **Gelb** eingezeichnet. Der empfohlene therapeutische Bereich der UFH-Therapie bei Überwachung mittels Bestimmung der Anti-F Xa-Aktivität ist **grau** dargestellt. Eine lineare Trendlinie mit Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 ist eingezeichnet



Je nachdem wie man also den therapeutischen Bereich ermittelt, ergeben sich unterschiedliche Resultate. (Tabelle 18) Wenn man, wie BASU et al. (1972) den therapeutischen Bereich aus der oberen Referenzbereichsgrenze heraus berechnet, ergibt sich ein relativ weiter Bereich. Auffallend ist auch, dass der durch den in vitro Versuch gewonnene Bereich kürzere Gerinnungszeiten beinhaltet als wenn dieser an Hand von Patientenplasmen mit linearer Regression zur Anti-FXa-Aktivität gewonnen wird.

Tabelle 18 Unterschiedliche Ergebnisse für den therapeutischen Bereich von Pathromtin

Berechnungsgrundlage	Therapeutischer Bereich
Referenzbereich: Verlängerung auf das 1,5- – 2,5- des Referenzbereiches	62,1 s - 103,6 s
in vitro Verdünnungsreihe: APTT von normalem Poolplasma nach Aufstockung mit 0,2 – 0,4 IE/ml UFH	55,0 s – 78,7 s
Untersuchung von Plasma heparinisierter Patienten: Einsetzen von 0,35– 0,70 U/ml in die Regressionsgerade	68,3 s – 89,7 s

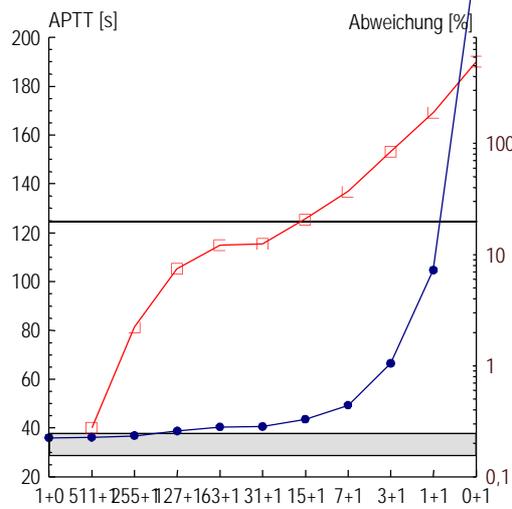
Zusammenfassend zeigt sich also, dass die Heparinempfindlichkeit der einzelnen untersuchten Methoden sehr unterschiedlich ist. In der Regel decken sich die beiden Definitionen des therapeutischen Bereichs der Heparinbehandlung nach BASU (1972) und nach HIRSH (1995) nicht. Auch wenn in vivo gewonnene Plasmen von Patienten unter Therapie mit UFH untersucht werden, lässt sich deren unterschiedliche APTT nur zu etwa 50% aus dem unterschiedlichen Heparinplasmakonzentration erklären. Proben mit therapeutischer APTT und einer zu hohen Anti-F Xa-Aktivität kommen genauso vor wie Proben mit hoher APTT aber korrektem Anti-F Xa-Aktivität. Viele Proben im therapeutischen Bereich der APTT weisen eine zu niedrige Anti-F Xa-Aktivität auf.

3.1.6 Empfindlichkeit gegenüber Lupusantikoagulantien

Poolplasma wurde in mehreren Stufen mit dem Plasma eines Patienten gemischt, welches einen hohen Gehalt an Lupusantikoagulantien aufwies. Der Anteil des Patientenplasmas entsprach dabei 0%, 0,195%, 0,391%, 0,781%, 1,56%, 3,13%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% und 100%. Dargestellt ist die **APTT in Sekunden (blau ●)**, sowie in **rot (□)** die **Abweichung** von der APTT des Poolplasmas in Prozent in einer logarithmischen Skala. Der Referenzbereich der APTT ist in grau eingezeichnet, eine schwarze, horizontale Linie markiert eine Abweichung von 20% zur APTT des Poolplasmas.

Das verwendete Poolplasma liefert bei seiner Messung bei Pathromtin SL am BCT, Neothromtin am BCT, APTT Sigma und Actin FSL eine APTT im unteren Referenzbereich. Im Gegensatz dazu liefert Pathromtin am BFA eine APTT oberhalb dieses Bereiches. Aus diesem Grund kann der Austrittspunkt der dargestellten blauen Kurve aus dem Referenzbereich nicht zum Vergleich der Empfindlichkeit der Reagenzien aus LA verwendet werden. Relevanter ist daher die Beobachtung, ab welcher Verdünnungsstufe des Patientenplasmas die APTT um 20% von der APTT des Poolplasmas abweicht. Die höchste Verdünnungsstufe erreichen dabei APTT Sigma und Platelin LS, welche schon eine 20%ige Veränderung der APTT ausweisen, wenn nur 1,56% des lupusantikoagulans-positiven Plasmas zugefügt werden. DAPTIN, APTT-L und SynthASil zeigen dies ab Zusatz von 3,13% Patientenplasmas, alle anderen bei 6,25%. Lediglich Neothromtin am BCT braucht 12,5% Patientenplasma, um eine um 20% verlängerte APTT zu erzeugen.

Abbildung 29 Pathromtin BCT



Pathromtin SL BCT

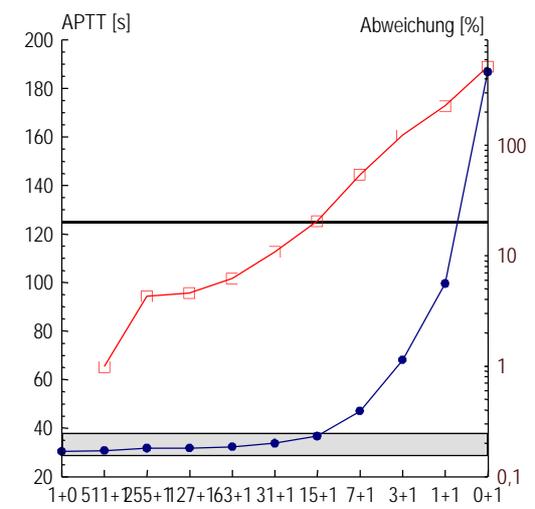
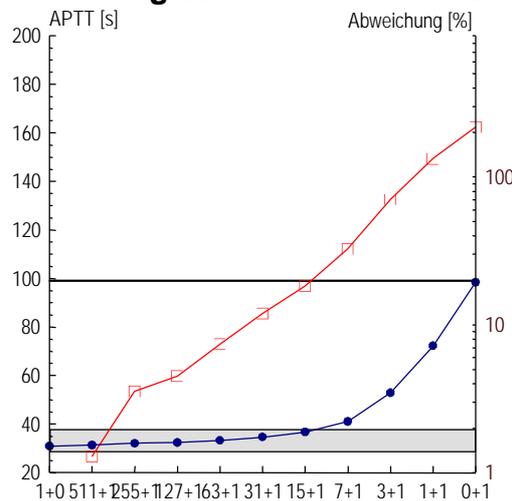


Abbildung 30 Neothromtin BCT



Pathromtin BFA

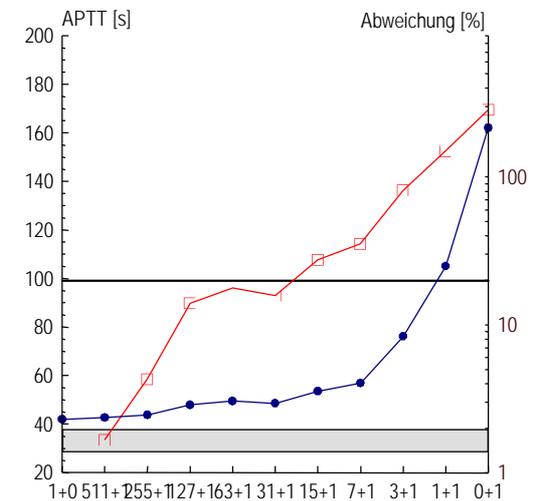
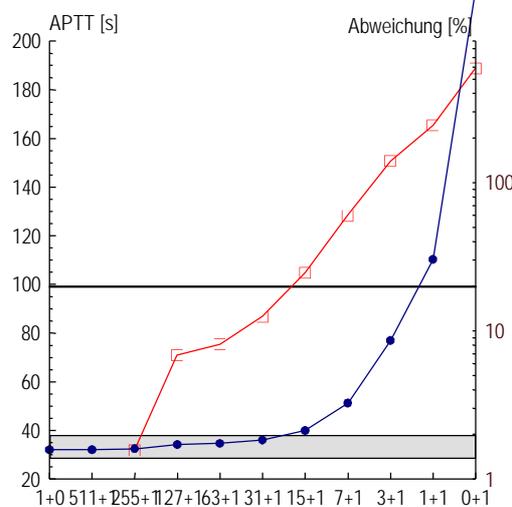


Abbildung 31 Pathromtin SL BFA



DAPTTIN BFA

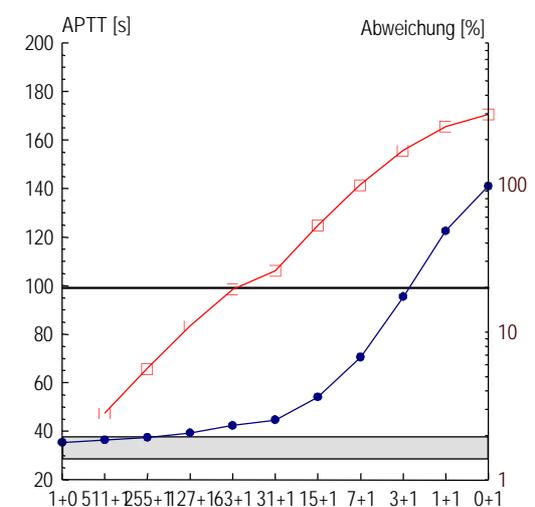
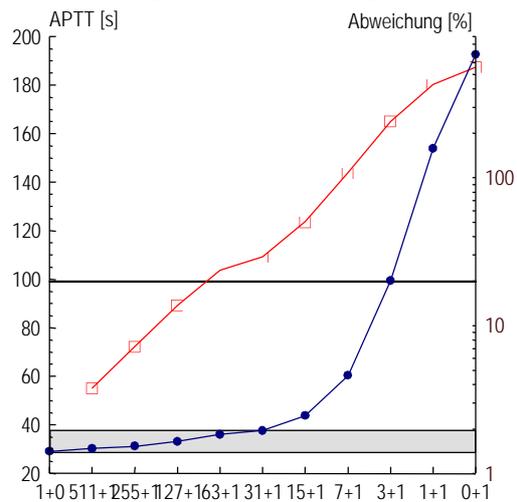


Abbildung 32 APTT Sigma BFA



Actin FSL BFA

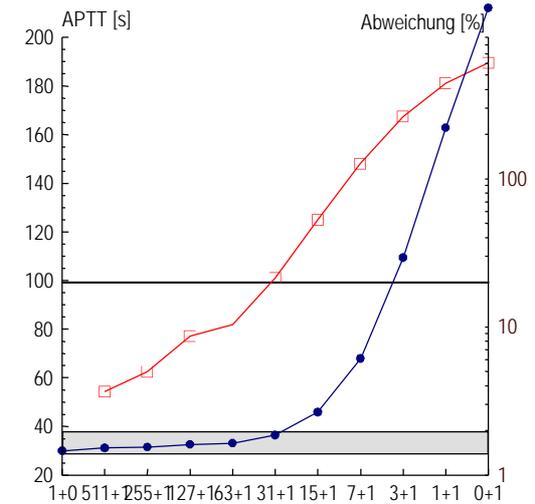
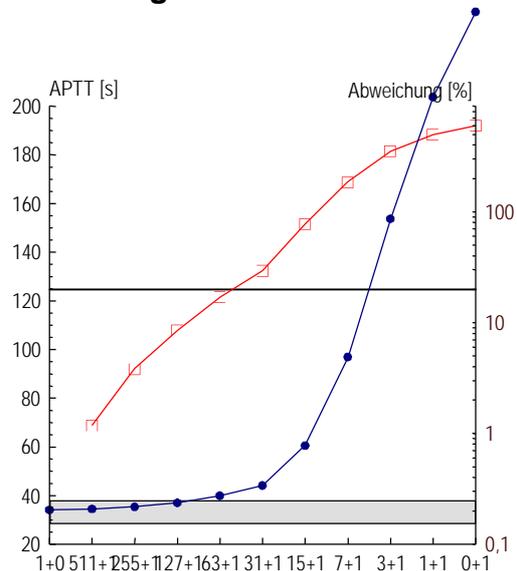


Abbildung 33 APTT-L BFA



Platelin LS BFA

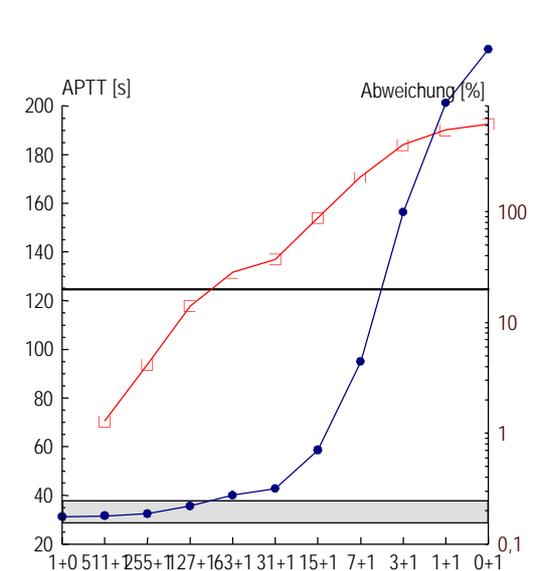
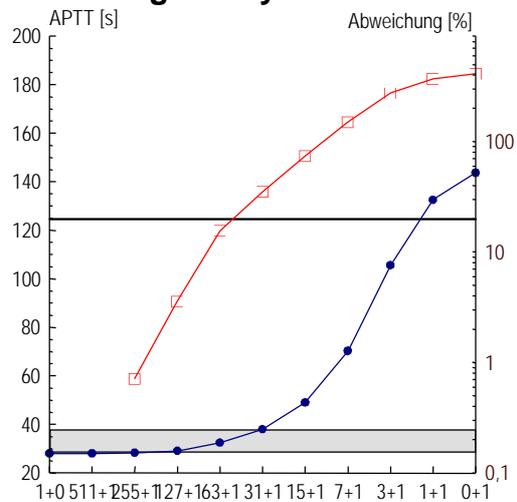
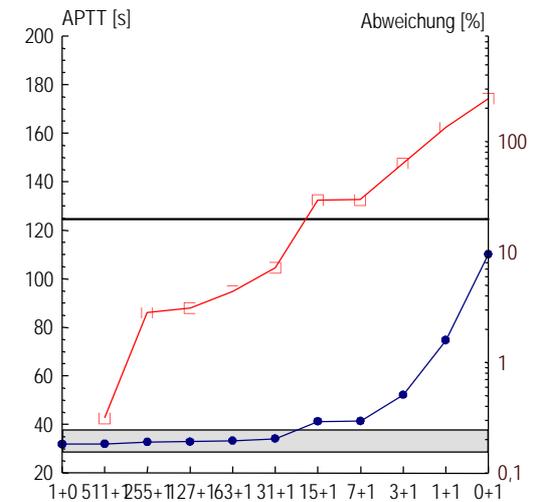


Abbildung 34 SynthASil BFA



Neothromtin LS BFA



In einer zweiten Untersuchung wurde Plasma von 20 hämatologischen Patienten mit pathologischem DRVVT untersucht. Tabelle 19 stellt dar, dass Pathromtin SL an

beiden Geräten, Pathromtin am BFA, Neothromtin am BFA für alle diese Plasmen eine pathologische APTT fand, dies heißt, dass das Analysenergebnis oberhalb des Referenzbereichs lag. Platelin LS hingegen zeigte nur 15 pathologische Ergebnisse, was lediglich einer Sensitivität von 75% entsprach. Auch APTT-L und ACTIN FSL zeigten sich mit geringer Sensitivität als die anderen Methoden. Abbildung 35 stellt das untersuchte Kollektiv noch einmal grafisch dar, wobei jedes rote Rechteck einem Messergebnis entspricht. Durch schwarze Balken sind die oberen Normbereichsgrenzen für die jeweiligen Methoden eingetragen. Da ein Plasma mit keiner Methode zur Clotbildung führte, ist es mit dem Messdauermaximum von 240 s in die Grafik mitaufgenommen. Sichtbar wird auch hier, dass die meisten Analysenergebnisse im pathologischen Bereich zum Liegen kommen. Bei Pathromtin BCT, DAPTTIN, APTT Sigma, Actin FSL, Platelin und APTT-L zeigen sich falsch negative Ergebnisse. Pathromtin weist drei, Platelin LS eins, APTT-L fünf Messergebnisse auf, welche weit oberhalb der anderen zum Liegen kommen, wenn man von der ungerinnbaren Probe absieht.

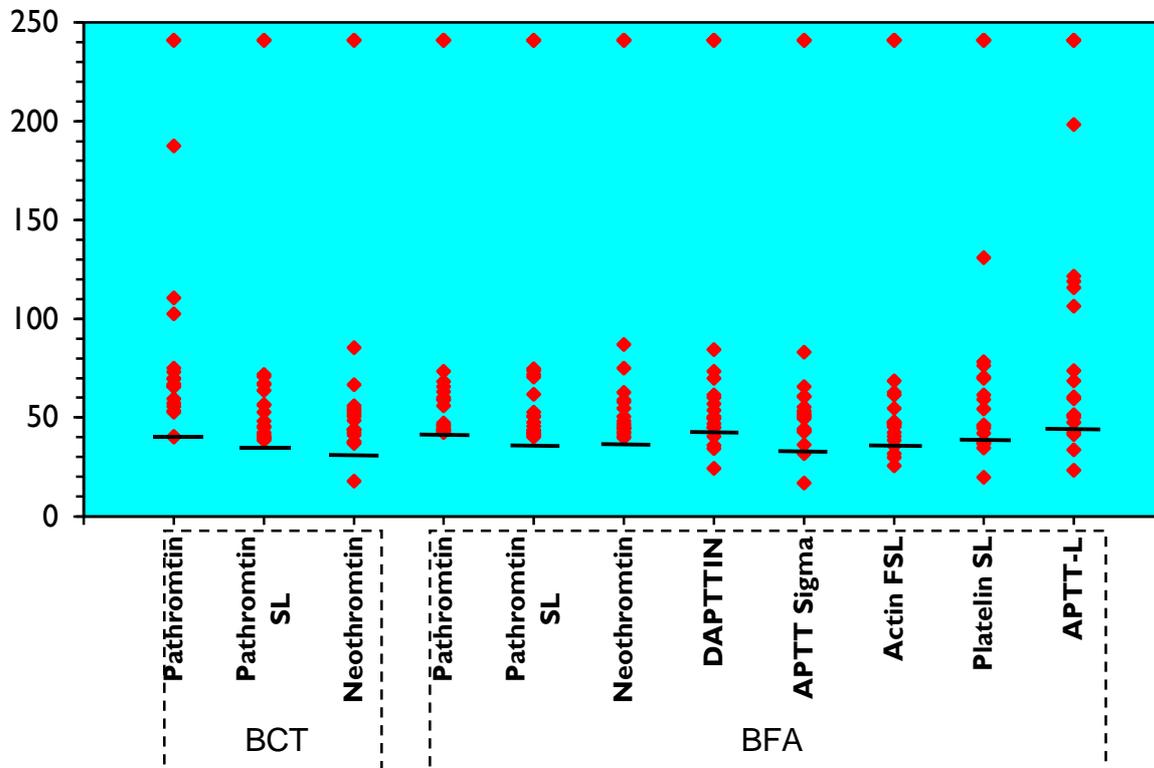
Tabelle 19 Verlängerte APTT bei LA-haltigen Citratplasmen

Citratplasma von 20 Patienten mit pathologischem DRVVT wurde mit den APTT-Methoden untersucht. Dargestellt ist die Anzahl der in den pathologischen Bereich verlängerten APTT. (Das bedeutet, oberhalb des 95. Perzentil gelegen). Die Sensitivität ergab sich als Quotient der Anzahl der pathologischen Resultate durch deren Gesamtzahl von 20.

APTT-Reagenz	Gerät	95. Perzentil	Anzahl pathologisch	Sensitivität
Pathromtin	BCT	40,30 s	18	90%
Pathromtin SL	BCT	35,70 s	20	100%
Neothromtin	BCT	31,07 s	19	95%
Pathromtin	BFA	41,42 s	20	100%
Pathromtin SL	BFA	37,01 s	20	100%
Neothromtin	BFA	38,11 s	20	100%
DAPTTIN	BFA	42,75 s	16	80%
APTT Sigma	BFA	32,56 s	18	90%
Actin FSL	BFA	37,40 s	16	80%
Platelin LS	BFA	38,41 s	15	75%
APTT-L	BFA	43,21 s	16	80%

Abbildung 35 Verlängerte APTT bei APA-positiven Citratplasmen

Durch die schwarzen Linien ist das jeweilige 95. Perzentil der Referenzgruppe dargestellt, ein Patient führte mit keiner Methode zu einer nachweisbaren Fibrinotbildung und ist mit 240 s in die Darstellung aufgenommen.



Auch die Empfindlichkeit der einzelnen Reagenzien für Lupusantikoagulantien ist unterschiedlich. In der Verdünnungsreihe eines Plasmas mit einem besonders starkem LA und in der Untersuchung von 20 Patienten zeigten sich scheinbar widersprüchliche Ergebnisse: In vitro zeigten APTT Sigma und Platelin LS die höchste Sensitivität. Unterschied zwischen Neothromtin am BCT und am BFA verdeutlichen, dass auch diese Eigenschaft der Methode vom Analysator beeinflusst wird. Anscheinend trägt zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen die große Heterogenität der LA bei, welche zu unterschiedlichen Ergebnissen bei verschiedenen Methoden der APTT führt.

3.1.7 Methodenvergleich nach Passing-Bablok

In drei Durchgängen wurde ein Vergleich der APTT-Methoden durchgeführt. Zunächst wurden sechs Reagenzien am BFA miteinander verglichen, dann drei Reagenzien am BFA mit drei Reagenzien am BCT und schließlich noch Pathromtin gegen DAPTTIN am BFA. Für den Methodenvergleich wurden lediglich Proben verwendet, welche bei der Messung mit Pathromtin am BFA pathologische Werte aufwiesen. Es wurde dann noch einmal unterschieden, ob diese Patienten UF-Heparin erhalten haben (Kollektiv UFH) oder nicht (Kollektiv NH). In diesen anderen Fällen ist also die Verlängerung der APTT nicht auf Heparin, sondern auf andere Ursachen z. B. auf einen Faktorenmangel zurückzuführen.

In Tabelle 20 bis Tabelle 22 sind für die Untersuchungen an den Kollektiven unter und ohne UF-Heparintherapie angegeben:

b = Steigung der berechneten Regressionsgeraden
a = Achsenabschnitt dieser Geraden

r = Korrelationskoeffizient

Zum Verdeutlichung, welcher Oberflächenaktivator bei den einzelnen Methoden verwendet wurde, sind die Methoden entsprechend eingefärbt:

Kaolin – rot

Silikate – blau

Ellagsäure – grün

Zusätzlich sind außer den Tabellen einige der interessantesten Vergleiche nach Passing-Bablok als Plot dargestellt. Einzelne Messpaare sind hierbei durch rote Punkte gekennzeichnet, die durchgezogene Linie gibt die Korrelationsgerade wieder. Dargestellt ist der Vergleich, welcher am Kollektiv UFH (links) und am Kollektiv NH (rechts) ermittelt wurde.

Die lineare Korrelation der einzelnen Methoden fällt sehr unterschiedlich aus: Der lineare Korrelationskoeffizient reicht von geringen 0,37 (APTT-L gegen SynthASil, Abbildung 36) bis zu sehr guten 0,96. (Pathromtin SL am BFA gegen Pathromtin SL am BCT, Abbildung 37) Diese sehr gute Korrelation verbunden mit einer Steigung von nahe 1 und einem kleinen Achsenabschnitt, also einer vergleichbaren Wertlage, wurde bei Vergleich zweier Methoden erreicht, welche das selbe Reagenz verwendeten und sich somit nur durch den Analysator unterschieden.

Dies sieht jedoch bei Vergleich von Pathromtin an BFA gegen BCT (Abbildung 38) anders aus: Obwohl auch hier jeweils das gleiche Reagenz genutzt worden ist, finden sich am BCT in beiden untersuchten Kollektiven längere APTT. Während aber die APTT bei Patienten unter Heparintherapie zu mindestens von der Korrelation ($r=0,91$) her als gut vergleichbar darstellt, sieht dies beim NH-Kollektiv schlechter aus. ($r=0,76$)

In diesem Beispiel wechselt der lineare Korrelationskoeffizient mit der Art des untersuchten Patientenkollektiv. Dies zeigt sich auch beim Beispiel der Korrelation APTT-L gegen SynthASil. (Abbildung 36) Werden in den Vergleich ausschließlich Patienten unter UFH-Therapie einbezogen, so ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von annehmbaren $r=0,81$, wobei SynthASil in der Regel zu niedrigeren APTT-Resultaten führt. Ist die APTT-Verlängerung jedoch nicht durch Heparin bedingt, zeigt sich eine sehr geringe Korrelation mit $r=0,37$. Beide Reagenzien wurden am gleichen Analyser verwendet und benutzten Silikate als Oberflächenaktivator. Unterschiede der Methoden lagen in den verwendeten Phospholipide und in der Inkubationsdauer. Scheinbar ist in diesem Falle die Heparinempfindlichkeit der Methoden vergleichbar, während dies bei der Faktorenempfindlichkeit nicht der Fall ist.

Aber auch wenn Kaolin als Oberflächenaktivator am gleichen Gerät von zwei Methoden verwendet wird, ergeben sich auch nur mäßige Korrelationen: DAPTTIN (welches als zusätzlichen Aktivator auch Sulfatid einsetzt) vs. Pathromtin (Abbildung 39) zeigte am BFA ein $r=0,86$ für Patienten unter UFH-Therapie und $r=0,76$ für das Kollektiv NH. DAPTTIN liefert in den meisten Fällen kürzere Resultate für die APTT als Pathromtin.

Mäßige Vergleichbarkeit der Methoden am gleichen Analyser (BFA) zeigt sich auch, wenn zwei Methoden, welche beide Ellagsäure als Oberflächenaktivator verwenden, gegenüber gestellt werden. (Abbildung 40) Actin FSL lieferte kürzere Gerinnungszeiten als Neothromtin, wobei die Korrelation lediglich $r=0,74$ (heparinisierte Patienten) bzw. $r=0,64$ (nicht-heparinisierte Patienten) betrug.

Trotz des Beispiels in Abbildung 36 existieren zwei auf Silikate basierende Methoden, Platelin LS und APTT-L, welche zumindest für das Kollektiv UF-heparinisierte Patienten eine gute Korrelation ($r=0,92$) bietet, beim Vergleich des

Kollektives NH ist jedoch der Korrelationskoeffizient $r=0,73$ niedriger ausgefallen. (Abbildung 41)

Betrachtet man die Reagenzien, welche von einem Hersteller (Behring) stammen, so fällt auf, Pathromtin und Neothromtin (Abbildung 42) nur eine niedrige lineare Korrelation demonstrieren: ($r=0,65$ für das UFH-Kollektiv und $r=0,60$ für das NH-Kollektiv). Wie schon bei gesunden Probanden liefert Neothromtin in beiden Patientenkollektiven niedrigere Werte als Pathromtin.

Anders sieht es jedoch aus, wenn Pathromtin und sein Nachfolger Pathromtin SL (Abbildung 43) miteinander verglichen werden: Der Korrelations-Koeffizient beträgt gute $0,92$ bzw. $0,88$, wobei die Wertlage, besonders wenn das NH-Kollektiv betrachtet wird, ähnlich ist.

Tabelle 20 Vergleich von 6 Methoden der APTT-Bestimmung am BFA

Methode 1	Methode 2	UFH-Therapie			keine UFH-Gabe		
		b	a	r	b	a	r
Pathromtin	Neothromtin	0,97	-5,82	0,65	0,51	10,84	0,60
Pathromtin	Actin FSL	0,78	-1,19	0,62	0,50	10,82	0,70
Pathromtin	Platelin LS	1,08	-11,95	0,58	0,92	-0,69	0,60
Pathromtin	APTT-L	1,23	-11,81	0,62	0,98	-4,47	0,59
Pathromtin	SynthASil	0,56	9,28	0,46	0,36	15,73	0,74
Neothromtin	Actin FSL	0,72	6,46	0,74	0,51	12,89	0,64
Neothromtin	Platelin LS	1,04	-2,41	0,78	0,57	9,61	0,65
Neothromtin	APTT-L	1,05	4,33	0,80	1,00	-1,10	0,74
Neothromtin	SynthASil	0,59	12,38	0,56	0,35	18,88	0,64
Actin FSL	Platelin LS	1,46	-11,89	0,90	1,22	-7,00	0,73
Actin FSL	APTT-L	1,38	-2,53	0,91	1,99	-28,35	0,74
Actin FSL	SynthASil	0,76	8,57	0,83	0,71	9,51	0,76
Platelin LS	APTT-L	0,97	8,23	0,92	1,52	-10,14	0,73
Platelin LS	SynthASil	0,56	14,03	0,79	0,61	13,05	0,64
APTT-L	SynthASil	0,58	8,87	0,81	0,38	18,41	0,37

Tabelle 21 Vergleich von 6 Methoden der APTT-Bestimmung an BFA und BCT

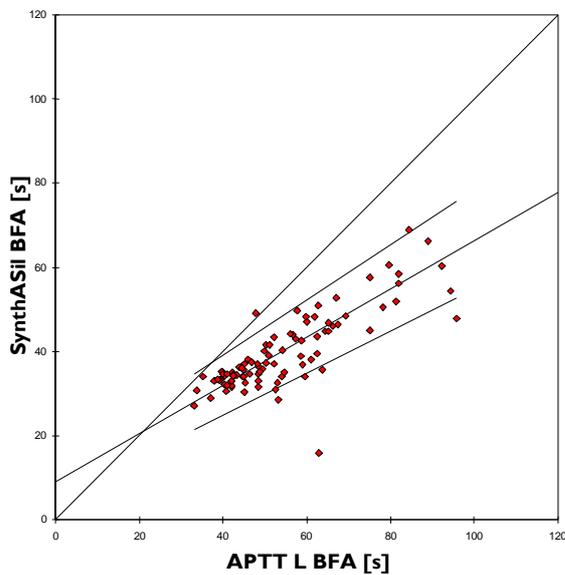
Methode 1	Methode 2	UFH-Therapie			keine UFH-Gabe		
		b	a	r	b	a	r
Pathromtin BFA	Pathromtin SL BFA	1,18	-11,57	0,92	1,00	-5,40	0,88
Pathromtin BFA	Sigma APTT BFA	1,17	-15,42	0,89	0,76	0,45	0,70
Pathromtin BFA	Pathromtin BCT	1,37	-13,08	0,91	1,47	-20,06	0,75
Pathromtin BFA	Pathromtin SL BCT	1,29	-16,38	0,89	1,06	-7,51	0,87
Pathromtin BFA	Neothromtin BCT	1,27	-20,09	0,82	0,98	-4,51	0,74
Pathromtin SL BFA	Sigma APTT BFA	0,96	-1,25	0,83	0,79	4,01	0,74
Pathromtin SL BFA	Pathromtin BCT	1,23	-2,69	0,77	1,56	-17,68	0,59
Pathromtin SL BFA	Pathromtin SL BCT	1,08	-2,14	0,96	1,06	-2,32	0,94
Pathromtin SL BFA	Neothromtin BCT	1,01	-4,59	0,86	0,98	-0,68	0,78
Sigma APTT BFA	Pathromtin BCT	1,27	-0,09	0,84	2,22	-32,38	0,44
Sigma APTT BFA	Pathromtin SL BCT	1,10	-0,62	0,88	1,40	-9,25	0,69
Sigma APTT BFA	Neothromtin BCT	1,20	-9,19	0,80	1,25	-6,40	0,68
Pathromtin BCT	Pathromtin SL BCT	0,90	-1,05	0,82	0,65	10,83	0,71
Pathromtin BCT	Neothromtin BCT	0,81	-2,04	0,73	0,62	11,45	0,67
Pathromtin SL BCT	Neothromtin BCT	0,99	-3,93	0,87	0,92	1,60	0,85

Tabelle 22 Vergleich von DAPTTIN und Pathromtin am BFA

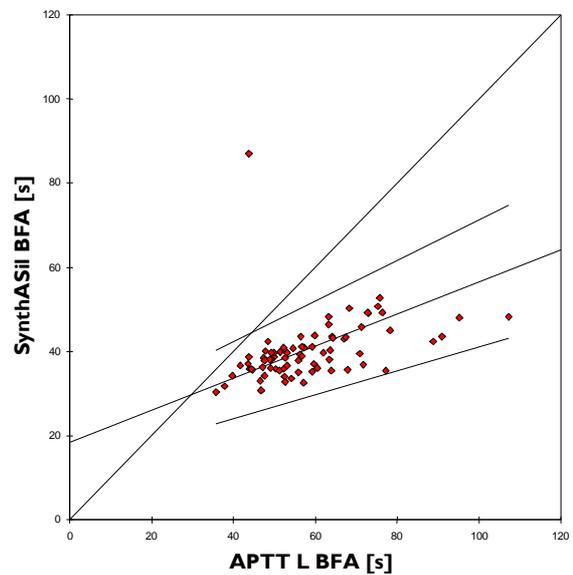
Methode 1	Methode 2	UFH-Therapie			keine UFH-Gabe		
		b	a	r	b	a	r
Pathromtin BFA	DAPTTIN BFA	0,71	9,88	0,86	0,88	4,22	0,76

Abbildung 36 Methodenvergleich - APTT-L am BFA vs. SynthASil am BFA

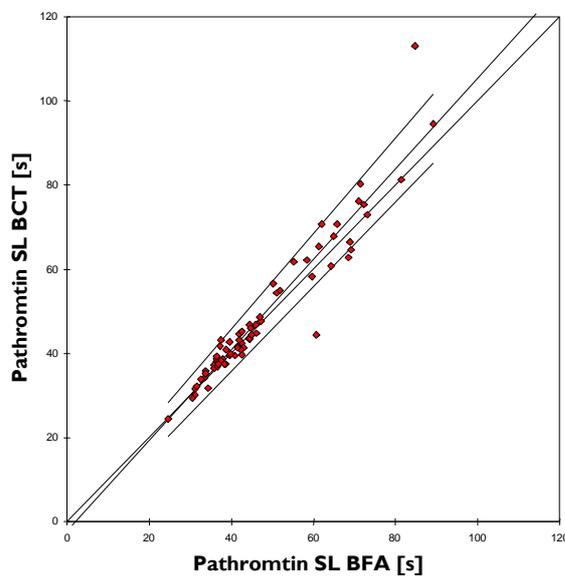
UF-Heparintherapie
 $y=0,58*x+8,87$
 $r=0,81$



keine UF-Heparintherapie
 $y=0,38*x+18,41$
 $r=0,37$

**Abbildung 37 Methodenvergleich – Pathromtin SL an BFA vs. BCT**

UF-Heparintherapie
 $y=1,08*x-2,14$
 $r=0,96$



keine UF-Heparintherapie
 $y=1,06*x-2,32$
 $r=0,94$

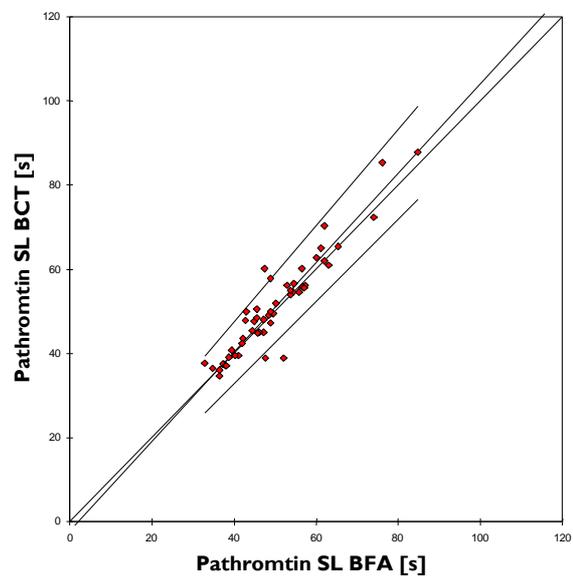


Abbildung 38 Methodenvergleich – Pathromtin an BFA vs. BCT

UF-Heparintherapie
 $y=1,37*x-13,08$
 $r=0,91$

keine UF-Heparintherapie
 $y=1,47*x-20,06$
 $r=0,75$

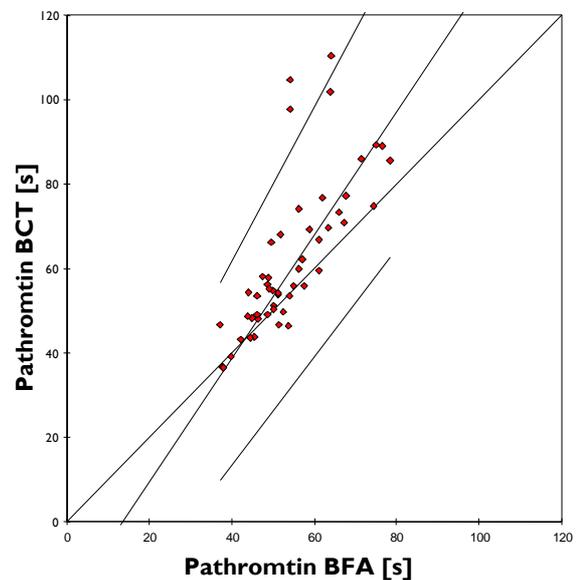
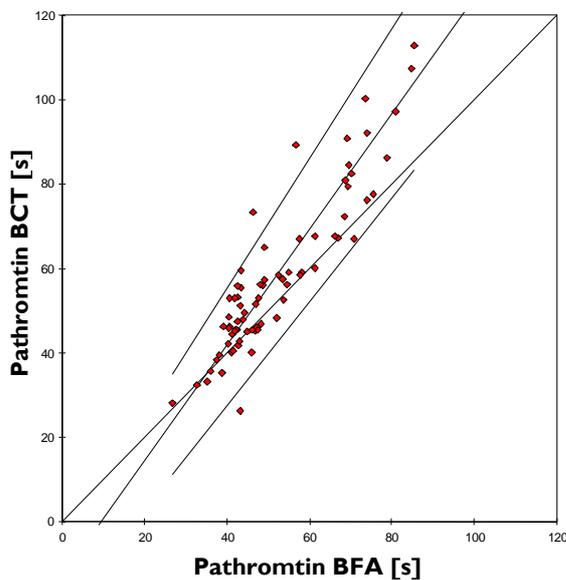


Abbildung 39 Methodenvergleich – Pathromtin an BFA vs. BCT

UF-Heparintherapie
 $y=0,71*x+9,88$
 $r=0,86$

keine UF-Heparintherapie
 $y=0,88*x+4,22$
 $r=0,76$

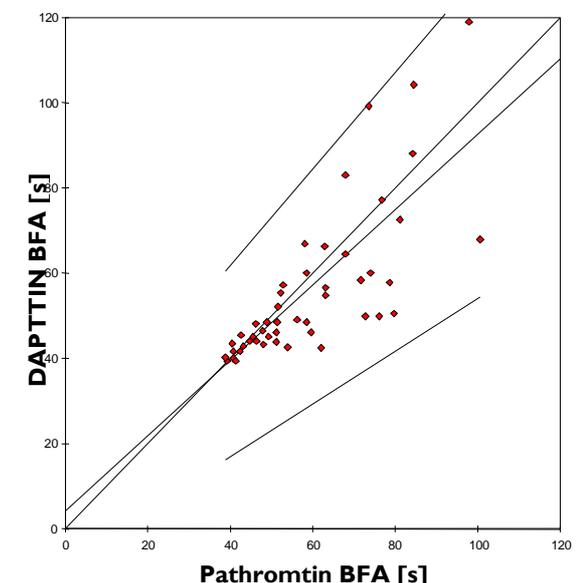
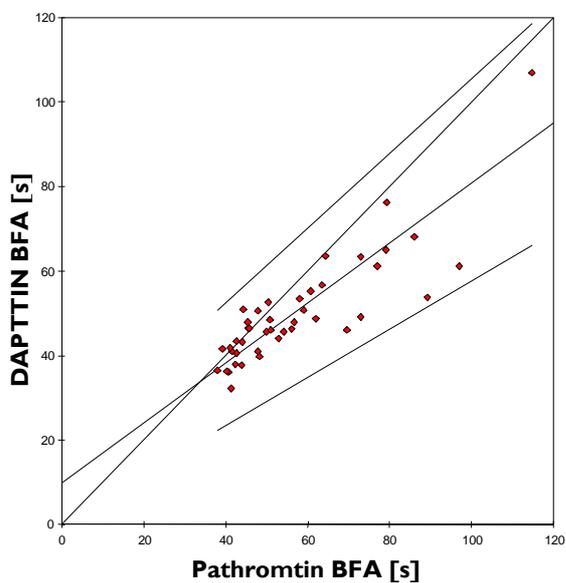
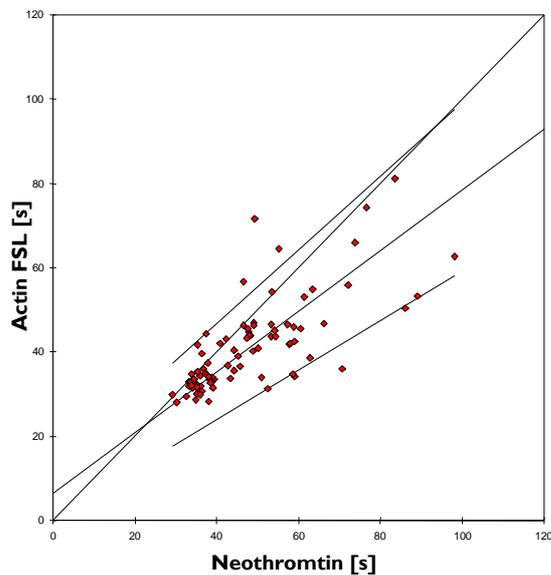
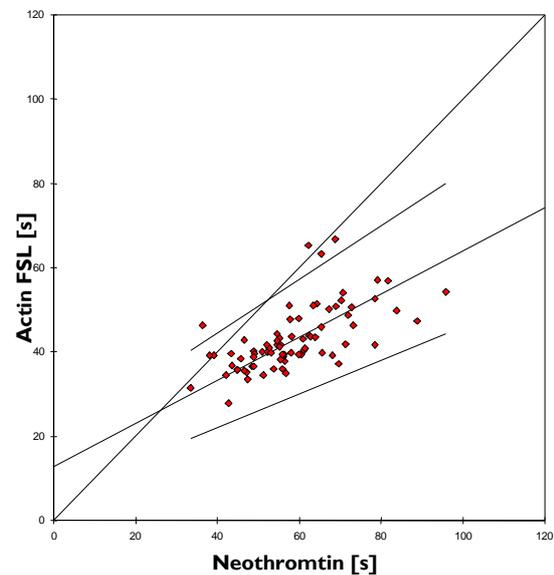


Abbildung 40 Methodenvergleich – Neothromtin vs. Actin FSL am BFA

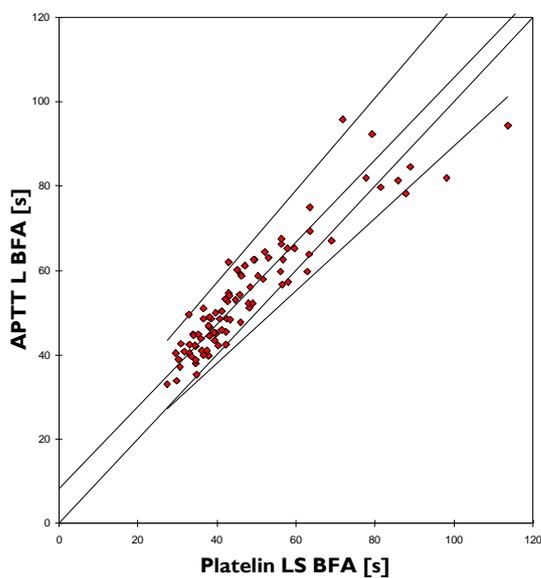
UF-Heparintherapie
 $y=0,72*x+6,46$
 $r=0,74$



keine UF-Heparintherapie
 $y=0,51*x+12,89$
 $r=0,64$

**Abbildung 41 Methodenvergleich – Platelin LS vs. APTT-L am BFA**

UF-Heparintherapie
 $y=0,97*x+8,23$
 $r=0,92$



keine UF-Heparintherapie
 $y=1,52*x-10,14$
 $r=0,73$

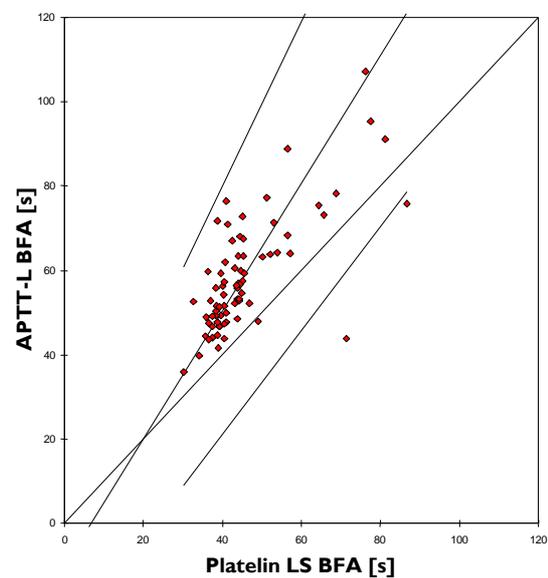
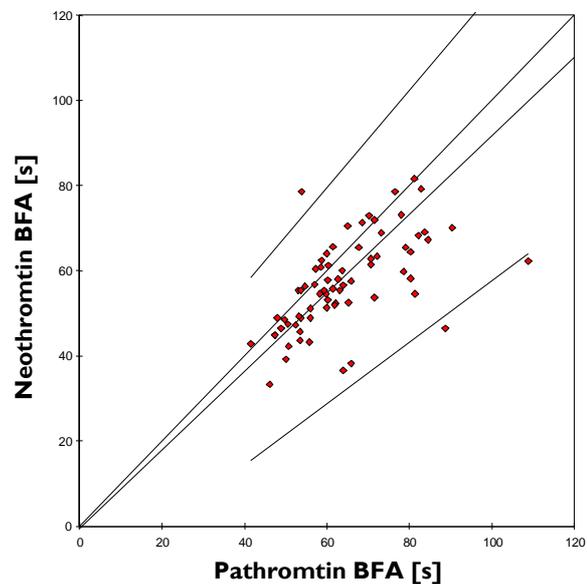
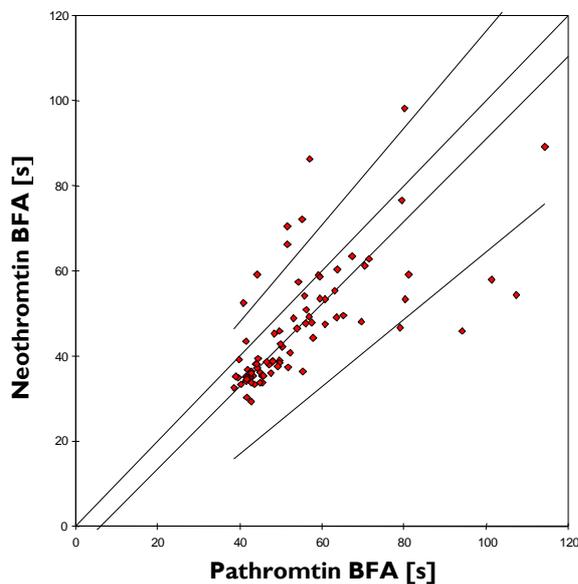


Abbildung 42 Methodenvergleich – Pathromtin vs. Neothromtin am BFA

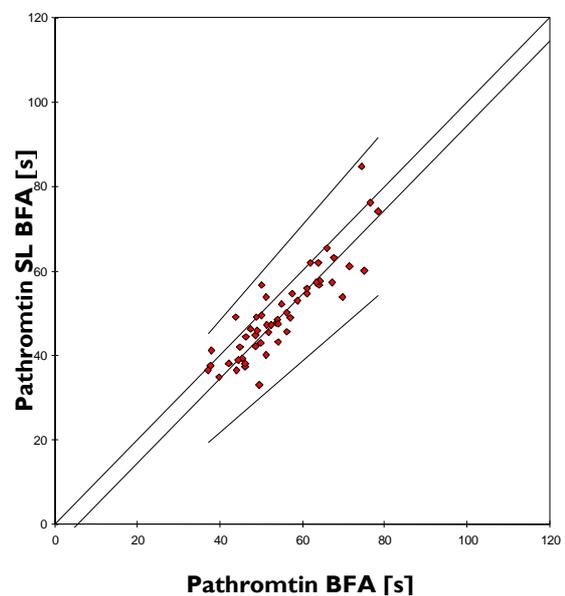
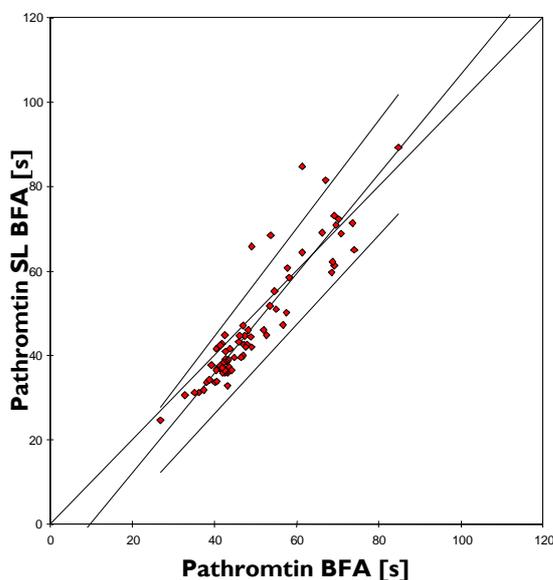
UF-Heparintherapie
 $y=0,97*x-5,82$
 $r=0,65$

keine UF-Heparintherapie
 $y=0,51*x+10,84$
 $r=0,60$

**Abbildung 43 Methodenvergleich – Pathromtin vs. Pathromtin SL am BFA**

UF-Heparintherapie
 $y=1,18*x-11,57$
 $r=0,92$

keine UF-Heparintherapie
 $y=1,00*x-5,40$
 $r=0,88$



Einzelne Methoden zur Bestimmung der APTT lassen sich nur bedingt vergleichen. Die lineare Korrelation zwischen den Resultaten kann hoch bis sehr schlecht sein. Ein ähnlicher Typ des Oberflächenaktivators bedeutet nicht gleichzeitig eine gute lineare Korrelation. Bei Verwendung unterschiedlicher Analyser kann die Korrelation gut sein, wenn das Reagenz an beide Geräte angepasst ist. (Pathromtin SL) Wenn aber, wie im Fall des Pathromtin ein Reagenz anscheinend für eine (hier: die photometrische) Methode nicht geeignet ist, so ergibt sich auch hier eine schlechtere

Korrelation. Wählt man unterschiedliche Patientenkollektive (heparinisiert vs. nicht-heparinisiert) so ergeben sich andere lineare Korrelationen.

3.2 Zum Vergleich verschiedener Bestimmungsmöglichkeiten der APC-Resistenz

3.2.1 Referenzbereiche

Zur Bestimmung der Referenzbereiche der einzelnen Methoden zur Bestimmung der APC-Resistenz (Tabelle 23) wurde tiefgefrorenes Plasma von 50 offensichtlich gerinnungsgesunden Personen ohne APC-Resistenz im Wasserbad bei 37°C auftaucht und innerhalb von 30 Minuten gemessen. Als Unter- bzw. Obergrenze des Referenzbereichs wurde das 5. bzw. 95. Perzentil festgelegt. Dabei ergab sich der höchste Referenzbereich für die APC-Ratio für Coatest ohne F V-MP-Vorverdünnung (2,59-3,93). Für die Methode mit gleichem Reagenz und F V-MP-Vorverdünnung ergab sich ein Referenzbereich bei 2,30 - 2,92 und für ProC bei 2,27 - 2,69. Der Bereich der APC-Response ist breiter (2,09 - 3,71).

Die normierte APC-Ratio wurde aus APC-Ratio des zu untersuchenden Plasmas durch den Mittelwert des Referenzkollektives berechnet. Trotzdem ergaben sich auch hier keine einheitlichen Bereiche: Coatest mit F V-MP: 0,92 - 1,17 und ProC 0,88 - 1,04.

Mittels Zweipunktkalibration wurde ebenfalls aus der APTC die APC-Sensitivität kalkuliert. Auch hier ergaben sich unterschiedliche Referenzbereiche: Coatest lieferte mit 81,8% - 132,0% einen weiteren Referenzbereich als ProC mit 91,16% - 112,04%.

Der Referenzbereich der AIT stellte sich sehr breit dar: 63,9% - 229,0%

Erhebliche Unterschiede zwischen dem Referenzbereich ermittelt durch das 5. - 95.- Perzentil und dem 2s-Bereich ergaben sich für die AIT, wo bedingt durch die große Standardabweichung s dieser schon bei 17,7% beginnt.

Tabelle 23 Normbereiche, ermittelt an 50 offensichtlich gesunden Personen

Testverfahren	Auswertung	Median 5. – 95. Perz.		Mittelwert 2s-Ber.	
Coatest ohne F V-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	3,44	2,59 - 3,93	3,39	2,55 - 4,23
	normierte APC-Ratio	1,00	0,76 - 1,15	0,99	0,74 - 1,23
Coatest mit F V-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	2,55	2,30 - 2,92	2,58	2,17 – 3,00
	normierte APC-Ratio	1,02	0,92 - 1,17	1,04	0,87 – 1,20
	APC-Sensitivität [%]	100,5	81,8-132,0	104,1	70,8 – 137,4
ProC	APC-Ratio	2,48	2,27-2,69	2,48	2,20 - 2,76
	normierte APC-Ratio	0,96	0,88 - 1,04	0,96	0,85 – 1,07
	APC-Sensitivität [%]	99,39	91,16-112,04	100,2	86,9 – 113,5
AIT	Akzelerininaktiv. [%]	117,3	63,9 - 229,0	129,7	17,7 – 241,7
Immunochrom	APC-Response	2,78	2,09 - 3,71	2,81	1,84 – 3,78

Mittels des Testes auf Normalverteilung nach LILJEFORS zeigte sich eine Normalverteilung des Referenzkollektives bei beiden Coatesten (APC-Ratio, normierte APC-Ratio und APC-Sensitivität), der AIT und der APC-Response. Lediglich beim ProC APC konnte eine Normalverteilung ausgeschlossen werden. Da nur die Erniedrigung der APC-Resistenz eine klinische Relevanz besitzt, ist in erster Linie die untere Grenze des Referenzbereichs entscheidend für die Testaussage. Dieses liegt bei den methodisch ähnlichen Testen Coatest mit FV-MP und ProC auf nahezu gleichem Niveau, während die ebenfalls mit diesen Testen ermittelte APC-Sensitivität

Unterschiede aufweist. (81,8% zu 91,2%) Bei allen anderen Methoden ist der Referenzbereich ebenfalls unterschiedlich.

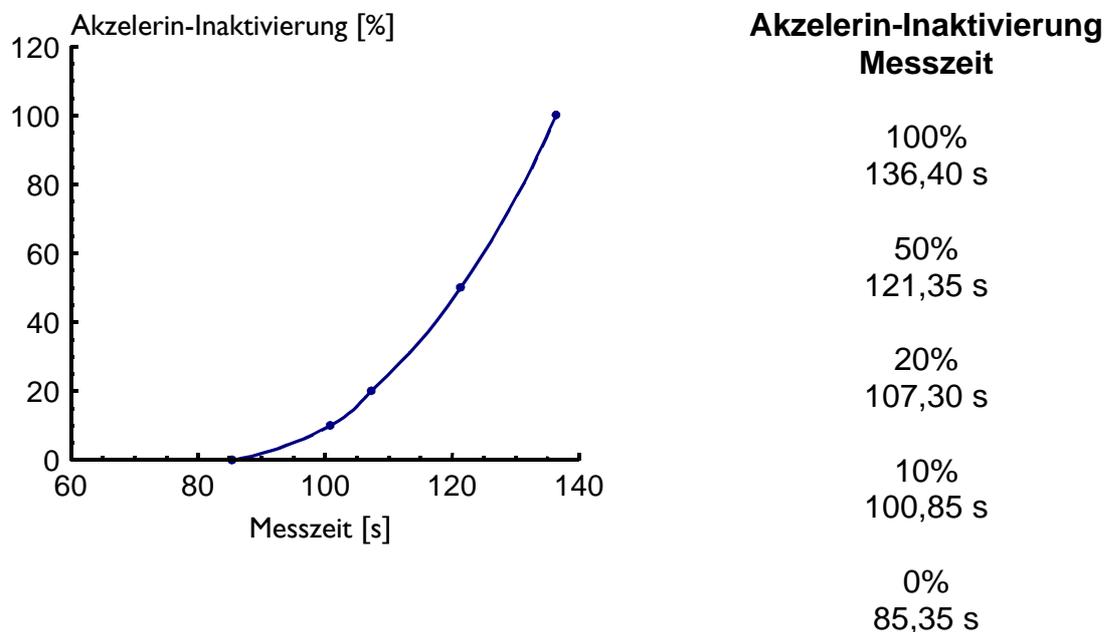
3.2.2 Kalibrationen

Kalibrationen waren sowohl zur Berechnung der APC-Sensitivität (Coatest und ProC) sowie zur Berechnung der Akzelerininaktivierung notwendig.

Bei der unter 2.4.2.4 (Seite 12) beschriebenen Kalibration des AIT ergab sich eine Akzelerininaktivierung von 0% eine Gerinnungszeit von 85,36 s. (Abbildung 44) Diese Zeit stieg mit der Akzelerininaktivierung exponentiell an und erreicht bei 100% 136,40 s.

Abbildung 44 Akzelerin-Inaktivierungs-Test: Ergebnisse der Kalibration

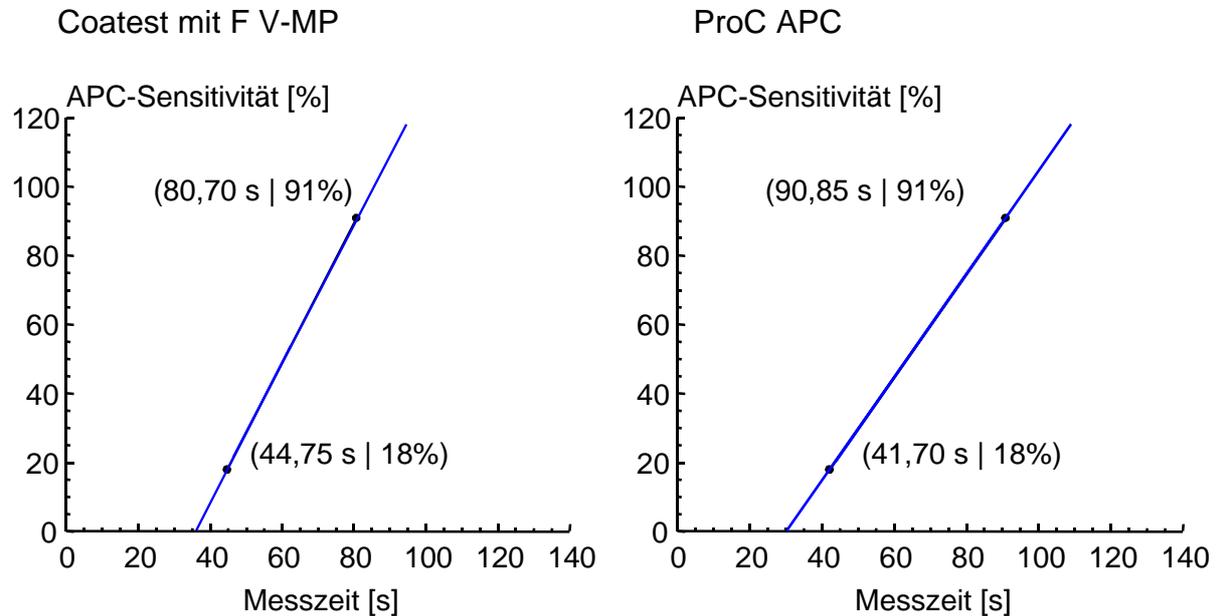
Die Kalibrationskurve für die Akzelerininaktivierung wurde wie unter 2.4.2.4 beschrieben bestimmt. In der Tabelle sind die Gerinnungszeiten für die gemessenen Stufen des APC-Gehaltes des Startreagenzes ebenfalls dargestellt.



Die APC-Sensitivität wurde für den Coatest mit F V-MP und für ProC durch Messung zweier Plasmen mit festgelegter APC-Sensitivität bestimmt. (Abbildung 45) Dabei ergab sich für eine APC-Sensitivität von 18% eine APTC von 44,75 s für Coatest und 41,70 s für ProC sowie für eine APC-Sensitivität von 91% eine APTC von 80,70 s für Coatest und 90,85 s für ProC. An Hand der dadurch gewonnenen Gerade, war eine Umrechnung der APTC in APC-Sensitivität möglich.

Abbildung 45 Kalibration der APC-Sensitivität

Behring bietet die Möglichkeit an, mittels zweier Kalibrationsplasmen (mit 18% bzw. 91% APC-Sensitivität) aus der APTC die APC-Sensitivität zu ermitteln. Angewendet wurde dies für den Coatest APC mit Faktor V-Mangelplasmavorverdünnung und für den ProC APC-Test.



3.2.3 Präzision in Serie (n=10)

Die Präzision der einzelnen Teste wurde mittels zweier Probe mit normaler (Tabelle 24) bzw. pathologischer APC-Resistenz (Tabelle 25) durch 10 Messungen in Serie bestimmt. Bei der Untersuchung der pathologischen Probe mit dem AIT konnte die Akzelerininaktivierung nicht in Prozenten angegeben werden, da die gewonnen Rohdaten in Sekunden unter dem Kalibrationspunkt für 0% lagen. Die für die AIT gemessene Gerinnungszeit zeigte im pathologischen Bereich folgende Präzisionseigenschaften: Mittelwert=68,43 s, $s=2,24$ s, $VK=3,27\%$

Coatest mit F V-MP ($VK=2,71\%$ bzw. $0,92\%$) und ProC ($VK=1,36\%$ bzw. $0,69\%$) maßen präziser als Coatest ohne F V-MP ($VK=4,65\%$ bzw. $4,48\%$). Die APC-Response war noch unpräziser: $VK=7,95\%$ bzw. $6,54\%$. Übertroffen wurde dies jedoch vom AIT: $VK=15,11\%$ für das Normalplasma.

Durch Anwendung der APC-Sensitivität kam es für die gleiche Methode zu einer Verschlechterung der Präzision durch Steigerung des VK um $0,66\%$ bis $2,59\%$. Der VK der normierten APC-Ratio ist aus mathematischen Gründen gleich dem VK der APC-Ratio.

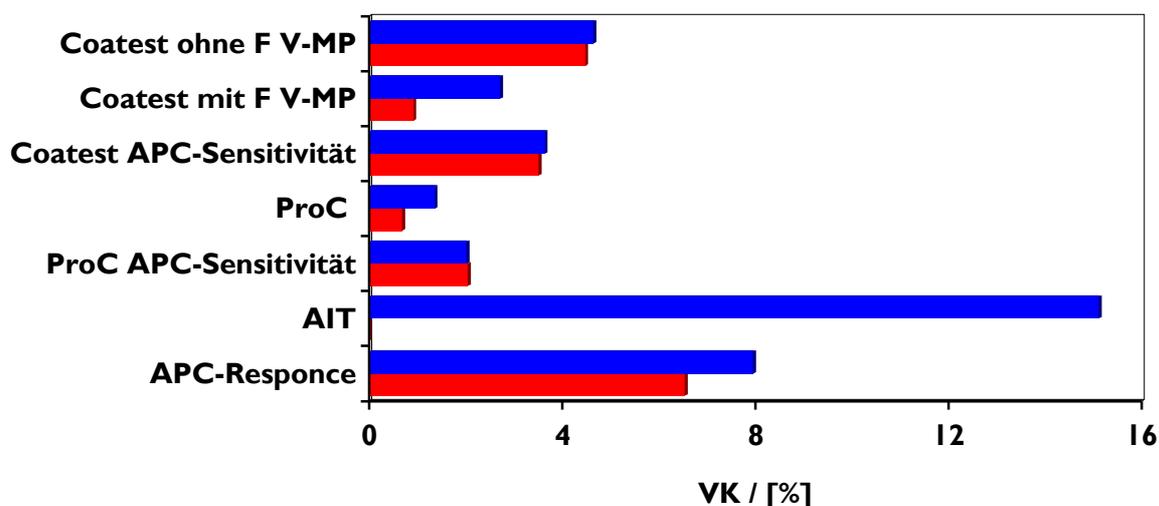
Tabelle 24 Präzision Kontrollplasma N (Normalplasma) n=10

Testverfahren	Auswertung	Mittelwert	s	VK
Coatest ohne FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	3,83	0,18	4,65%
	normierte APC-Ratio	1,12	0,05	4,65%
Coatest mit FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	2,29	0,06	2,71%
	normierte APC-Ratio	2,01	0,05	2,71%
	APC-Sensitivität	82,11%	2,99%	3,64%
ProC	APC-Ratio	2,25	0,03	1,36%
	normierte APC-Ratio	1,77	0,02	1,36%
	APC-Sensitivität	89,31%	1,80	2,02%
AIT	Akzelerininaktivierung	79,63%	12,04%	15,11%
Immunochrom	APC-Response	2,55	0,20	7,95%

Tabelle 25 Präzision APC-Kontroll (pathologisch) n=10

Testverfahren	Auswertung	Mittelwert	s	VK
Coatest ohne FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	3,04	0,14	4,48%
	normierte APC-Ratio	0,89	0,04	4,48%
Coatest mit FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	1,70	0,02	0,92%
	normierte APC-Ratio	1,50	0,01	0,92%
	APC-Sensitivität	33,73%	1,18%	3,51%
ProC	APC-Ratio	1,51	0,01	0,69%
	normierte APC-Ratio	1,19	0,01	0,69%
	APC-Sensitivität	33,91%	0,70%	2,05%
AIT	Akzelerininaktivierung	<0%		
Immunochrom	APC-Response	2,14	0,14	6,54%

Abbildung 46 Präzision in Serie (n=10) im grafischen Vergleich
 Blau ist jeweils die Präzision bei Messung eines normalen und rot bei Messung eines pathologischen Kontrollplasmas dargestellt.



3.2.4 Präzision von Tag zu Tag (n=2*5)

Die Präzision der einzelnen Teste wurde mittels der gleichen Plasmen wie zuvor schon für die Präzision in Serie durch 2 Messungen an 5 Tagen bestimmt. (n=2*5) Auch hier war eine AIT für das pathologische Kontrollplasma nicht bestimmbar. Die Gerinnungszeiten der pathologischen Probe für die AIT zeigten folgende Eigenschaften der Präzision: Mittelwert=72,35 s, s=5,65 s, VK=7,81%

Die Verhältnisse der VK der einzelnen Methoden bestätigen, dass was sich bereits in der Bestimmung der Präzision in Serie gezeigt hat: Mit 42,18% ist der VK der AIT unakzeptabel. ProC misst präziser als Coatest mit F V-MP. Danach folgen Coatest ohne F V-MP und APC Response. Die APC-Sensitivität lieferte höhere VK als die APC-Ratio.

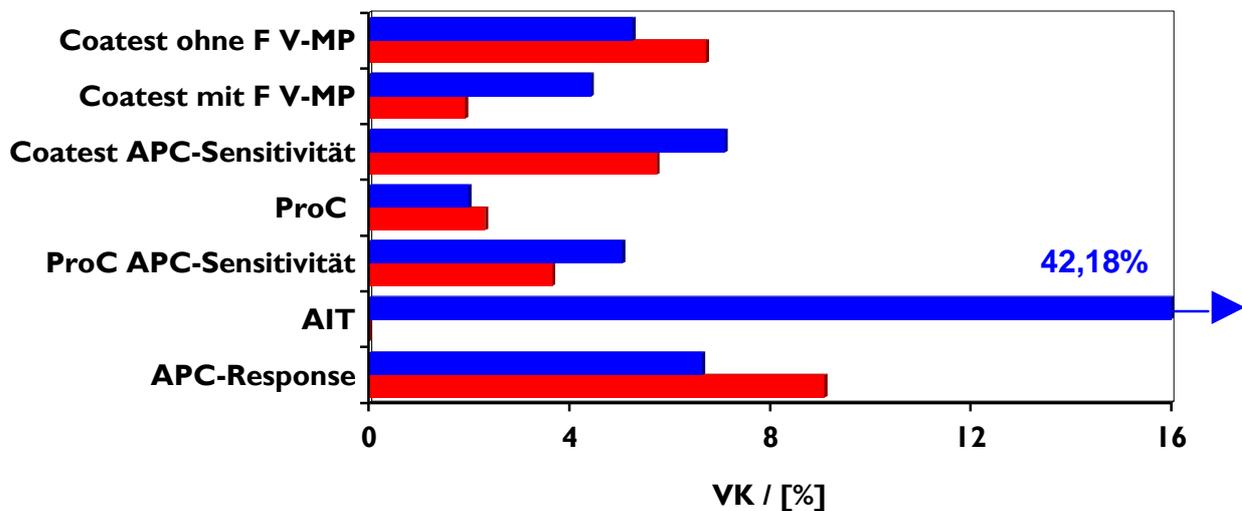
Tabelle 26 Präzision Kontrollplasma N (Normalplasma) n=2*5

Testverfahren	Auswertung	Mittelwert	s	VK
Coatest ohne FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	3,83	0,20	5,26%
	normierte APC-Ratio	1,12	0,06	5,26%
Coatest mit FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	2,37	0,11	4,43%
	normierte APC-Ratio	2,09	0,09	4,43%
	APC-Sensitivität	86,17%	6,12%	7,10%
ProC	APC-Ratio	2,27	0,05	1,99%
	normierte APC-Ratio	1,79	0,04	1,99%
	APC-Sensitivität	91,01%	4,59%	5,05%
AIT	Akzelerininaktivierung	92,03%	38,82%	42,18%
Immunochrom	APC-Response	2,63	0,17	6,64%

Tabelle 27 Präzision APC-Kontroll von Behring (pathologisch) n=2*5

Testverfahren	Auswertung	Mittelwert	s	VK
Coatest ohne FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	3,05	0,20	6,72%
	normierte APC-Ratio	0,89	0,06	6,72%
Coatest mit FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	1,72	0,03	1,92%
	normierte APC-Ratio	1,51	0,03	1,92%
	APC-Sensitivität	34,02%	1,95%	5,74%
ProC	APC-Ratio	1,49	0,03	2,32%
	normierte APC-Ratio	1,18	0,03	2,32%
	APC-Sensitivität	33,09%	1,21%	3,66%
AIT	Akzelerininaktivierung	<0%		
Immunochrom	APC-Response	2,24	0,20	9,08%

Abbildung 47 Präzision von zu Tag (n=2*5) im grafischen Vergleich
 Blau ist jeweils die Präzision bei Messung eines normalen und rot bei Messung eines pathologischen Kontrollplasmas dargestellt.



Zusammenfassend kann man an den zur Bestimmung der Präzision ermittelten Daten sehen, dass die beiden Coateste und der Behringtest eine akzeptable Präzision liefert. Der chromogene APC-Response-Test stellt sich hier weniger überzeugend dar. Der AIT zeigt eine so schlechte Präzision, dass seine Verwendung nicht empfohlen werden kann.

3.2.5 Heterozygotie für Faktor V Leiden

Zur Untersuchung standen lediglich Plasmen dreier Patienten mit nachgewiesenem heterozygoten Faktor V Leiden zur Verfügung. Die Hersteller empfehlen als cut-off, ab dem ein Patient zusätzlich zur APC-Resistenz auf ein Faktor V-Leiden genetisch untersucht werden sollte, den Mittelwert eines zuvor untersuchten Referenzkollektives weniger zweier Standardabweichungen, obwohl die Resultate dieses Kollektives nicht in jeden Fall normalverteilt sind. HINTZ et al. fordert jedoch für die von ihm entwickelte Akzelerininaktivierung einen cut-off von 50%. Diese cut-offs stellt Tabelle 28 im Vergleich zu den Messergebnissen der drei Plasmen dar.

Dabei zeigte sich, dass die beiden APTT-Modifikationen mit F V-MP-Vorverdünnung (Coatest mit F V-MP und ProC) sowohl mittels APC- Ratio als auch mittels APC-Sensitivität alle Plasmen als pathologisch erkennen. Das selbe ist bei dem AIT der Fall.

Mittel Coatest ohne F V-MP wurde ein Patient nicht als pathologisch erkannt. Im Falle der APC-Response waren dies sogar zwei.

Tabelle 28 APC-Resistenz: Messung dreier F V Leiden heterozygoter Patienten

Messungen, die keine Werte unterhalb des cut-offs ergeben haben, sind **rot** dargestellt.

Testverfahren	Auswertung	cut-off	1. Pat.	2. Pat.	3. Pat.
Coatest ohne FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	2,55	2,16	2,64	2,16
	normierte APC-Ratio	0,74	0,65	0,79	0,65
Coatest mit FV-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	2,17	1,52	1,57	1,62
	normierte APC-Ratio	0,87	0,61	0,63	0,65
	APC-Sensitivität	70,8%	32,1	28,7	28,7
ProC	APC-Ratio	2,20	1,50	1,57	1,67
	normierte APC-Ratio	0,85	0,57	0,61	0,64
	APC-Sensitivität	86,9	46,5	42,8	47,0
AIT	Akzelerininaktivierung	50 %	31,7	16,5	14,3
Immunochrom	APC-Response	1,84	1,52	1,86	1,88

Alle Patienten waren gesund, nicht oral antikoaguliert und wiesen einen normalen Quick und eine normale APTT ohne Hinweis auf einen wesentlichen F V-Mangel auf. Trotzdem detektiert im Falle des 2. Patienten der Coatest ohne FV-MP die APC-Resistenz nicht. Coatest mit FV-MP, ProC APC und AIT weisen bei allen dreien eine APC-Resistenz nach. Die APC-Response versagt in 2 von 3 Fällen und scheint nicht geeignet zu sein, einen heterozygoten FV Leiden-Träger zu erkennen.

3.2.6 Verdünnungsreihe: Plasma einer F V Leiden-homozygoten Patientin mit Poolplasmas

Das Plasma einer Patientin, welche homozygot für einen F V Leiden war, wurde im Verhältnis 0+5, 1+4, 2+3, 3+2, 4+1 und 5+0 mit Poolplasma gesunder Spender gemischt und mit den zu untersuchenden Methoden gemessen.

Bei der Untersuchung des Coatest ohne F V-MP (Abbildung 48) zeigte sich ein linearer Abfall der APTC bei weitgehend konstanter APTT ohne APC-Zusatz. Ab der 2+3-Verdünnungsstufe verlässt die APC-Ratio den Normbereich. Das Poolplasma besitzt eine Ratio von 3,43. Der Bereich, der einer F V Leiden-Heterozygotie entsprechen sollte (2+3- bzw. 3+2-Verdünnung) liegt bei einer Ratio von 2,57 bis 2,20. Die homozygote Patientin besitzt mit dieser Methode eine APC-Ratio von 1,50. Im Unterschied dazu befindet sich schon die 1+4-Verdünnungsstufe beim Coatest mit F V-MP (Abbildung 49) und beim ProC (Abbildung 50) unterhalb des Referenzbereiches und dies sowohl, wenn man APC-Ratio als auch APC-Sensitivität betrachtet. Die APC-Ratio beträgt dabei für das Plasma der Patientin 1,13 für Coatest und 1,27 für ProC. Die APC-Sensitivität war entsprechend 6,93% bzw. 28,7%. Für das Poolplasma ist die APC-Ratio 2,48 (Coatest) bzw. 2,58 (ProC), die APC-Sensitivität 98,9% bzw. 96,4%. Im Bereich der Heterozygotie (2+3- bis 3+2 Verdünnung) zeigt Coatest eine Ratio von 1,63 bis 1,51 und eine APC-Sensitivität von 39,0% bis 31,5%, während ProC hier eine Ratio von 1,79 bis 1,50 und eine APC-Sensitivität von 57,5% bis 41,2% liefert.

Der AIT (Abbildung 51) lieferte eine leicht konkave Kurve und maß das Poolplasma mit 97,7% und die Patientin mit 1,71%. Im Bereich, der für eine heterozygote

Mutation zu erwarten wäre (2+3- bzw. 3+2-Verdünnung), ergab sich eine Akzelerininaktivierung von 24,9% bzw. 14,7%.

Die APC-Response (Abbildung 52) verlässt erst mit der 3+2-Verdünnungsstufe ihren Referenzbereich. Dadurch überlappt sich dieser teilweise mit dem Bereich der Heterozygotie (2,19 bis 1,98). Für das Poolplasma ergibt sich eine APC-Response von 3,27, für das Plasma der homozygoten Patientin 1,66. Auffallend ist auch, dass nicht nur die Extinktionskinetik des Testansatzes mit APC zum Patientenplasma hin zunimmt, sondern, dass dieses auch in abgeschwächter Form beim Testansatz ohne APC auftritt.

Abbildung 48 Coatstest APC Resistance ohne F V-MP-Vorverdünnung:

Links ist der Normbereich für die APC-Ratio in grau eingezeichnet.

- Messzeit des Testes mit APC
- Messzeit des Testes ohne APC

- APC-Ratio
- normierte APC-Ratio

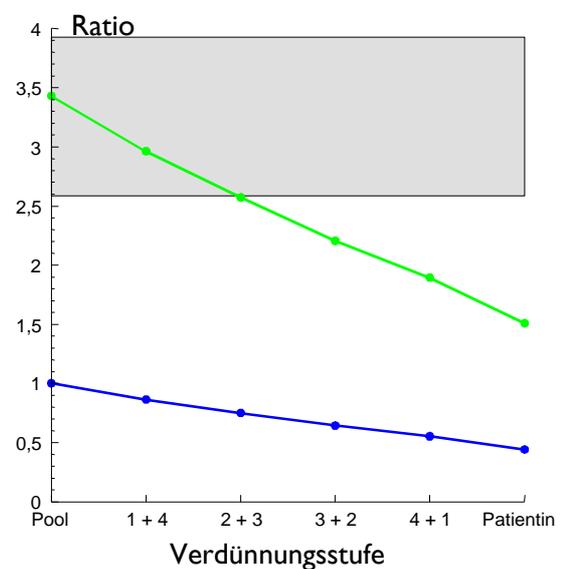
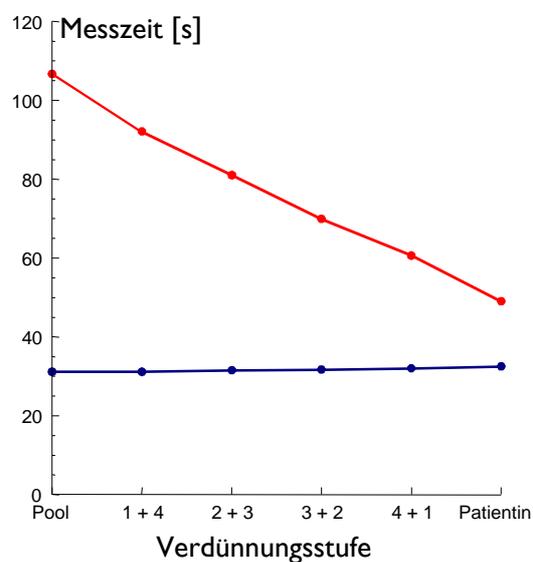


Abbildung 49 Coatest APC Resistance mit F V-MP-Vorverdünnung

Links ist der Normbereich für die APC-Ratio in Grau eingezeichnet.

- Messzeit des Tests mit APC
- Messzeit des Tests ohne APC
- APC-Ratio
- normierte APC-Ratio
- APC-Sensitivität

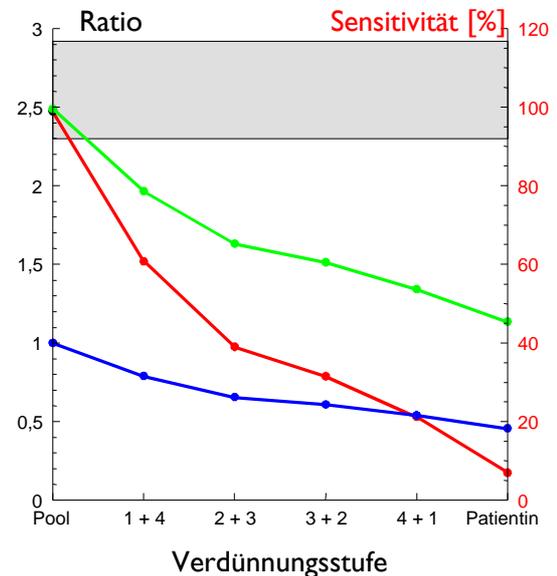
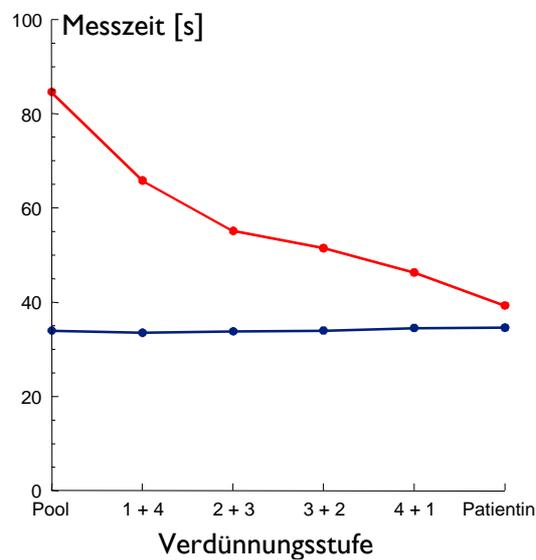


Abbildung 50 ProC APC

Links ist der Normbereich für die APC-Ratio in Grau eingezeichnet.

- Test ohne APC
- Test mit APC
- APC-Ratio
- normierte APC-Ratio
- Sensitivität

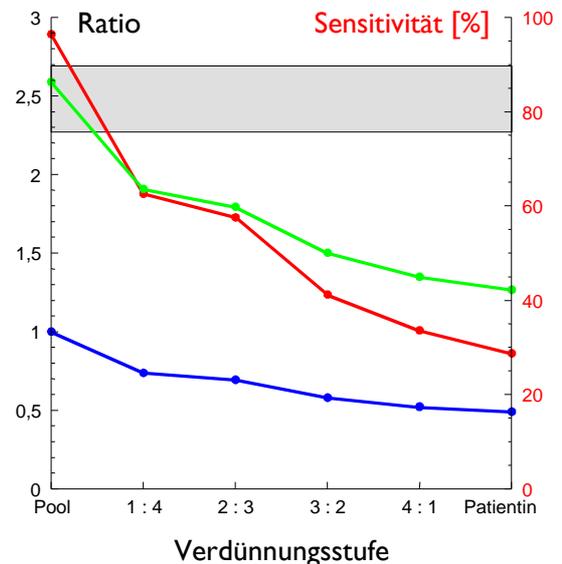
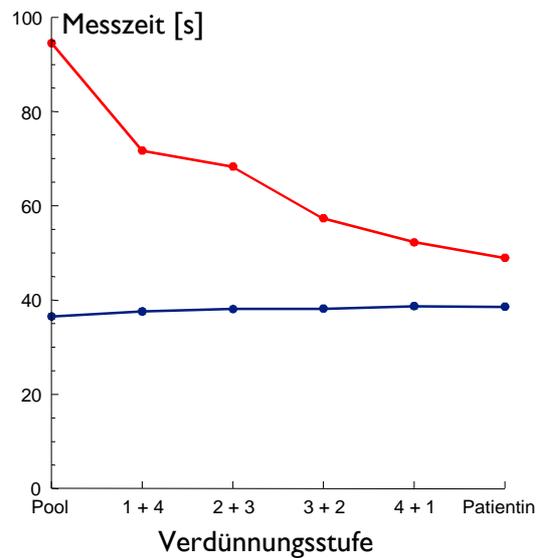
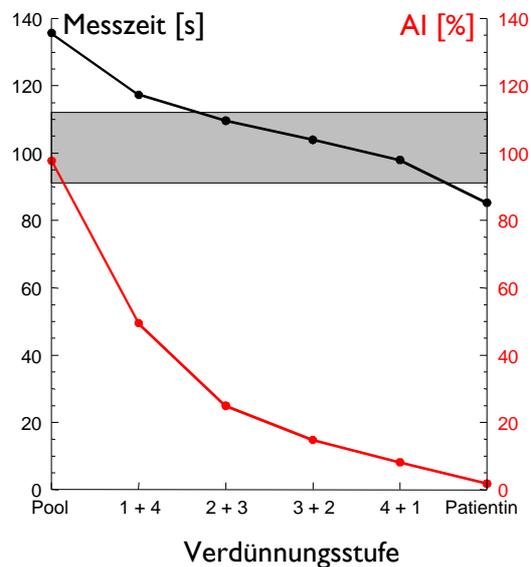


Abbildung 51 **Akzelerin-Inaktivierungs-Test:**

Der Normbereich für die Akzelerininaktivierung ist in Grau eingezeichnet.

● Messzeit

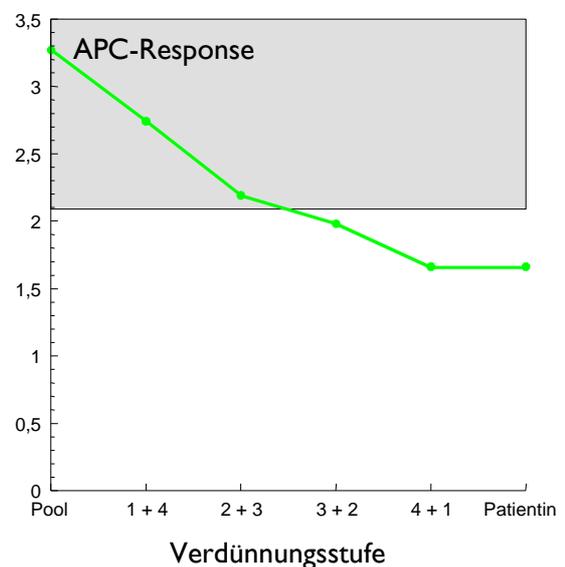
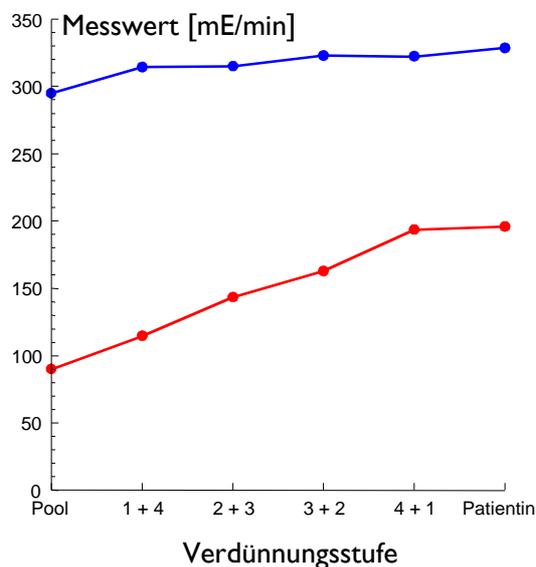
● Akzelerininaktivierung

Abbildung 52 **Immunochrom APC Response: Links ist der Normbereich für die APC-Ratio eingezeichnet.**

● Messwerte des Testes mit APC

● Messwerte des Testes ohne APC

● APC-Response



Alle Teste erkennen die homozygote FV Leiden-Trägerin und zeigen eine ausgeprägte APC-Resistenz an. Die meisten Teste liefern auch im Bereich, der den Resultaten eines heterozygoten FV Leiden-Trägers entsprechen würde, Ergebnisse unterhalb des Referenzbereiches. Lediglich die APC-Response zeigt hier, wie schon unter 3.2.6 beschrieben, dass eine APC-Resistenz, wie sie heterozygote FV Leiden-Träger aufweisen, durch diese Methode nicht nachgewiesen wird.

3.2.7 Störfaktor Lupusantikoagulantien

Mit Citratplasma von 23 Spendern mit pathologischem DRVVT wurde untersucht, in wie vielen Fällen es zu einem pathologischem bzw. – bei einem fehlenden Eintritt der

Gerinnung - zu keinem verwertbaren Ergebnis kam. Als pathologisch wurde ein Resultat dann bewertet, wenn es unterhalb des gewählten cut-offs lag. Dieser wurden bei allen Test als Mittelwert minus zwei Standardabweichungen festgelegt, mit Ausnahme des AIT, wo gemäß HINTZ et al. (1995) ein cut-off von 50% gewählt wurde. Mit der APC-Sensitivität (Coatest als auch ProC) und mit dem AIT zeigten sich keine falsch pathologischen Ergebnisse. Die APTC des ProC lieferte in drei Fällen keine detektierbaren Gerinnung, mit dieser Methode zeigte sich auch in einem anderen Fall eine pathologische APC-Ratio. Der Coatest mit F V-MP lieferte immer detektierbare Gerinnungszeiten, aber dafür in zwei Fällen eine pathologische Ratio. Die APC-Response lieferte fünf pathologische Ergebnisse.

Tabelle 29 Anwendung der Methoden zur APC-Resistenz bei 23 LA-haltigen Plasmen

Testverfahren	Auswertung	cut-off	Messbar und pathologisch	Nicht messbar
Coatest mit F V-MP-Vorverdünnung	APC-Ratio	<2,17	2	0
	APC-Sensitivität	<70,8%	1	0
ProC	APC-Ratio	<2,20	1	3
	APC-Sensitivität	<86,9	0	3
AIT	Akzelerininaktivierung	<50%	0	0
Immunochrom	APC-Response	<1,84	5	0

Die APC-Response von Immuno wird am stärksten von LA beeinflusst. Dies ist verständlich, da der für den Messablauf entscheidende Schritt der Aktivierung von F X durch F IX PL-abhängig ist. Die AIT ist wegen der hohen Verdünnung der Probe sehr unempfindlich gegenüber dem Störfaktor LA. Die APC-Sensitivität zeigt eine besser Spezifität als die Angabe als APC-Ratio. Da jedoch bei der Berechnung der APC-Sensitivität kein Vergleich mit der APTT ohne APC-Zugabe hergestellt wird, ist damit zu rechnen, dass bei der Kombination LA und APC-Resistenz die Verlängerung des Gerinnungstestes durch die LA eine Verkürzung durch die vorhandene APC-Resistenz ausgleicht. Dies würde die Sensitivität für eine APC-Resistenz bei Plasmen mit LA senken.

4 Diskussion

Die APTT stellt neben der Prothrombinzeit eine der häufigsten Analysen im hämostaseologischen Labor dar. Sie dient der Feststellung eines Mangel an Gerinnungsfaktoren im intrinsischen System und wird auch zur Analyse von Gerinnungsinhibitoren und von Lupusantikoagulantien eingesetzt. Außerdem ist sie APTT das häufigste Verfahren zur Therapieüberwachung bei Gabe von unfraktionierten Heparin und von Hirudin.

Die auf dem Markt befindlichen Methoden zur Bestimmung der APTT unterscheiden sich deutlich und ihre Vergleichbarkeit ist mangelhaft. Dies wird zum einen deutlich, wenn Ringversuchsergebnisse (Tabelle 1, Seite 1) als auch bei den Ergebnisse dieser Studie Referenzbereiche und Empfindlichkeit für Faktorenmangel, Heparin und Lupusantikoagulanzen betrachtet werden. Neben der unterschiedlichen Inkubationszeit und der CaCl_2 -Konzentration unterscheiden sich die auf dem Markt vorhanden Methoden der APTT durch die verwendeten Phospholipide, den Oberflächenaktivator und den verwendeten Analyser:

4.1 Methodische Unterschiede der APTT

Viele Firmen bieten Reagenzien in unterschiedlichen Zusammensetzungen der verwendeten Phospholipide und des Oberflächenaktivators an. Diese werden an unterschiedlichen Analysern desselben oder anderer Hersteller eingesetzt. Dieses sind jedoch Faktoren, welche die Eigenschaften der zu bestimmten Gerinnungszeit entscheidend beeinflussen.

4.1.1 Phospholipide

Phospholipide dienen als Ko-Faktoren bei der Aktivierung von F X durch F IXa und F VIIIa und bei der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin durch F Xa und Va. (Abbildung 2, Seite 3). Die Verlängerung der APTT bei Anwesenheit von Lupusantikoagulanzen beruht auf einer Komplexierung der Phospholipide durch diese besonderen Antikörper. Daher wird verständlich, dass die Auswahl der verwendeten Phospholipide eine wichtige Rolle für die Faktoren- als auch für die Lupusantikoagulanzenempfindlichkeit spielt. So bewirkt eine hohe Phospholipidkonzentration eine geringere Sensitivität für Lupusantikoagulantien (STEVENSON et al. 1986). Ein hoher Anteil an Phosphatidylcholin und ein niedriger Anteil an Phosphatidylserin verbessert die Empfindlichkeit gegenüber einem Mangel an F VIII. Entscheidend für eine hohe Faktorenempfindlichkeit ist auch die Struktur der Liposomen, in welcher die Phospholipide angeordnet sind. So zeigen Reagenzien mit einem definierten einheitlichen Liposomenaufbau eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Faktorenmangel und Heparin-gabe als Reagenzien mit Liposomen in unregelmäßiger Größe.

4.1.2 Oberflächenaktivator

Der Einfluss des verwendeten Oberflächenaktivators wurde von HELLSTERN (1989) herausgestellt. Er fand, dass Ellagsäure zu kürzeren Gerinnungszeiten als Kaolin führt. SMITH et al. (1985) beschreiben, dass eine Methode mit Ellagsäure empfindlicher auf einen Faktorenmangel reagiert als bei Verwendung des Oberflächenaktivators Silikat. Dies können die Daten dieser Studie aber nicht bestätigen, da sich in unseren Verdünnungsreihen ein Reagenz, Pathromtin SL, welches gerade eben Silikat verwendet, als am empfindlichsten zum Nachweis eines Faktorenmangels herausstellte. BABSON et al. (1974) veröffentlichten, dass ein Reagenz mit Ellagsäure im Vergleich zu einem mit kolloidalen Silikaten weniger empfindlich für F X- und F XII- Mangel war. Das Silikat-Reagenz war hingegen empfindlicher bei Detektion niedriger Heparinspiegel. Insgesamt existiert also keine

einheitliche Meinung, in wie weit der Oberflächenaktivator die Empfindlichkeiten des Reagenzes beeinflusst. In der vorliegenden Studie zeigte jeweils ein Reagenz mit Silikat als Aktivator die beste bzw. die schlechteste Empfindlichkeit für einen Faktorenmangel. Offenbar bestimmt der Aktivator in erster Linie die Dauer der APTT von Normalprobanden, während die Empfindlichkeit für Faktorenmangelzustände von der Phospholipidzusammensetzung abhängig ist. Unterstrichen wird dies auch durch den Befund in dieser Studie, dass APTT-Methoden mit ähnlichem Kontaktaktivator sehr unterschiedlich miteinander korrelieren können. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass andere Faktoren die Empfindlichkeit für einen Faktorenmangel oder eine Heparinabgabe in Wesentlichen beeinflussen.

4.1.3 Analysator

Auch der verwendete Analysator kann entscheidend für die Eigenschaften einer APTT-Methode sein. Der BCT liefert bei allen auf ihm getesteten Reagenzien kürzere Gerinnungszeiten als der BFA. Besonders deutlich wird dies beim Neothromtin mit einem Unterschied der Mediane von fast 5 Sekunden. Die entscheidende Rolle spielt mit großer Wahrscheinlichkeit die unterschiedliche Detektionsmethode der beiden Analyser: Anscheinend reagiert die photometrische Methode des BCT sehr empfindlich auf die Trübung durch die beginnende Bildung eines Fibrinoclots. Schon geringere Abweichungen der Extinktion von der Baseline werden als Ende der Messung bewertet. Die optomechanische Methode des BFA hingegen detektiert erst den vollständig ausgebildeten Fibrinoclot. Dieser führt dann zu Spannungsveränderung an der Fotozellen durch die mechanische Bewegung des Gerinnsels im Strahlengang. Wichtig für Qualität einer APTT-Methode ist, dass sich das Reagenz für die verwendete Detektionsmethode eignet. Dies war in dieser Untersuchung bei Pathromtin jedoch nicht der Fall, welches sich aufgrund seiner starken Trübung durch Kaolin bei der photometrischen Gerinnungsdetektion Probleme bereitet. Wurde diese und keine optomechanische verwendet, folgte eine Verminderung der Sensitivität für Faktormangelzuständen und eine Überempfindlichkeit für Heparin. Eine Verwendung von trüben Reagenzien kann daher auf photometrischen arbeitenden Geräten nicht empfohlen werden. Ebenso bereiten trübe Proben diesem Detektionsverfahren Probleme. Im Gegensatz dazu hatte bei Verwendung des klaren Reagenzes Pathromtin SL ein Wechsel des Analysators und damit der Detektionsmethode zwar eine Änderung des Referenzbereiches zur Folge, doch war die Empfindlichkeit für einen Faktorenmangel an beiden Geräten vergleichbar. Allerdings ergaben sich dann Unterschiede, wenn eine größere Menge Heparin in vitro dem Plasma zu gegeben wurde. Die photometrische Methode wies hierbei längere Zeiten als die optomechanische auf. An Hand von drei Plasmen, die in 340 Laboratorien parallel gemessen wurden, konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Ratio aus der APTT eines Patientenplasmas zu einem Normalplasma zu etwa 94% auf unterschiedliche Reagenzien zurückzuführen sei und 6% auf die unterschiedlichen Detektionsmethoden (NAGHIBI et al. 1988). Auch haben schon Veränderungen am Auswertalgorithmus bei der optischer Detektion einen Einfluss auf die Dauer der gemessenen APTT. Dieser Effekt tritt sowohl auf, wenn die Art des Algorithmus als auch die Schwellwerte verändert werden. Daher ist bei jeder Änderung des Detektionsverfahrens einschließlich des Detektionsalgorithmus der Referenzbereich erneut zu evaluieren. (HEINS und REINAUER 1996)

Durch die Ergebnisse in Kapitel 3.1.2 (Seite 18) und 3.1.3 (Seite 19) konnte gezeigt werden, dass die Verwendung eines vollautomatischen Analysegerätes, sei es ein photometrisch oder ein optomechanisch arbeitender Analyser, zu

zufriedenstellenden Ergebnissen hinsichtlich der intra- als auch interassay-Präzision führt, welche den VK manueller Methoden deutlich unterschreiten. Von einer Doppelbestimmung der APTT für Routineproben kann daher heutzutage auch aus Kostengründen abgesehen werden.

4.2 Bisherige Ansätze einer Standardisierung

4.2.1 Versuch der Normierung der Referenzbereiche: APTT-Ratio und APTT-Quotient

Die Referenzbereiche sind sowohl von der Zusammenstellung des Reagenz als auch vom verwendeten Analyser abhängig. Deshalb muss an den Herstellern der hier untersuchten Reagenzien Kritik geübt werden, da sie nicht in ihrer Reagenzbeschreibung mitteilen, wann und an welchen Geräten ihr Referenzbereich ermittelt worden ist. Möglicherweise erklärt dies auch zum Teil, warum die Ergebnisse dieser Studie sich von den Herstellerangaben (Tabelle 13, Seite 17) unterscheidet:

Selbst Behring-Reagenzien gemessen auf zwei Behring-Analysern zeigen Abweichungen zwischen den Ergebnissen dieser Studie und den Herstellerangaben. Zumindest im Falle des Neothromtin kann dies nicht nur statistisch bedingt sein. Daher unterstreicht die vorliegende Arbeit noch einmal, was auch schon von KOEPKE et. al (1995) und Köhler (1995) gefordert worden ist: Der Referenzbereich des Herstellers ist im anwendenden Labor an einer Referenzpopulation (mindestens 40 Probanden) zu überprüfen, bei Abweichung muss ein eigener Referenzbereich ermittelt werden.

Auch die Referenzbereiche angegeben als APTT-Ratio entsprechen sich nicht. Auffallend ist hier besonders das Verhalten von Neothromtin, welches am BCT den engsten (Differenz 95. zu 5. Perzentil = 0,190), am BFA hingegen den weitesten Bereich liefert. (0,292) Das bedeutet, allein durch ein Wechsel des Analysegerätes kann sich die Breite des Referenzbereiches um 54% erweitern. Bei den anderen Methoden liegt diese Weite zwischen 0,206 und 0,270. Folglich ist auch die APTT-Ratio nicht dazu geeignet, vergleichbare Referenzbereiche zu erzeugen. Ihr Einsatz bietet somit keinen wesentlichen Vorteil gegenüber der APTT in Sekunden mit gleichzeitiger Nennung des Referenzbereiches.

Gleiches würde auch für den in der DIN 58908 „Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT)“ (2000) genannten APTT-Quotienten gelten. Dieser wird berechnet, indem die APTT des Patientenplasmas ($APTT_p$) durch die APTT eines Kalibrationsplasmas ($APTT_n$) geteilt wird. Durch den Korrekturfaktor F wird noch der Unterschied der APTT des Kalibrationsplasma zum Referenznormalplasma ($APTT_r$) ausgeglichen:

$$APTT\text{-Quotient} = \frac{APTT_p}{APTT_n} \cdot F \qquad F = \frac{APTT_n}{APTT_r}$$

Würde man vereinfacht davon ausgehen, dass die APTT des Referenznormalplasma in etwa der Mitte des Referenzbereiches entspräche, so ließen sich dennoch nicht mit der Methode der Quotientenbildung die obere und untere Grenze des Referenzbereiches vereinheitlichen, da in die Formel die Spannbreite des Referenzbereiches nicht eingeht. Außerdem berücksichtigt diese Art der Vereinheitlichung auch nicht das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Methoden der APTT im pathologischen Bereich. Der Referenzbereich wird an

gerinnungsgesunden Personen gewonnen, die unterschiedlichen Eigenschaften der Methoden hinsichtlich Heparin-, Lupusantikoagulans-, Faktormangelsensitivität usw. werden durch den Referenzbereich alleine also nicht erfasst. Ein ähnlicher Referenzbereich zweier verschiedener Methoden hat somit keine Aussage über deren Vergleichbarkeit im pathologischen Bereich.

Die Verwendung der APTT-Ratio verbessert jedoch die Präzision von Messungen des gleichen Plasmas in verschiedenen Laboratorien, da mittels der APTT-Ratio eine gewisse Anpassung der Wertlage erfolgt. (NAGHIBI, 1988) Daher verwenden vor allen Dingen Ringversuchsorganisation die Ratio eines pathologischen Plasmas zu einem mitversandten Normalplasma zur Auswertung ihrer hämostaseologischen Ringversuche. Ob dies jedoch die Qualität der Analysen der Teilnehmer verbessert, ist fraglich, da somit lediglich im Ringversuch das Verhältnis der APTT zweier Proben zu einander untersucht wird. Eine komplette Verschiebung der Wertlage im normalen und pathologischen Bereich würde durch so eine Auswertung unerkant bleiben.

4.2.2 Versuche der Normierung der Überwachung der Heparintherapie

Der Umstand, dass auf dem Markt die unterschiedlichsten Reagenzien und Analysatoren mit verschiedenen Detektionsweisen verwendet werden, sowie das Fehlen eines Referenzreagenzes, haben bisher eine Standardisierung unmöglich gemacht. Dazu beigetragen hat auch die Tatsache, dass die APTT so vielen verschiedenen Einflüssen von Seiten des Untersuchungsgutes wie Faktorenmangel, Inhibitoren, Lupusantikoagulantien und Heparin unterliegt: Da eine Standardisierung für alle diese Einflussfaktoren gleichzeitig sich sehr schwierig gestaltet, versprach der Versuch einer Standardisierung der APTT von Patienten unter Heparintherapie mehr Erfolg, zu mal dies mit der International Normalized Ratio (INR) bereits für die Prothrombinzeit gelungen ist.

Die INR wurde von der Weltgesundheitsorganisation WHO 1983 eingeführt, um die Überwachung der Cumarintherapie zu vereinheitlichen. (Übersichten bei VAN DEN BESSELAER 1991, HIRSH 1991b, LOELIGER 1985) Bezugsgröße für die INR ist die Prothrombinratio, also der Quotient aus Thromboplastinzeit des Patienten durch die Thromboplastinzeit eines Normalplasmapools. Diese wird mit dem International Sensitivity Index des Thromboplastinreagenzes potenziert. Die ISI des ersten WHO-Standards entspricht dabei 1,0. Jedes andere Thromboplastin wird kalibriert, indem die Prothrombinratio von Normalplasmen und von Plasmen von Patienten unter Cumarintherapie gegen das WHO-Thromboplastin gemessen und in einem doppellogarithmischen System einander zugeordnet werden.

$$INR = \left(\frac{\text{Thromboplastinzeit des Patientenplasmas}}{\text{Thromboplastinzeit des Normalplamapools}} \right)^{ISI}$$

Diese Normierung der Prothrombinzeit ist allerdings nur anwendbar auf Plasmen, der Gerinnungszeitverlängerung allein auf eine stabile orale Antikoagulation zurückzuführen ist.

Der Versuch, dieses System auf die APTT bei heparinisierten Patienten zu übertragen, misslang jedoch. REED et al. verteilten 1994 fünf APTT-Reagenzien an 13 Laboratorien und ließen dort eine frische Normalplasmaprobe und Plasma von Patienten unter Heparintherapie analysieren. Unabhängig davon, welches Reagenz als Standardreagenz betrachtet wurde, lagen die Unterschiede der gewonnenen ISI der einzelnen Laboratorien und die Unpräzision innerhalb eines Labors und zwischen den Labors unakzeptabel hoch. REED et al. folgerten daraus, dass ein

solches System auf die APTT nicht übertragbar sei. Dies war auch schon 1986 von NAGHIBI et al. nach Untersuchungen mit verschiedenen APTT-Reagenzien an verschiedenen Analysen und mehreren Laboratorien gefunden worden. Sie konnten keine logarithmische Beziehung zwischen den einzelnen Methoden der APTT-Bestimmung finden. Auch wenn VAN DER VELDE et al. (1995) einen weiteren, angeblich positiven Versuch der Einführung eines Standardreagenzes und einer Kalibration nach dem Vorbild der INR unternahmen, so konnte sich dies ebenfalls nicht allgemein durchsetzen, da ihre guten Ergebnisse zwar für die drei untersuchten Reagenzien zutrafen, aber nicht auf die Vielzahl der auf dem Markt befindlichen übertragbar war.

Ein weiteres Problem stellt die fehlende Übertragbarkeit der Ergebnisse aus in vitro Verdünnungsreihen auf das Verhalten der Methoden bei Untersuchung von Proben heparinierter Patienten. Trotzdem wird diese Art der Testevaluation in der Standortbestimmung von KÖHLER et al. (1995) zumindest zum orientierenden Vergleich der Heparinsensitivitäten gefordert. Im Rahmen dieser Studie wurde das Reagenz Pathromtin sowohl mit in vitro heparinisierten Plasmen als auch mit Plasmen heparinierter Patienten untersucht, für welche die Heparinkonzentration mittels eines chromogenen Anti-F Xa-Assays bestimmt wurde. Dabei haben sich für den therapeutischen Bereich der Heparintherapie unterschiedliche Werte ergeben: Wenn man, wie BASU et al. (1972) den therapeutischen Bereich aus der oberen Referenzbereichsgrenze heraus berechnet, so ist dieser relativ weit. Auffallend ist auch, dass der durch den in vitro Versuch gewonnene Bereich kürzere Gerinnungszeiten beinhaltet als wenn dieser an Hand von Patientenplasmen mit linearer Regression zur Anti-F Xa-Aktivität gewonnen wird. (Tabelle 18, Seite 33) Ähnliche Ergebnisse sahen auch schon BAIN et al. (1980): Die Autoren konnten bei einer Untersuchung mit sechs APTT-Reagenzien, unter anderem auch Pathromtin, eine höhere Empfindlichkeit der APTT nachweisen, wenn in vitro zugesetztes Heparin statt Heparin aus Plasmen antikoagulierter Patienten bei gleicher Anti-F Xa-Aktivität gemessen wird. Zusätzlich haben VAN DER VELDE et al. (1995) ihre Versuche zu Standardisierung der Therapieüberwachung mittels APTT mit in vitro aufgestockten Plasmen durchgeführt, aber gleichzeitig in den teilnehmenden Labors ein Patientenplasma mit bekannter Anti-FXa-Aktivität untersuchen lassen. Auch hierbei ergaben sich niedrigere Resultate für die APTT des Patientenplasma als von den Daten der in vitro Studie erwartet werden müsste. Zum selben Ergebnis kommt noch eine weitere Studie mit in vitro und ex vivo Proben. (VAN DEN BESSELAAR et al. 1990)

Der Unterschied zwischen der in vitro und ex vivo Heparinempfindlichkeit scheint bei den einzelnen Methoden verschieden stark ausgeprägt ist. So fanden KITCHEN et al. (1996) bei Vergleich britischer Ringversuche mit in vitro heparinisierten Proben und Plasmen heparinierter Patienten, dass die Methode, welche die höchste APTT-Ratio bei in vitro heparinisierten Proben aufweist, eine niedrige Response für das Heparin in Plasmen heparinierter Patienten besitzt als ein in der in vitro Verdünnungsreihe mäßig sensitives Reagenz. Die Ergebnisse aus Aufstockungsversuchen von Heparin in Normalplasmapools sind daher ungeeignet, einen therapeutischen Bereich für die jeweilige APTT-Methode zu ermitteln. Die auf diese Weise gewonnenen Daten sind in ihrer Aussagekraft in hohem Maße eingeschränkt.

In aktuell gültigen Leitlinien empfiehlt das College of American Pathologists (CAP) (OLSON et al. 1998), dass der therapeutische Bereich für jede APTT-Methode zu bestimmen ist, indem in Plasmen von Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen die APTT und die Anti-F Xa-Aktivität gemessen wird und dann durch

lineare Regression der Bereich der APTT berechnet wird, welcher einer Anti-F Xa-Aktivität von 0,3 IE/ml bis 0,7 IE/ml entspricht. Als Alternative wird außerdem vorgeschlagen, zwischen dem einzuführendes und dem bisher verwendeten APTT-Reagenz mit Hilfe dieser Plasmen einen Methodenvergleich durchzuführen und die bisherigen Bereiche dann zu übernehmen, wenn sich beide Methoden als vergleichbar darstellen. Die in Kapitel 3.1.5 (Seite 27) dargestellten Methodenvergleiche an Plasmen heparinierter Patienten verdeutlichen jedoch, wie selten dies der Fall ist und daher wieder auf den Vergleich Anti-F Xa-Aktivität APTT zu gegriffen werden muss.

Auch die Leitlinien des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, Approved Guideline 1996) sehen eine Bestimmung des therapeutischen Bereiches an Hand der Bestimmung von APTT und Anti-F Xa-Aktivität von Plasmen heparinierter Patienten vor. Eine Bestimmung mittels einer in vitro Verdünnungsreihe wird in dieser Leitlinie noch als gleichwertig angesehen, was jedoch wegen den Ergebnissen dieser Studie und der anderen hier dargestellten Literatur abgelehnt werden muss. Im übrigen liefert die deutsche Norm DIN 58908 zur Bestimmung der APTT keinen Hinweis zur Bestimmung eines therapeutischen Bereiches.

Die Standardisierung der Heparintherapie im Sinne eines INR/ISI-System wird von einigen Autoren eher für ein untergeordnetes Problem gehalten (z. B. EBY 1997). Immer häufiger wird ein niedermolekulares statt eines unfraktionierten Heparins verwendet. Diese bedürfen in der Regel nicht einer Therapieüberwachung und werden zudem nicht adäquat von der APTT erfasst. EBY schlägt vor, die Zusammenarbeit von Industrie und Laboratorien dahingehend zu verbessern, dass der laboreigene therapeutische Bereich kostengünstig mit Hilfe von versandten Plasmen heparinierter Spender bestimmt werden kann. Diese Forderung nach kommerziell erhältlichen Patientenplasmen mit bekannter Anti-F Xa-Aktivität ist jedoch auch heute noch nicht erfüllt.

4.2.3 Verwendung der APTT zum Nachweis von Lupusantikoagulantien

Eine Verlängerung der APTT kann auch durch ein sogenanntes Lupusantikoagulans (LA) bedingt sein. Wie in Kapitel 3.1.6 (Seite 33) dokumentiert und durch andere Autoren (MANNUCCI et al. 1979, ADCOCK et al. 1992, Hartung et al. 1997) beschrieben, ist die Sensitivität für LA sehr von der verwendeten Methode abhängig. Allerdings darf die Diagnostik des LA nicht alleine durch die APTT erfolgen. Aufgrund der geringen Sensitivität eines einzelnen Testes wird empfohlen, mindesten zwei (besser drei) unterschiedliche phospholipidabhängige Teste hierfür zu verwenden. (BRANDT et al. 1995) Dies können zum Beispiel eine LA-empfindliche APTT, eine verdünnte Schlangengiftzeit (DRVVT) oder eine Kaolin Clotting Time (KCT) sein. Die APTT besitzt zwar in Bezug auf die Erkennung von LA die höhere Sensitivität als der DRVVT, dafür ist dieser aber spezifischer. (ALVING et al. 1992) Hohe F VIII-Aktivitäten, wie z. B. während der Schwangerschaft oder in einer akuten Phase einer bakteriellen Infektion, können ein LA maskieren. (BLANCO et al. 1993, BRANDT JT 1991)

Zur Diagnostik des LA gehört auch die Verdünnung des Patientenplasmas mit Normalplasma und Wiederholung der Teste, um so die Existenz eines Inhibitors nachzuweisen. Während ein Faktorenmangel durch Mischung mit einem Normalplasma in seiner Konsequenz für die Gerinnungszeit zum größten Teil ausgeglichen wird, bleibt die Wirkung eines Gerinnungsinhibitors auch im Plasmatauschversuch bestehen. In einem dritten Schritt muss die Phospholipidabhängigkeit dieses Inhibitors dargestellt werden: Durch Zugabe von

Phospholipiden in den Reaktionsansatz soll sich die Gerinnungszeit normalisieren. Dies kann bei einer pathologischen DRVVT eine DRVVT mit einem Überschuss an Phospholipiden im Reagenz sein oder bei einer pathologischen APTT eine APTT-Messung nach Zugabe von Phospholipiden oder mit einer LA-unempfindlichen APTT. Daher ist es für den Anwender von Bedeutung zu wissen, welches Reagenz LA-empfindlich bzw. -unempfindlich ist. Zum Screening reicht das erstere, während für die Bestätigung ein Plasmatauschversuch und eine Untersuchung mit LA-unempfindlichen Reagenz notwendig ist. Die Existenz von Reagenzien unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber LA ist daher, wenn sie in Kombination angewendet werden, für diese diagnostische Aufgabe von Vorteil.

4.3 Möglichkeiten der Standardisierung in der Zukunft

Die bereits erwähnte Methodenbeschreibung und die Definitionen von DIN sowie die Leitlinien der NCCLS geben nur einen groben Rahmen vor, wie eine APTT technisch durchzuführen ist. Die Art des verwendeten Thromboplastin, des verwendeten Kontaktaktivators, die CaCl_2 -konzentration des Startreagenzes, die Inkubationsdauer und die Methode zur Gerinnseldetektion sind frei wählbar. Dadurch existiert auf dem Markt eine große Zahl von Methoden, die in ihren Eigenschaften nicht vergleichbar sind und auch nicht durch mathematische Methoden (z. B. analog zur INR) vergleichbar gemacht werden können. Es sind nur die Ergebnisse einer APTT vergleichbar, welche aus dem selben Labor stammen, da in der Regel dem beurteilenden Kliniker weder das verwendete APTT-Reagenz noch dessen besonderen Eigenschaften bekannt sind. An Hand des gleichzeitig mitgeteilten Normbereiches lässt sich allenfalls eine grobe Einteilung in normal und pathologisch treffen, wobei jedoch die eine Methode im individuellen Fall einen leichten Faktorenmangel oder ein schwaches LA erkennen kann und die andere nicht. Da sich die Unterschiede der Methoden in erster Linie durch die unterschiedlichen Reagenzien erklären (NAGHIBI et al. 1988), wäre die Festlegung eines Referenzreagenzes der erste und wichtige Schritt für eine Standardisierung und eine Vergleichbarkeit der APTT. Dieses müsste jedoch folgende Eigenschaften besitzen:

- **Anwendbarkeit an verschiedenen Analysesystemen:** Das Referenzreagenz sollte klar sein, und sowohl an mechanischen wie auch an optischen Systemen vergleichbare Ergebnisse zu führen.
- **Nur synthetische Bestandteile:** Reagenzien mit Bestandteilen biologischen Ursprung unterliegen einer natürlichen Variabilität. Daher sind unterschiedliche Eigenschaften von Charge zu Charge möglich. (ROSBOROUGH 1998) Die artifizielle, genau vorgegebene Produktion des gleichen partiellen Phospholipids und des gleichen Oberflächenaktivators wären die Eigenschaften des so erhaltenen Reagenzes unabhängig von Produktionszeitpunkt und Produktionsort.
- **Hohe Empfindlichkeit gegenüber Faktorenmängeln und für Lupusantikoagulanzen, einen gut definierten therapeutischen Bereich für Heparin und Hirudin:** Ansonsten hätte ein nicht standardisiertes Reagenz Vorteile gegenüber dem Referenzreagenz, was dadurch besonders auf internationaler Ebene (ISO, WHO) eine Durchsetzung verhindern würde.
- **Fehlender Patentschutz:** Das Reagenz sollte von möglichst vielen Diagnostikaherstellern produziert werden.

Eine solche Forderung nach einem einheitlichen APTT-Reagenz ist jedoch nur schwer durchzusetzen, da andere wirtschaftliche Gründe diesem entgegenstehen.

Auch wäre die Standardisierung erst dann perfekt, wenn die gleiche Detektionsmethode mit dem gleichen Auswertalgorithmus angewendet würde. Bis dahin sind wenigsten Mindestanforderungen an die Präzision und die Empfindlichkeit einer zugelassenen APTT-Methode zu stellen. Auch sollte es vermieden werden, dass, wie im Bereich des Universitätsklinikums Düsseldorf, innerhalb einer Institution verschiedene APTT-Reagenzien zur Anwendung kommen. Die Einführung eines APTT-Reagenzes in ein Labor bedarf einer genauen Evaluierung. An Hand von Plasmen gesunder Spender ist zu überprüfen, ob der vom Hersteller ermittelte Referenzbereich übertragbar auf das Labor oder ob durch Berechnung der Perzentile ein eigener festzulegen ist. Die Bestimmung des therapeutischen Bereiches der Heparintherapie könnte dadurch vereinfacht werden, dass aus den Laboratorien Patientenplasmen mit bereits gemessener Anti-F Xa-Aktivität zur Verfügung gestellt werden. Durch deren Messung ließe sich mit vertretbarem Aufwand der therapeutische Bereich festlegen. Die bisher verwandte Verdünnungsreihe eines Normalpoolplasmas mit Heparin ist für die Festlegung des therapeutischen Bereiches nicht geeignet.

Möglicherweise wird sich der Bedarf einer Standardisierung der APTT vermindern, weil statt der unfraktionierten vermehrt niedermolekulare Heparine zum Einsatz kommen. Diese werden nicht mittels der APTT überwacht und weisen eine bessere Verträglichkeit bei gleichem klinischen Erfolg auf. (LENSING et al. 1995) Außerdem könnten spezifischere Methoden der Therapieüberwachung wie die chromogene Anti-F Xa-Bestimmung günstiger und verfügbarer werden.

4.4 Anwendbarkeit der Modifikation der APTT zur Diagnostik der APC-Resistenz

Einige der in dieser Studie untersuchten Methoden wiesen Probleme auf, die ihre Praktikabilität in großem Maßstab einschränken und deren Verwendung daher nicht empfohlen werden kann:

Die Akzelerininaktivierung zeichnet sich durch eine sehr hohe Unpräzision und eine komplizierte Kalibration aus. Sie ist daher für den praktischen Einsatz weniger geeignet als die APTT-Ratio mit F V-MP-Vorverdünnung. Seit ihrer Vorstellung 1995 (HINTZ et al. 1995) fand sie daher auch lediglich Anwendung durch die gleiche Arbeitsgruppe (HORSTKAMP et al. 1996).

Die APC-Response, welche auf einer chromogenen Bestimmung der F VIII-Aktivität in An- und Abwesenheit von APC beruht, differenziert nicht ausreichend zwischen Gesunden und heterozygoten F V Leiden-Trägern. Dies wurde sowohl in der Verdünnungsreihe einer homozygoten Merkmalsträgerin mit Normalplasma als auch bei Untersuchung der drei Plasmen heterozygoter Spender deutlich. Auch in einer Studie, in welcher insgesamt 13 Methoden miteinander verglichen wurden, fand sich mit dieser Methode ein großer Überlappungsbereich der Resultate beider Kollektive. (TRIPODI et al. 1996) Zudem zeigen die Ergebnisse in dieser Arbeit, dass Lupusantikoagulantien in einem besonderen Maße die APC-Response beeinflussen. Eine APTT-abhängige Bestimmung der APC-Resistenz kann ohne F V-MP-Vorverdünnung nicht mehr empfohlen werden. Zunächst wurde die Vorverdünnung eingeführt, um Patienten unter oraler Antikoagulation untersuchen zu können. (JORQUERA et al. 1994) Durch diese Maßnahme ließ sich aber auch bei der Untersuchung anderer Patientenplasmen die Sensitivität und Spezifität in einem erheblichen Maße steigern. (SVENSON et al. 1996) Auch in dieser Arbeit zeigte sich ein heterozygoter F V Leiden-Träger ohne Faktorenmangel, welcher nicht durch den Coatest ohne F V-MP-Vorverdünnung erfasst wurde. Durch die 1+4-Verdünnung mit F V-MP kann der Einfluss eines Protein S-Mangels und einer erhöhten F VIII- oder F

IX-Aktivität auf die APC-Ratio in einem entscheidenden Masse vermindert werden. (KRAUS et al. 1995) Auch lässt sich durch diese Maßnahme Plasma mit einer Heparinkonzentration bis zu einer Anti-F Xa-Aktivität von 2 IE/ml sinnvoll untersuchen. Bei einem höheren Anteil sollte Heparin vor der Untersuchung neutralisiert werden. Somit besitzen lediglich neben einer Mutation des Faktors V ein Faktor V-Mangel, Lupusantikoagulantien und Hirudin in jedoch vermindertem Maße Einfluss auf die zu bestimmende APC-Ratio bei Verwendung der F V-MP-Vorverdünnung.

Nur zwei der untersuchten Methoden zur Bestimmung der APC-Resistenz können also zur Anwendung empfohlen werden: ProC APC von Behring und der Coatest APC Resistance mit F V-MP-Vorverdünnung. Beide bedienen sich einer F V-MP-Vorverdünnung und der APTT mit und ohne Zugabe von APC in das Startreagenz. Der Unterschied liegt somit im verwendeten Aktivatorreagenz und im F V-MP. Allerdings werden sowohl von im ProC APC-Kit verwendeten Pathromtin SL als auch von der Coatest APTT Silikate als Aktivator benutzt. Beide Teste wiesen in der vorliegenden Untersuchung eine ähnliche untere Normbereichsgrenze für die APTT-Ratio, als auch für die normierte APTT-Ratio auf. Die Präzision beider Methoden war akzeptabel und sowohl in der Verdünnungsreihe mit einem Plasma einer homozygoten Merkmalsträgerin und einem Normalplasma als auch bei der Untersuchung von Plasma dreier heterozygoter zeigten sich beide Methoden eine Sensitivität von 100%. Lupusantikoagulantien haben auf beide Teste einen störenden Einfluss, was sich jedoch weniger deutlich als bei der APC-Response ausprägt. Beim Verwendung des ProC APC bei LA-haltigen Plasmen zeigte in nur einem Fall eine pathologische Ratio in drei Fällen wurde die maximale Messzeit überschritten, weshalb keine APC-Ratio angegeben werden konnte.

Durch die Verwendung der normierten APC-Ratio, also der Angabe des Quotienten aus der APC-Ratio des untersuchten Plasmas durch die APC-Ratio eines Poolplasmas von Spender ohne F V Leiden, ergab sich kein Vorteil hinsichtlich der Unterscheidung von Trägern und Nicht-Träger der Mutation. Zum gleichen Ergebnis kommen auch TRIPODI et al. (1998) In dieser Arbeit wurde zudem noch auf die Gefahr einer reduzierten Sensitivität des Testes hingewiesen, wenn auch nur ein Spender im Poolplasma eine minderte APC-Resistenz aufweist. Daher muss bei Verwendung der normierten APC-Ratio sichergestellt werden, dass bei allen Spender genetisch ein F V Leiden ausgeschlossen ist.

Die Angabe der APC-Sensitivität in Prozent nach Kalibration mit zwei Plasmen beruht auf einem Vorschlag von Behring, wird aber in der Literatur nicht zur Beschreibung der APC-Resistenz verwendet. Die Verwendung der APC-Sensitivität bringt keinen Vorteil hinsichtlich einer Vereinheitlichung der Ergebnisse verschiedener Methoden. So wird der Unterschied der unteren und damit entscheidenden Referenzbereiche zwischen ProC APC und Coatest sogar noch vergrößert (APC-Sensitivität 91,2% zu 81,8% statt APC-Ratio 2,27 zu 2,30). Außerdem geht in die APC-Sensitivität lediglich das Testergebnis aus der APTC und nicht aus der unmodifizierten APTT ein. Somit haben Störfaktoren, die zu einer Verlängerung der APTC führen (Heparin, Lupusantikoagulantien, Hirudin, F V-Mangel) einen größeren Einfluss auf das Ergebnis, als wenn dieser durch die Division mit der APTT ohne APC-Zugabe herausgerechnet wird. Damit kann durch Verwendung der APC-Sensitivität ein Träger der F V Leiden Mutation, welcher diese Störfaktoren ausweist, nur mit einer geringeren Sensitivität als bei Verwendung der APC-Ratio erkannt werden.

Nicht untersucht wurden in dieser Studie neueren Methoden, die statt der APTT eine Schlangengiftzeit oder F Xa verwendeten. In einem Methodenvergleich konnte

gezeigt werden, dass sowohl diese als auch die APTT-Methoden mit F V-MP-Vorverdünnung eine 100% Sensitivität und Spezifität für den Nachweis des Faktor V Leiden aufweisen. Alle anderen Methoden wie der hier untersuchte auf Messung der F VIIIa basierende Test aber auch die APTT-basierenden Methoden ohne Vorverdünnung erreichten dies nicht. (TRIPODI et al. 1996)

Vor Einsatz teurer molekularbiologischer Diagnostik eignen sich die APTT-basierenden Methoden mit der F V-MP-Vorverdünnung als Screening in hervorragender Weise. Von Anwendung der APC-Sensitivität in Prozent, der Akzelerininaktivierung und dem APC Response Assay muss zumindest bei Anwendung auf dem BCT abgeraten werden. Die Verwendung der normierten APC-Ratio bringt keine Vorteile.

5 Zusammenfassung

Um die Vergleichbarkeit verschiedener Methoden zur Analyse der APTT zu überprüfen, wurden acht verschiedene kommerzielle APTT-Reagenzien an zwei verschiedenen Analysatoren mit optomechanischer (BFA) bzw. photometrischer Fibrinclotdetektion (BCT) untersucht:

Die Referenzbereiche und die Nachweisempfindlichkeit für einen Faktorenmangel im intrinsischen System, für Heparin und Lupusantikoagulantien waren reagenz- und geräteabhängig. Durch Bildung einer APTT-Ratio ließen sich die Referenzbereiche nicht vereinheitlichen. Mittels Neothromtin kann nicht zwischen einem leichten und einem klinisch relevanten Faktorenmangel unterschieden werden. Die Empfindlichkeit für einen F XII-Mangel ist bei den meisten Reagenzien schwächer ausgeprägt als für die anderen untersuchten Faktorenmängel. Lediglich Pathromtin SL weist an beiden Analysatoren hierfür eine hohe Empfindlichkeit auf und übertrifft auch beim Nachweis eines Mangels an F XI, F IX und F VIII die anderen untersuchten Reagenzien. Die Ergebnisse von in vitro Verdünnungsreihen können hinsichtlich der Heparinempfindlichkeit nicht auf die Resultate von Patientenproben übertragen werden. Für jede Methode muss ein eigener therapeutischer Bereich mit Hilfe von Plasmen heparinierter Patienten bestimmt werden. Auch die Lupusantikoagulanzeempfindlichkeit stellt sich in einer Verdünnungsreihe anders als bei Patientenplasmen dar.

Die Präzision der Methoden lag mit Ausnahme von Neothromtin und von APTT-L dank der vollständigen Analysenautomatisierung in einem akzeptablen Bereich.

Eine hohe Korrelation wurde beim Vergleich von Pathromtin SL am BFA und am BCT erreicht. Zwischen Methoden, welche denselben Oberflächenaktivator benutzten, ergaben sich sehr unterschiedliche Korrelationen. Der Korrelationskoeffizient veränderte sich, wenn der Vergleich statt an einen Kollektiv, dessen APTT-Verlängerung auf einer Heparinabgabe beruht, an einem Kollektiv nicht heparinierter Patienten durchgeführt wurde. Dies deutet auf unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit für Faktormangel und Heparin.

Eine Standardisierung der APTT unter Verwendung mathematischer Methoden ist mehrfach fehlgeschlagen. Um eine Vereinheitlichung über Mindestanforderungen an die APTT hinaus zu erreichen, müssten alle Hersteller ein chemisch einheitliches APTT-Reagenzproduzieren. Dieses sollte eine hohe Faktormangel- und eine hohe Lupusantikoagulanzeempfindlichkeit sowie eine definierte Empfindlichkeit für Heparin und Hirudin aufweisen, damit es in dieser Beziehung den zur Zeit auf dem Markt befindlichen Reagenzien nicht unterlegen ist. Bis dahin ist für jede APTT-Methode der Referenz- und der therapeutische Bereich sowie nach Möglichkeit die Nachweisempfindlichkeit für Faktormangel und Lupusantikoagulanzen zu evaluieren. Zumindest für ein Universitätsklinikum ist es notwendig, in allen angeschlossenen Laboratorien ein einheitliches Analysesystem durchzusetzen. Hilfreich wäre auch, wenn zur Bestimmung des therapeutischen Bereiches der Heparinabgabe Patientenplasmen mit bekannter Anti-F Xa-Aktivität kommerziell zu Verfügung stehen würden.

Untersucht wurden weiterhin vier Methoden zur Bestimmung der APC-Resistenz. Wegen ihrer hohen Sensitivität und Spezifität eignen sich hervorragend die APTT-basierenden Methoden mit F V-Mangelplasmavorverdünnung als Screeningteste vor Anwendung teurer genetischer Tests. Von der Verwendung von APTT-Modifikationen ohne F V-MP-Vorverdünnung, von der APC-Sensitivität, von der Akzelerinaktivierung und von Testen, welche auf Messung der F VIII-Aktivität beruhen, muss hingegen abgeraten werden.

Eine Anwendung der sogenannten normierten APC-Ratio besitzt keine Vorteile, da sich hiermit die Referenzbereiche nicht vereinheitlichen lassen und auch keine Verbesserung der Sensitivität oder Spezifität erreicht wird.

6 Literaturverzeichnis

- ADCOCK DM, MARLAR RA: Activated Partial Thromboplastin Time Reagent Sensitivity to the Presence of the Lupus Anticoagulant. *Arch Lab Med* 1992; 116: 837-840
- ALVING BM, BARR CF, TANG DB: Correlation between lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies in patients with prolonged activated partial thromboplastin time. *Am J Med* 1990; 88: 112-116
- ALVING BM, BARR CF, JOHANSEM LE, TANG DB: Comparison Between a One-Point Dilute Phospholipid APTT and the Diluted Russell Viper Venom Time for Verification of Lupus Anticoagulants. *Thromb Haemost* 1992; 67 (6) 672-678
- ASAKAI R, CHUNG DW: The molecular genetics of factor XI deficiency. *Baillères Clin. Haematol.* 1989; 2 (4): 787-799
- BABSON AL, BABSON SR: Comparative evaluation of a partial thromboplastin reagent containing a non-settling, particulate activator. *Am J Clin Pathol* 1974; 62: 856-860
- BAIN B, FORSTER T, SLEIGH B: Heparin and the Activated Partial Thromboplastin Time – A Difference between the In-vitro and In-vivo Effects and Implications for the Therapeutic Range. *Am J Clin Path* 1980; 668-673
- BAIN B, FORSTER T, SLEIGH B: Heparin and the activated partial thromboplastin time – a difference between the in vitro and in vivo effects and implications for the therapeutic range. *Am J Clin Pathol* 1980; 74: 668-673
- BARNA LK, TRIPLETT DA: A report on The First International Workshop for Lupus Anticoagulant Identification. *Clin Exp Rheuma* 1991; 9: 557-567
- BARRITT DW, JORDAN SC: Anticoagulant drugs in the treatment of pulmonary embolism. A controlled trial. *Lancet* 1960; I: 309-312
- BAR-SHAVIT R, ELDOR A, VLODAVSKY I: Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix: protection and expression of functional properties. *J Clin Invest* 1989; 84: 1096-1104
- BARTHELS M, POLIWODA H: Gerinnungsanalysen. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997
- BASU D, GALLUS A, HIRSH J, CADE J: A prospective study on the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *N Engl J Med* 1972; 287: 324-327
- BERTINA R, KOELEMAN BP, KOSTER T, ROSENDAAL FR, DIRVEN RJ, DE RONDE H, VAN DER VELDEN PA, REITSMA PH: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67

- BLANCO AN, GRAND BE, PIERONI G, PENALVA LB, VOTO LS, LAZZARI MA: Behaviour of diluted activated partial thromboplastin time in pregnant women with a lupus anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1993;100: 99-102
- BRACK MJ, MORE RS, HUBNER JB, GERSHLICK AH: The effect of low dose nitroglycerin on plasma heparin concentrations and activated partial thromboplastin times. *Blood Coagul Fibrinol* 1993; 4: 183-186
- BRANDT JT, TRIPLETT DA, ALVING B, SCHARRER I: Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. *Thromb Haemost* 1995; 74 (4): 1185-1190
- BRANDT JT, TRIPLETT DA: Laboratory monitoring of heparin: effect of reagents and instruments on the activated partial thromboplastin time. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: 530-537
- BRANDT JT, TRIPLETT DA, ROCK WA: Effect of lupus anticoagulant on the activated partial thromboplastin time. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 109-114
- BRILL-EDWARDS P, GINSBERG JS, JOHNSTON M, HIRSH J: Establishing a therapeutic range for heparin therapy. *Ann Intern Med* 1993; 119: 104-109
- BRINKHOUS KM, DOMBROSE FA: Partial thromboplastin time. *CRC-Handbook Series in Clinical Laboratory Science Section I. Hematology*, vol III, 1980
- BROMMER EJP, BOKS AL, SCHALM SW, RIJKEN DJ, VERHEIJEN JH: Inhibitoren von Gerinnung und Fibrinolyse bei akuter und dekompensierter chronischer Leberinsuffizienz. In: TILSNER V, MATTHIAS FR: *Leber, Blutgerinnung und Hämostase*. Roche, Basel 1984
- CHIU HM, HIRSH J, YUNG WL, REGOECZI E, GENT M: Relationship between the anticoagulant and antithrombotic effects of heparin in experimental venous thrombosis. *Blood* 1977a; 49: 171-184
- CHIU HM, VAN AKEN WG, HIRSH J, REGOECZI E, HORNER AA: Increased heparin clearance in experimental pulmonary embolism. *J Lab Clin Med* 1977b; 90: 204-215
- COLVIN BT: The British Society for Haematology Guidelines on the Monitoring of Heparin 1992. Second Revision. *J Clin Pathol* 1993; 46: 97-103.
- CUMMING AM, TAIT RC, FILDES S, YOONG A, KEENEY S, HAY CRM: Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Brit J Haemat* 1995; 90: 725-727
- DAHLBÄCK B et al.: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc nat Acad Sci* 1993; 90, 1004-1008
- DAHLBÄCK B, HILDEBRAND B: Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 1396-1400

- DUKE WW: The pathogenesis of purpura hemorrhagica with special reference to the part played by blood platelets. Arch Intern Med 1912; 10: 445-469
- DYERBERG J, STOFFERSEN E: Recurrent thrombosis in a patient with Factor XII deficiency. Acta Haematol 1980; 63: 278-282
- EBY C: Standardization of APTT Reagents for Heparin Therapy Monitoring: Urgent of Fading Priority? Clin Chem 1997; 43(7): 1105-1107
- EXNER T, RICHARD KA, KRONENBERG H: A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioral pattern. Brit. J. Haemat. 1978; 40: 143-151
- EXNER T, TRIPLETT DA, TABERNER D, MACHIN SJ: Guidelines for testing and revised criterias for lupus anticoagulant. SSC subcommittee for the standardazation of lupus anticoagulants. Thrombo Haemostas 1991; 65: 320-322
- FEINSTEIN DJ: Immune Coagulation Disorders. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 3rd ed Lippincott, Philadelphia 1994; 881-898
- FEINSTEIN DJ: Acquired inhibitors against factor VIII and other clotting proteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW: Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice, 3rd ed. Lippincott, Philadelphia 1994, S. 825ff
- FRANCIS JL, HOWARD C: The effect of aprotinin on the response of the activated partial thromboplastin time (APTT) to heparin. Blood Coagul Fibrinol 1993; 4: 33-40
- GAWOSKI JW, ARKIN CF, BOVILL T, BRAND J, ROCK WA, TRIPLETT DA: The effects of heparin on the activated partial thromboplastin time of the College of American Pathologists Survey Specimens: responsiveness, precision and sample effects. Arch Pathol Lab Med 1987; 111: 785-790
- HARTUNG KJ, LUTZE G, LULEY C: Untersuchung zur "Lupusantikoagulanzen-Empfindlichkeit" verschiedener APTT-Reagenzien. J Lab Med 1997; 21-27
- HEINS M, REINAUER H: Automation in Coagulation Testing. J Int Fed Clin Chem 1996; 8(3): 117-122
- HELLSTERN P, OBERFRANK K, KÖHLER M, HEINKEL K, WENZEL E: Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) als Screeningtest für leichte Gerinnungsfaktorenmängel – Untersuchung zur Sensitivität von verschiedenen Reagentien. Lab. med. 1989; 13: 83 – 86
- HENKENS CMA, BOM VJJ, SEINEN AJ, VAN DER MEER J: Sensitivity to Activated Protein C: Influence of Oral contraceptives and Sex. Thromb Haemost 1995; 73: 402-404

- HINTZ G, RIESS H, HUHND D: Akzelerininaktivierung bestimmt Resistenz gegenüber aktiviertem Protein C. *Klin Lab* 1995; 41:113-117
- HIRSH J: Heparin. *New Engl J Med* 1991a; 324: 1565-1574
- HIRSH J: Oral anticoagulant drugs. *New Engl J Med* 1991b; 324: 1865-1875
- HIRSH J, VAN AKEN WG, GALLUS AS, DOLLERY CT, CADE JF, YUNG WL: Heparin kinetics in venous thrombosis and pulmonary embolism. *Circulation* 1976; 53: 691-695
- HIRSH J, LEVINE MN: Low molecular weight heparin. *Blood* 1992; 79:1
- HIRSH J, DALEN JE, WARKENTIN TE, DEYKIN D, POLLER L, RASCHKE R: Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring efficacy and safety. *Chest*. 1995; 108 (supp 4): 258-275
- HOGG PJ, JACKSON CM: Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989; 86: 3619-3623
- HOLT JC, NIEWIAROWSKI S: Biochemistry of α -granule proteins. *Semin Hematol* 1985; 22: 151-163
- HORSTKAMP B, LUBKE M, KENTENICH H, RIESS H, BUSCHER U, LICHTENEGGER W: Internal jugular vein thrombosis caused by resistance to activated protein C as a complication of ovarian hyperstimulation after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1996; 11(2): 280-282
- HOUGIE C: Circulating anticoagulants. In: *Recent Advances in Blood Coagulation*, vol IV. Churchill Livingstone, Edinburgh 1985: S. 63
- HULL RD, RASKOB GE, HIRSH J et al.: Continuous intravenous heparin compared with intermittent subcutaneous heparin in the initial treatment of proximal-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1986; 315: 1109-1114
- JORQUERA JI, MONTORO JM, FERNANDEZ MA, AZNAR J: Modified test for activated protein C resistance. *Lancet* 1994; 344: 1162-1163
- KITCHEN S, JENNINGS I, WOODS TAL, PRESTON FE: Wide variability in the sensitivity of APTT reagents for monitoring heparin dosage. *J Clin Pathol*. 1996; 49: 10-14
- KITCHEN S, PRESTON FE: The therapeutic range for heparin therapy: relationship between six activated partial thromboplastin time reagents and two heparin assays. *Thromb Haemost* 1996; 75: 734-739
- KOELEMAN BPC, VAN RUMPT D, HAMULYAK K, REITSMA PH, BERTINA RM: Factor V Leiden: An additional risk factor for thrombosis in protein S deficient families? *Thromb Haemost* 1995; 74: 580-583

- KÖHLER M, DATI F, KOLDE HJ: Aktivierte partielle Thromboplastinzeit: Standortbestimmung. *Hämostaseologie* 1995; 15: 232- 235
- KOLLER F, USTERI C: Methodisches zur Bestimmung der Gerinnungszeit. *Helvet Physiol Acta* 1948; 6: C9
- LÄMMLE B, WUILLEMIN WA, HUBER J et al.: Thromboembolism and bleeding tendency in congenital Factor XII deficiency – a study on 74 subjects from 14 swiss families. *Thromb Haemost* 1991; 65 (2): 117-121.
- LANGDELL RD, WAGNER RH, BRINKHOUS KM: Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests. *J Lab & Clin Med* 1953; 41: 637-647
- LE DT, GRIFFIN JH, GREENGARD JS, MUJUMDAR V, RAPAPORT SI: Use of a Generally Applicable Tissue Factor-Dependent Factor V Assay to Detect Activated Protein C-Resistant Factor Va in Patients Receiving Warfarin and in Patients with a Lupus Anticoagulant. *Blood* 1995; 85: 1704-1711
- LECHNER K: Acquired inhibitors in nonhemophilic patients. *Haemostasis* 1974; 3: 65-93
- LECHNER K: Blutgerinnungsstörungen. Springer, Berlin 1982
- LECHNER K: Lupus anticoagulants and thrombosis. In: Verstraete M, Vermynen J: *Thrombosis and Hemostasis*. University Press, Leuven, 1987
- LENSING AWA, PRINS MH, DAVIDSON BL, HIRSCH J: Treatment of deep venous thrombosis with low-molecular-weight heparins. A meta-analysis. *Arch Intern Med* 1995; 155: 601-607
- LOELIGER EA, VAN DEN BESSELAAR AMHP, LEWIS SM: Reliability and clinical impact of the normalization of the prothrombin times in oral anticoagulant control. *Thromb Haemost* 1985; 53: 148-154
- MANNUCCI PM, CANCIANI MT, MARI D, MEUYCCI P: The varied sensitivity of partial thromboplastin and prothrombin reagents in the demonstration of lupus-like anticoagulants. *Scand J Haematol* 1979; 22: 423-432
- MARCINIAK E: Factor X, inactivation by antithrombin 3. Evidence for biological stabilization of factor X by factor V-phospholipid complex. *Br J Haematol* 1973; 24: 391-400
- NAGHIBI F, HAN Y, DODDS WJ, LAWRENCE CE: Effect of Reagent and Instrument on Prothrombin Times, Activated Partial Thromboplastin Times and Patient/Control Ratio. *Thromb Haemost* 1988; 59: 455-63
- NCCLS: One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved Guideline. NCCLS document H47-A Juni 1996
- O'BRAIN PF, NORTH WRS, INGRAM GIC: The diagnosis of mild haemophilia by the partial thromboplastin time test. WFH/ICTH study of the Manchester method. *Thromb Haemost* 1981; 45: 162-168

- OFOSU FA, MODI GJ, HIRSH J, BUCHANAN M, BLAJCHMAN MA: Mechanisms for inhibition of the generation of thrombin activity by sulfated polysaccharides. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 485: 41-45
- OLSON JD, ARKIN CF, BRANDT JT, CUNNINGHAM TC, GILES A, KOEPKE JA, WITTE DL: College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory Monitoring of Anticoagulant Therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 782-798
- PASSING H, BABLOK WJ: Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes. *Clin Chem Biochem* 1983; 21: 709-720
- PERRY PJ, HERRON GR, KING JC: Heparin half life in normal and impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther* 1974; 16: 514
- PIZZULI L, NITSCH J, LÜDERITZ B: Hemmung der Heparinwirkung durch Glycerolnitrat. *Dtsch Med Wschr* 1988; 113: 1837-1840
- POPOV-CENIC S, DANKWORTH HP, NOE G: Antithrombin-III und Heparinbestimmung mit chromogenem Substrat. In: Breddin HK: Prostaglandine und Plättchen Funktion. Schattauer, Stuttgart 1978
- PROCTOR RR, RAPAPORT SI: The partial thromboplastin time with koalin: A simple screening test for the first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Path* 1961; 36: 212-219
- QUICK AJ, STANLEY-BROWN M, BANCROFT FW: A study of the coagulation defect in hemophilia and jaundice. *Am J Med Sci* 1935; 190: 501-511
- REED SV, HADDON ME, DENSON KWE: An attempt to standardize the APTT for heparin monitoring, using the P. T. ISI/INR system of calibration. Results of a 13 centre study. *Thromb Res* 1994; 74 : 515-522
- RODEGHIERO F, CASTAMANN G, RUGGIERI M, TOSETTO A: Thrombosis in subjects with homozygous and heterozygous factor XII deficiency. *Thromb Haemost* 1992; 67: 590-591
- ROSBOROUGH TK: Comparing different lots of activated partial thromboplastin time reagent. Analysis of two methods. *Am J Clin Pathol* 1998;110: 173-177
- ROSENBERG RD: The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 2nd ed. Philadelphia: J- B. Lippincott 1987: 1373-1392
- ROSENDAAL FR, KOSTER T, VANDENBROUCKE JP, REITSMA PH: High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-1508
- SCHNITGER H, GROSS R: Über ein Universalgerät zur automatischen Registrierung von Gerinnungszeiten. *Klin Wschr* 1954; 32: 1011-1012

- SCHRAMM W: In: Marx R, Thies HA: Klinische und ambulante Anwendung klassischer Antikoagulantien. Schattauer, Stuttgart 1977: 140-141
- SHAULIAN E, SHOENFELD Y, BERLINER S, SHAKLAI M, PINKHAS J: Surgery in patients with circulating lupus anticoagulant. *Int Surg* 1981; 66:157
- SHEN L, DAHLBÄCK B: Factor V and Protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1995; 269: 18735-18738
- SMITH LG, KITCHENS CS: A comparison between two commercially available activators for determining the partial thromboplastin time. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 243-246
- STENFLO J: Vitamin K, Prothrombin- and γ -carboxyglutamic acid. *New Engl J Med* 1977; 296: 624
- STEVENSON KJ, EASTON AC, CURRY A, THOMSON JM, POLLER L: The Reliability of Activated Partial Thromboplastin Time Methods and the Relationship to Lipid Composition and Ultrastructure. *Thrombo Haemostas* 1986; 55: 250-258
- SUN X, EVATT B, GRIFFIN JH: Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood* 1994; 83: 3120-3125
- SUTOR AH, NIEMANN J, PANCOCHAR H: Zellulär bedingte Veränderung der Heparinwirkung. In: Tilsner V, Matthias FR: Probleme der low dose Heparin-Thromboseprophylaxe. XXVI. Hamburger Symposium. Roche, Grenzach 1983: 262-267
- SVENSSON PJ, ZÖLLER B, DAHLBÄCK B: Evaluation of Original and Modified APC-Resistance Tests in Unselected Outpatients with Clinically Suspected Thrombosis and in Healthy Controls. *Thromb Haemost* 1997; 77: 332-335
- TANS G, GRIFFIN JH: Properties of sulfatides in factor XII-dependent contact activation. *Blood* 1982; 59: 69-73
- TEIEN AN: Heparin elimination in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 1977; 38: 701-706
- THIAGARAN P, SHAPIRO SS, DEMARCO L: Monoclonal immunoglobulin M λ -coagulation inhibitor with phospholipid specificity: mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980; 66: 397-405
- THORELLI E, KAUFMAN RJ, DAHLBACK B: Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood* 1999; 93(8): 2552-2558
- TRIPODI A, NEGRI B, BERTINA RM, MANNUCCI PM: Screening for the FV:Q506 mutation - evaluation of thirteen plasma-based methods for their

- diagnostic efficacy in comparison with DNA analysis. *Thromb Haemost* 1997; 77: 436-439
- TRIPODI A, CHANTARANGKUL V, NEGRI B, MANNUCCI PM: Standardization of the APC resistance test. Effects of normalization of results by means of pooled normal plasma. *Thromb Haemost* 1998; 79: 564-566
- VAN BOVEN HH, REITSMA PH, ROSENDAAL FR, BAYSTON TA, CHOWDHURY V, BAUER KA, SCHARRER I, CONARD J, LANE DA: Factor V Leiden (FV R506Q) in Families with Inherited Antithrombin Deficiency. *Thromb Haemost* 1996; 75: 417-421
- VAN DEN BESSELAAR AMHP: The significance of the international normalized ratio (INR) for oral anticoagulant therapy. *JIFCC* 1991; 3: 146
- VAN DEN BESSELAER AMHP, GRALNICK HR, LEWIS SM: *Thromboplastin Calibration and Oral Anticoagulation Control*. Nijhoff, Boston 1984
- VAN DEN BESSELLAAR AM, MEEUWISSE-BRAUN J, BERTINA RM: Monitoring heparin therapy: relationship between the activated partial thromboplastin time and heparin assay based on ex-vivo heparin samples. *Thromb Haemost* 1990; 63: 16-23
- VAN DER GRAAF F, KEUS FJA, VLOOSWIJK RAA, BOUMA BN: The contact activation mechanism in human plasma: Activation induced by dextran sulfate. *Blood* 1982; 52: 1225-1227
- VAN DER VELDE EA, POLLER L: The APTT Monitoring of Heparin – The ISTH/ICSH Collaborative Study. *Thromb Haemost* 1995; 73: 73-81
- VANDENBROUCKE JP, KOSTER T, BRIET E, REITSMA PH, BERTINA RM, ROSENDAAL FR: Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; 344: 1453-1457
- VARADI K, MORITZ B, LANG H, BAUER K, PRESTON E, PEAKE I, RIVARD GE, KEIL B, SCHWARZ HP: A chromogenic assay for activated protein C resistance. *Br J Haematol* 1995; 90: 884-891
- WALKER FJ, ESMON CT: The effects of phospholipid and factor V on the inhibition of factor X by antithrombin III. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90: 641-647
- WEITZ JI, HUDOBA M, MASSEL D, MARAGANORE J, HIRSH J: Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest* 1990; 86: 385-391
- ZÖLLER B, BERNTSDOTTER A, DE FRUTOS PG, DAHLBÄCK B: Resistance to Activated Protein C as an Additional Genetic Risk Factor. In: *Hereditary Deficiency of Protein S*. *Blood* 1995; 85: 3518-3523

7	Abkürzungen
AIT	Akzelerin-Inaktivierungs-Test
APA	Antiphospholipidantikörper
APC	Aktiviertes Protein C
APTC	modifizierte APTT, bei der dem CaCl ₂ im Startreagenz auch APC zugesetzt ist
APTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT	Antithrombin
BFA	Behring Fibrintimer A
BCT	Behring Coagulation Timer
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAP	College of American Pathologist
DRVVT	diluted Russell viper venom time
ECT	Ecarin Clotting Time
F V Leiden	Faktor V Leiden
F I	Fibrinogen
F II	Prothrombin
F IIa	Thrombin
F V	Gerinnungsfaktor V (Akzelerin)
F Va	aktivierter Faktor V, entspricht Faktor VI
F V-MP	Faktor-V-Mangelplasma
F VII	Gerinnungsfaktor VII (Prokonvertin)
F VIIa	aktivierter Faktor VII
F VIII	Gerinnungsfaktor VIII (antihämophiles Globulin A)
F VIIIa	aktivierter Faktor VIII
F VIIIi	inaktivierter Faktor VIII
F IX	Gerinnungsfaktor IX (antihämophiles Globulin B)
F IXa	aktivierter Faktor IX
F X	Gerinnungsfaktor X (Stuart-Prower-Faktor)
F Xa	aktivierter Faktor X
F XI	Gerinnungsfaktor XI (Rosenthal-Faktor)
F XIa	aktivierter Faktor XI
F XII	Gerinnungsfaktor XII (Hageman-Faktor)
F XIIa	aktivierter Faktor XII
F XIII	Gerinnungsfaktor XIII (fibrinstabilisierender Faktor)
F XIIIa	aktivierter Faktor XIII
FSP	Fibrinogenspaltprodukte
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HMWK	high molecular weight kininogen
i. v.	intravenös
IE/ml	Internationale Einheiten pro Milliliter
INR	International Normalized Ratio
INSTAND	Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium e. V.
ISI	International Sensitivity Index
KCT	Kaolin Clotting Time
LA	Lupusantikoagulans
LMWH	Low molecular weight heparin (niedermolekulares Heparin)
NaCl	Natriumchlorid
NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanometer

PCR	Polymerasekettenreaktion
PL	Phospholipide
PTZ	Prothrombinzeit
PTT	partielle Thromboplastinzeit
s	Standardabweichung der Stichprobe bzw. Sekunden
s. c.	subkutan
TZ	Thrombinzeit
UFH	unfraktioniertes Heparin
VK	Variationskoeffizient
vWF	von Willebrand-Faktor
vWS	von Willebrand-Jürgens-Syndrom
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

8 Danksagung

Ich möchte Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hans Reinauer meinen besonderen Dank für die Überlassung des Themas, für die Ermöglichung eines selbstständigen Arbeitens in dem vom ihm geleiteten Institut und für die wertvolle Beratung bei der vorliegenden Dissertation aussprechen.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. med. Michael Heins für seine fachliche Unterstützung in der experimentellen Phase dieser Arbeit sowie meinen Laborkollegen Herrn Dr. rer. nat. Theodorus Akerboom, Frau Dr. med. Christiane Boogen, Herrn Dr. med. Stefan Dederichs, Herrn Dr. rer. nat. Manfred Falck, Frau Dr. rer. nat. Urte Fahren, Herrn Dr. med. Derik Hermsen, Herrn Dr. med. Matthias Imöhl, Herrn Dr. med. Kardorf-Kovacs, Frau Dr. med. Susanne Kolbe-Busch, Herrn Dr. rer. nat. Manfred Reuschenbach und Herrn Bernd Zur für ihre Ermutigung und Hilfsbereitschaft.

Tabellarischer Lebenslauf

Name Günther Kappert
 Wohnort, Straße 40591 Düsseldorf, Bensberger Weg 13
 Geburtsdatum 10 Juni 1971
 Geburtsort Mönchengladbach
 Eltern Brigitta Kappert geb. Warnecke, Herrenschneiderin,
 Friedrich Kappert, Kraftfahrer Gefahrgut; beide im
 Ruhestand
 Schwester Sabine Hermans, geb. Kappert, Arzthelferin

Schulbesuch

1977 - 1982 kath. Gottfried-Kricker-Grundschule, Willich
 1982 - 1990 St. Bernhard Gymnasium, Willich, vorzeitiger Versetzung
 vom 1. Halbjahr 10 ins 2. Halbjahr 11

Wehrdienst

1990 - 1991 Militärkraftfahrer BCE und Ordonanz, Augustdorf und
 Dülmen

Studium der Humanmedizin

1991 - 1998 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 Famulaturen Innere Medizin, Augenheilkunde (Perugia, Italien),
 Laboratoriumsmedizin, Gynäkologie
 Praktisches Jahr Wahlfach: Pädiatrie; Chirurgisches Terzial in Italien
 Erasmusstipendium Visceralchirurgie (4 Monate), Università degli Studi di
 Padova, Padua, Italien

Arzt im Praktikum

Jul 1998 - Dez 1999 Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie,
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Direktor: Univ.-Prof.
 Dr. med. D. Häussinger

Weiterbildung

Jan 2000 - heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Zentralinstitut für Klinische
 Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-
 Universität Düsseldorf, kommissarischer Direktor: Univ.-Prof.
 Dr. med. H. Reinauer

Abstract: Vergleichbarkeit der Methoden zur Bestimmung der Aktivierten Partiellen Thromboplastinzeit und der Resistenz gegen aktiviertes Protein C
von Günther Kappert

Um die Vergleichbarkeit verschiedener Methoden zur Analyse der Aktivierten Partiellen Thromboplastinzeit (APTT) zu überprüfen, wurden acht verschiedene kommerzielle APTT-Reagenzien an zwei verschiedenen Analysatoren mit optomechanischer bzw. photometrischer Fibrinclotdetektion untersucht:

Die Referenzbereiche und die Nachweisempfindlichkeit für einen Faktorenmangel im intrinsischen System, für Heparin und Lupusantikoagulantien waren reagenz- und geräteabhängig. Durch Bildung einer APTT-Ratio ließen sich die Referenzbereiche nicht vereinheitlichen. Mittels Neothromtin kann nicht zwischen einem leichten und einem klinisch relevanten Faktorenmangel unterschieden werden. Die Empfindlichkeit für einen Faktor XII-Mangel ist bei den meisten Reagenzien schwächer ausgeprägt als für die anderen untersuchten Faktorenmängel. Lediglich Pathromtin SL weist an beiden Analysatoren hierfür eine hohe Empfindlichkeit auf und übertrifft auch beim Nachweis eines Mangels Faktor XI, IX und VIII die anderen untersuchten Reagenzien. Die Ergebnisse von in vitro Verdünnungsreihen können hinsichtlich der Heparinempfindlichkeit nicht auf die Resultate von Patientenproben übertragen werden. Für jede Methode muss ein eigener therapeutischer Bereich mit Hilfe von Plasmen heparinierter Patienten bestimmt werden. Auch die Lupusantikoagulanzenempfindlichkeit stellt sich in einer Verdünnungsreihe anders als bei Patientenplasmen dar.

Die Präzision der Methoden lag mit Ausnahme von Neothromtin und von APTT-L dank der vollständigen Analysenautomatisierung in einem akzeptablen Bereich.

Eine hohe Korrelation wurde beim Vergleich von Pathromtin SL am BFA und am BCT erreicht. Zwischen Methoden, welche denselben Oberflächenaktivator benutzten, ergaben sich sehr unterschiedliche Korrelationen. Der Korrelationskoeffizient veränderte sich, wenn der Vergleich statt an einen Kollektiv, dessen APTT-Verlängerung auf einer Heparinabgabe beruht, an einem Kollektiv nicht heparinierter Patienten durchgeführt wurde. Dies deutet auf unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit für Faktormangel und Heparin.

Eine Standardisierung der APTT unter Verwendung mathematischer Methoden ist mehrfach fehlgeschlagen. Um eine Vereinheitlichung über Mindestanforderungen an die APTT hinaus zu erreichen, müssten alle Hersteller ein chemisch einheitliches APTT-Reagenz produzieren. Dieses sollte eine hohe Faktormangel- und eine hohe Lupusantikoagulanzenempfindlichkeit sowie eine definierte Empfindlichkeit für Heparin und Hirudin aufweisen, damit es in dieser Beziehung den zur Zeit auf dem Markt befindlichen Reagenzien nicht unterlegen ist. Bis dahin ist für jede APTT-Methode der Referenz- und der therapeutische Bereich sowie nach Möglichkeit die Nachweisempfindlichkeit für Faktormangel und Lupusantikoagulanzen zu evaluieren. Zumindest für ein Universitätsklinikum ist es notwendig, in allen angeschlossenen Laboratorien ein einheitliches Analysensystem durchzusetzen. Hilfreich wäre auch, wenn zur Bestimmung des therapeutischen Bereiches der Heparinabgabe Patientenplasmen mit bekannter Anti-F Xa-Aktivität kommerziell zu Verfügung stehen würden.

Untersucht wurden weiterhin vier Methoden zur Bestimmung der Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC). Wegen ihrer hohen Sensitivität und Spezifität eignen sich die APTT-basierenden Methoden mit Faktor V - Mangelplasmavorverdünnung hervorragend als Screeningteste vor Anwendung teurer genetischer Methoden. Von der Verwendung von APTT-Modifikationen ohne Faktor V - Mangelplasmavorverdünnung, von der APC-Sensitivität, von der Akzelerininaktivierung und von Teste, welche auf Messung der Faktor VIII-Aktivität beruhen, muss hingegen abgeraten werden. Eine Anwendung der sogenannten normierten APC-Ratio besitzt keine Vorteile, da sich hiermit die Referenzbereiche nicht vereinheitlichen lassen und auch keine Verbesserung der Sensitivität oder Spezifität erreicht wird.