

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Marburg  
Direktor: Prof. Dr. V. Kretschmer

"Evaluation eines neuen Thrombelastographie-Verfahrens - ROTEM™  
(Rotationsthrombelastometrie)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von

Anton Todorov Daraktchiev  
aus Sofia

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 29.01.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. V. Kretschmer

1. Korreferent: PD Dr. med. N. Al-Fakhri

## Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung, Fragestellung und Ziel der Untersuchungen	9
2. Material und Methoden	12
2.1. ROTEM	12
2.1.1. System und Zubehör, Küvetten, Stempel	12
2.1.2. Messungsdurchführung, Mischverfahren und Messprinzip	13
2.1.3. Testparameter	15
2.1.4. Reagenzien	17
2.1.5. Verwendete Tests - INTEM, NATEM, EXTEM, ROTROL	18
2.1.6. Probanden und Probengewinnung	19
2.1.7. Kurvenauswertung, fehlerhafte Messungen	20
2.2. Andere Tests und Methoden	21
2.2.1. Automatische Zellzählung	21
2.2.2. PFA-100®, VCP	21
2.2.3. Kugelkoagulometer und Häkchenkoagulometer	22
2.2.4. Aggregometrie	22
2.2.5. Quick, PTT, Fibrinogen, D-Dimere, Antithrombin	23
2.2.6. Herstellung von plättchenarmem Plasma (PAP) und Probenverdünnung	23
2.3. Datenverarbeitung und statistische Prüfung	24
2.4. Kurzbeschreibung der einzelnen Teilstudien	24
2.4.1. Einfluss des Zeitintervalls zwischen Blutentnahme (BE) und Testbeginn	25
2.4.1.1. Zeitintervalle bis 7 Minuten nach BE mit Nativ- und Citratblut	25

2.4.1.2. Zeitintervalle <10 Min. vs. >30 Min. nach BE.	
Blut von Spendern und thrombozytopenischen Patienten	26
2.4.2. Modifikation des Pipettiervorgangs, Referenzwerte	27
2.4.3. Unterschiedliche EXTEM Aktivatorreagenzien	27
2.4.4. Blutverdünnung mit unterschiedlichen Infusionslösungen	28
2.4.5. Erfassung von Hämostasestörungen	29
2.4.5.1. Einfluss von ASS Einnahme	29
2.4.5.2. Patienten mit vWS	29
2.4.5.3. Patienten unter Heparin	30
2.4.5.4. Patienten unter Marcumar	30
2.4.5.5. Patienten mit Leberfunktionsstörung	31
2.4.5.6. Intensivpatienten	31
3. Ergebnisse	32
3.1. Einfluss des Zeitintervalls zwischen Blutentnahme (BE) und Testbeginn	32
3.1.1. Zeitintervalle von 1 bis 7 Minuten nach BE	32
3.1.2. Zeitintervall <10 Min. vs. >30 Min. nach BE	37
3.1.2.1. Spenderblutproben	37
3.1.2.2. Blutproben thrombomozytopenischer Patienten	39
3.2. Nativblut versus Citratblut	42
3.3. Modifikation des Pipettiervorgangs, Referenzwerte	46
3.4. Vergleich zweier EXTEM Aktivatorreagenzien, Referenzwerte	50
3.4.1. Messgenauigkeit	50
3.4.1.1. Messungen mit ROTROL	50
3.4.1.2. Messungen mit Spenderblut	51
3.4.2. Reproduzierbarkeit	53
3.4.2.1. Messungen mit ROTROL	53
3.4.2.2. Messungen mit Spenderblut	56
3.4.3. Referenzwerte für EXTEM	57

3.5. Blutverdünnung mit unterschiedlichen Infusionslösungen - Plättchenarmes autologes Plasma (PAP), Physiologische Kochsalzlösung (NaCl) und Hydroxyäthylstärke (HAES)	58
3.6. Nachweis von Hämostasestörungen	62
3.6.1. ASS	62
3.6.2. Patienten mit von Willebrand-Syndrom (vWS)	65
3.6.3. Patienten mit Thrombozytopenie	67
3.6.4. Patienten unter Heparin	69
3.6.5. Patienten unter Marcumar	70
3.6.6. Patienten mit Leberfunktionsstörung	76
3.6.7. Patienten von Intensivstationen	79
4. Diskussion	83
4.1. Entwicklung von ROTEM	83
4.2. TEG vs. ROTEM	83
4.3. Präanalytik	84
4.3.1. Zeitintervall zwischen Blutentnahme und Testbeginn	85
4.3.2. Zeitintervall bei Thrombozytopenische Proben	89
4.3.3. Nativblut versus Citratblut	89
4.3.4. Modifikation des Pipettiervorgangs, Referenzwerte	90
4.3.5. Vergleich zweier EXTEM Aktivatorreagenzien, Referenzwerte	92
4.3.6. Blutverdünnung mit unterschiedlichen Infusionslösungen	93
4.4. Nachweis von Hämostasestörungen	97
4.4.1. ASS	97
4.4.2. Patienten mit von Willebrand-Syndrom	97
4.4.3. Patienten mit Thrombozytopenie	98
4.4.4. Patienten unter Heparin	99
4.4.5. Patienten unter Marcumar	100
4.4.6. Patienten mit Leberfunktionsstörung und Intensivpatienten	101
4.5. ROTEM und POCT	103
5. Zusammenfassung	107

- Summary (Zusammenfassung in Englisch)	111
6. Literaturverzeichnis	114
7. Anhang	124
7.1. Aufklärungsbogen für Patienten	125
7.2. Tabellarischer Anhang	126
8. Verzeichnis der akademischen Lehrer	131
9. Danksagung	132

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AGG	Aggregometrie
Alp	Alpha-Winkel
ApTEM	Aprotinin-Thrombelastometrie
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Antithrombin
BE	Blutentnahme
BV	Blutvolumen (bei PFA-100® und VCP)
CFT	Clot formation time, Gerinnselbildungszeit
CHE	Cholinesterase
Col	Kollagen
CT	Clotting time, Gerinnungszeit
Epi	Epinephrin
ExTEG	Extrinsisch aktivierte Thrombelastographie
EXTEM	Extrinsisch aktivierte Thrombelastometrie
FBR	Fibrinogen
g	Erdbeschleunigung
GEL	Gelatine(Infusionslösung)
GGT	Gammaglutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (auch AST oder ASAT)
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (auch ALT oder ALAT)
HAES	Hydroxyethylstärke(Infusionslösung)
HepTEM	Heparinase-Thrombelastometrie
INR	International normalized ratio
InTEG	Intrinsisch aktivierte Thrombelastographie
INTEM	Intrinsisch aktivierte Thrombelastometrie
KC4	Kugelkoagulometer
KG	Körpergewicht
Koll	Kollagen
LMWH	Low Molecular Weight Heparin, niedrig molekulares Heparin
MCF	Maximum clot firmness, Maximalamplitude
MV	Mischverfahren
n	Anzahl
NaCl	Physiologische Kochsalzlösung

NaTEG	nicht aktivierte Thrombelastographie
NATEM	nicht aktivierte Thrombelastometrie
p	statistischer p-Wert
PAP	Plättchenarmes Plasma
PFA-100®	Plättchenfunktionsanalyzer-100®
POCT	Point-of-Care Test
PRP	Plättchenreiches Plasma
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
Quick-Wert	Thromboplastinzeit, engl. prothrombin time
Risto	Ristocetin
RL	Ringer-Laktat
RoTEG	Rotations-Thrombelastographie
ROTEM	Rotations-Thrombelastometrie
s	Sekunden
SCT	Sonoclotanalyse
SGC	Häckchenkoagulometer Schnittger-Groß
TEG	Thrombelastographie
Thro	Thrombozytenzahl
UFH	Unfraktioniertes Heparin
vWF	von-Willebrand-Faktor
vWS	von Willebrand Jürgens Syndrom
V <sub>k</sub>	Variationskoeffizient
VCP	Virtual-Capillary-Prototype
VZ	Verschlusszeit (bei PFA-100® und VCP)

## Sonderzeichen

®	eingetragenes Warenzeichen
<	kleiner
>	größer
≤ / ≥	größer/kleiner-gleich
*	schwach signifikant (p<0,05)
**	signifikant (p<0,01)
***	hoch signifikant (p<0,001)



# 1. Einleitung

Die Durchführung von Gerinnungstests bei einem Patienten gehört zur Routinediagnostik und ist Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen und ggf. therapeutische Maßnahmen. Für die Diagnostik steht eine ganze Reihe von unterschiedlichen Tests zur Verfügung. Die Thrombozytenzahl z.B. ist ein numerischer Wert, der bei Gesunden innerhalb bestimmter Grenzen liegt. Ein Abfall unter die Normgrenze birgt zumindest theoretisch die Gefahr einer vermehrten Blutungsbereitschaft. Die Thrombozytenzahl ist teilweise noch immer ein Richtwert, der darüber entscheidet, ob am Patienten bestimmte Manipulationen wie Punktionen mit einem zumutbaren Blutungsrisiko durchführbar sind, bzw. ob ein Patient eine Transfusion eines Thrombozytenkonzentrats benötigt. Aus klinischer Sicht erweist sich die Abschätzung alleine nach diesem Parameter als ungenügend, weil nicht nur die Zahl, sondern auch der funktionelle Zustand der Thrombozyten für die Hämostase entscheidend ist.

Nicht minder wichtig sind die Faktoren der plasmatischen Gerinnungskaskade, die mit den zellulären Bestandteilen interagieren und so die Abdichtung von verletzten Gefäßen gewährleisten. Der Quick-Test (Thromboplastinzeit) und die aPTT sind die wesentlichen Routinemethoden, um deutliche Störungen der plasmatischen Gerinnung aufzudecken. Häufig wird die Diagnostik noch durch die Bestimmung von Fibrinogen ergänzt. Weitere Faktoren (z.B. Einzelfaktoren, D-Dimere) werden in der Regel nur bei Auffälligkeiten dieser Befunde oder der Anamnese bestimmt. Gemeinsam ist diesen Untersuchungen, dass sie nur einen Teilaspekt der Hämostase überprüfen und somit - bezogen auf den komplexen Ablauf der Hämostase - nur eine eingeschränkte Aussage ermöglichen.

Dagegen erlauben Thrombelastometrie (auch Thrombelastographie, TEG genannt) und Sonoclot-Analyse (SCT) eine komplexere Einschätzung des Zustandes des Hämostasesystems. Darüber hinaus wird heutzutage nicht nur Wert auf die Aussagekraft und Präzision diagnostischer Tests, sondern auch auf die schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse gelegt, wenn diese für therapeutische Entscheidungen wichtig sind. Daher werden zunehmend Verfahren bevorzugt, die patientennah durchgeführt werden können (Point-of-Care Tests). Gerade in dieser Hinsicht wurden in den letzten Jahren durch entsprechende Modifikationen wesentliche Fortschritte

beim TEG erzielt, die es für die Point-of-Care-Diagnostik geeignet erscheinen lassen, zumal es einfach durchzuführen und schnell zu erlernen ist [14].

Die Thrombelastographie (TEG) wurde bereits 1948 von Hartert entwickelt [47]. Der Thrombelastograph von Hellige war das erste kommerziell erhältliche Gerät für dieses Verfahren. Seither wurde das TEG ständig weiterentwickelt. Eine Renaissance hat das TEG in den letzten Jahren durch die Rotations-thrombelastographie (RoTEG) erfahren, die auf Grund von Patentrechten heute unter der Bezeichnung "Rotationsthrombelastometrie" (ROTEM) vermarktet wird. Die Methode erfasst den gesamten Gerinnungsprozess in vitro vom Start der Gerinnungsbildung, über Fibrinbildung, Polymerisierung der Fibrinmonomere, Interaktion mit den Thrombozyten, Stabilisierung und Retraktion des Gerinnsels sowie schließlich dessen Lyse. Erste Ergebnisse können innerhalb von fünf bis zehn Min. gewonnen werden, die auf Störungen der Hämostase rückschließen lassen und möglicherweise therapeutische Konsequenzen z.B. Transfusion von Thrombozytenkonzentraten oder frisch gefrorenes Plasma (FFP) nach sich ziehen können. Mittlerweile wird das TEG in seinen verschiedenen Modifikationen in vielen Zentren zur Diagnostik und Therapiesteuerung sowohl unter wissenschaftlichen als auch routinemäßigen Bedingungen eingesetzt. Insbesondere liegen bereits Erfahrungen bei Herz- und Leberoperationen [77, 102, 116, 117], ebenso bei Tumorpatienten [36], bei schwangeren Frauen [43], Frauen mit Eklampsie [11, 86, 103], und bei Kindern [78] vor. Weiterhin liegen Daten von Patienten mit Polytrauma und Intensivtherapie vor, wo anhand des TEG die Therapie der Hämostasestörungen gesteuert wurde [99]. Allerdings ist das Verfahren noch nicht standardisiert und hinsichtlich seiner Aussagen und therapeutischen Konsequenzen nicht bzw. nicht ausreichend validiert [100]. Daher ist der routinemäßige Einsatz im klinischen Alltag problematisch. Derzeit werden zahlreiche Studien durchgeführt, um diese Defizite auszugleichen. Auch die vorgelegte Arbeit hat zum Ziel dazu einen Beitrag zu leisten.

#### Fragestellung und Ziel der Untersuchungen

Zunächst sollten Einflussgrößen untersucht werden, welche die Präzision und damit die Zuverlässigkeit der Methode beeinflussen können. Dazu gehören das Zeitintervall zwischen Blutentnahme und Testdurchführung, die Antikoagulation der Blutproben,

Variationen des Pipettiervorgangs, der Einfluss von Blutverdünnung und Zusatz von Infusionslösungen (Plasma, NaCl, HAES) sowie die Auswahl der Reagenzien. Nach Optimierung des Verfahrens sollten die Referenzwerte bestimmt werden.

Schließlich sollte die diagnostische Kapazität des standardisierten Verfahrens anhand von Patienten mit Hämostasestörungen analysiert werden. Mit Hilfe der Untersuchung entsprechender Patientenproben sollten im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

Wird die Wirkung von Thrombozytenaggregationshemmern und Antikoagulanzen ausreichend empfindlich nachgewiesen (ASS, Heparin, Marcumar)?

Wie sensitiv ist der Test hinsichtlich Thrombozytopenie und vWS?

Eignet sich das ROTEM System als Point-of-Care Test?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. ROTEM

#### 2.1.1 System und Zubehör, Küvetten, Stempel

Das ROTEM<sup>®</sup> Vollblut Hämostase System (Abb. 2-1) besteht aus

- ◆ dem Messgerät mit integriertem Computersystem (Auswertung des Signals, Kommunikation mit dem Notebook, Steuerung der Heizung des Wärmeblocks)
- ◆ einem Notebook, dessen Software das Gerät steuert, die Daten speichert und über das die Eingaben erfolgen sowie die Befunde gespeichert und abgerufen werden können
- ◆ eine elektronische Pipette, die mit dem Messgerät verbunden ist
- ◆ einem Drucker (optional, nicht auf der Abb. dargestellt)



Abb. 2-1 ROTEM<sup>®</sup> System (Pentapharm GmbH, München)

Das ROTEM<sup>®</sup> Gerät hat vier Kanäle für parallele Messungen. Die Daten werden fortlaufend automatisch während der Messung ausgewertet. Die Parameter werden

auf dem Farbbildschirm des Notebooks in Form von Diagrammen und Messwerten angezeigt, und automatisch gespeichert. Bei Bedarf können die Ergebnisse auch zu einem späteren Zeitpunkt aufgerufen werden, bzw. die Kurven nochmals gedruckt werden. Die Daten können exportiert werden, auf einen Datenträger gespeichert und anschließend mit einer Tabellenverarbeitungssoftware (z.B. „Microsoft Excel®“) bearbeitet werden.

Die elektronisch gesteuerte Pipette wird manuell bedient und erlaubt eine präzise Durchführung der Messungen auch durch ungeübte Personen.

Das Messgerät besitzt einen Wärmeblock, der nach Inbetriebnahme des Geräts konstant auf 37 C° erwärmt bleibt. Die Wärme wird durch die Küvettenhalter, die mit dem Wärmeblock Kontakt haben, an die Blutproben weitergegeben.

Für jede Probe benötigt man eine Küvette (als Behälter für Blut und Reagenzien) und einen Stempel. Beide sind aus Plastik und haben eine zylindrische Form. Vor der Messung befestigt man die Küvette in der Öffnung des Küvettenhalters und den Stempel an dem unteren Ende der senkrechten Achse des entsprechenden Kanals.

Die von uns verwendeten Küvetten und Stempel hatten eine glatte Oberfläche und waren nicht beschichtet.

### 2.1.2 Messungsdurchführung, Mischverfahren und Messprinzip

Die Blutprobe kann nach Empfehlung des Herstellers Citratblut oder Nativblut sein. Mittels der elektronischen Pipette werden die Blutprobe und zusätzliche Reagenzien (Lösung zur Rekalzifizierung, Aktivatoren der Gerinnung) in die Küvette pipettiert. Die Pipettierschritte, bzw. deren Reihenfolge erscheinen aufgelistet im Notebookdisplay. Mit Hilfe der Tastatur kann man einzelne Schritte vor- und zurückgehen, falls man falsch pipettiert hat, z.B. den falschen Aktivator in die Pipette eingezogen hat.

Es wurden bei den Untersuchungen zwei Mischverfahren im Rahmen des Pipettierens verwendet:

**Mischverfahren 1 (MV1):** Dieses Verfahren war zur Zeit der Durchführung der Studie die empfohlene Standardmethode. Es besteht aus folgenden Schritten:

- Blutprobe in die Pipettenspitze aufnehmen, dann in die Küvette entleeren
- Spitzenwechsel
- Startreagenz aufziehen, zusätzlich definiertes Volumen Luft aufnehmen und schließlich zusätzlich noch den Gerinnungsaktivator (Thromboplastin oder partielles Thromboplastin) aufziehen (das Luftpolster trennt beide Reagenzien, solange sie sich in der Pipettenspitze befinden)
- Entleerung in die Küvette, vorsichtiges dreimaliges Umrühren mit der Pipettenspitze
- Küvettenhalter (samt Küvette) an den entsprechenden Messkanal befestigen

Ein Nachteil der Methode besteht in der Notwendigkeit, manuell umrühren zu müssen, wodurch die Thrombozyten aktiviert werden können. Ein weiterer Nachteil ergibt sich aus der Tatsache, dass an der Außenseite der Pipettenspitze, mit der man umrührt, kleine Reste der Aktivatorlösungen (nach Aufziehen des Aktivators) haften bleiben und diese dann mit in die Probe gelangen.

**Mischverfahren 2 (MV2):** ist inzwischen die Standardmethode. Dieses Verfahren besteht aus folgenden Schritten:

- Start Reagenz aufziehen, Luftpolster (standardisiert, s.o.) setzen und Aktivator der Gerinnung aufziehen
- Entleerung in die Küvette
- Spitzenwechsel
- Blutprobe aufnehmen, in die Küvette entleeren; mit der selben Spitze den Inhalt der Küvette aufziehen (dabei vermischen sich Blutprobe und Reagenzien) und in die Küvette entleeren
- Küvettenhalter (samt Küvette) an den entsprechenden Messkanal befestigen

Bei dieser Methode wird das manuelle Mischen vermieden. Außerdem wird die Pipettenspitze mit der evtl. daran haftenden kleinen Reagenzienmenge verworfen. Somit ist gewährleistet, dass immer die gleichen Volumina Start- und Aktivatorlösung benutzt werden.

Bei beiden Verfahren wird zum Schluss nach dem letzten Pipettierschritt der Küvettenhalter zügig, aber vorsichtig am entsprechenden Messkanal befestigt. Dabei

taucht der Stempel in die Probe ein. Während der Messung rotiert der Stempel abwechselnd in beide Richtungen um jeweils  $4,75^\circ$  (Abb. 2-2). Durch Reflektion eines Lichtstrahls einer Dioden-Lichtquelle an einer Spiegelplatte am oberen Ende der Achse wird die Rotation einem lichtempfindlichen Sensor übermittelt. Bei fehlender Gerinnung bleibt die Bewegung des Stempels bzw. der Achse unverändert. Das System stellt dies graphisch als gerade Linie dar.

Sobald die Gerinnung eintritt, haftet das Gerinnsel an den Wänden von Stempel und Küvette und behindert so die Bewegung des Stempels. Die verminderte Auslenkung von der Mittellinie wird graphisch dargestellt. Je stärker die Stempelrotation mit der zunehmenden Gerinnselfestigkeit behindert wird, desto größer wird die Amplitude. Wenn bei maximaler Festigkeit des Gerinnsels die Achse nicht mehr rotiert beträgt die Amplitude 100 mm.

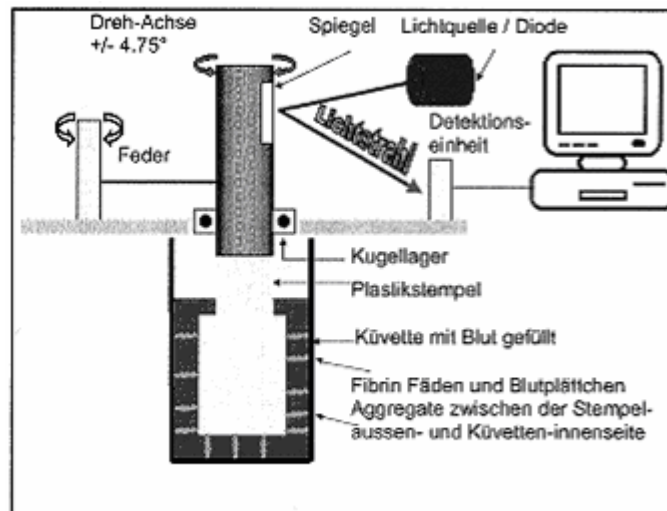


Abb. 2-2 Prinzip der Rotationsthrombelastometrie (ROTEM<sup>®</sup>)

Auf dem Bildschirm des Notebooks wird der Gerinnungsablauf als Graphik gegen die Zeit dargestellt (Abb. 2-3). Gleichzeitig werden die Messergebnisse in Zahlen am Display angezeigt.

### 2.1.3 Testparameter von ROTEM

Folgende Parameter wurden in dieser Arbeit zur Auswertung herangezogen:

**CT [s]** (engl. clotting time; deutsch Gerinnungszeit): Zeitspanne vom Startzeitpunkt (letzte Reagenzienzugabe) bis zum Beginn einer signifikanten Gerinnselformung.

Technisch wird die Zeit bis zum Auftreten einer 2 mm breiten Amplitude gemessen. Ein älterer Begriff dafür ist "r-Zeit", bzw. Reaktionszeit.

**CFT [s]** (engl. clot formation time, deutsch Gerinnelbildungszeit): Zeitspanne vom Ende der Gerinnungszeit bis zum Erreichen einer Amplitude von 20 mm. Ein älterer Begriff dafür ist "k-Zeit"

**Alpha-Winkel [°]** ( $\alpha$ ): ergibt sich durch den Winkel zwischen der Mittellinie und einer Tangente an die Kurve durch den 2 mm Amplituden-Punkt. Er beschreibt die Kinetik der Gerinnelentstehung.

**MCF [mm]** (engl. maximum clot firmness, maximale Gerinnselfestigkeit): beschreibt die größte Festigkeit, die das Gerinnel in der Messung erreicht hat. Ein älterer Begriff dafür ist "MA", bzw. maximale Amplitude.

**MCE** (engl. maximum clot elasticity, maximale Gerinnselelastizität): errechnet sich aus der Formel  $100 \times \text{MCF} / (100 - \text{MCF})$  und wandelt dadurch die MCF in einen Wert proportional zur Elastizität um

**A5-A30[mm]** Amplitude zum Zeitpunkt 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten nach der CT

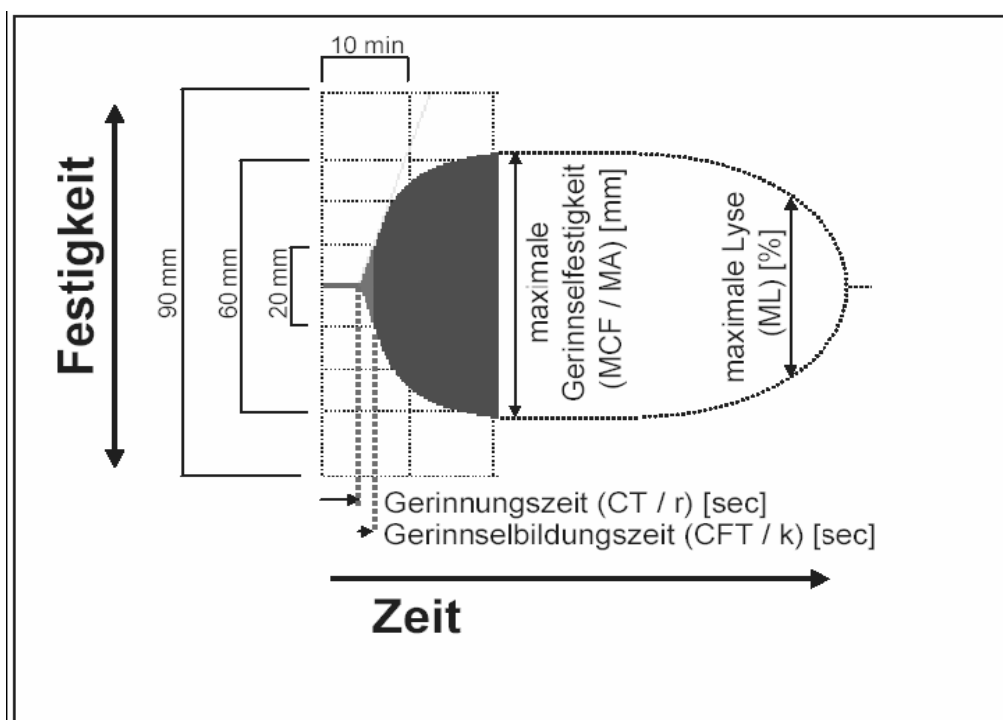


Abb. 2-3 Parameter von ROTEM / Messkurve



#### 2.1.4 Reagenzien

Beim klassischen TEG wurde die Gerinnung bei nicht antikoaguliertem Blut durch Oberflächenkontakt und bei Citratblut zusätzlich durch Rekalzifizierung aktiviert. Durch Zugabe von bestimmten Gerinnungsaktivatoren wird die Gerinnung wesentlich schneller in Gang gesetzt. Dadurch werden die Messzeiten gegenüber dem klassischen TEG erheblich verkürzt. Innerhalb von 10 Minuten können bereits ausgeprägte Störungen der Gerinnung festgestellt werden. In dieser Arbeit wurden folgende Reagenzien verwendet:

**InTEG<sup>®</sup> Reagenz:** gebrauchsfertiges flüssiges Reagenz, das partielles Thromboplastin und Ellagsäure enthält. Es führt zu einer standardisierten Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems über Faktor XI und XII. Hergestellt wurde das Reagenz von der Firma Nobis Labordiagnostica GmbH, Endingen. Verwendet wurden die Chargennummern 055129 und 404936. 2004 wird dieses Reagenz als **in-TEM<sup>®</sup> Reagenz** bezeichnet.

**ExTEG<sup>®</sup> Reagenz** (Nobis) enthält Gewebethromboplastin (Tissue Factor). Es führt zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems über Faktor VII. Zunächst wurden die Untersuchungen mit "ExTEG S" durchgeführt. Dieses war lyophilisiert und musste vor Gebrauch gelöst werden. Die meisten EXTEM Tests in dieser Arbeit wurden mit diesem Reagenz durchgeführt (siehe Kapitel 2.4). Verwendet wurde die Chargennummer 050129. Seit 2004 wurde das **ex-TEM<sup>®</sup> Reagenz** eingeführt, das gebrauchsfertig geliefert wird.

**Diaplastin** wurde als weiteres ExTEG/EXTEM Reagenz bei der Teilstudie „Vergleich von zwei EXTEM Aktivatorreagenzien“ eingesetzt. Das Reagenz ist flüssig und kann direkt verwendet werden. Nach der Testphase wurde dieses Reagenz als "**ExTEG L**" vertrieben. Verwendet wurde die Chargennummer 404937.

**StartTEG Reagenz** enthält Calciumchlorid und dient zur Rekalzifizierung der Citratblutprobe. Bei alleiniger Zugabe von StartTEG wird der Gerinnungsprozess

allein über Kontaktaktivierung gestartet. Bei Untersuchung von Citratblut wird es zusätzlich zu Thromboplastinen (EXTEM) und partiellen Thromboplastinen (INTEM) zur Rekalzifizierung zum Ansatz hinzu pipettiert und damit der Gerinnungsprozess letztlich in Gang gesetzt. Verwendet wurden die Chargennummern 060040 und 404935. Seit 2004 wird das Reagenz als star-TEM<sup>®</sup> Reagenz bezeichnet.

**ROTROL N Reagenz** wurde für die Qualitätskontrolle am ROTEM verwendet. Die mit ROTROL gemessenen Werte sollten innerhalb eines bestimmten Intervalls liegen, das einer mitgelieferten Tabelle zu entnehmen war.

#### 2.1.5 Verwendete Tests

Entsprechend der Reagenzien wurden folgende Tests verwendet:

**InTEG:** Mit Hilfe der Pipette wurden 300µl Citratblut + 20µl InTEG Reagenz + 20µl StartTEG Reagenz in die Küvette gegeben. Untersucht wurde das intrinsische Gerinnungssystem sowie die Wechselwirkung mit den Thrombozyten. Seit 2004 wird dieser Test als **INTEM Test** bezeichnet.

**ExTEG:** Mit Hilfe der Pipette werden 300µl Citratblut + 20µl ExTEG Reagenz + 20µl StartTEG Reagenz in die Küvette gegeben. Untersucht wurde das extrinsische Gerinnungssystem, sowie die Wechselwirkung mit den Thrombozyten. Seit 2004 wird dieser Test als **EXTEM Test** bezeichnet.

**NaTEG** - Ist ein Test, bei dem die Gerinnung nur über Kontaktaktivierung in Gang gesetzt wird. Wenn Citratblut getestet wird, muss initial eine Rekalzifizierung (StartTEG) erfolgen. Mit Hilfe der Pipette wurden 300µl Citratblut und 20µl StartTEG Reagenz in die Küvette gegeben. Seit 2004 wird dieser Test als **NATEM Test** bezeichnet.

Ca. 15 Min. vor Anfang des Tests wurden die Reagenzien aus dem Kühlschrank entnommen, auf Haltbarkeit geprüft und ggf. gelöst.

## 2.1.6 Probanden und Probengewinnung

Im Rahmen der vorgelegten Studie wurden Blutproben von 278 Probanden (110 Patienten, 154 Blutspender und weitere 14 gesunde Probanden) untersucht (Tab. 2-1).

Tab. 2-1      Untersuchte Probanden – Altersverteilung, Geschlecht

Alter (Jahre)				Geschlecht	
Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Männer	Frauen
48	49	6	94	172	106

Die Blutspender erfüllten die Voraussetzungen gemäß der Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion [127].

Am Ende der Vollblutspende wurden die Proben über die noch liegende Kanüle entnommen. Die Proben wurden nach Entnahme und vor den Messungen mehrmals vorsichtig hin- und hergeschwenkt.

Bei 14 gesunden Probanden (für ASS- und Verdünnungs-Versuche) wurde das Blut ohne vorausgehende Blutspende über eine 18G Butterfly-Kanüle entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Stauung nicht länger als eine Minute dauerte und nicht zu fest angelegt war. Die Probanden waren gemäß der Auflagen der Ethikkommission aufgeklärt und hatten ihr Einverständnis schriftlich gegeben.

Nach der Entnahme blieben die Proben außer bei Untersuchung kürzerer Zeitintervalle in der Regel mindestens 30 Min. liegen. Die Laufzeit der Messungen betrug je nach Untersuchung und Fragestellung zwischen 15 und 45 Min.

Für die Citratblutproben wurden Röhrchen mit 0,106 molarer Natriumcitratlösung (Sarstedt) verwendet. Das Mischungsverhältnis mit Blut betrug 1:10.

Die Untersuchungen wurden mit Geräten der Firma Pentapharm (81829 München, Deutschland) durchgeführt.

### 2.1.7 Auswertung – Beurteilung der Messkurven, Fehlerhafte Messungen

Bei vielen Untersuchungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Irreguläre Kurvenverläufe wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt und wurden in der Regel wiederholt.

Irreguläre Kurvenverläufe stellten sich folgendermaßen dar:

#### 1. Sofortige bzw. zu schnelle Gerinnung (Abb. 2-4 und 2-5)

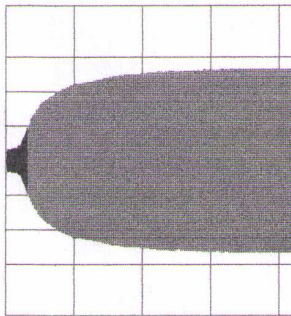


Abb. 2-4

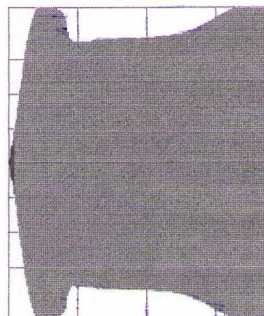


Abb.2-5

#### 2. Keine Gerinnung (Abb.2-6)

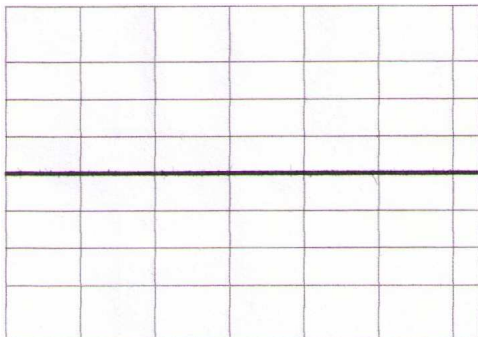


Abb.2-6

#### 3. Gestörte Gerinnung (Abb.2-7; Pat. ohne Gerinnungsstörung, restliche Kurven bzw. Zweitansatz regelrecht)

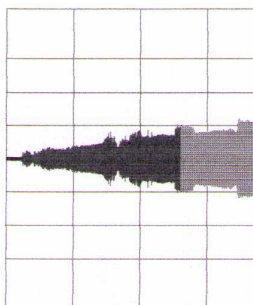


Abb.2-7

## 2.2 Andere Tests und Methoden

Als weitere Untersuchungsmethoden wurden durchgeführt:

### 2.2.1 Automatische Zellzählung

Bei allen Untersuchungen wurden Thrombozytenzahl, Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Hämoglobin und die Leukozytenzahl gemessen. Dafür wurde ein automatisches Zellzählgerät verwendet - Sysmex K-1000. (Sysmex Deutschland GmbH, Hamburg)

### 2.2.2 PFA-100® / VCP

Bei mehreren Teilstudien wurde zusätzlich der In-vitro-Blutungstest zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion gemacht.

Der **PFA-100®** ist ein etablierter und standardisierter Test. Bei Raumtemperatur 30 Min. vorinkubiertes Citratblut wird in das Reservoir einer Kartusche pipettiert. Anschließend wird das Blut unter konstantem Sog von -40 mbar durch eine Kapillare (30 mm lang, 200 µm Innendurchmesser) und durch ein Loch (Durchmesser 150 µm) einer mit Kollagen beschichteten Membran gesaugt. Zusätzlich ist diese Membran mit Epinephrin oder ADP beschichtet. Auf diese Weise wird die primäre Hämostase in vivo an einem kleinen Gefäß simuliert. Die Thrombozyten adhärieren an der Membran und vernetzen sich. Es bildet sich ein Thrombozytenpfropf, der den weiteren Blutzustrom vermindert. Dieser Vorgang wird von einem elektronischen System gemessen und ausgewertet, bis die Öffnung im Filter vollständig verschlossen ist. Es werden dabei folgende Parameter ermittelt: initialer Blutfluss (IF), Verschlusszeit (VZ) und Blutvolumen (BV). Die Messung wird beendet, wenn entweder das Loch in der Membran (Apertur) verschlossen ist oder die VZ von 300 s oder das benötigte BV von 800 µl überschritten werden.

Eine Weiterentwicklung des PFA-100® Geräts ist die **VCP-** Methode. Bei ihr wird die Kapillare der Messzellen durch eine „elektronische Kapillare“ virtuell ersetzt. Die Kapillare wird durch ein Verfahren simuliert, bei dem der Computer die Druckverhältnisse während der Messung so steuert, dass sie einer tatsächlichen

Kapillare entsprechen. Es können die gleichen Parameter gemessen werden. Für unsere Versuche wurden die PFA-Messzellen nach entsprechender Modifikation verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Kapillaren auf ein Drittel gekürzt. Die Messung wurde beendet, wenn die VZ 486 s, bzw. das BV 950  $\mu\text{l}$  überschritt. Nähere Einzelheiten zu dem verwendeten Verfahren wurden von Kretschmer und Mit. publiziert [65].

### 2.2.3 Kugelkoagulometer KC 4 und Häkchenkoagulometer Schnitger-Gross

Das **Kugelkoagulometer KC 4A micro** (Amelung Heinrich GmbH, Lehbringsweg 59, 32657 Lemgo) hat 4 Messkanäle, die sich während der Messung drehen. In die Öffnungen der Kanäle wurden Plastikküvetten eingebracht. In jede Küvette wurde eine kleine Stahlkugel gegeben.

Während der Messung drehen sich die in einem Winkel von  $10^\circ$  geneigten Küvetten. Die Kugeln bleiben am tiefsten Punkt der Küvette liegen. Sobald sich in der Küvette ein Gerinnsel bildet, in das die Kugel einbezogen wird, wird die Kugel von der Küvette mitgerissen. Durch die dann ausgelöste Unterbrechung eines Magnetfelds im Gerät kann die Gerinnungszeit gemessen werden. Die Blutproben wurden 30 Min. nach Entnahme bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Schwenken des entsprechenden Röhrchens, wurden  $300\mu\text{l}$  Probe entnommen und in die Küvette pipettiert. Nach Probenzugabe wird eine Minute gewartet. In dieser Zeit wird die Probe in der Küvette angewärmt ( $37^\circ\text{C}$ ). Danach wurde  $n\ 20\ \mu\text{l}$  Start Reagenz ( $\text{CaCl}_2$ ) zugegeben, die Messung gestartet und schließlich die Gerinnungszeit gemessen. Der Test entspricht vom Prinzip her dem NATEM Test. Generell wurden wegen der großen Variabilität der Ergebnisse Vierfachmessungen gemacht.

Beim **Häkchenkoagulometer SGC** wird die Probe durch ein regelmäßig eintauchendes Häkchen gemischt. Sobald die Gerinnung einsetzt, bleibt ein Fibrinfaden am Häkchen haften, sodass das Häkchen sich nicht in unveränderter Weise zurückziehen lässt. Dadurch wird die Zeitmessung gestoppt.

### 2.2.4 Aggregometrie

Eingesetzt wurde ein Plättchenaggregometer (Platelet Aggregation Profiler 4, Bio/Data Corporation, Hatboro PA USA).

Messprinzip: Zu einer plättchenreichen Plasmaprobe, die sich im Strahlengang eines Photometers befindet und gleichmäßig gerührt wird, wird ein Stimulanz hinzugefügt (z.B. ADP, Collagen, Ristocetin). Die einsetzende Aggregation führt zu einer Abnahme der optischen Dichte bzw. Zunahme der Transmission, die quantitativ erfasst und graphisch dargestellt wird. Der nach vollständig abgelaufener Aggregation resultierende Gesamtanstieg der Transmission ( $T_{\max}$ ) wurde als Maß für die Thrombozytenfunktion herangezogen. Ausmaß der Aggregation und Verlauf der Aggregationskurve sind vom jeweiligen Aggreganz abhängig. Durch Verwendung verschiedener Aggreganzen in unterschiedlicher Konzentration können Aggregationsprofile erstellt werden. Veränderungen der Aggregationsprofile lassen Rückschlüsse auf bestimmte Funktionsstörungen zu.

Verwendet wurden folgende Aggreganzen: Ristocetin in Konzentrationen von 0,5 bzw. 1,0 und 1,5 mg/ml; Kollagen 0,19 mg/ml; ADP in Konzentrationen 2 und 4  $\mu\text{mol/L}$ ; Arachidonsäure 0,5 mg/ml.

#### 2.2.5 Quick, PTT, FBR, D-Dimere, Antithrombin

Mit Hilfe eines Gerinnungsautomaten (Blood Coagulation System/BCS; Dade Behring, Deutschland) wurden Quick-Wert, INR, PTT, Fibrinogen, D-Dimere und Antithrombin gemessen.

#### 2.2.6 Herstellung von plättchenarmem Plasma (PAP) und Probenverdünnung

Nach Probengewinnung wurde das Blut 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Citratröhrchen wurden liegend gelagert. Dann wurden sie 15 Min. bei 130 x g zentrifugiert. Der plättchenreiche Überstand (Plättchenreiches Plasma, PRP) wurde entnommen und erneut 10 Min. bei 1500 x g zentrifugiert. Der so entstandene Überstand ist das Plättchenarme Plasma (PAP). Das Sediment besteht überwiegend aus Erythrozyten. Aus 3 ml Vollblut konnte man etwas mehr als 1 ml PAP gewinnen.

In 3 jeweils 4 ml Citratblut enthaltende Röhrchen wurde 1 ml PAP, 1 ml NaCl oder 1 ml HAES 6% hinzu gegeben. Die Röhrchen wurden mit einem Stöpsel verschlossen und zur Vermischung mehrmals hin- und hergeschwenkt. So entstanden 3 x 5 ml

verdünntes Blut mit einer Verdünnung von 20%. Die zur Kontrolle dienenden unverdünnten Proben wurden in gleicher Weise verschlossen und hin- und hergeschwenkt. Anschließend wurden von allen Proben die Thrombozytenzahl und der Hämatokrit gemessen. Danach ruhten die Proben liegend noch eine halbe Stunde. Vor Testung wurden die Röhrchen erneut geschwenkt.

### 2.3 Datenverarbeitung und statistische Prüfung.

Für die statistische Auswertung wurde die Beratung im Institut für Medizinische Biometrie der Philipps-Universität Marburg (Herr R.Jäger) eingeholt. Die statistische Auswertung der Daten dieser Arbeit wurde mit dem Programm SPSS für Windows, Version 12 durchgeführt.

Prüfung auf Normalverteilung:

Vor dem Einsatz parametrischer Tests (T-Test) wurden die in die Auswertung aufgenommenen Parameter mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung geprüft. Bei einem Signifikanzlevel von 5 % ( $p \leq 0,05$ ) wurde eine Normalverteilung angenommen.

Mittelwerte wurden durch den T-Test (Student) für verbundene und unverbundene Testproben verglichen. In den Fällen, wo Ausreißer den Mittelwert stark beeinflussten, wurden die Medianwerte verglichen. Bei verbundenen Stichproben wurde der Wilcoxon Test, bei unverbundenen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test bzw. der Median-Test zur Auswertung herangezogen. Zusätzlich wurden auch Box-Whiskers Plots erstellt.

Der Unterschied zwischen zwei Parametern wurde als signifikant betrachtet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.

### 2.4 Kurzbeschreibung der einzelnen Teilstudien

Bei der jeweiligen Teilstudie sind in einer Tabelle die Anzahl der Probanden, die verwendeten Tests, Reagenzien u.a.m. aufgelistet.



## 2.4.1 Einfluss des Zeitintervalls zwischen Blutentnahme (BE) und Testbeginn

### 2.4.1.1. Zeitintervalle bis 7 Minuten, Nativ- und Citratblut

Im Rahmen von POCT wird das ROTEM häufig mit frischem Nativblut ohne Zusatz von Antikoagulantien durchgeführt. Da die nicht antikoagulierten Proben relativ schnell angerinnen, ist eine Verfälschung der Ergebnisse bei unterschiedlichen Zeitintervallen bis zur Durchführung der Tests zu erwarten. Um die Stabilität der von nicht antikoagulierten und antikoagulierten Proben zu ermitteln, wurden Nativblutproben und Citratblutproben von gesunden Probanden nach unterschiedlichen Zeitintervallen untersucht.

Das Blut wurde am Ende der Spende aus der schon liegenden Kanüle mit Hilfe einer 10 ml Spritze vorsichtig entnommen. Fünf ml wurden in ein Citratröhrchen gegeben, die restlichen 5 ml wurden in ein Polypropylenröhrchen (Greiner 115301) überführt. Beide Röhrchen wurden verschlossen, vorsichtig 3x geschwenkt und danach stehend während der Messungen gelagert. Die Messungen wurden parallel an zwei Geräten durchgeführt. Um die genauen Zeiten einzuhalten wurde eine Stoppuhr benutzt. Die Tests mit Nativblut wurden jeweils 15 s. vor dem entsprechenden Zeitpunkt gestartet. Bei der ersten Messung wurden die Proben direkt aus dem Röhrchen entnommen, bei den späteren Messungen wurden die Röhrchen vor der Probeentnahme noch 3x vorsichtig geschwenkt. Die Untersuchungen fanden 1, 3, 5 und 7 Minuten nach Blutentnahme statt.

Es wurden zwei ROTEM Geräte verwendet. Um die Geräte bedingte Variation möglichst gering zu halten, wurden alle Nativblutmessungen stets an dem einen, alle Citratblutmessungen stets am anderen Gerät an allen vier Kanälen des jeweiligen Gerätes durchgeführt. Es wurden jeweils EXTEM oder INTEM oder NATEM als Doppeluntersuchungen von einem Spenderblut durchgeführt – Tabelle 2-2.

Für die 3 verschiedenen Testmethoden wurden insgesamt 60 Spender einbezogen. Einmal täglich wurde eine ROTROL Kontrolle mit der für den Tag verwendeten Testmethode gemacht.

Tabelle 2-2 Probanden, Materialien und Tests bei Messungen 1, 3, 5 und 7 Min. nach BE.  
Citratblut vs. Nativblut

<b>Probanden</b>			
60 Spender		Je 20 pro Testmethode	
<b>Materialien</b>		<b>Testmethode</b>	<b>Testlaufzeit</b>
InTEG Reagenz		INTEM Test	20 Min. (bis A20)
ExTEG L Reagenz		EXTEM Test	20 Min.
StartTEG Reagenz		NATEM Test	20 Min
ROTROL N		ROTROL Test	20 Min
Pipettenspitzen	300µl (weiss)	1 Ansatz pro Test	
		Mischverfahren 2	
Andere Tests: Sysmex - Thrombozyten, HkT			
<b>Gerät</b>			
RoTEG 05	S.N.0208038	Software Version	2.98
RoTEG 05	S.N.0208039	Software Version	2.98

2.4.1.2. Zeitintervalle <10 und >30 Min. nach BE. Blut von Spendern und thrombozytopenischen Patienten.

Im Rahmen von Funktionsuntersuchungen von Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass die Thrombozyten nach Blutentnahme oder anderen mechanischen Belastungen etwa 20 bis 30 Minuten Ruhe benötigen, um sich zu erholen, da sie anderenfalls eine gestörte Funktion aufweisen. Normalerweise wird das zu untersuchende Blut daher nach Entnahme 30 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen, um eine eventuelle Aktivierung der Thrombozyten durch mechanischen Stress rückgängig zu machen.

Tab. 2-3 Probanden, Materialien und Tests bei unterschiedlichen Zeitintervallen nach BE

<b>Probanden</b>			
Spender		10	
Patienten mit Thrombozytopenie		10	
<b>Materialien</b>		<b>Testmethode</b>	<b>Testlaufzeit</b>
InTEG Reagenz		INTEM Test	30 Min.
ExTEG S Reagenz		EXTEM Test	30 Min.
StartTEG Reagenz			
Pipettenspitzen	1000µl (blau)	2 Ansätze pro Test	
		Mischverfahren 1	
Andere Tests -Sysmex Thro, Hct;			
<b>Gerät</b>			
RoTEG 04	S.N.0124311	Software Version	2.94

Ob dies auch für die Untersuchung von Citratblut mittels ROTEM gilt, sollte im Rahmen dieser Studie geprüft werden. Daher wurden Messungen <10 und >30 Minuten nach Blutentnahme gemacht. Das Blut wurde von gesunden Blutspendern und Patienten mit Thrombozytopenie infolge Knochenmarkaplasie gewonnen – Tabelle 2-3.

#### 2.4.2 Modifikation des Pipettiervorgangs/Referenzwerte

Es wurden zwei unterschiedliche Pipettierverfahren verglichen (für ausführliche Beschreibung siehe 2.1.2). Das untersuchte Blut stammte von gesunden Blutspendern. Es wurden Tests mit INTEG, EXTEG und NATEG durchgeführt – Tabelle 2-4. Für jedes Verfahren wurden Referenzwerte für die einzelnen Parameter ermittelt.

Tab. 2-4 Probanden, Materialien und Tests bei dem Vergleich von zwei Pipettierverfahren (Referenzwerte)

<b>Probanden</b>			
Spender	30		
<b>Materialien</b>		<b>Testmethoden</b>	<b>Testlaufzeit</b>
InTEG Reagenz		INTEM Test	30 Min.
ExTEG S Reagenz		EXTEM Test	30 Min.
StartTEG Reagenz		NATEM Test	45 Min.
Pipettenspitzen	1000µl (blau)	2 Ansätze pro Test	
		Mischverfahren 1 u. 2	
Andere Tests -Sysmex - Thro, Hct			
<b>Gerät</b>			
RoTEG 04	S.N.0124311	Software Version	2.94

#### 2.4.3. Unterschiedliche Aktivatorreagenzien

Das zunächst verwendete ExTEG Reagenz (ExTEG S, Nobis) war relativ wenig empfindlich bzgl. des Nachweises von Gerinnungsstörungen im extrinsischen System. Ein Nachteil bestand auch darin, dass es als Lyophilisat erst gelöst werden musste.

Das zum Vergleich untersuchte Diaplastin (DiaMed) sollte eine höhere Sensitivität aufweisen. Darüber hinaus wurde es gebrauchsfertig geliefert.

Zur Prüfung der methodischen Variabilität wurden zunächst Präzisionsmessungen gemacht. Zum einen wurden von einem Spender 10 auf einander folgende

Messungen vorgenommen. Zum anderen wurden 10 aufeinander folgende ROTROL Kontrollen durchgeführt. Schließlich wurde täglich mit ROTROL die Messvariabilität kontrolliert.

Tabelle 2-5 Probanden, Patienten, Materialien und Tests zur Prüfung zweier Aktivatorreagenzien im EXTEM

<b>Probanden</b>			
Spender (Präzision)	1	Pat. unter Marcumar	38
Spender (Normalwerte)	18	Intensivpatienten	22
Pat. erhöhte Leberwerte	8		
<b>Materialien</b>		<b>Testmethoden</b>	<b>Testlaufzeit</b>
ExTEG S Nobis		ExTEM Test	10 Min. (bis A10)
Diaplastin Diamed		2 Ansätze pro Test	
StartTEG Reagenz		Mischverfahren 2	
ROTROL N			
Pipettenspitzen	300µl (weiss)		
Andere Tests - INR, aPTT, FBR, HCT, teilw.Thro,AT III, DD			
<b>Gerät</b>			
RoTEG 04	S.N.3892B645	Software	2.94

In einer zweiten Untersuchungsphase wurden weitere gesunde Spender, Patienten mit oraler Antikoagulation (Marcumar), Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion (Erhöhung der Transaminasen) sowie Intensivpatienten (vor allem nach kardiochirurgischen Operationen) vergleichend mit diesen beiden unterschiedlichen Aktivatorreagenzien untersucht, um die Sensitivität und Spezifität für die beiden Testmodifikationen zu ermitteln (2.4.5.4.-2.4.5.6.). Es wurden immer Doppelbestimmungen gemacht. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die verschiedenen Reagenzien hinsichtlich der Messkanäle und der Zeitintervalle gleichmäßig zum Einsatz kamen – Tabelle 2-5.

#### 2.4.4. Blutverdünnung mit unterschiedlichen Infusionslösungen

Zunächst wurden von 10 gesunden Probanden mit PAP, NaCl und HAES 20% verdünnte Proben (Herstellung siehe 2.2.6) untersucht. Die Untersuchung schloss neben ROTEM auch PFA-100® und VCP ein. Zusätzlich wurden unverdünnte Kontrollen mitgeführt. Die nötige Blutmenge betrug 30 ml Citratblut.

Bei den ROTEM Untersuchungen wurden Einzelbestimmungen (INTEM und NATEM), bei PFA-100® und VCP Doppelbestimmungen mit den Epinephrin-Messzellen durchgeführt.

In einer weiteren Untersuchungsreihe (10 Probanden) wurden analog verdünnte und unverdünnte Proben am Kugelkoagulometer mittels Vierfachbestimmung getestet.

In einer dritten Untersuchungsreihe (15 Probanden) wurden die gleichen Proben am Häkchenkoagulometer mittels Vierfachbestimmungen durchgeführt – Tabelle 2-6.

Tabelle 2-6 Probanden, Materialien und Tests bei Verdünnung mit NaCl, HAES und PAP; Messungen vor/nach Verdünnung

<b>Probanden</b>			
Spender	35		
<b>Materialien</b>		<b>Testmethoden</b>	<b>Testlaufzeit</b>
InTEG Reagenz		INTEM Test	ca. 30 Min.
StartTEG Reagenz		NATEM Test	ca. 45 Min.
Pipettenspitzen	1000µl (blau)	1 Ansatz pro Test	
		Mischverfahren 1	
Andere Tests – Sysmex - Thro, Hct; PFA-100®, VCP II, Kugelkoagulometer, Häkchenkoagulometer			
<b>Gerät</b>			
RoTEG 04	S.N.0124311	Software Version	2.94

## 2.4.5 Erfassung von Hämostasesstörungen

### 2.4.5.1. Einfluss von ASS Einnahme

Vier gesunde Probanden nahmen an 3 aufeinander folgenden Tagen immer zur gleichen Tageszeit eine Tablette ASS 100. Vor der ersten und 2 Stunden nach der letzten Einnahme wurden ROTEM (INTEM und EXTEM), PFA-100® (EPI) und VCP (EPI) durchgeführt – Tabelle 2-7.

### 2.4.5.2 von Willebrand Syndrom (vWS)

Es wurden acht Patienten getestet. Bei einem Teil der Patienten war ein vWS bekannt, bei anderen wurde es aufgrund der Anamnese vermutet. Bei sechs Patienten wurde das vWS letztendlich nachgewiesen – teilweise mit milder Form (vWF:RiCof 45-67%) und mittelschwerem vWS (vWF:RiCof 13 –18%).

Bei zwei Probanden waren die Tests bzgl. des vWS ohne pathologischen Befund. Bei dem einen wurde aufgrund Erkrankung seines Bruders und seiner Mutter der

Verdacht auf vWS ausgesprochen. Der zweite Patient klagte über eine erhöhte Blutungsneigung.

Die Untersuchungen schlossen ROTEM (INTEM und EXTEM), PFA-100® (Epinephrin und ADP), Plättchenaggregometrie (Kollagen, ADP, Ristocetin, Arachidonsäure), Quick, PTT, Fibrinogen, Faktor VIII und IX Aktivität, vWF:RiCof, Kollagen-Bindung-Aktivität, vWF:Ag ein – Tabelle 2-7.

#### 2.4.5.3. Heparinisierte Patienten

Es wurden 22 heparinisierte Patienten (Heparindosis 22800 – 43200 IE/Tag) im ROTEM (INTEM und EXTEM) untersucht – Tabelle 2-7. Die Heparinwirkung wurde anhand der PTT verifiziert.

Tabelle 2-7 Probanden, Materialien und Tests bei Spendern und Patienten mit beeinträchtigter Gerinnung

<b>Probanden</b>			
ASS	4	Heparin	22
vWS	8	Marcumar	12
<b>Materialien</b>		<b>Testmethoden</b>	<b>Testlaufzeit</b>
InTEG Reagenz		INTEM Test	30 Min.
ExTEG Reagenz		EXTEM Test	30 Min.
StartTEG Reagenz		NATEM Test	45 Min.
Pipettenspitzen	1000µl (blau)	1 Ansätze pro Test	
		Mischverfahren 1	
Andere Tests – Sysmex -Thro, Hct; BCS – Quick, aPTT; Plättchenaggregometer, PFA-100®, Faktor VIII und IX Aktivität, vWF:RiCof, Kollagen-Bindung-Aktivität, vWF:Ag			
<b>Gerät</b>			
RoTEG 04	S.N.0124311	Software Version	2.94

#### 2.4.5.4. Patienten unter Marcumar

Zwölf Patienten unter Marcumartherapie (INR zwischen 2 und 7,3) wurden im ROTEM (INTEM, EXTEM und NATEM) untersucht. Die Marcumarwirkung wurde anhand der INR (Quick) verifiziert – Tabelle 2-7.

In einer zweiten Untersuchungsserie wurden 38 marcumarisierte Patienten (INR zwischen 1,9 und 8,7) mit zwei EXTEM Reagenzien – ExTEG S Nobis und Diaplastin von Diamed untersucht – s. Tabelle 2-5, bzw. Abschnitt 2.4.3.

#### 2.4.5.5. Patienten mit Leberfunktionsstörung

Es wurden 8 Patienten mit Erhöhung der Transaminasen (GGT zwischen 15 und 120 U/l; GPT zwischen 9 und 478 U/l; GOT zwischen 9 und 99 U/l) bzw. Patienten mit Leberfunktionsstörung getestet. Die Untersuchungen schlossen ROTEM-EXTEM (ExTEG S und Diaplastin) ein – Tabelle 2-5, Abschnitt 2.4.3.

#### 2.4.5.6. Intensivpatienten

Es wurden 22 Patienten nach chirurgischen Eingriffen (überwiegend Herzoperationen) getestet. Die Untersuchungen schlossen ROTEM - EXTEM (ExTEG S und Diaplastin) ein - Tabelle 2-5, Abschnitt 2.4.3.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Einfluss des Zeitintervalls zwischen BE und Testbeginn

Der Hersteller des ROTEM-Systems sieht das Intervall zwischen BE und Testdurchführung als unkritisch an. Darüber hinaus soll die Verwendung von Nativblut und Citratblut gleichermaßen möglich sein und keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Ergebnisse mit sich bringen.

Wie bereits vorher dargelegt, gerinnen nicht antikoagulierte Proben innerhalb weniger Minuten, weshalb geklärt werden sollte, wie zuverlässig die Befunde innerhalb der ersten Minuten nach Blutentnahme sind. Citrat-antikoagulierte Proben wurden untersucht, um auch die Vergleichbarkeit der Befunde von Nativ- und Citratblut zu prüfen. Außerdem sollte an antikoagulierten Proben untersucht werden, ob auch ein Ruheintervall von ca. 30 Minuten erforderlich ist, um den Thrombozyten die Möglichkeit zur Erholung vom Abnahmestress zu geben.

#### 3.1.1 Zeitintervalle von 1 bis 7 Minuten nach BE

Die Zeitintervalle wurden so gering gewählt, damit keine spontane Gerinnung bei Verwendung von Nativblut eintritt. Tatsächlich konnten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitintervallen nachgewiesen werden, aber lediglich bei der CT konnte in EXTEM und INTEM ein einheitlicher Trend in Abhängigkeit vom Zeitintervall festgestellt werden. Die CT nahm in diesen Testverfahren mit dem Zeitintervall zu. Die mit Thromboplastin und partiellem Thromboplastin aktivierten Ansätze des ROTEM wiesen deutlich kürzere CT und CFT sowie breitere MCF als das NATEM auf. Generell wurden bei etwa gleicher Streubreite längere CT und CFT mit Citratblut gemessen (Abb. 3.1 - 3.18). Im Einzelnen werden die Unterschiede zwischen den Ergebnissen mit Nativ- und Citratblut in Kapitel 3.2. aufgeführt.



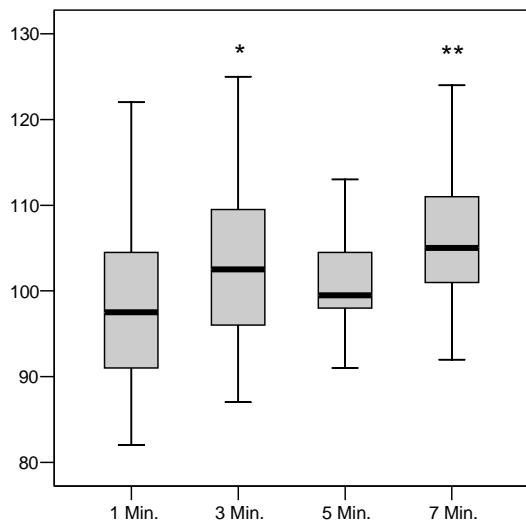


Abb. 3-1 CT in INTEM mit Nativblut

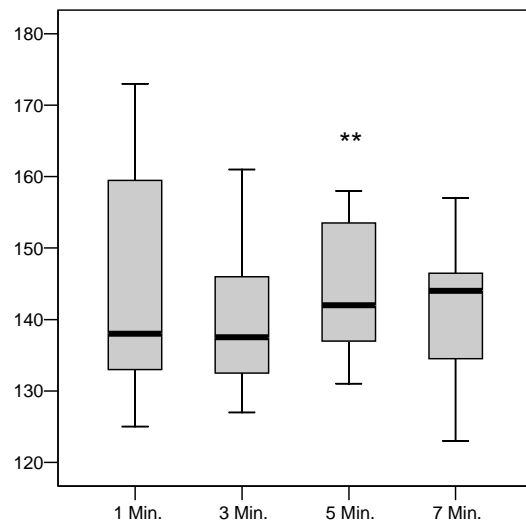


Abb. 3-2 CT in INTEM mit Citratblut

\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  beim Vergleich von 3,5 und 7 vs. 1 Min. nach BE

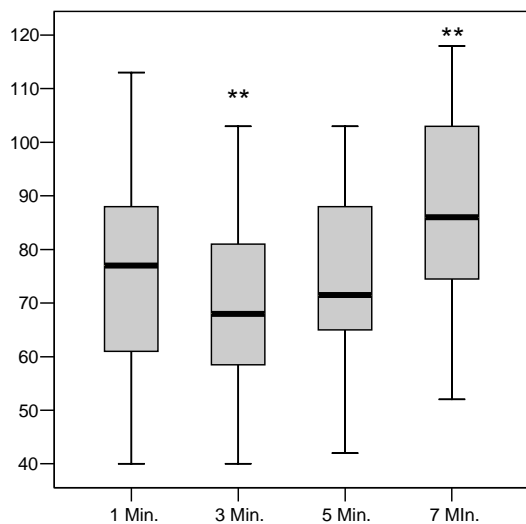


Abb. 3-3 CFT in INTEM mit Nativblut

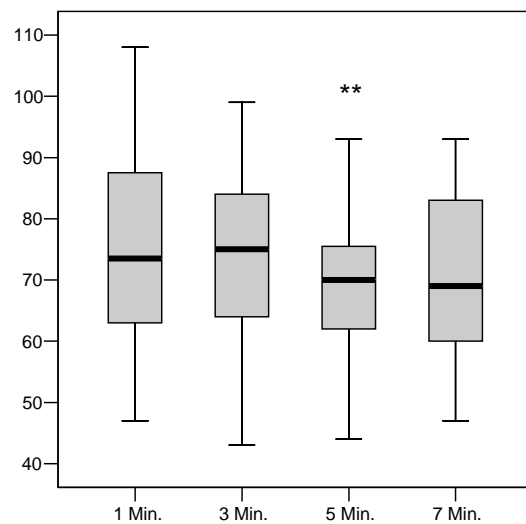


Abb. 3-4 CFT in INTEM mit Citratblut

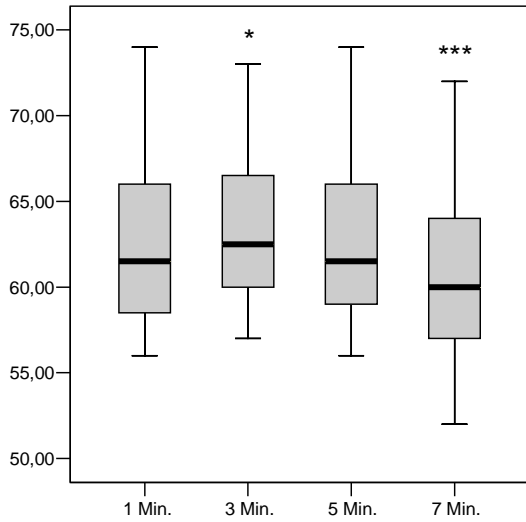


Abb. 3-5 MCF in INTEM mit Nativblut

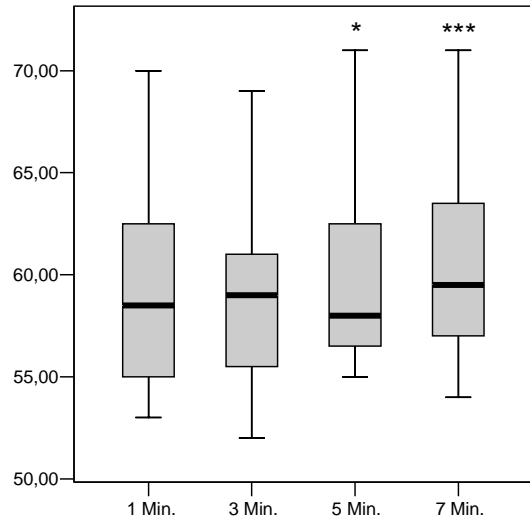


Abb. 3-6 MCF in INTEM mit Citratblut

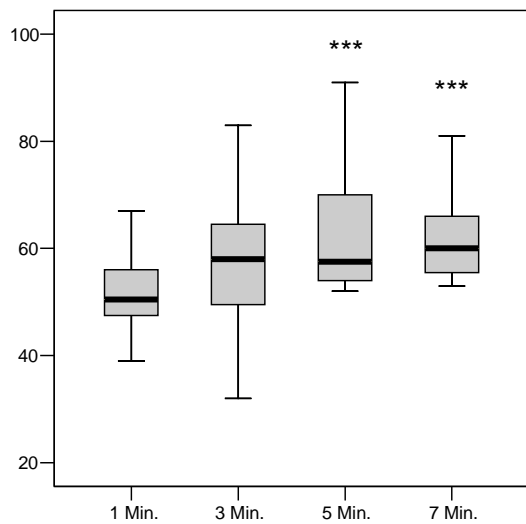


Abb. 3-7 CT in EXTEM mit Nativblut

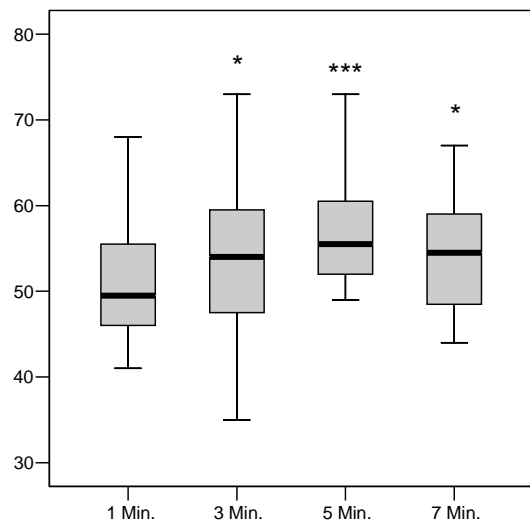


Abb. 3-8 CT in EXTEM mit Citratblut

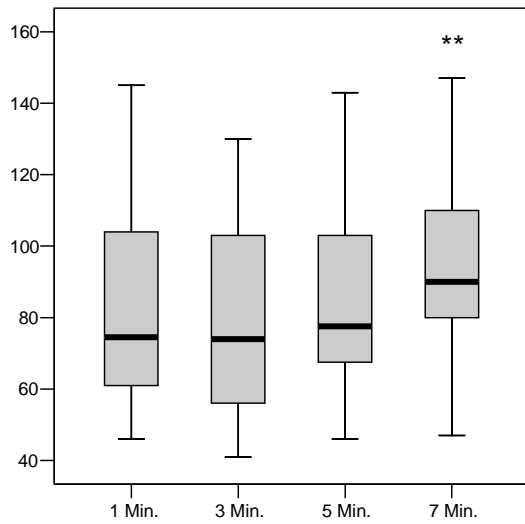


Abb. 3-9 CFT in EXTEM mit Nativblut

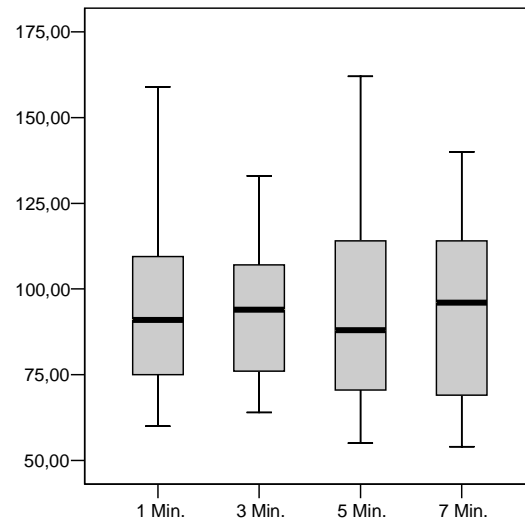


Abb. 3-10 CFT in EXTEM mit Citratblut

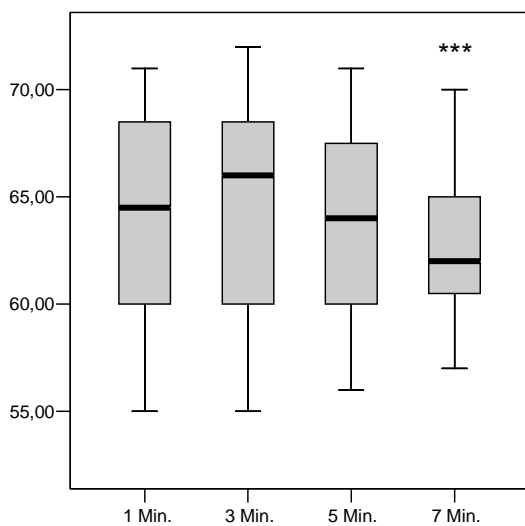


Abb. 3-11 MCF in EXTEM mit Nativblut

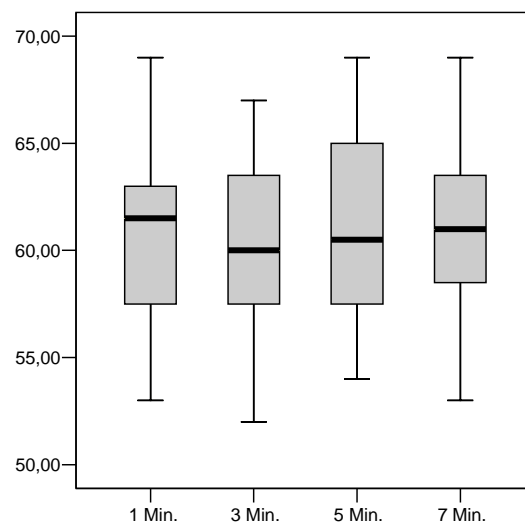


Abb. 3-12 MCF in EXTEM mit Citratblut

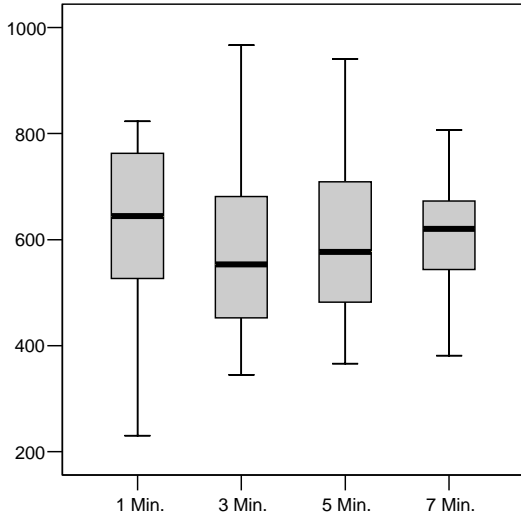


Abb. 3-13 CT in NATEM mit Nativblut

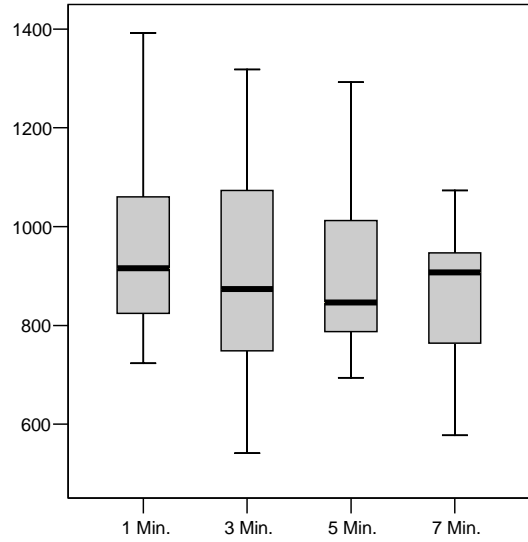


Abb. 3-14 CT in NATEM mit Citratblut

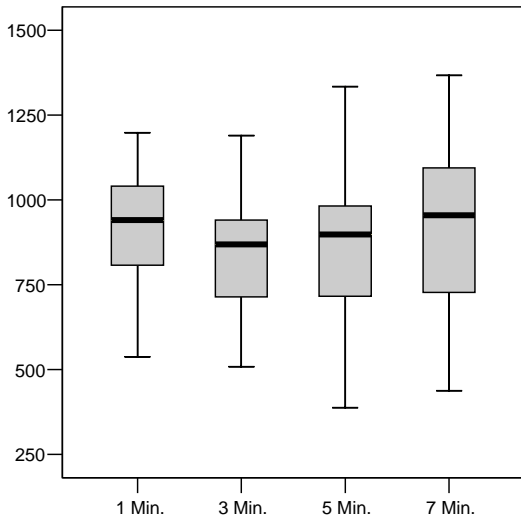


Abb. 3-15 CFT in NATEM mit Nativblut

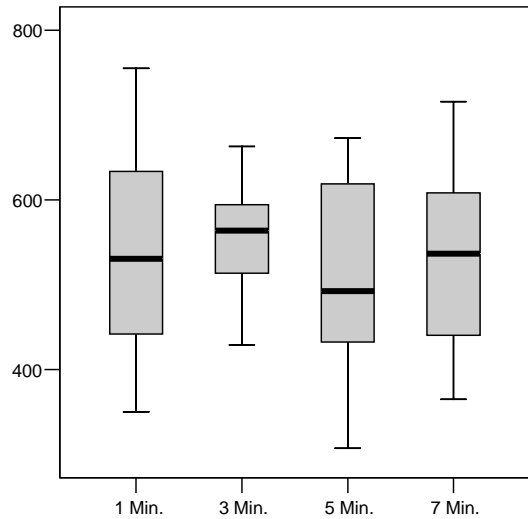


Abb. 3-16 CFT in NATEM mit Citratblut

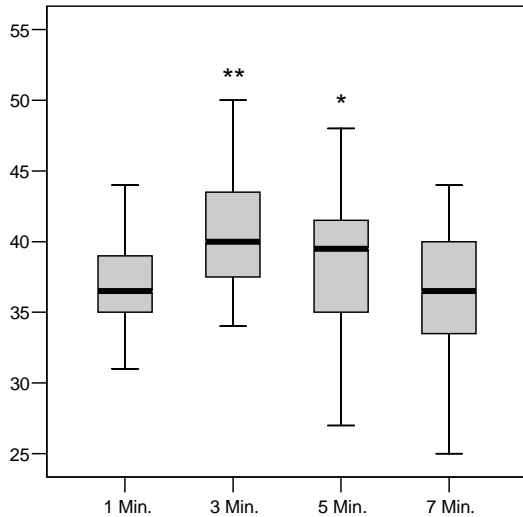


Abb. 3-17 MCF in NATEM mit Nativblut

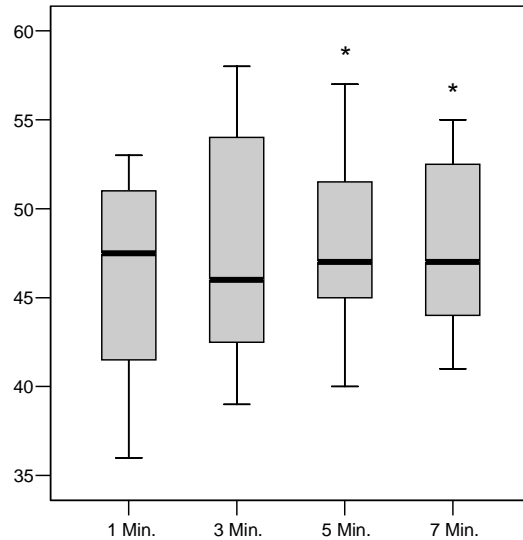


Abb. 3-18 MCF in NATEM mit Citratblut

### 3.1.2 Zeitintervalle <10 und >30 Min. nach BE

#### 3.1.2.1. Spenderblutproben

Citratblut von 10 gesunden Spendern wurde wenige Minuten nach Entnahme (<10 Min.) und nach 30 Min. (>30 aber <40 Min.) nach BE mittels INTEM und EXTEM untersucht (Doppeluntersuchungen). Die Medianwerte der einzelnen Parameter verglichen wir mit Hilfe des Wilcoxon Tests für verbundene Stichproben.

Bei dem INTEM Test fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zeitintervallen (Abb. 3.19):

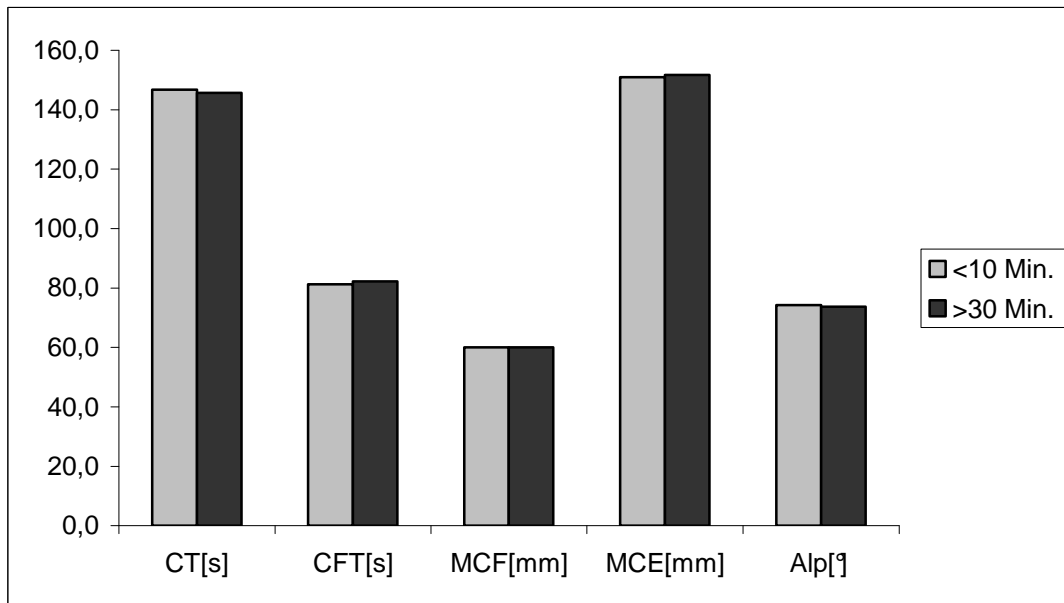


Abb. 3-19 INTEM Parameter bei Untersuchung von Citratblut 10 und 30 Min. nach Blutentnahme, (Medianwerte, Spender, n=10)

Bei dem EXTEM Test (Abb. 3.20) war 30 Min. nach BE die CFT etwas kürzer, entsprechend war der Alpha-Winkel etwas größer ( $p < 0,05$ ).

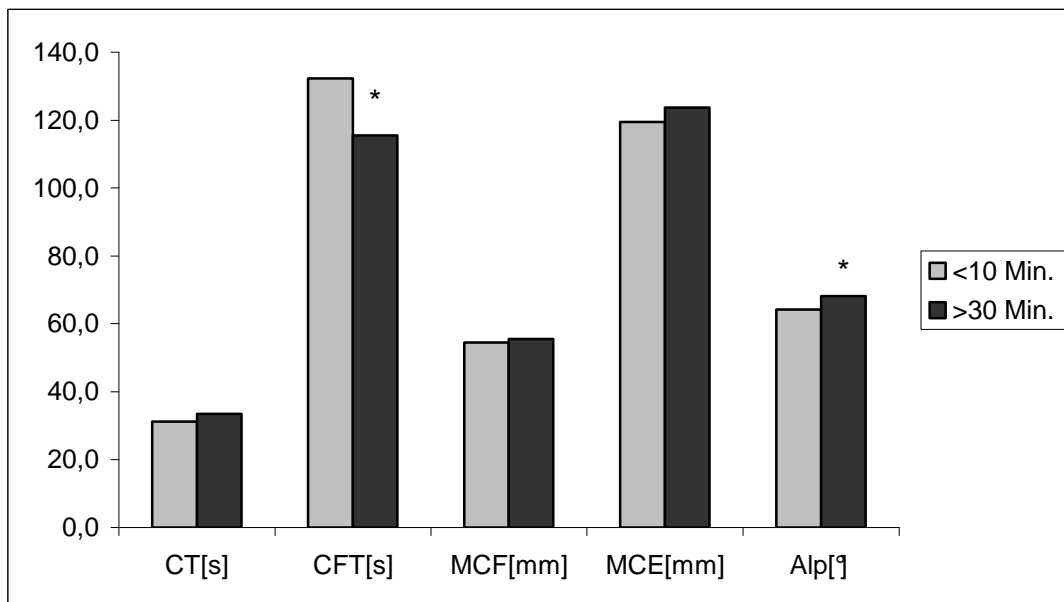


Abb. 3-20 EXTEM Parameter bei Untersuchung von Citratblut 10 und 30 Min. nach Blutentnahme, (Medianwerte, Spender, n=10)

Die Variationskoeffizienten  $V_k$  zwischen den nach unterschiedlichen Zeitintervallen ermittelten Befunden unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 3-21 und 3-22)

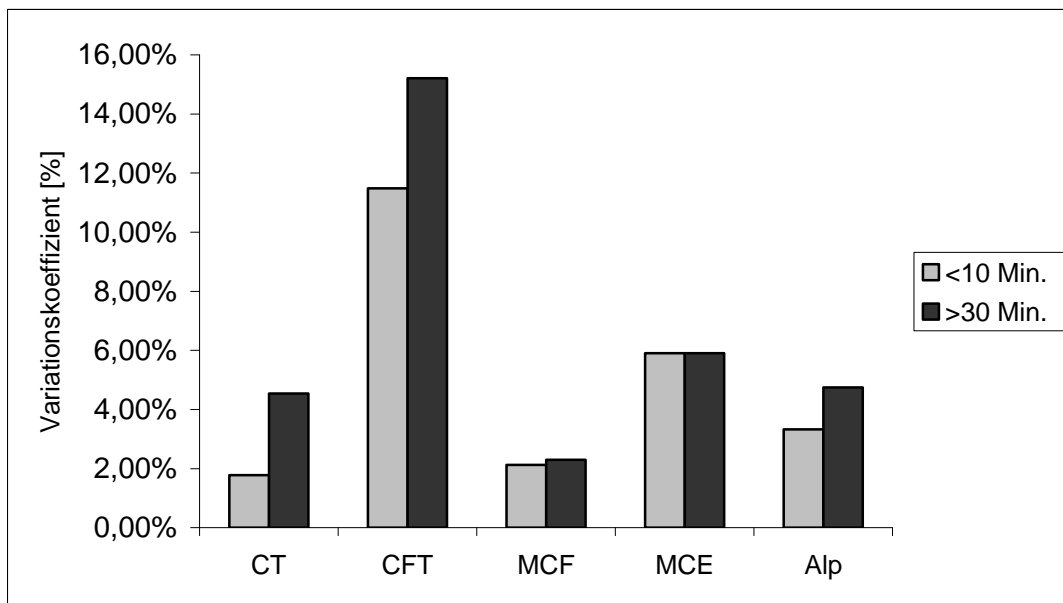


Abb. 3-21 Variationskoeffizienten  $V_k$  in INTEM bei Messung nach 10 und 30 Min.

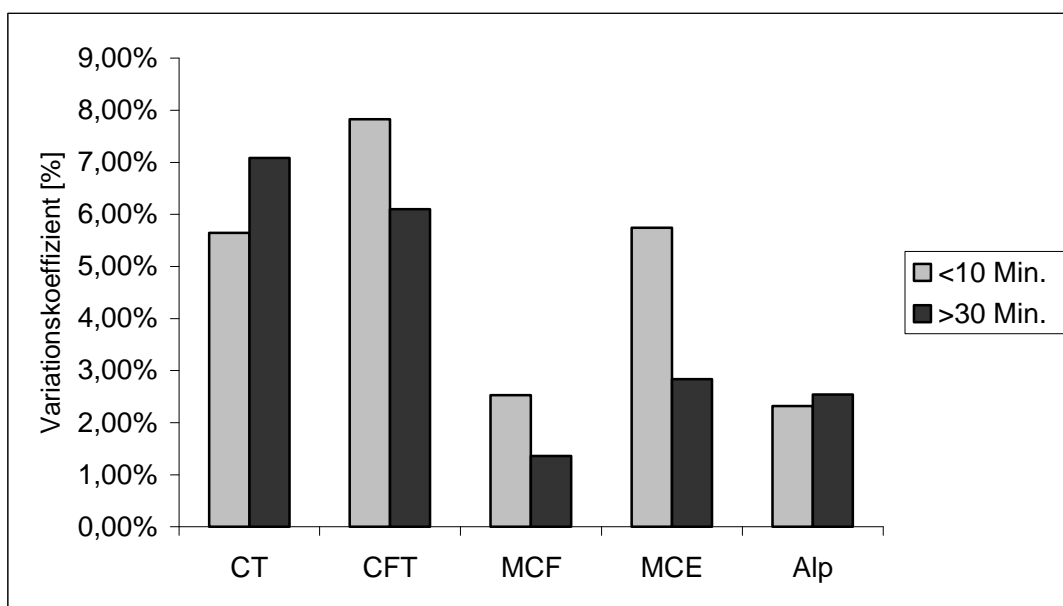


Abb. 3-22 Variationskoeffizienten  $V_k$  in EXTEM bei Messung nach 10 und 30 Min.

Der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Zeitintervallen für INTEM und EXTEM ist im Anhang in Tabelle a) aufgeführt.

### 3.1.2.2. Thrombozytopenische Patientenblutproben

Die unter 3.1.2.1. beschriebenen Untersuchungen wurden auch mit Citratblut thrombozytopenischer Patienten durchgeführt, um den Einfluss der Thrombozyten auf die evtl. Variabilität zu prüfen. Zunächst zeigten die thrombozytopenischen

Proben signifikant längere CFT und deutlich schmalere MCF als die Proben gesunder Blutspender. Es ergaben sich weder in INTEM noch EXTEM signifikante Unterschiede hinsichtlich des Zeitintervalls nach BE (Abb. 3-23 und 3-24).

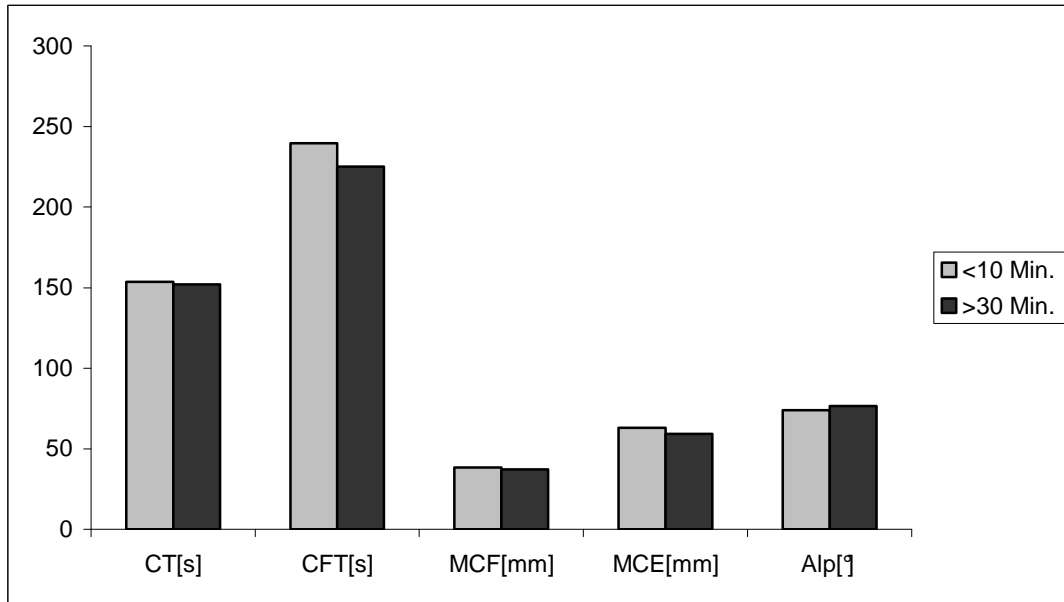


Abb. 3-23 INTEM Parameter bei Untersuchung von Citratblut 10 und 30 Min. nach Blutentnahme, (Medianwerte, Patienten mit Thrombozytopenie, n=10)

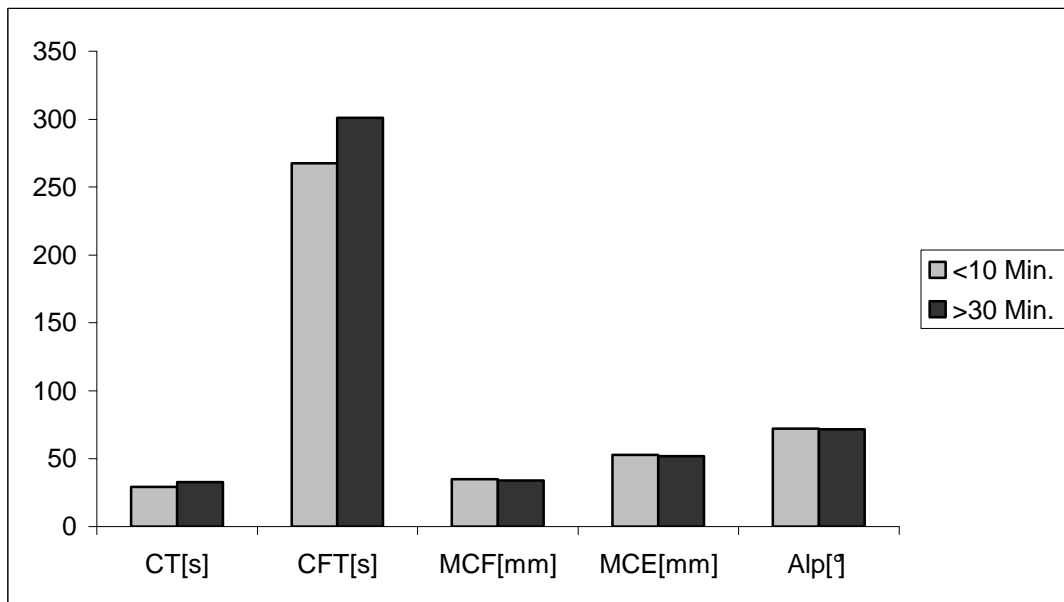


Abb. 3-24 EXTEM Parameter bei Untersuchung von Citratblut 10 und 30 Min. nach Blutentnahme, (Medianwerte, Patienten mit Thrombozytopenie, n=10)

Fast sämtliche Parameter zeigten sowohl in INTEM wie EXTEM größeren  $V_k$  in den Doppelbestimmungen, wenn dies erst nach >30 Minuten durchgeführt wurden Abb.



3-25 und 3-26). Allerdings war der Unterschied nur für die CFT in INTEM signifikant ( $p < 0,01$ ).

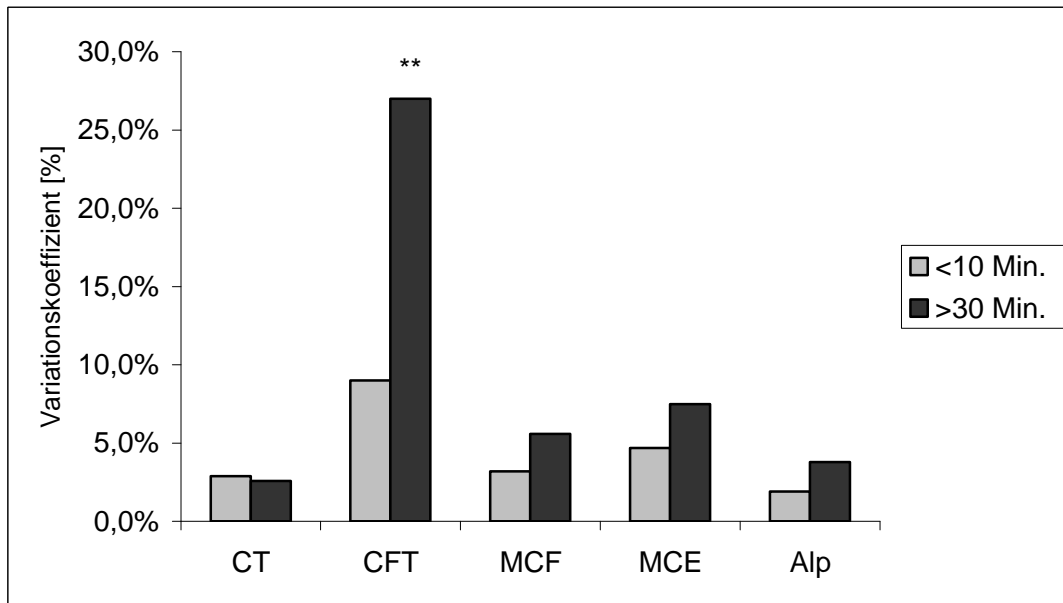


Abb. 3-25 Variationskoeffizienten  $V_k$  in INTEM bei Messungen nach 10 und 30 Min. (Patienten mit Thrombozytopenie,  $n=10$ )

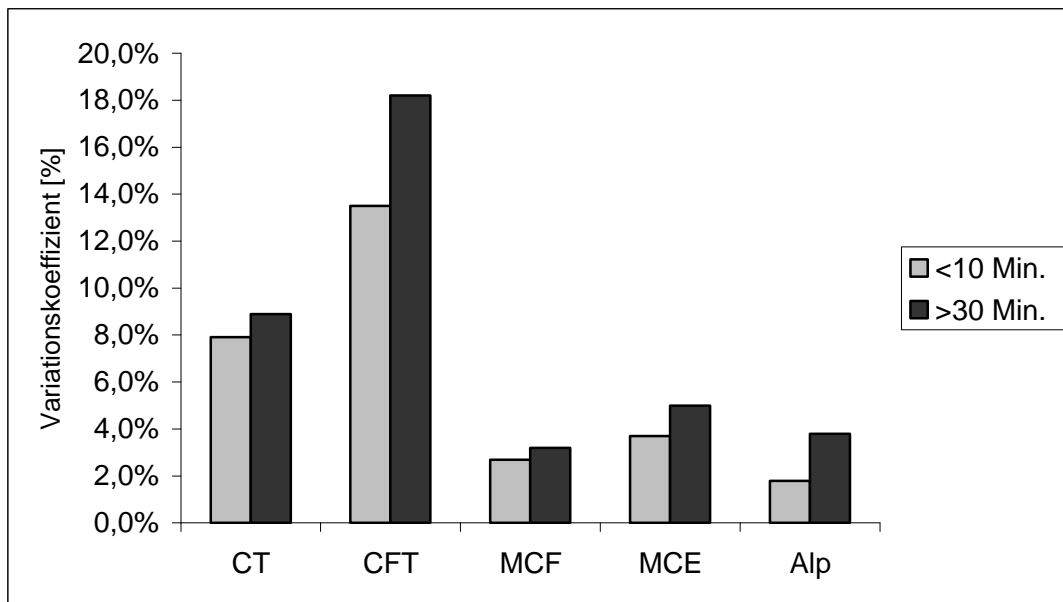


Abb. 3-26 Variationskoeffizienten  $V_k$  in EXTEM bei Messung nach 10 und 30 Min. (Patienten mit Thrombozytopenie,  $n=10$ )

Der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Zeitintervallen für INTEM und EXTEM ist im Anhang in Tabelle b) aufgeführt.

### 3.2. Nativblut versus Citratblut

Nachfolgend sind die Untersuchungen unter 3.1.1. hinsichtlich der unterschiedlichen Blutproben (Nativ- versus Citratblut) ausgewertet:

**INTEM:** Die CT war mit Nativblut deutlich kürzer als mit Citratblut ( $p < 0,001$ , Abb. 3-27). Dagegen waren CFT und MCF gering, aber signifikant größer als mit Citratblut. Logischerweise traf dies auch für die Amplituden nach 10 und 20 Minuten (A10 und A20) zu.

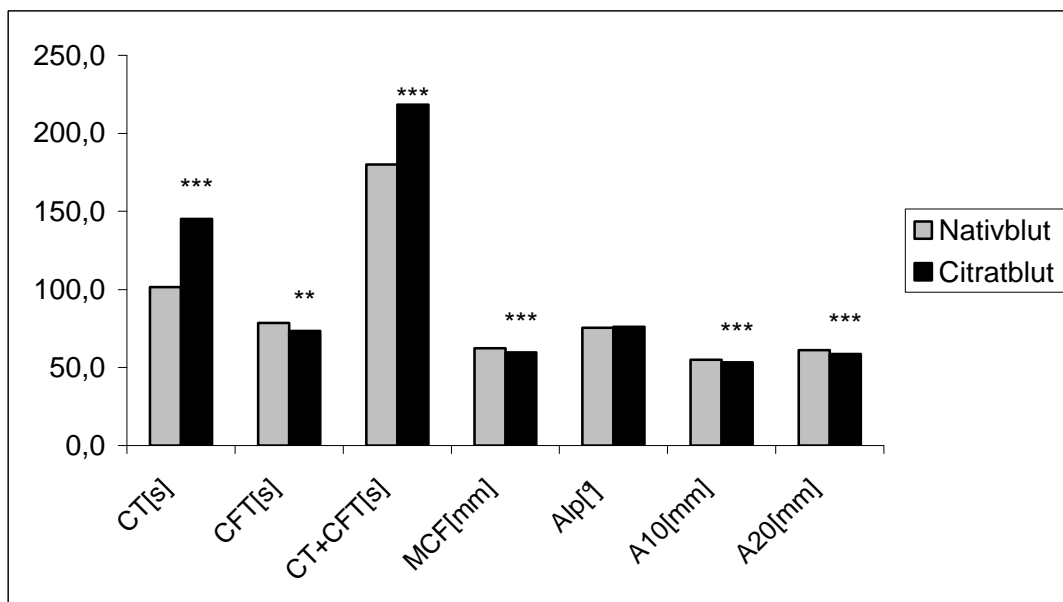


Abb. 3-27 Vergleich von Nativblut vs. Citratblut in INTEM (Mittelwerte, n=20 gesunde Probanden)

**EXTEM:** Die CT war im Gegensatz zu den Ergebnissen in INTEM mit Nativblut länger als mit Citratblut ( $p < 0,01$ , Abb. 3-28) bzw. die CFT kürzer ( $p < 0,001$ ). Allerdings waren die Unterschiede gering. Die übrigen Parameter zeigten die gleichen Unterschiede wie in INTEM.

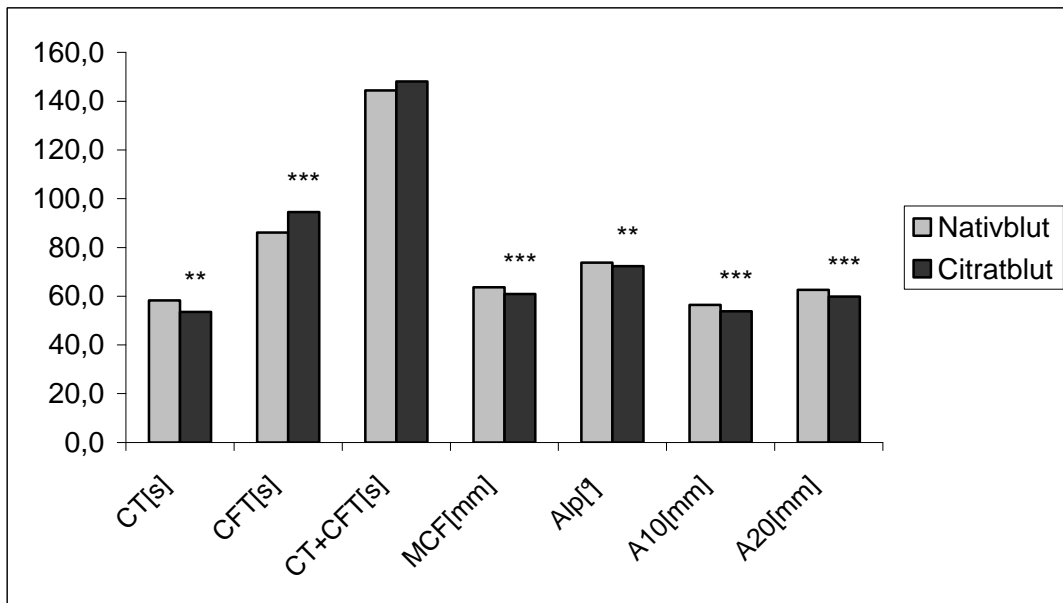


Abb. 3-28 Nativblut vs. Citratblut, Mittelwerte bei EXTEM, Spender, n=20

**NATEM:** Die Unterschiede zwischen Nativ- und Citratblut entsprachen bis auf die Amplituden (MCF, A20, A30) den für INTEM beschriebenen (Abb. 3-29a und b). Die Amplituden waren aber mit Nativblut deutlich schmaler ( $p < 0,001$ ).

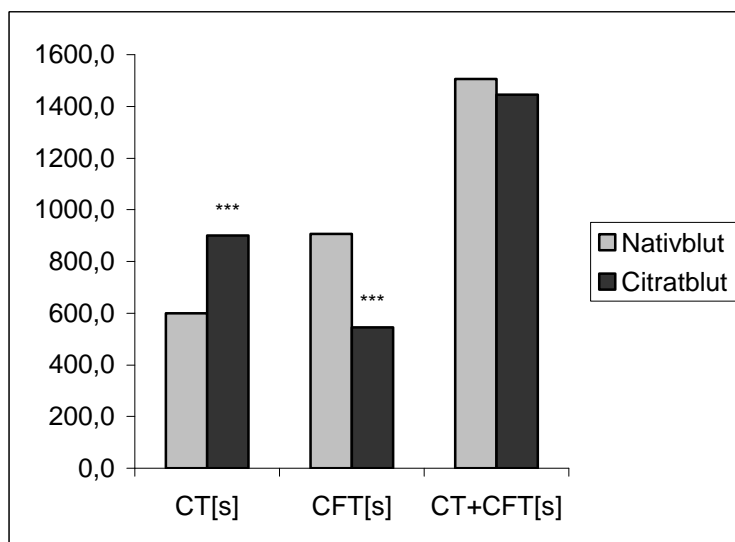


Abb. 3-29a Nativblut vs. Citratblut, Mittelwerte bei NATEM, Spender, n=20

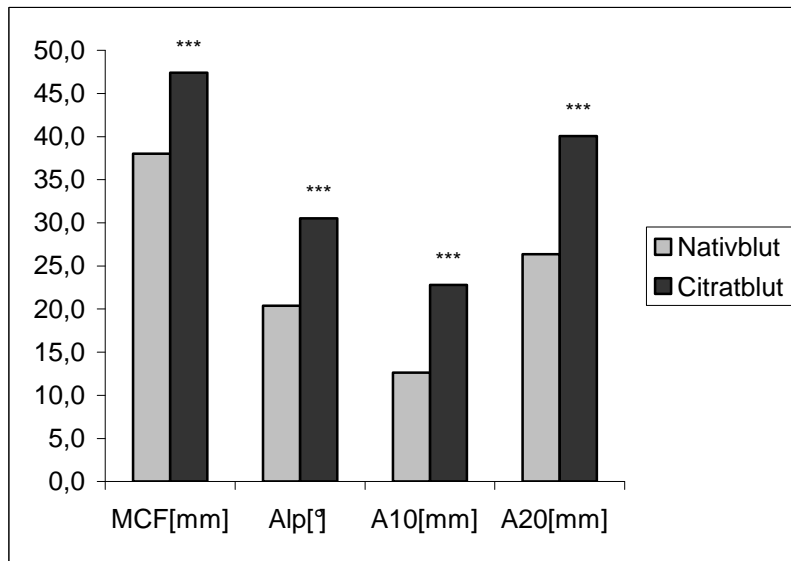


Abb. 3-29b Nativblut vs. Citratblut, Mittelwerte bei NATEM, Spender, n=20

Die Variationskoeffizienten waren in allen 3 RoTEM Verfahren für fast alle Parameter (außer CFT/NATEM) größer mit Nativblut, wobei die Unterschiede vor allem bei INTEM und EXTEM signifikant waren (s. Abb. 3-30 – 3-32)

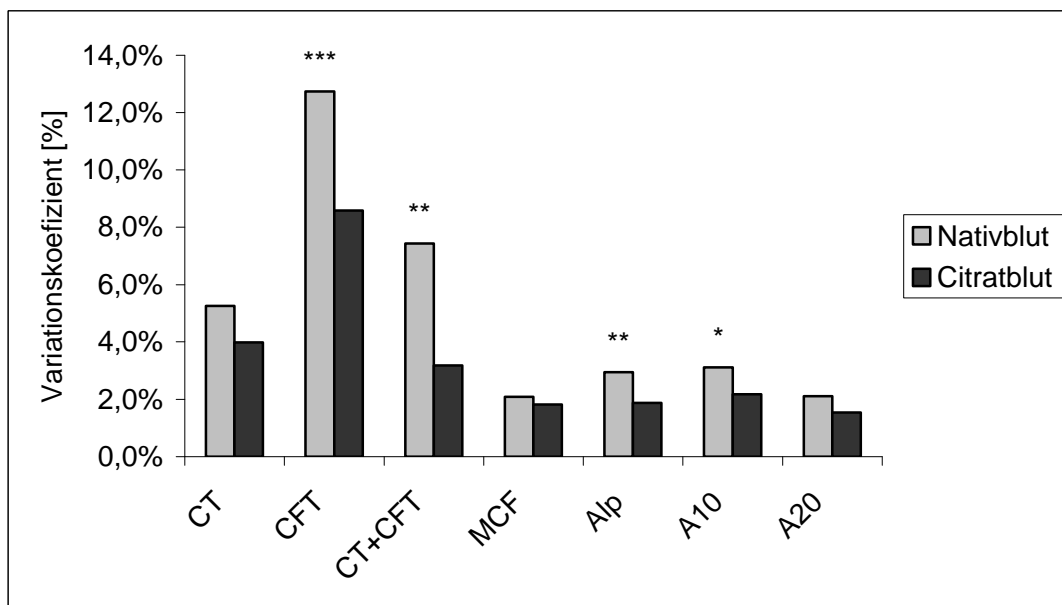


Abb. 3-30 Nativblut vs. Citratblut, Medianwerte der V<sub>k</sub> bei INTEM, Spender, n=20

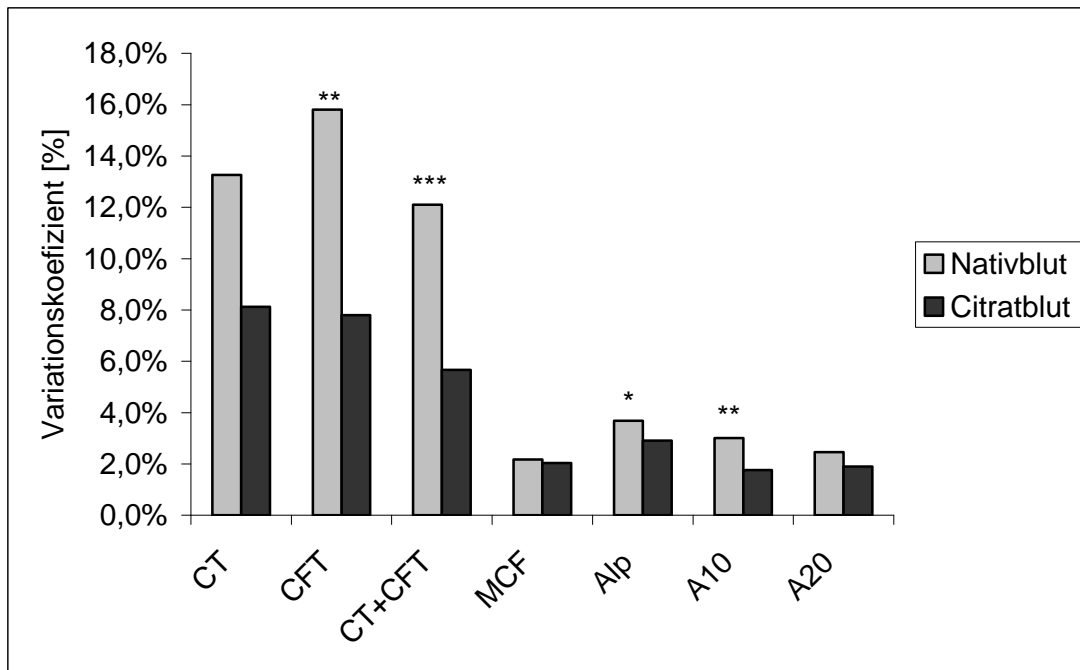


Abb. 3-31 Nativblut vs. Citratblut, Medianwerte der  $V_k$  bei EXTEM, Spender, n=20

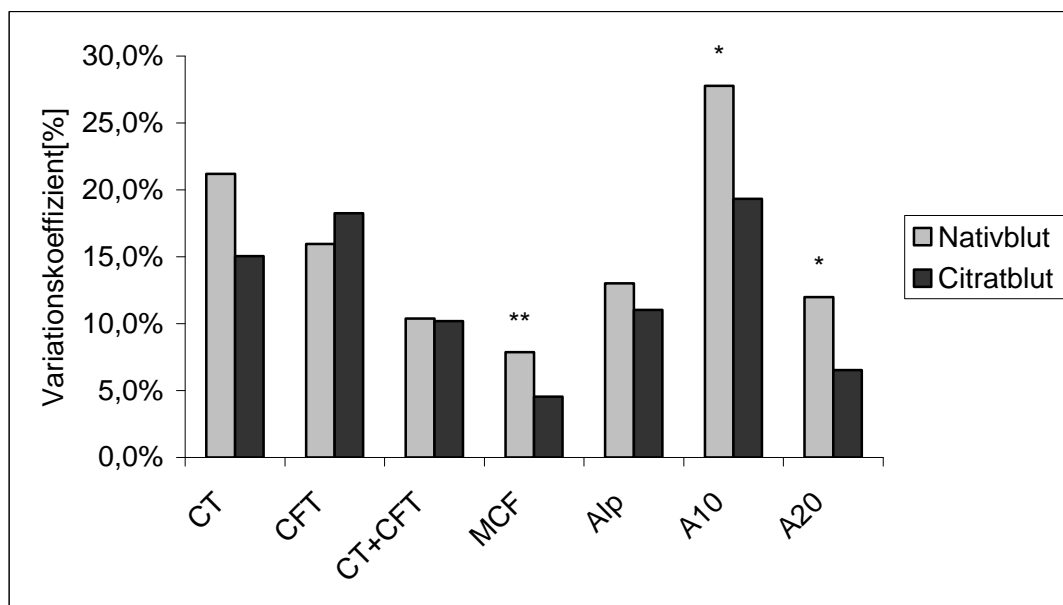


Abb. 3-32 Nativblut vs. Citratblut, Medianwerte der  $V_k$  bei NATEM, Spender, n=20

Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Nativblut- und Citratblutproben für die einzelnen Zeitintervallen sind im Anhang in den Tabellen c), d) und e) aufgeführt.

### 3.3 Modifikation des Pipettiervorgangs, Referenzwerte

Die unterschiedlichen Pipettierverfahren, durch die sich v.a. der Mischvorgang änderte ergaben signifikante Unterschiede in den unterschiedlichen ROTEM Testmethoden (Abb. 3-33 – 3-35a/b). Im Allgemeinen waren die Abweichungen trotz ihrer Signifikanz nicht groß. Vereinzelt wichen die ermittelten Referenzwerte jedoch erheblich ab z.B. die CFT bei INTEM.

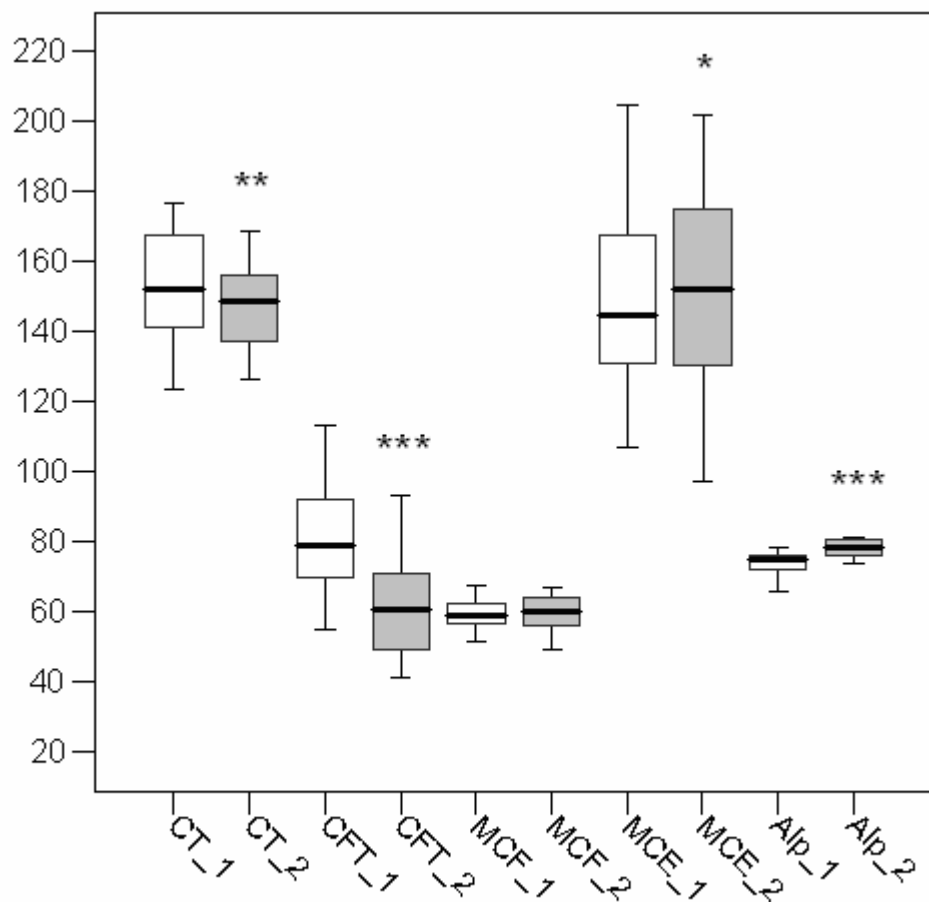


Abb. 3-33 Vergleich zweier unterschiedlicher Pipettierverfahren in INTEM, Referenzwerte (n=30 Spender)

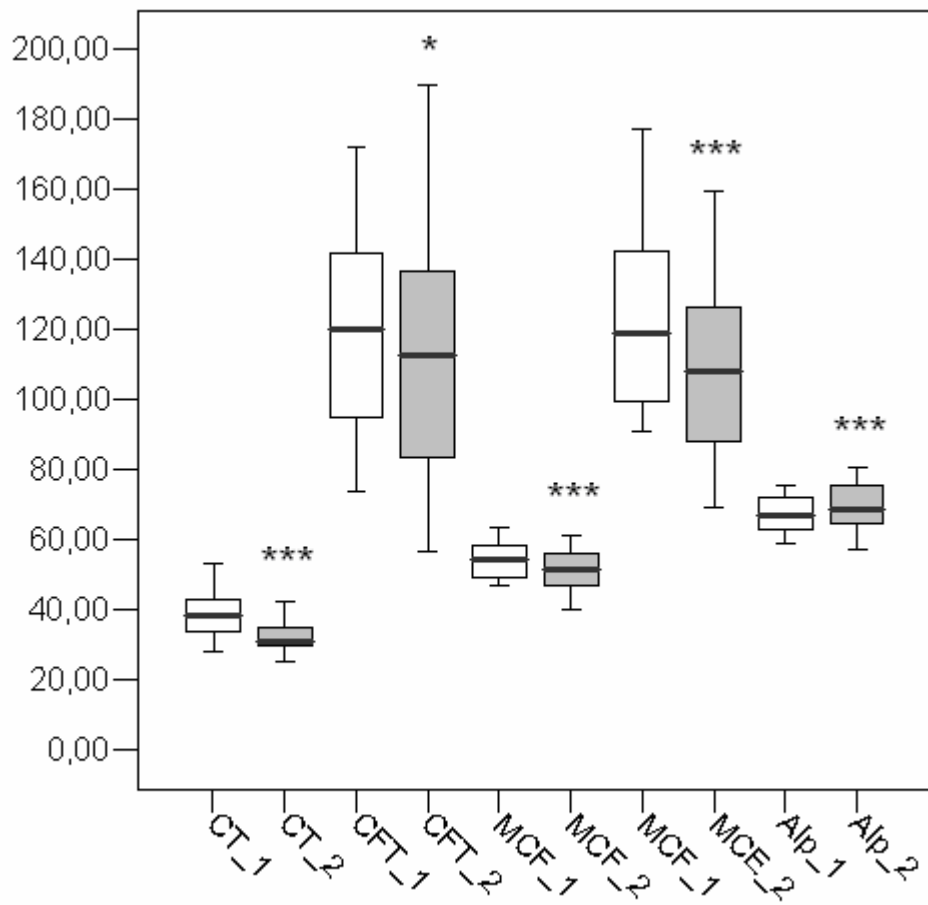


Abb. 3-34 Vergleich zweier unterschiedlicher Pipettierverfahren in EXTEM, Referenzwerte (n=30 Spender)

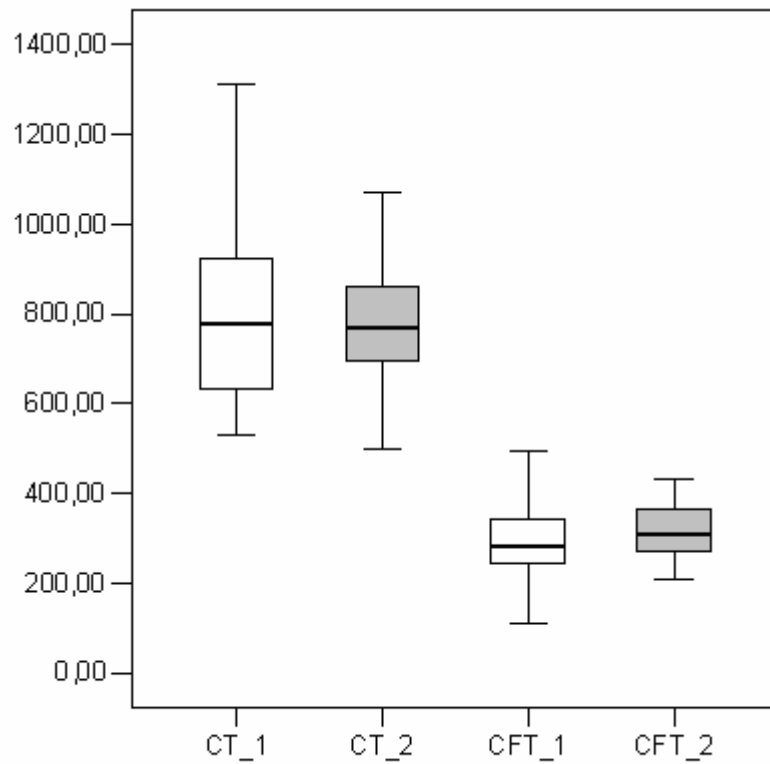


Abb. 3-35a Vergleich zweier unterschiedlicher Pipettierverfahren in NATEM, Referenzwerte (n=30 Spender)

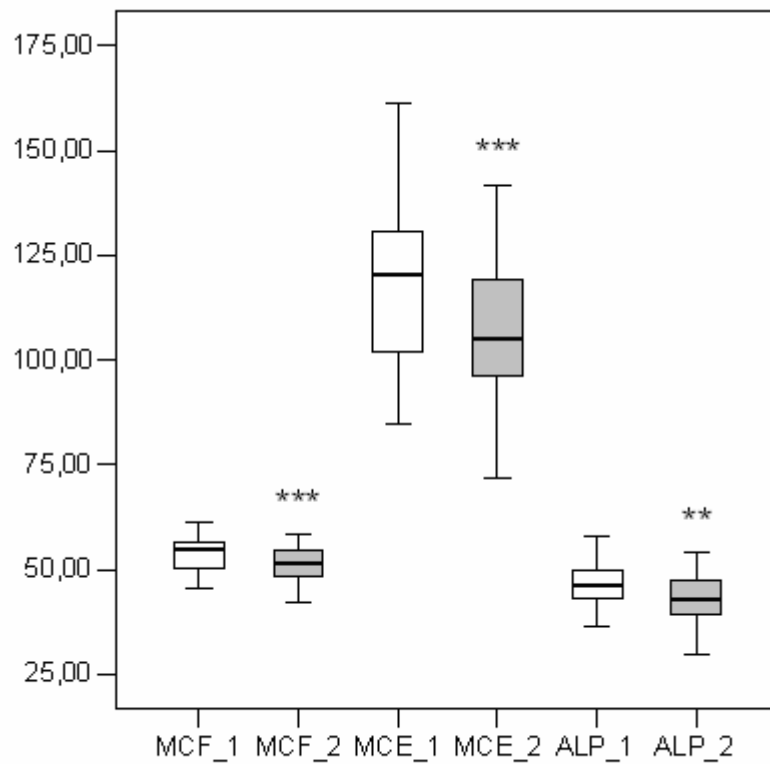


Abb. 3-35b Vergleich zweier unterschiedlicher Pipettierverfahren (1 und 2) in NATEM, Referenzwerte (n=30 Spender)



Die Variationskoeffizienten der Doppelbestimmungen ergaben vereinzelt signifikante, aber nicht besonders große Unterschiede für die beiden unterschiedlichen Pipettierverfahren (Abb. 3-36 - 3-38).

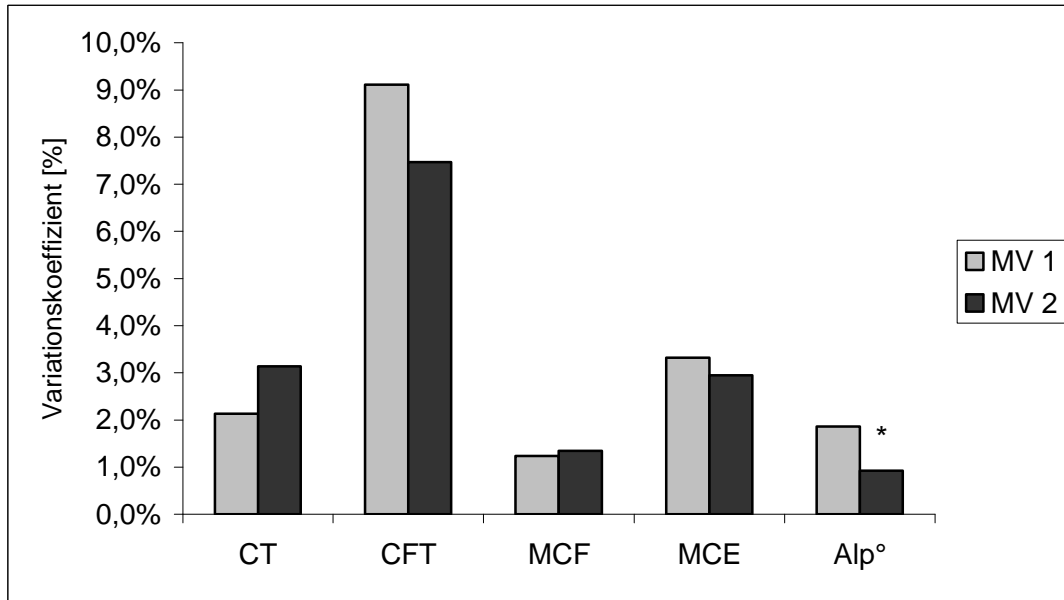


Abb. 3-36 Variationskoeffizienten  $V_k$  in INTEM bei unterschiedlichen Pipettierverfahren (Mischverfahren, MV)

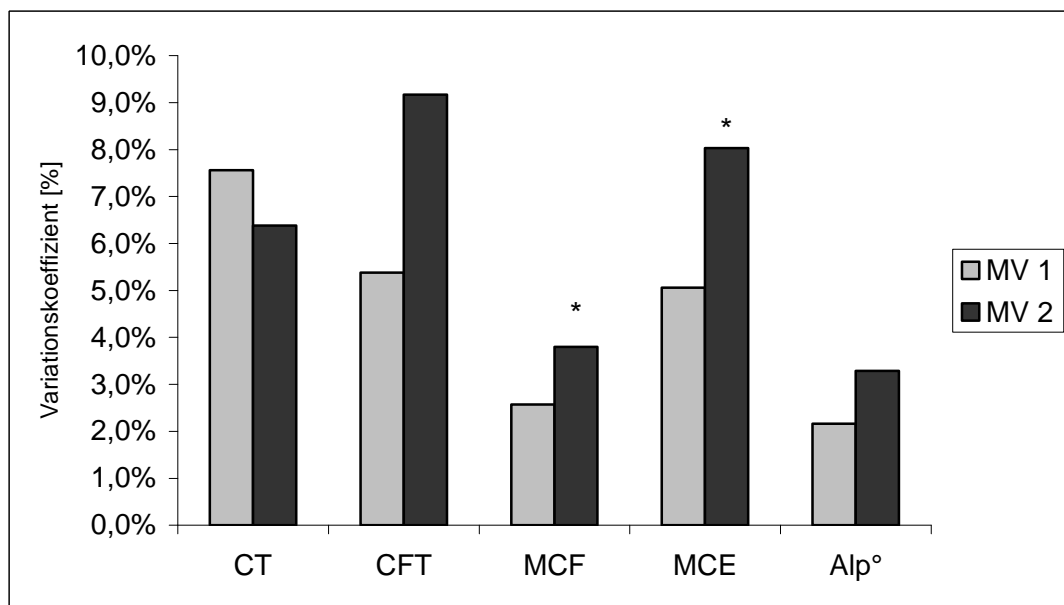


Abb. 3-37 Variationskoeffizienten  $V_k$  in EXTEM bei unterschiedlichen Pipettierverfahren (Mischverfahren)

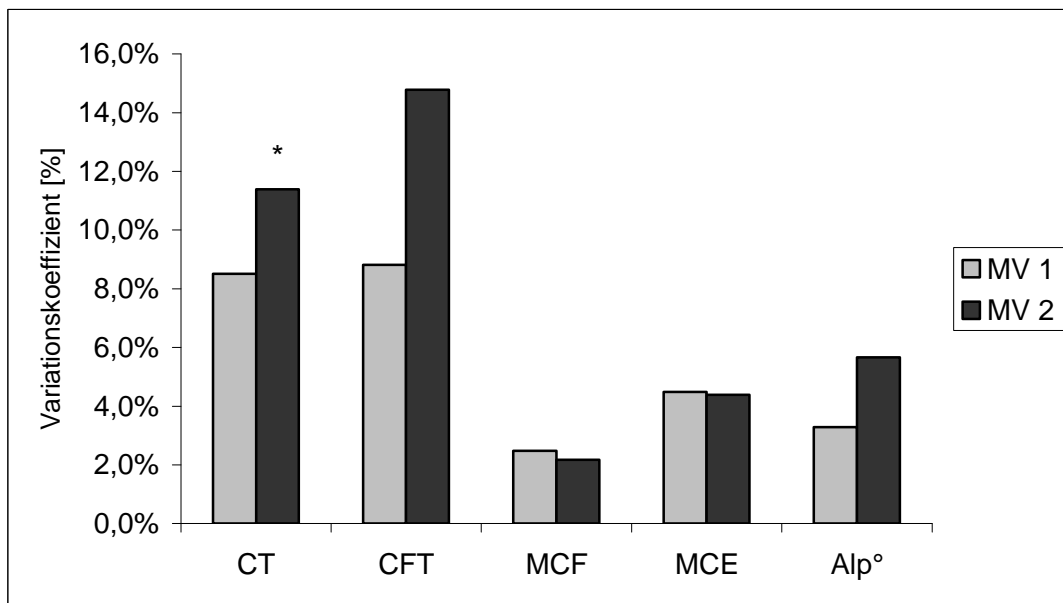


Abb. 3-38 Variationskoeffizienten  $V_k$  in NATEM bei unterschiedlichen Pipettierverfahren (Mischverfahren)

Die Referenzwerte sind im Einzelnen im Anhang in den Tabellen f) bis k) aufgeführt. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Parametern der Tests zwischen Mischverfahren 1 und 2 ist in Tabelle l) im Anhang aufgeführt.

### 3.4. Vergleich zweier ExTEM Reagenzien

Es standen zwei verschiedene Aktivatorreagenzien (ExTEG S Nobis und Diaplastin Diamed) für den EXTEM zur Verfügung. Diese wurden an Kontroll-Reagenz sowie Blut von Normalpersonen und Patienten mit Hämostasesstörungen vergleichend eingesetzt.

#### 3.4.1 Messgenauigkeit

##### 3.4.1.1 Messungen mit Kontrollplasma (ROTROL Kontrolle)

Es wurden 10-fach Messungen mit ROTROL durchgeführt. Die CT war mit Diaplastin deutlich länger als mit ExTEG S (Abb. 3-39,  $p < 0,001$ ). Die anderen Parameter unterschieden sich kaum zwischen den beiden Aktivatorreagenzien.

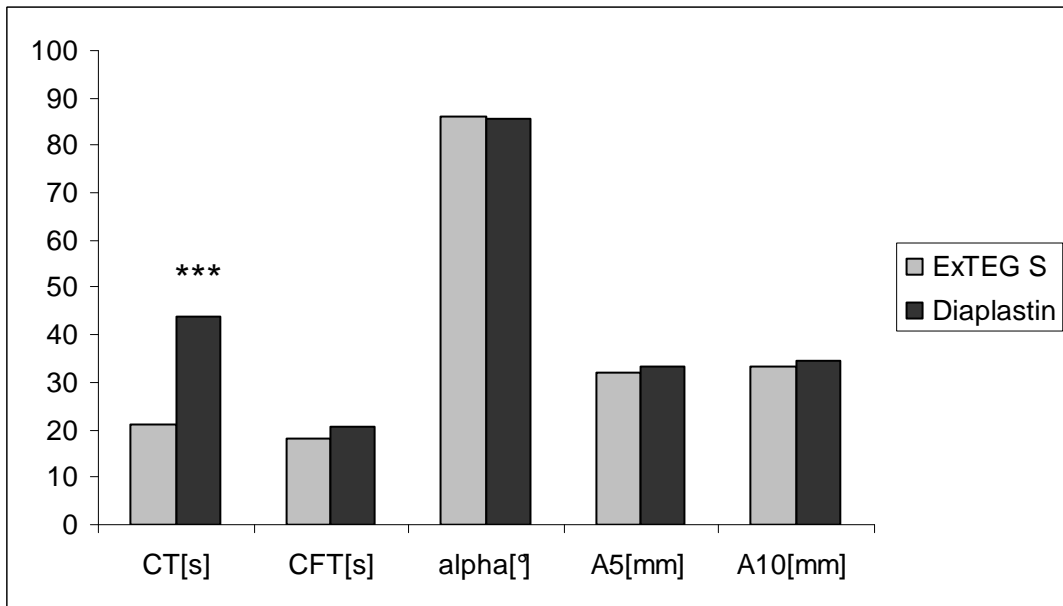


Abb. 3-39 Vergleich der Messergebnisse mit ROTROL bei 10 auf einander folgenden Messungen (Mittelwerte) unter Verwendung von ExTEG S und Diaplastin als Aktivatorreagenzien

Die Präzision war ebenfalls mit beiden Reagenzien vergleichbar (Abb. 3-40). Lediglich für den Alpha-Winkel wurde bei Verwendung von ExTEG S ein kleinerer Variationskoeffizient für die Doppelbestimmungen errechnet ( $p < 0,05$ ).

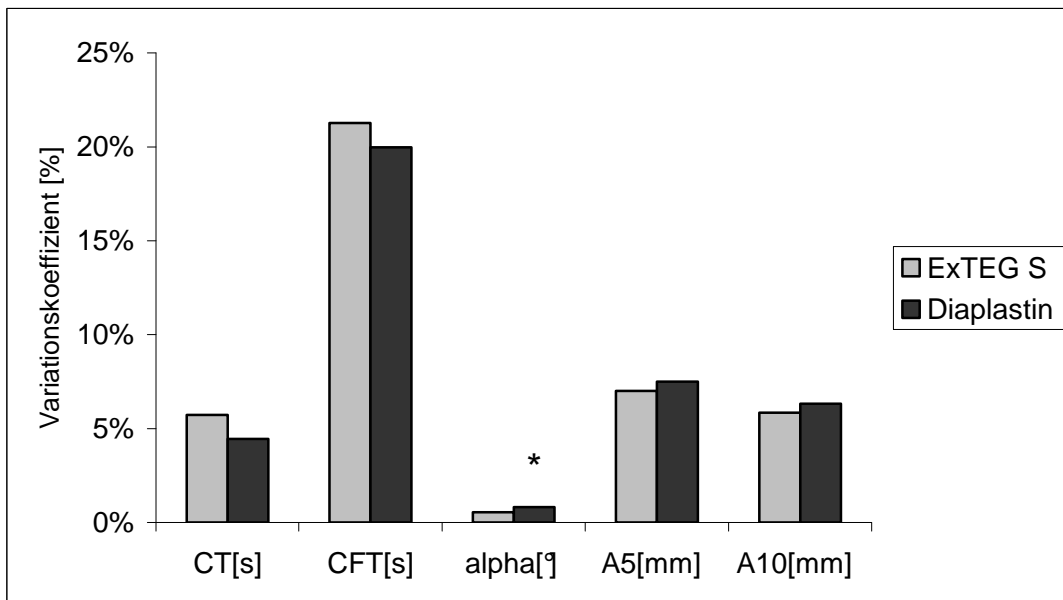


Abb. 3-40 Variationskoeffizienten ( $V_k$ ) der Messergebnisse mit ROTROL bei 10 auf einander folgenden Messungen (Mittelwerte) unter Verwendung von ExTEG S und Diaplastin als Aktivatorreagenzien

### 3.4.1.2 Messungen mit Spender-Citratblut

Auch mit Spenderblut war die CT deutlich länger bei Verwendung von Diaplastin im Vergleich zu ExTEG S ( $p < 0,001$ , Abb. 3-41). Darüber hinaus wichen aber auch die anderen Parameter signifikant ab: Die CFT war um 25% kürzer (jeweils  $p < 0,001$ ) und Alpha-Winkel sowie Amplitude (MCF, A5, A10) um ca. 10% größer bei Verwendung von Diaplastin anstelle von EXTEG S.

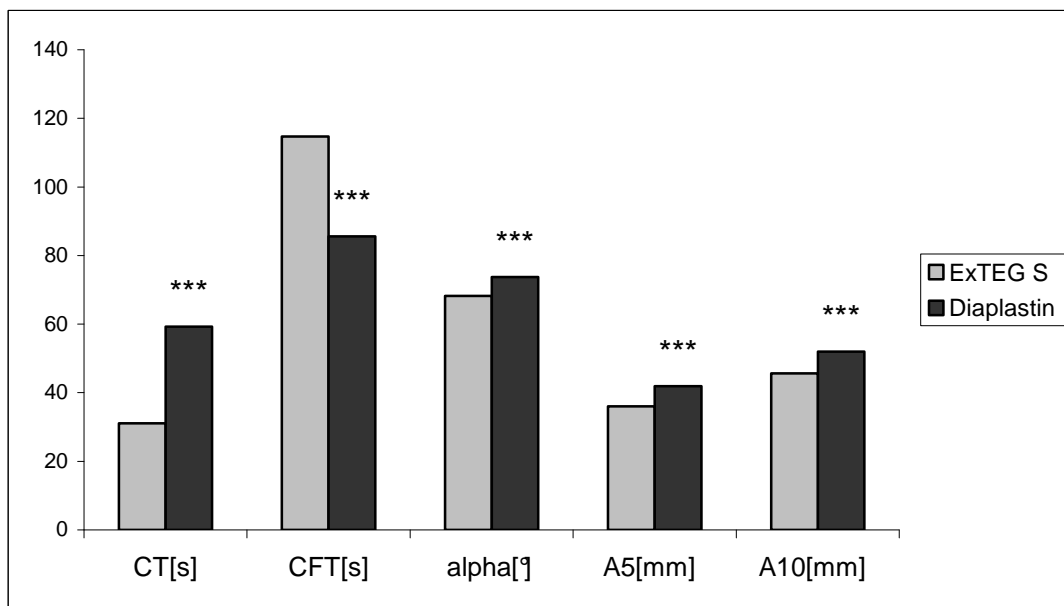


Abb. 3-41 Vergleich der Messergebnisse mit Spenderblut bei 10 aufeinander folgenden Messungen (Mittelwerte) unter Verwendung von ExTEG S und Diaplastin als

Der  $V_K$  war mit Diaplastin um 9% (A5) bis 60% (CT) kleiner als mit ExTEG S (Abb 3-71). Allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant.

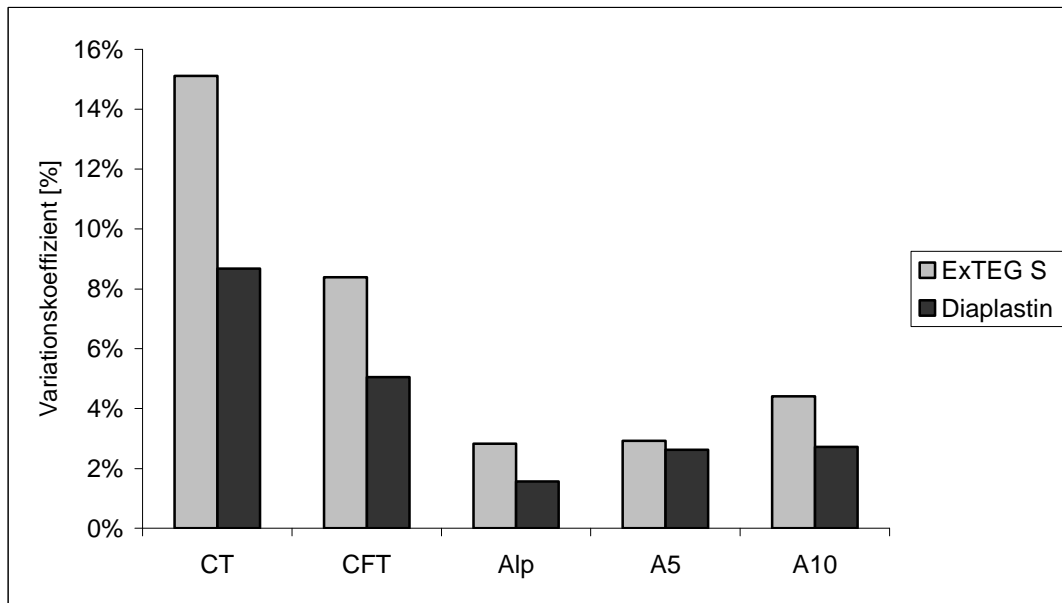


Abb. 3-42 Variationskoeffizienten ( $V_k$ ) der Messergebnisse mit Spenderblut bei 10 aufeinander folgenden Messungen (Mittelwerte) unter Verwendung von ExTEG S und Diaplastin als Aktivatorreagenzien

### 3.4.2. Reproduzierbarkeit

#### 3.4.2.1. Messungen mit ROTROL

Über einen Zeitraum von 16 Tagen wurden täglich Untersuchungen von EXTEM mit ROTROL als Doppelbestimmungen durchgeführt (Abb. 3-43 – 3-46). Die Abb. 3-43 – 3-45 zeigen, dass mit Diaplastin der Variationskoeffizient für die Doppelbestimmungen durchschnittlich deutlich niedriger ist.

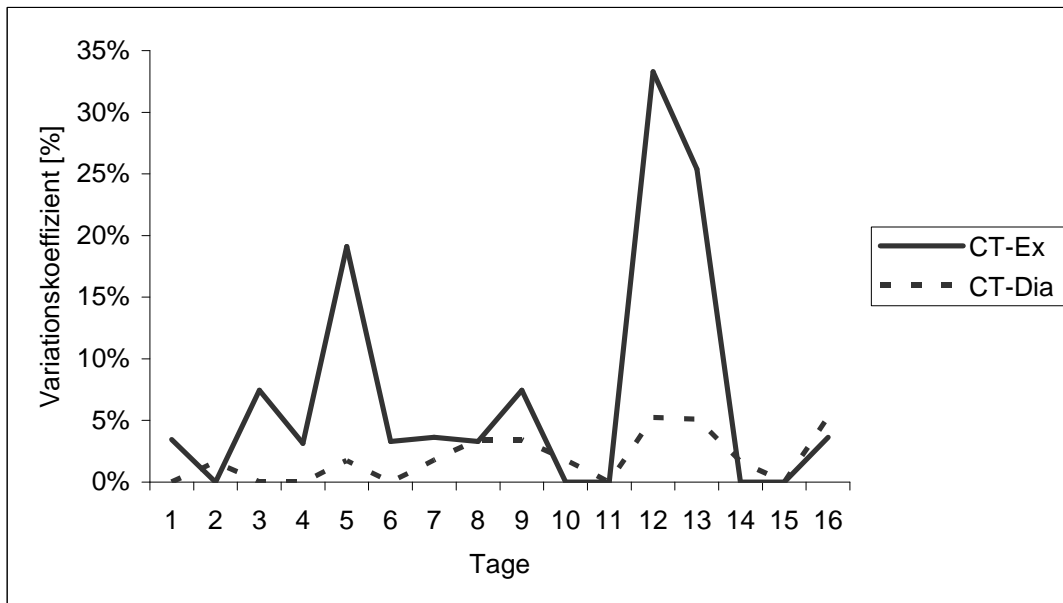


Abb. 3-43 Variationskoeffizienten  $V_k$  für die CT von Doppelbestimmungen mit ROTROL bei Verwendung von EXTEG S und Diaplastin als Aktivatorreagenzien über 16 Tage

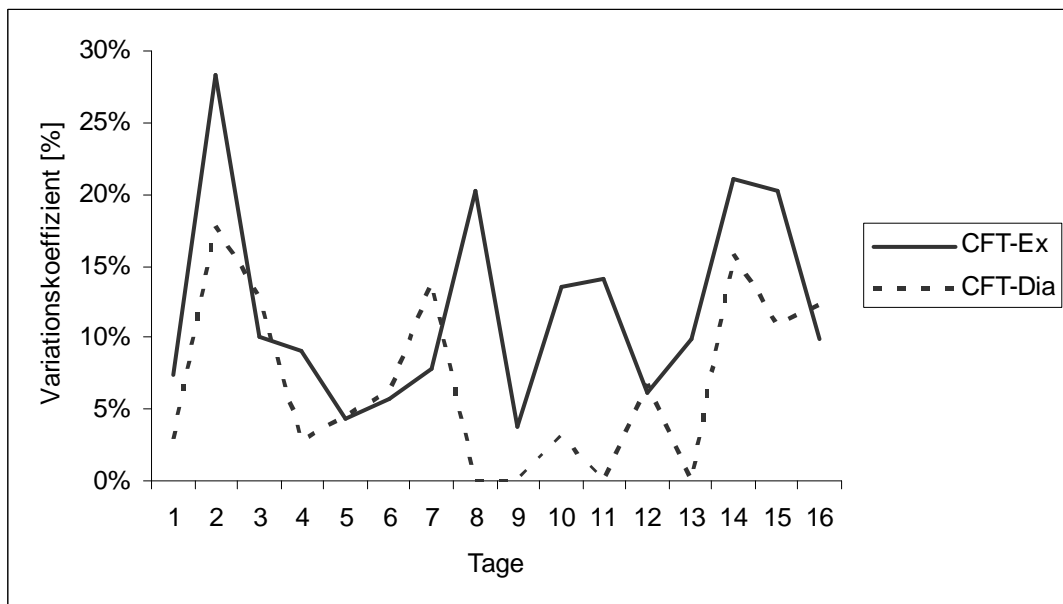


Abb. 3-44 Variationskoeffizienten  $V_k$  für die CFT von Doppelbestimmungen mit ROTROL bei Verwendung von EXTEG S und Diaplastin als Aktivatorreagenzien über 16 Tage

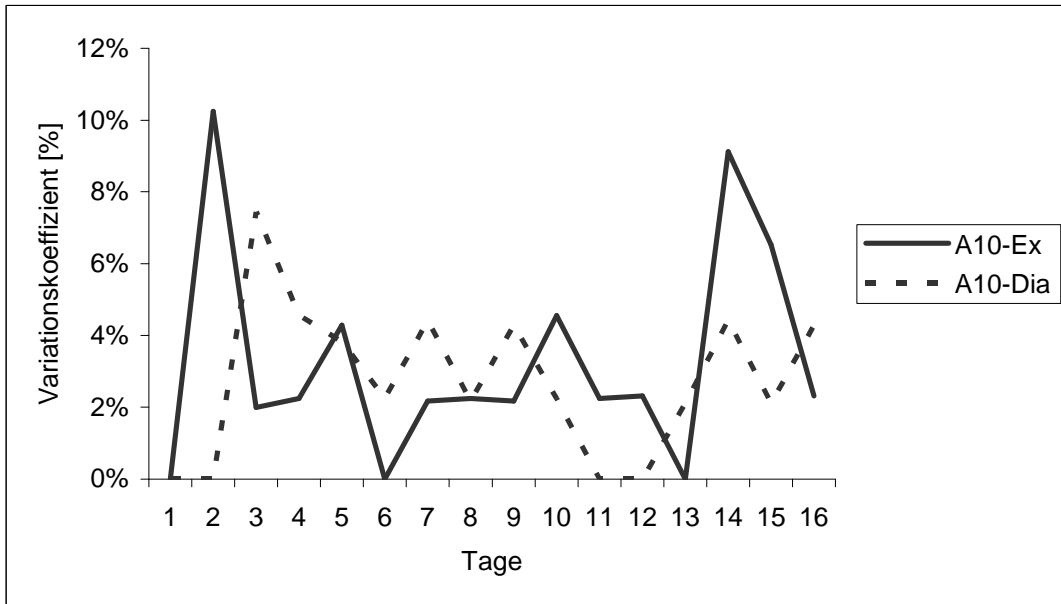


Abb. 3-45 Variationskoeffizienten  $V_k$  für A10 von Doppelbestimmungen mit ROTROL bei Verwendung von EXTEG S und Diaplastin als Aktivatorreagenzien über 16 Tage

Darüber hinaus wurden die mittleren Variationskoeffizienten aus allen Untersuchungen der einzelnen Tage errechnet und graphisch dargestellt (Abb. 3-46). Der  $V_k$  bei CT und CFT ist mit Diaplastin sogar signifikant kleiner als mit ExTEG S ( $p < 0,05$ ). Der  $V_k$  für den Alpha-Winkel war mit beiden Reagenzien Null.

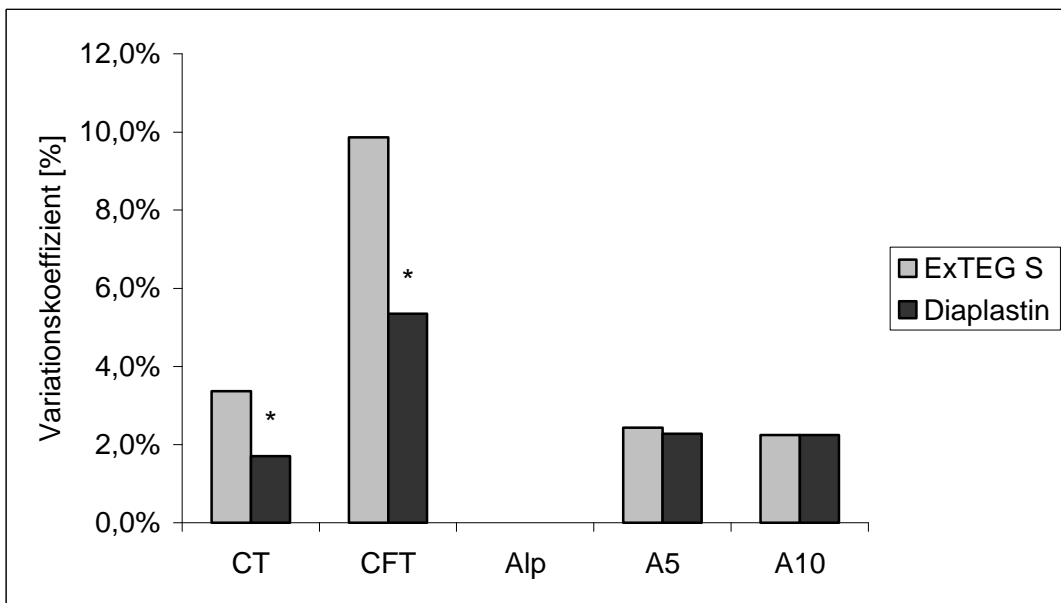


Abb. 3-46 Mittlerer  $V_k$  der EXTEM-Messungen mit ROTROL über einen Zeitraum von 16 Tagen

### 3.4.2.2. Messungen mit Spenderblut

Die über einen Zeitraum von 16 Tagen von 18 Blutproben gesunder Blutspender erhobenen Befunde (Abb. 3-47) unterscheiden sich kaum von den Ergebnissen der 10-fach-Messungen an einem Tag (Abb. 3-41). Die Parameter, gemessen mit Diaplastin, unterschieden sich alle signifikant von denen, die mit ExTEG S gemessen wurden ( $p < 0,001$ ). Die CT war deutlich länger mit Diaplastin als mit ExTEG S ( $p < 0,001$ ), alle übrigen Parameter veränderten sich bei Diaplastin signifikant im Sinne gesteigerter Gerinnung.

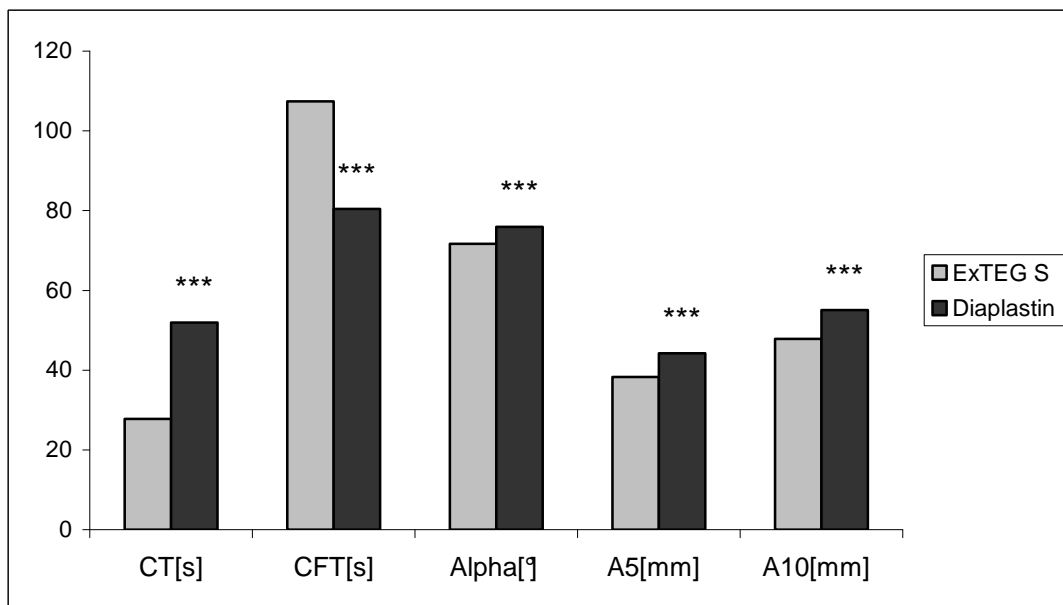


Abb. 3-47 Vergleich von ExTEG S vs. Diaplastin, Spender, Mittelwerte der Parameter, n=18

Der  $V_K$  aus allen Messungen zeigte wie bei den Messungen mit ROTROL eine signifikant geringere Testvariabilität mit Diaplastin als mit ExTEG S (Abb. 3-48).



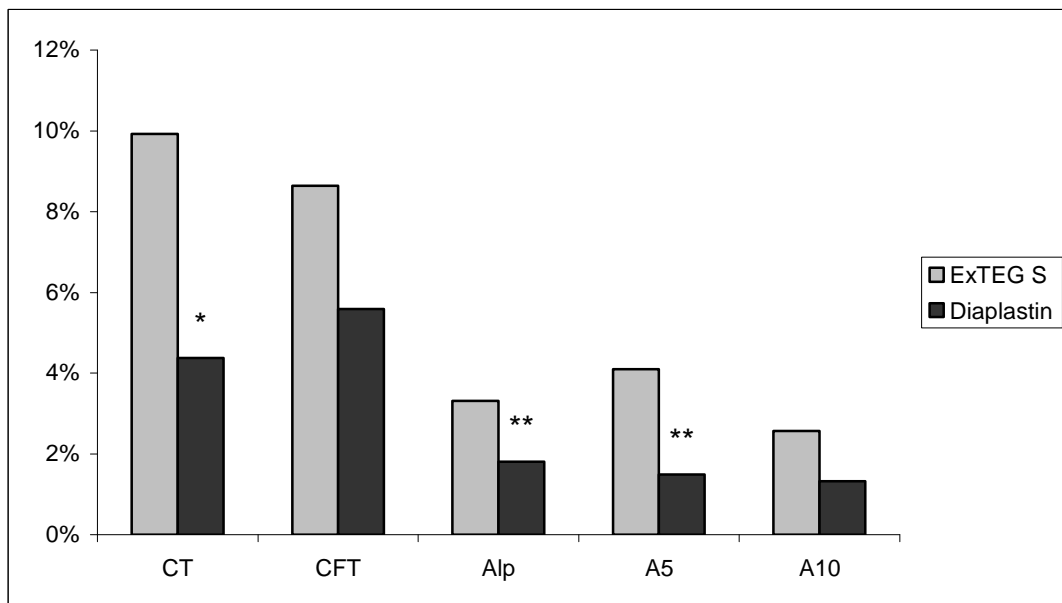


Abb. 3-48 Variationskoeffizienten ( $V_k$ ) bei ExTEG S vs. Diaplastin, Spender, n=18

### 3.4.3. Referenzwerte für EXTEM

Tabelle 3-1 gibt die für die beiden verschiedenen Aktivatorreagenzien bestimmten Referenzwerte für EXTEM wieder, die an 30 gesunden Spendern ohne Hinweis auf Hämostasestörungen ermittelt wurden. Es sind die oberen und unteren Grenzwerte bei einem Konfidenzintervall von 95% wiedergegeben. Die ausführlichere Statistik diesbezüglich ist in den Tabellen m) und n) im Anhang aufgeführt.

Tabelle 3-1 EXTEM Referenzwerte für 2 verschiedene Aktivatorreagenzien

	95% konfid. Intervall	CT[s]	CFT[s]	Alp[°]	A5[mm]	A10[mm]
ExTEG S	Oberer Grenzwert	34	194	87	51	61
	Unterer Grenzwert	21	21	57	26	35
Diaplastin	Oberer Grenzwert	62	134	85	56	66
	Unterer Grenzwert	42	27	66	33	44

Wir haben auch beide EXTEM Reagenzien an mehreren Gruppen von Patienten mit unterschiedlichen Hämostasestörungen getestet. Die Ergebnisse davon sind in den Kapiteln 3.6.4., 3.6.6. und 3.6.7. dargestellt.

### 3.5. Blutverdünnung mit unterschiedlichen Infusionslösungen

Verdünnung der Blutproben (Citratblut) mit autologem PAP veränderte die ROTEM Parameter bei Aktivierung durch Rekalzifizierung (NATEM) in einer Weise, wie sie für eine gesteigerte Gerinnung als charakteristisch geltet: – Die CT wurde in allen und die CFT in 8 von 10 Fällen verkürzt; die Maximalamplitude (MCF) wurde in 8 von 10 Fällen verbreitert und der Alpha-Winkel in 9 von 10 Fällen vergrößert. In Abb. 3-49 bis 3-52 sind die Mittelwerte der Parameter für NATEM vor und nach Verdünnung dargestellt.

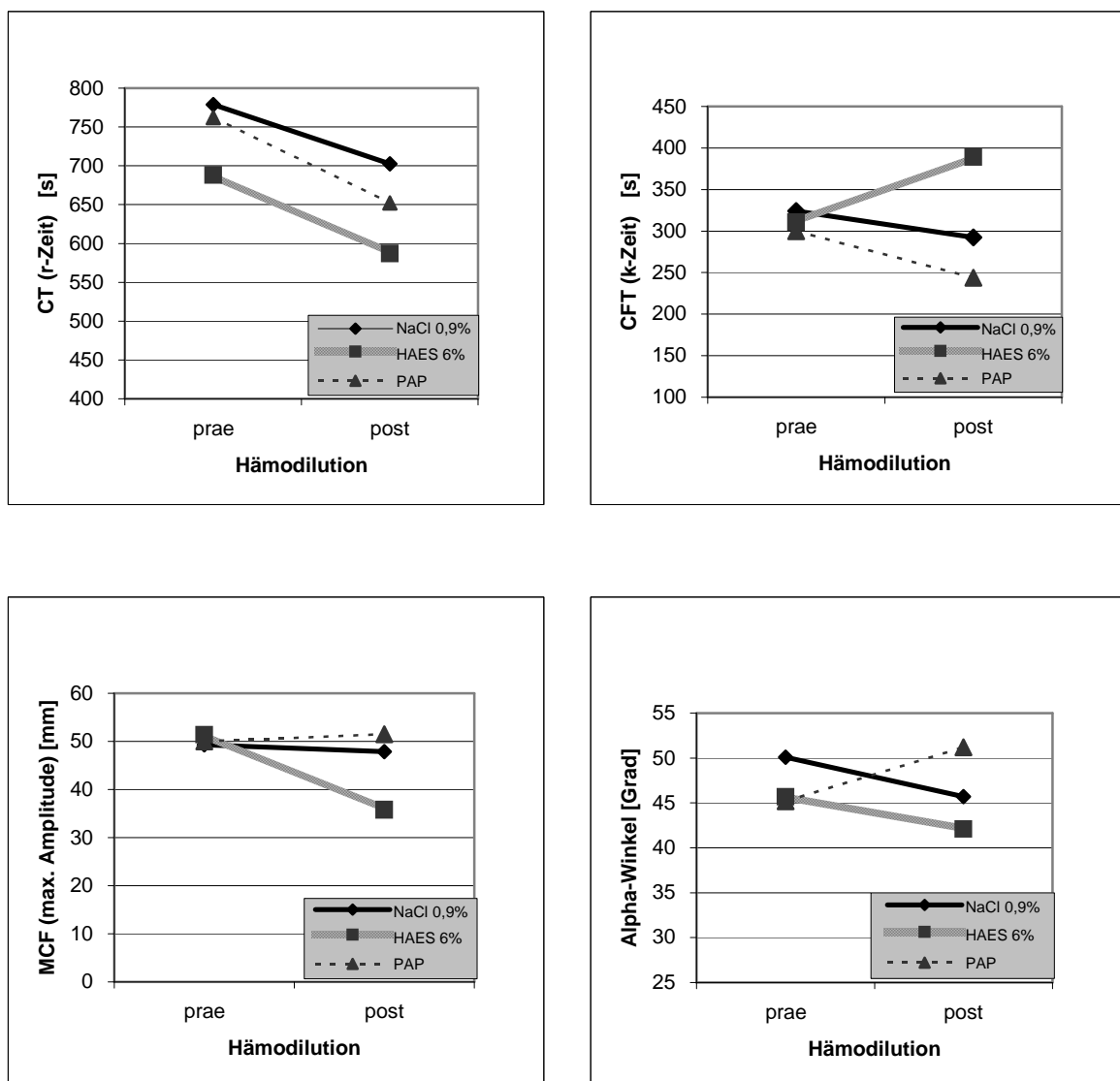


Abb. 3-49 bis 3-52 Einfluss der Verdünnung mit NaCl, HAES und PAP auf die NATEM – CT, CFT, MCF, Alpha-Winkel (Mittelwerte aus 10 Messreihen)

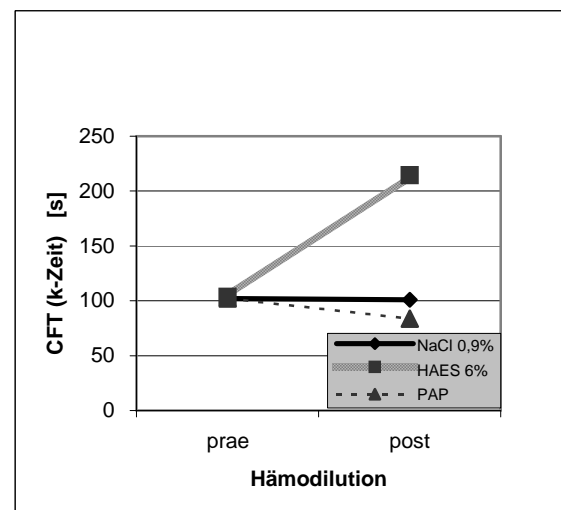
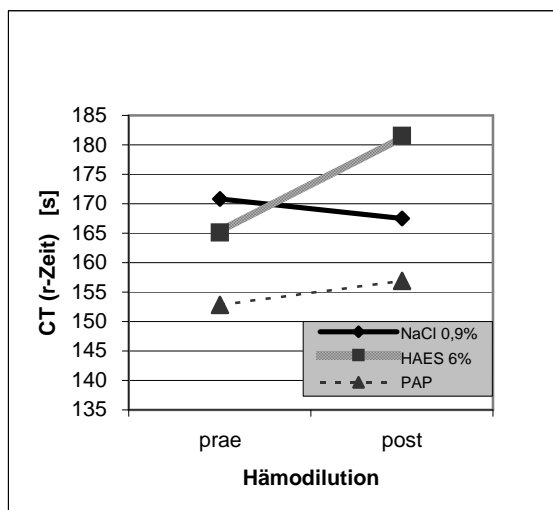
Ähnlich verhielten sich die CT und CFT bei Verdünnung mit NaCl. Die CT war in 8 von 10 Fällen und die CFT in 5 von 10 Fällen verkürzt. Allerdings verkleinerte sich die Maximalamplitude in 6 und der Alpha-Winkel in 5 von 10 Fällen.

Bei Verdünnung mit HAES wurden die Parameter überwiegend im Sinne einer Verschlechterung der Gerinnung verändert: Die CFT war in 6 von 10 Proben verlängert, die MCF immer und der Alpha-Winkel in 5 Fällen verkleinert.

Bei zusätzlicher Aktivierung der Gerinnung mit PTT-Reagenz (INTEM) fanden sich ebenso am deutlichsten bei Verdünnung mit PAP Veränderungen im Sinne gesteigerter Gerinnung: Die CT war in 6 von 10 Fällen und die CFT in 7 von 10 Fällen verkürzt, die MCF in 6 von 10 Fällen verbreitert und der Alpha-Winkel in 7 von 10 Fällen vergrößert. In Abb. 3-53 bis 3-56 sind die Mittelwerte der Parameter für INTEM vor und nach Verdünnung dargestellt.

Bei Verdünnung mit NaCl wurden dagegen überwiegend Befunde im Sinne einer gestörten (verlangsamten) Gerinnung gemessen: CT und CFT waren in der Hälfte der Fälle verlängert und die MCF in 9 von 10 Fällen verschmälert.

Bei Verdünnung mit HAES wurden alle Parameter in allen Untersuchungen im Sinne gestörter Gerinnung verändert.



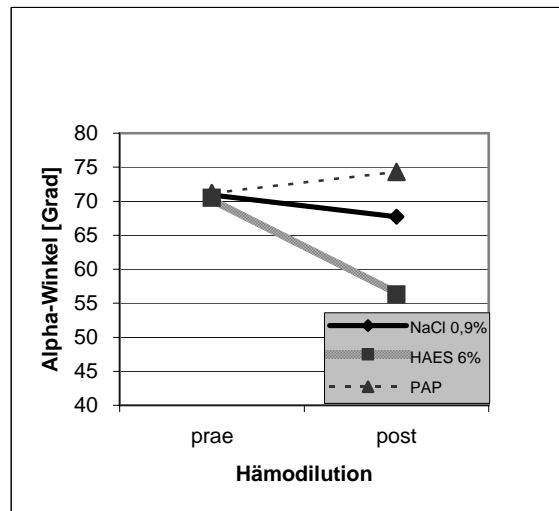
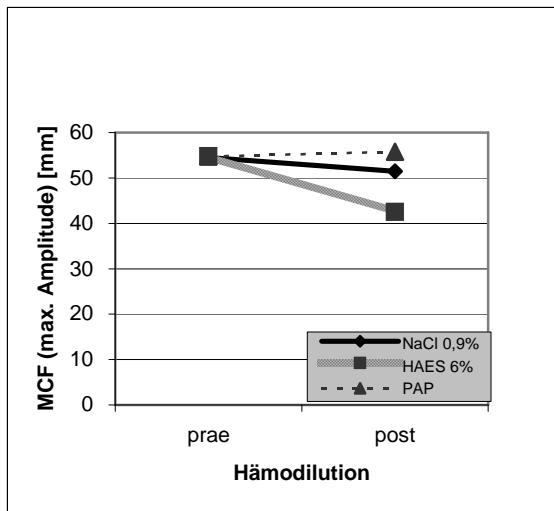


Abb. 3-53 bis 3-56 Einfluss der Verdünnung mit NaCl, HAES und PAP auf die INTEM – CT, CFT, MCF, Alpha-Winkel (Mittelwerte aus 10 Messreihen)

Die Messungen mittels Kugel- und Hähchenkoagulometer ergaben mit NaCl eine signifikante Verlängerung der Gerinnungszeit (+25% bzw. +17%,  $p < 0,001$ ). HAES und PAP verlängerten auch die Gerinnungszeiten, jedoch nicht signifikant (Abb. 3-57 und 3-58)

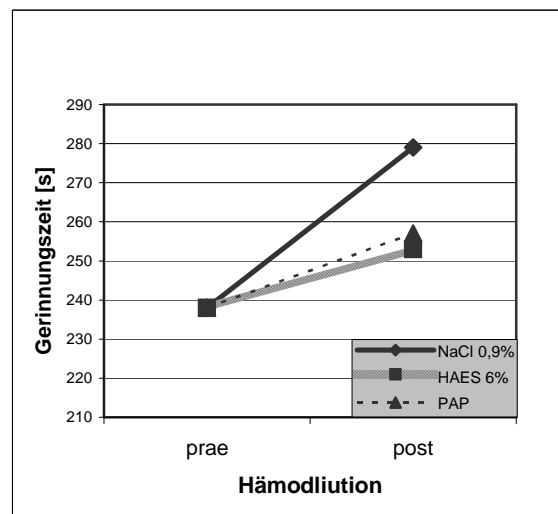
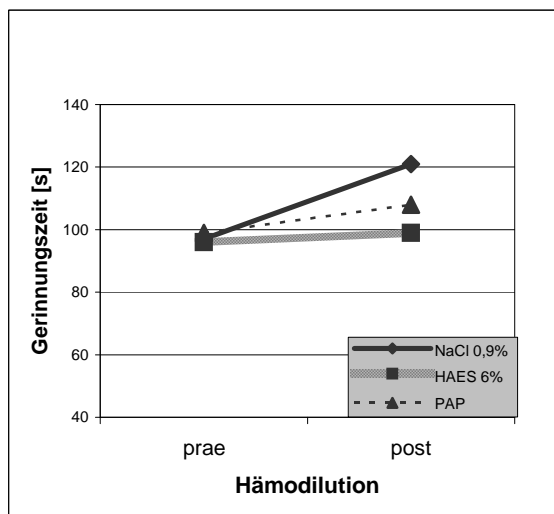


Abb. 3-57 und 3-58 Einfluss der Verdünnung mit NaCl, HAES und PAP auf die Gerinnungszeit bei KC4 (Mittelwerte,  $n=10$ ) und SGC (Mittelwerte,  $n=15$ )

Der PFA-100® und der VCP zeigten übereinstimmend vor allem bei Verdünnung mit HAES eine deutliche Störung der primären Hämostase, erkennbar an einer signifikanten (oft pathologischen) Verlängerung der Verschlusszeiten (Kochsalz +41±18%, PPP +37±20%, HAES +69±24%; Abb. 3-59 und 3-60).

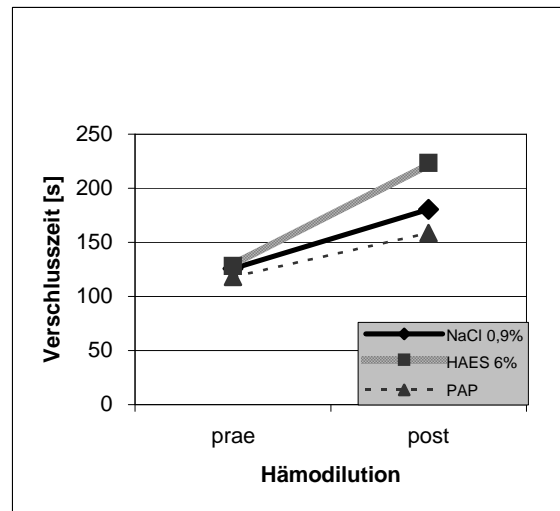
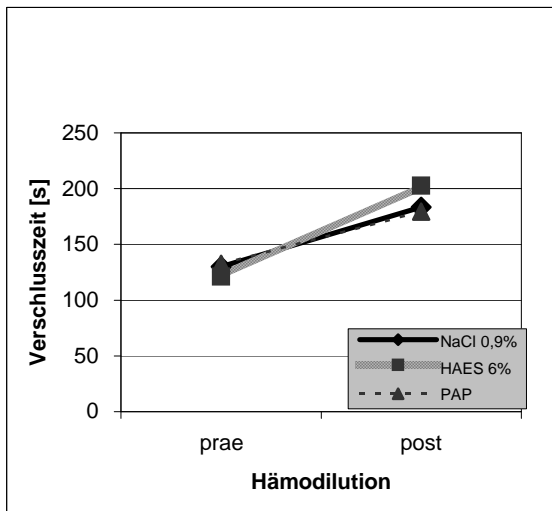


Abb. 3-58 und 3-59 Einfluss der Verdünnung mit NaCl, HAES und PAP auf die Verschlusszeit bei PFA-100® (Col/Epi; Mittelwerte, n=10) und VCP (Col/Epi; Mittelwerte, n=5)

Die Abb. 3-60 und 3-61 zeigen die Veränderung der verschiedenen ROTEM Parametern bei unterschiedlicher Verdünnung (NATEM und INTEM) als prozentuale Differenz, um die Auswirkungen der Verdünnungen besser vergleichen zu können.

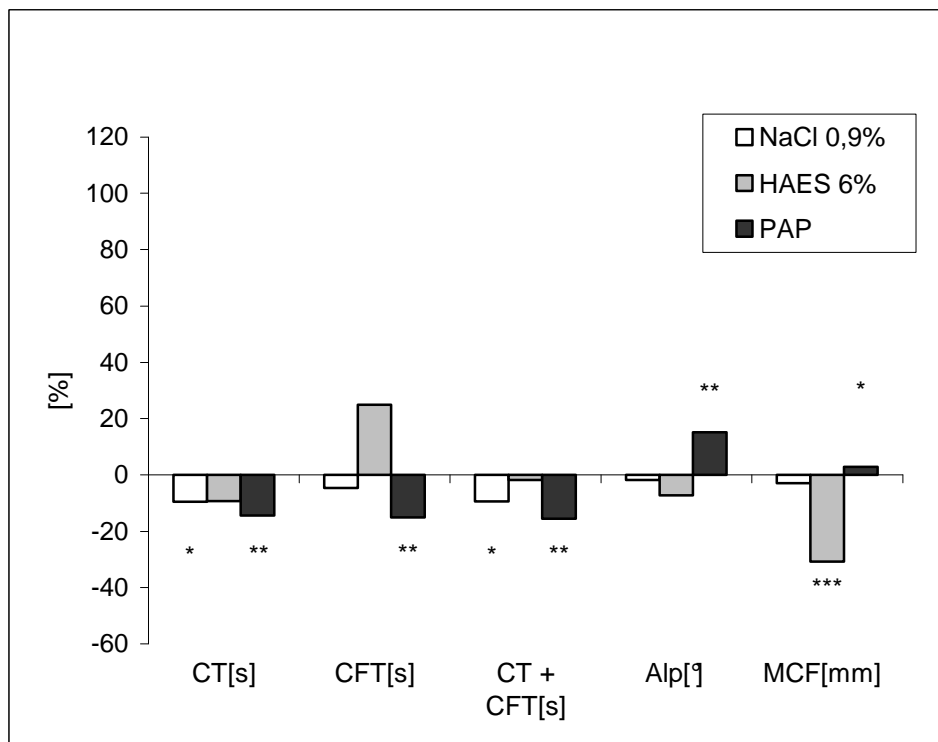


Abb. 3-60 Mittelwerte der Differenzen, vor und nach Hämodilution, aus Messreihe 1-10 in %, NATEM

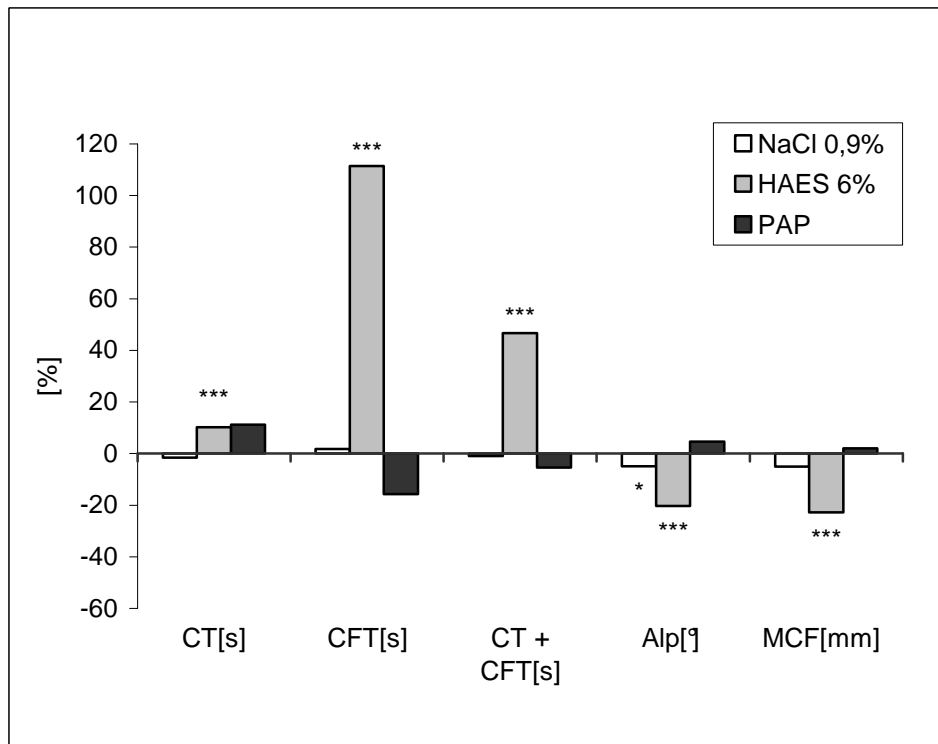


Abb. 3-61 Mittlere Veränderungen [%] der INTEM-Parameter bei Hämodilution mit NaCl, HÄS und PAP von 10 Messreihen

In der Tabelle o) im Anhang sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Parameter von den einzelnen Tests aufgeführt.

### 3.6. Nachweis von Hämostasestörungen

#### 3.6.1 ASS 100

Es wurde die Sensitivität von ROTEM bei gesunden Probanden nach dreitägiger Einnahme von täglich 100 mg ASS getestet. Der EXTEM wurde mit ExTEG S Nobis als Aktivatorreagenz durchgeführt. Parallel dazu wurden Messungen mit dem PFA-100® gemacht.

Die ROTEM-Parameter zeigten insgesamt keine eindeutigen Veränderungen, die den ASS-Effekt dokumentiert hätten. Nur beim Probanden A konnte in EXTEM und INTEM eine Verlängerung der CT festgestellt werden, bei den anderen Probanden wurde die CT sogar kürzer (Abb. 3-62).

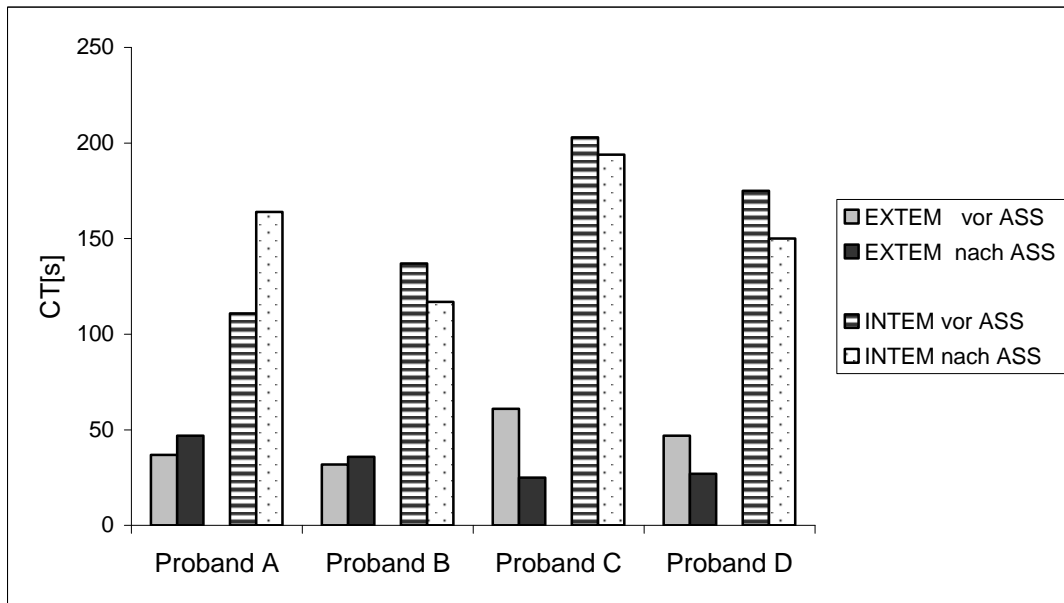


Abb. 3-62 CT bei gesunden Probanden vor und nach dreitägiger ASS 100 Einnahme, EXTEM und INTEM, n=4

Ähnlich verhielt sich das bei der CFT. Nur der erste Proband zeigte in INTEM und EXTEM eine Verlängerung, bei den übrigen 3 Probanden wurde die CFT überraschenderweise auch kürzer (Abb. 3-63).

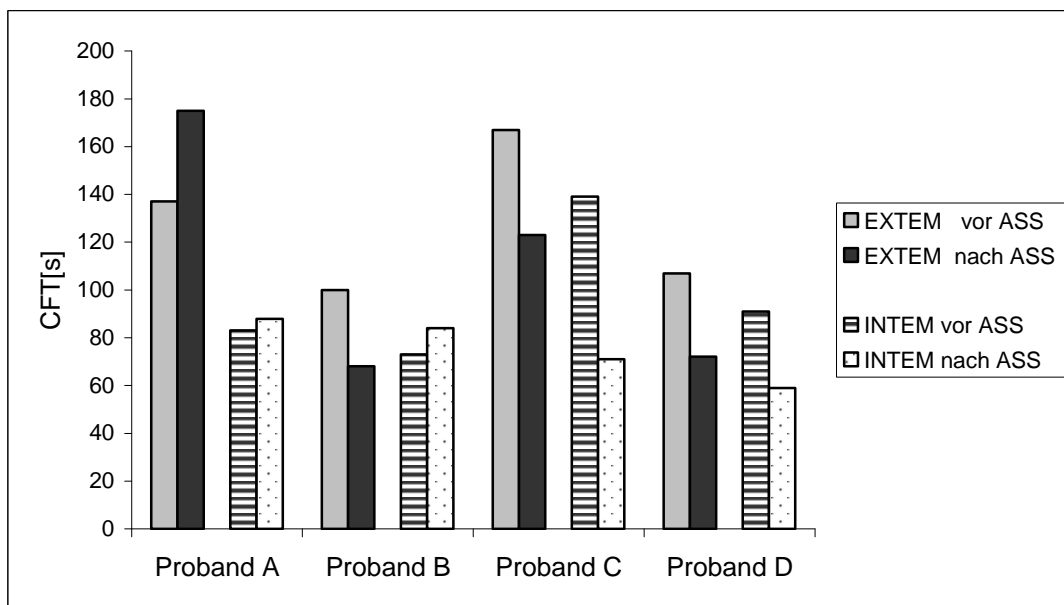


Abb. 3-63 CFT bei gesunden Probanden vor und nach dreitägiger ASS 100 Einnahme, EXTEM und INTEM n=4

Auch die MCF wurde nicht einheitlich schmaler, wie das für die Störung der Thrombozytenfunktion zu erwarten wäre (Abb. 3-64)

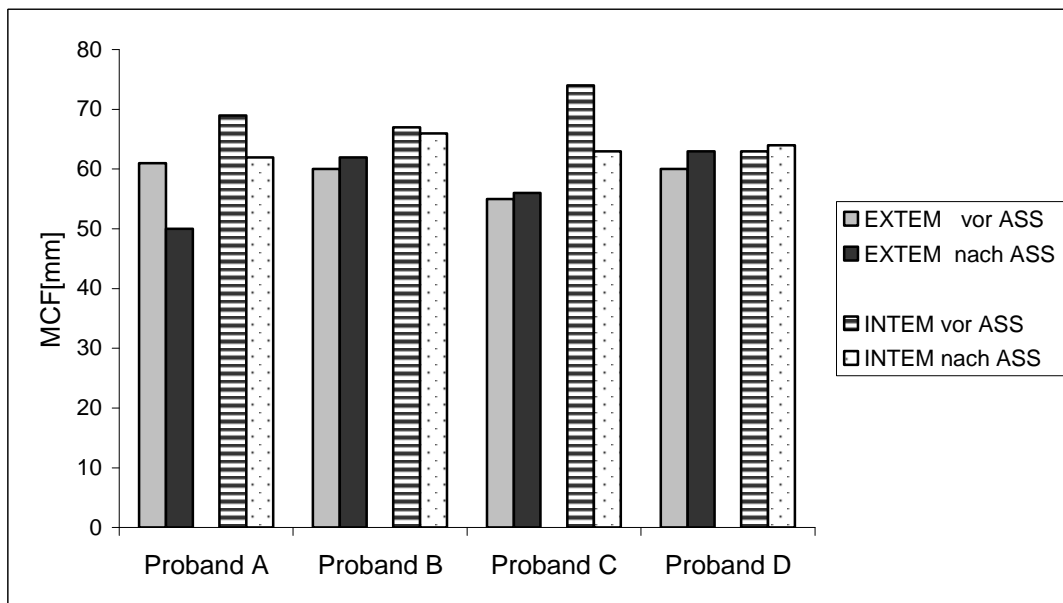


Abb. 3-64 MCF bei gesunde Probanden vor und nach dreitägiger ASS 100 Einnahme, EXTEM und INTEM, n=4

Insgesamt zeigten die ROTEM-Befunde im Gegensatz zum PFA-100® tendenziell eine Steigerung der Hämostase (Abb. 3-65). Pathologische Werte wurden in ROTEM zu keiner Zeit erzielt, während die Verschlusszeiten im PFA/EPI sich nicht nur signifikant verlängerten, sondern auch pathologisch wurden.



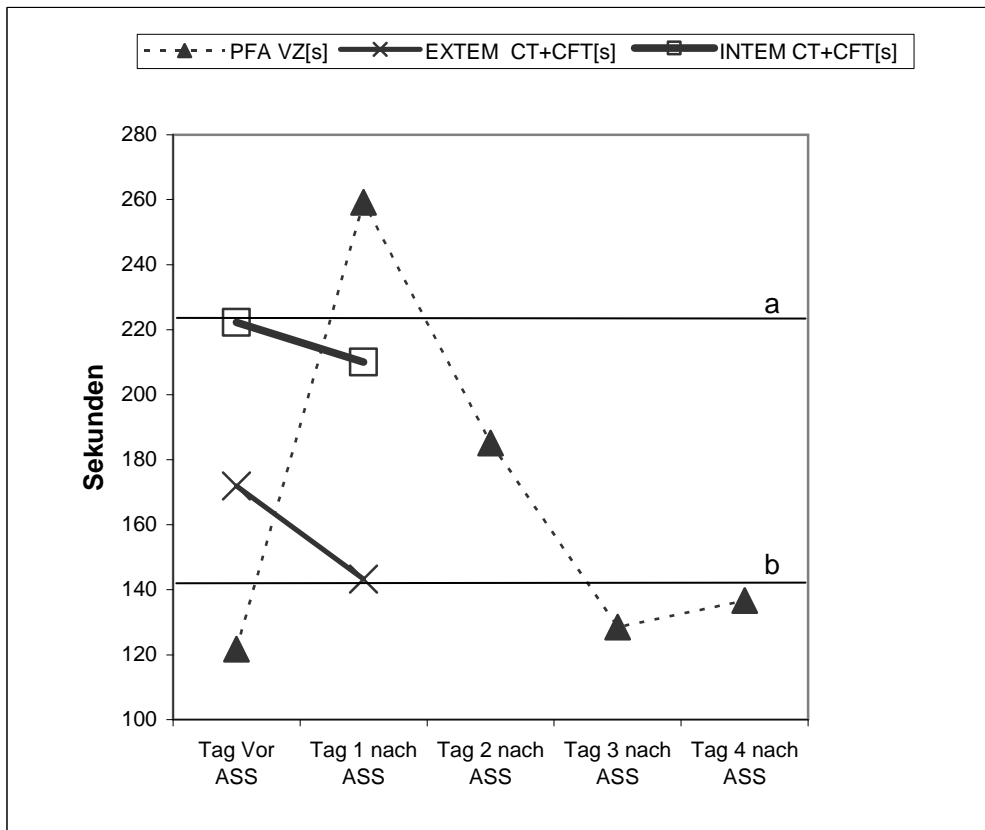


Abb. 3-65 Kinetik der ASS-Wirkung anhand der Messdaten von ROTEM (CT+CFT) und PFA-100® (VZ) (Mittelwerte von n=4 Probanden)

a oberer Normgrenzwert für CT + CFT [s] bei EXTEM; bei INTEM liegt er bei 300 s (nicht in der Abbildung eingezeichnet)

b oberer Normgrenzwert der Verschlusszeit (VZ) für PFA/Epi

### 3.6.2. Patienten mit von Willebrand Syndrom

In der Tabelle 3-2 sind die Testergebnisse der Patienten, bei denen ein vWS bekannt war oder vermutet wurde, dargestellt.

Die Probanden „a“ bis „d“ haben ein mildes vWS Typ 1. Die Probanden „e“ und „f“ – ein mittelschweres vWS. Bei „g“ und „h“ konnte ein vWS ausgeschlossen werden, wobei „h“ eine milde Thrombozytenfunktionsstörung aufwies.

Tab. 3-2 Zusammenstellung der Testergebnissen bei Probanden mit vWS, n=8

Methode	Parameter	Normwerte	Probanden							
			a	b	c	d	e	f	g	h
BB (EDTA)	Hämoglobin [g/dl]	w 12,3-15,3 m 14,0-17,5	16,3	12,3	11,9	14,6	12,2	12,1	12,9	14,7
	Thrombozyten [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	150-400x $10^3/\mu\text{l}$	179	290	367	322	289	227	290	282
PFA-100®	ADP VZ [s]	62-118 s	KW	122	111	94	300	300	83	103
	EPI VZ [s]	73-141 s	144	153	143	135	300	300	97	146
Thro-Aggregometrie	mit Ristoc. 1,0 Tmax [%]	≥60%	11	12	35	20	8	12	75	5
Spez. Diagnostik	vWF:RCoF [%]	60-170 %	67	45	54	52	18	13	131	84
	Faktor VIII [%]	70-150 %	83	122	96	111	18	92	59	KW
ROTEM	CT INTEM [s]	122-182 s (MV1)	162	112	159	130	178	157	142	<b>198</b>
	CFT INTEM [s]	47-117 s (MV1)	<b>125</b>	67	<b>144</b>	<b>137</b>	69	56	71	<b>178</b>
	MCF INTEM [mm]	51-67 mm (MV1)	57	63	60	60	66	63	65	53
	CT EXTEM [s]	27-51 s (MV1)	29	56	27	43	31	27	25	<b>90</b>
	CFT EXTEM [s]	65-174 s (MV1)	120	135	103	<b>218</b>	143	94	79	<b>222</b>
	MCF EXTEM [mm]	45-64 mm (MV1)	58	52	62	54	56	58	66	50

- die pathologisch veränderte ROTEM Werte sind Fett markiert
- KW – kein Wert

Insgesamt fielen nur vereinzelt Parameter des ROTEM Tests pathologisch aus. Folglich gab es natürlich auch keine Korrelation zwischen den vWF:RCoF Werten und die Parameter des ROTEM Tests.

### 3.6.3 Patienten mit Thrombozytopenie

Es wurden 10 Patienten mit Thrombozytenwerten  $<55.000/\mu\text{L}$  infolge Knochenmarkhypoplasie untersucht. Die Hb-Werte dieser Proben variierten zwischen 7,3 g/dl und 9,5 g/dl. Der EXTEM wurde mit ExTEG S Nobis als Aktivatorreagenz durchgeführt. Wie zu erwarten, war die CFT bei den thrombopenischen Patienten signifikant verlängert ( $p<0,01$ ) und MCF bzw. MCE waren signifikant kleiner ( $p<0,001$ ). Diese Veränderungen fanden sich sowohl in INTEM als auch EXTEM und waren unabhängig von der Liegezeit der Proben (gemessen  $<10$  Min. und gemessen  $>30$  Min. nach BE). Dagegen war der Thrombozytengehalt ohne Einfluss auf CT und Alpha-Winkel (Abb. 3-66 und 3-67).

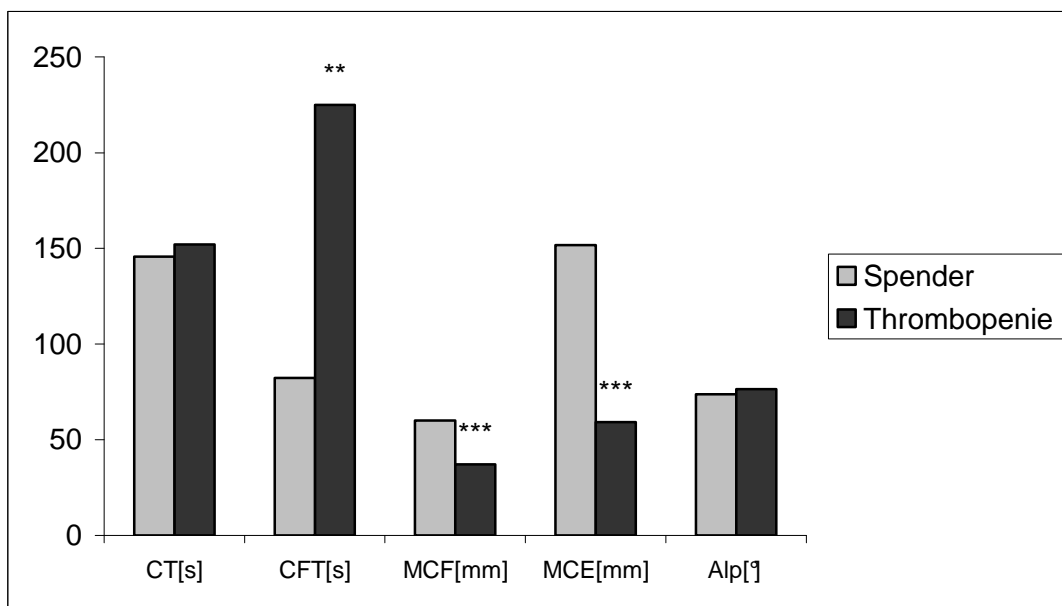


Abb. 3-66 INTEM Parameter bei Proben von Patienten mit Thrombozytopenie im Vergleich zu solchen von Gesunde Probanden (n=10)

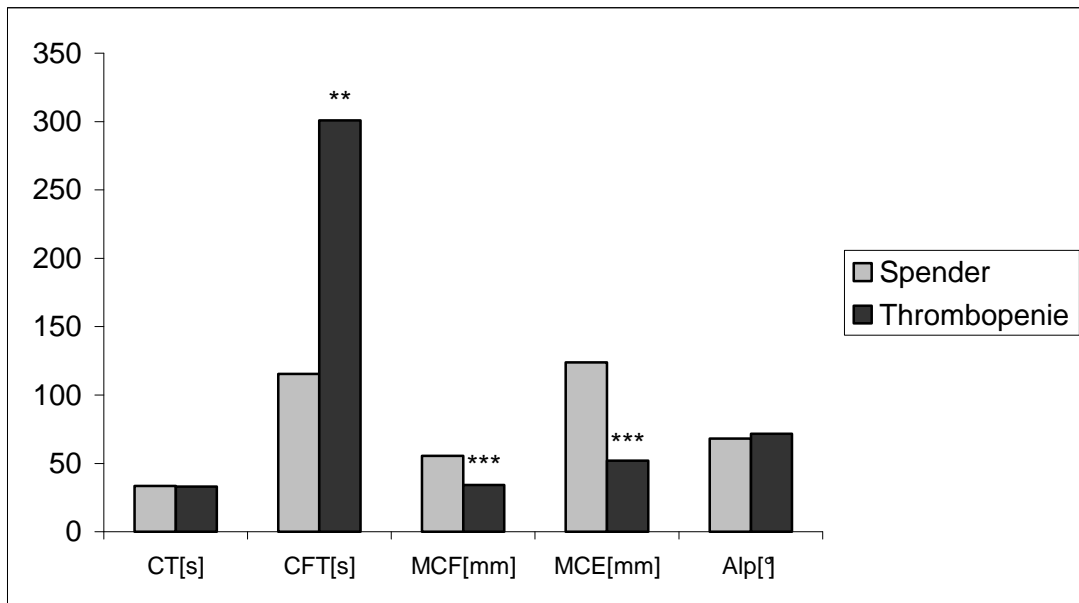


Abb. 3-67 EXTEM Parameter bei Proben von Patienten mit Thrombozytopenie im Vergleich zu solchen von gesunden Blutspendern (n=10)

Die Korrelation zwischen den verschiedenen Parametern und der Thrombozytenzahl war mäßig (Abb. 3-61).

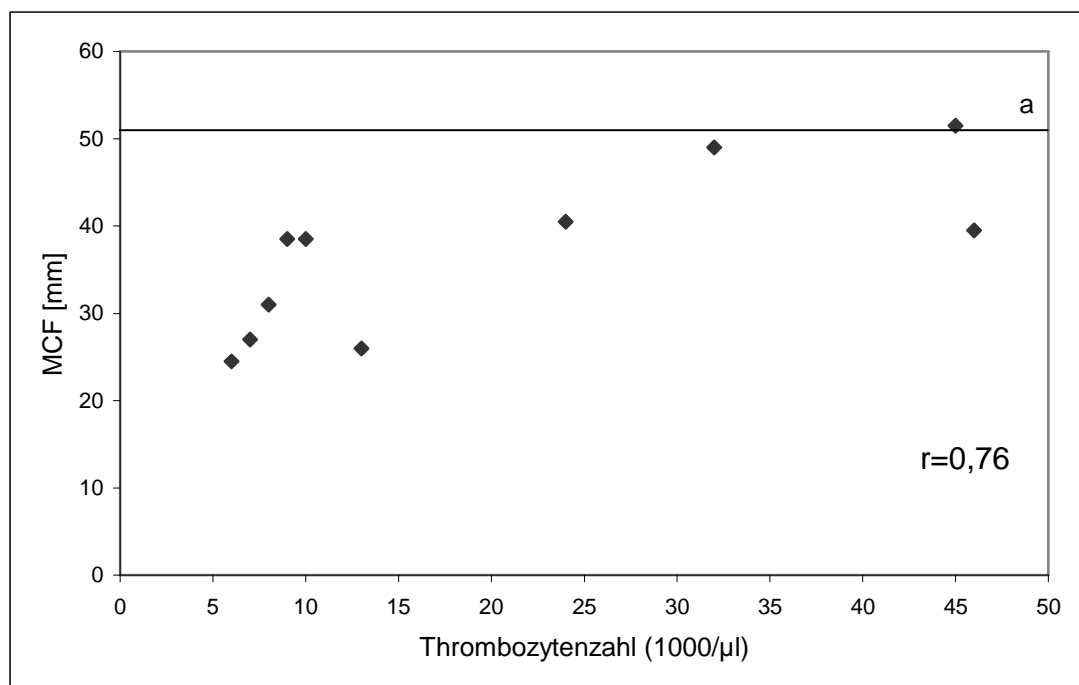


Abb. 3-61 Korrelation zwischen MCF/INTEM und der Thrombozytenzahl (n=10 Patienten)

a die horizontale Linie markiert den unteren Grenzwert der MCF bei Spendern (51 mm)

Der Korrelationskoeffizient  $r$  lag für die INTEM-Parameter zwischen 0,68 und 0,76 und für die EXTEM-Parameter zwischen 0,58 – 0,63.

### 3.6.4. Patienten unter Heparin

Es wurden 22 Patienten mit einer aPTT zwischen 41 s. und 138 s. untersucht. Die mittlere PTT betrug 70 s. (Median 65 s.). Der EXTEM wurde mit ExTEG S Nobis als Aktivatorreagenz durchgeführt.

Am deutlichsten zeigte sich die Heparin Wirkung im INTEM anhand der deutlich verlängerten CT. Ab PTT-Werten von ca. 80 Sekunden fiel die CT in allen Fällen pathologisch aus (Abb. 3-62). Bei subtherapeutischer Heparinisierung (PTT 50 - 60 s.) war die CT in 4 von 8 Fällen pathologisch verlängert (Sensitivität 50%) Bei einer aPTT von 60 -<80 s. zeigten immer noch 2 der 14 Fälle eine normale CT (Sensitivität 86%).

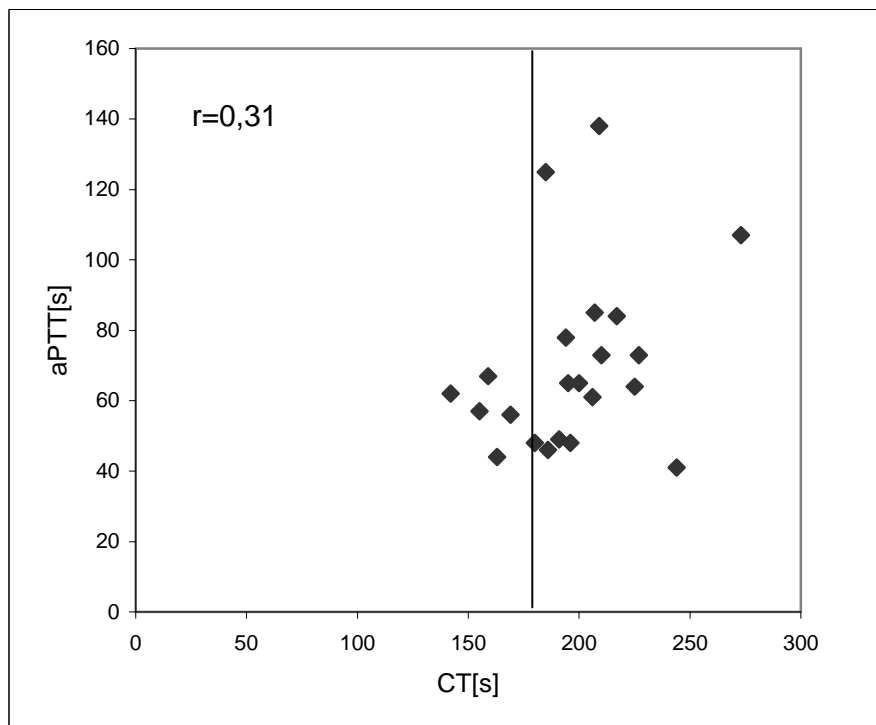


Abb. 3-62 INTEM - Korrelation zwischen CT und aPTT bei Patienten mit Heparin,  $n=22$

- der obere Grenzwert für die CT ist als vertikaler Strich (bei 182 s) abgebildet

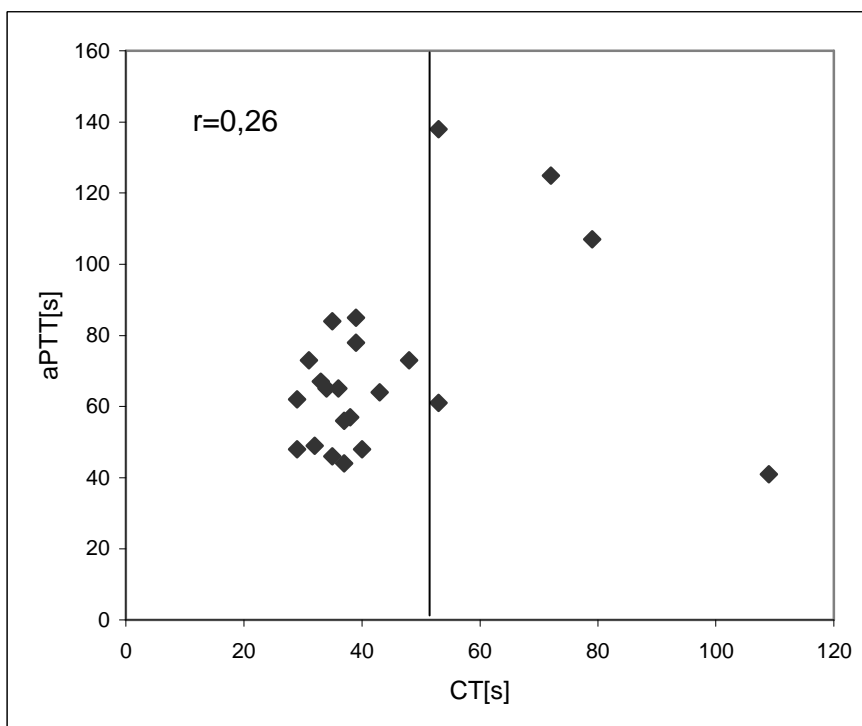


Abb. 3-63 EXTEM - Korrelation zwischen CT und aPTT bei Patienten mit Heparin, n=22

- der obere Grenzwert für die CT ist als vertikaler Strich (bei 51 s.) abgebildet

Bei EXTEM waren nur in einigen wenigen Fällen die CT bzw. die CFT verlängert. Ein bestimmter Schwellenwert diesbezüglich fand sich nicht (Abb. 3-63).

Die Korrelation zwischen der PTT und den einzelnen Parametern des ROTEMs waren schlecht (Tab. 3-3, Abb. 3-62 und 3-63)

Tabelle 3-3 Korrelationskoeffizient r bei Korrelation zwischen der PTT und den entsprechenden Parameter von ROTEM; Pat. mit Heparin

aPTT [s] und	CT	CFT	MCF	Alp
INTEM	0,31	0,34	-0,19	0,13
EXTEM	0,26	-0,12	-0,02	-0,04

### 3.6.5. Patienten unter Marcumar

Die Nachweisbarkeit des Marcumar-Effekts wurde in zwei Untersuchungsserien geprüft. Zunächst wurden 12 Patienten in INTEM und EXTEM untersucht, wobei das zuerst für ROTEM empfohlene Aktivatorreagenz (ExTEG S) zum Einsatz kam. Da die

erzielten Ergebnisse enttäuschend waren, folgte eine Untersuchungsreihe, bei der 38 Patienten und 19 gesunde Blutsender zusätzlich mit einem weiteren Thromboplastin als Aktivatorreagenz (Diaplastin) parallel zu ExTEG S untersucht wurden.

### 3.6.5.1. Erste Untersuchungsreihe mit ExTEG S (Mischverfahren 1)

Zwölf Patienten unter Marcumar wurden in INTEM und EXTEM (ExTEG S, Mischverfahren 1) untersucht. Der Median der INR-Werte betrug 3 (Mittelwert: 3, Streubreite: 2,0 – 7,3). Die in ROTEM ermittelten Parameter lagen überwiegend im Normbereich oder widersprachen sich sogar, z.B. waren EXTEM-CFT in 50% verkürzt und die EXTEM-Alpha-Winkel waren in ca. 40% der Fälle erhöht (Tab. 3-4), was eher für eine gesteigerte Gerinnung sprechen würde.

Tabelle 3-4 Pathologisch veränderte Testparameter in ROTEM bei Patienten unter Marcumar (n=12)

Test	Veränderungen	CT	CFT	MCF	Alp
EXTEM	pathol. erhöht	0	0	4/12	5/12
	pathol. vermindert	0	6/12	0	0
INTEM	pathol. erhöht	3/12	0	4/12	1/12
	pathol. vermindert	0	1/12	0	0
NATEM	pathol. erhöht	1/12	3/12	2/12	1/10 <sup>a</sup>
	pathol. vermindert	0	0	0	0

a - bei 2 Proben wurden keine Werte für den Alpha-Winkel von der Software des ROTEMs erhoben

Es fanden sich auch keine adäquaten Korrelationen zwischen INR und den Parametern der Tests (Tabelle 3-5). Überraschenderweise waren die Korrelationen mit dem INTEM noch besser als mit dem EXTEM.

Tabelle 3-5 Korrelation (r) zwischen INR und den ROTEM Parametern bei Patienten unter Marcumar (n = 12)

INR und	CT	CFT	MCF	Alp
INTEM	0,49	-0,46	0,32	0,46
EXTEM	0,36	-0,30	0,33	0,19
NATEM	0,22	0,01	0,15	-0,26

Insgesamt ergaben sich folglich im Zusammenhang mit der Marcumarisierung weder im INTEM noch EXTEM signifikante Veränderungen, welche das Ausmaß der Gerinnungshemmung einzuschätzen erlaubten.

### 3.6.5.2. Untersuchungen mit ExTEG S und Diaplastin (Mischverfahren 2)

Tab. 3-6 gibt die hämostaseologischen Eckdaten der Patienten wieder.

Tabelle 3-6 Hämostaseologische Eckdaten der Patienten unter Marcumartherapie (n = 38)

Statistik	Quick [%]	INR	aPTT [s]	FBR [g/L]	Hkt [%]	Thro [ $10^3/\mu\text{l}$ ]
Mittelwert	29,5	3,2	48,4	5,1	36,3	187,5
Median	28,0	2,9	48,0	4,8	37,1	179,5
Minimum	9,0	1,9	36,0	1,9	26,4	92,0
Maximum	48,0	8,7	62,0	8,0	45,8	370,0
Spannweite	39,0	6,8	26,0	6,1	19,4	278,0

Mit dem Reagenz Diaplastin von DiaMed (=ExTEG L, Abb. 3-65) wurden nun völlig andere Ergebnisse als mit ExTEG S (Abb. 3-64) erzielt.

Bei 38 Patienten unter Marcumar mit Quickwerten zwischen 9% und 48% bzw. INR-Werten zwischen 1,9 und 8,7 war die CT gegenüber Proben von gesunden Blutspendern signifikant verlängert ( $p < 0,01$ ). Bei 33 von 38 Patienten war die CT auch pathologisch, was eine deutliche bessere Sensitivität (86,8%) dokumentiert. Mit Diaplastin als Aktivatorreagenz waren die übrigen Parameter jedoch signifikant im Sinne einer gesteigerten Gerinnung verändert: Verkürzung von CFT, Verbreiterung der Amplituden (A5, A10) und Vergrößerung von Alp. ( $p < 0,01$ ). Bis zu 45% der Werte von A5 und A10 lagen oberhalb des 95% Konfidenzintervalls des Normalkollektivs.



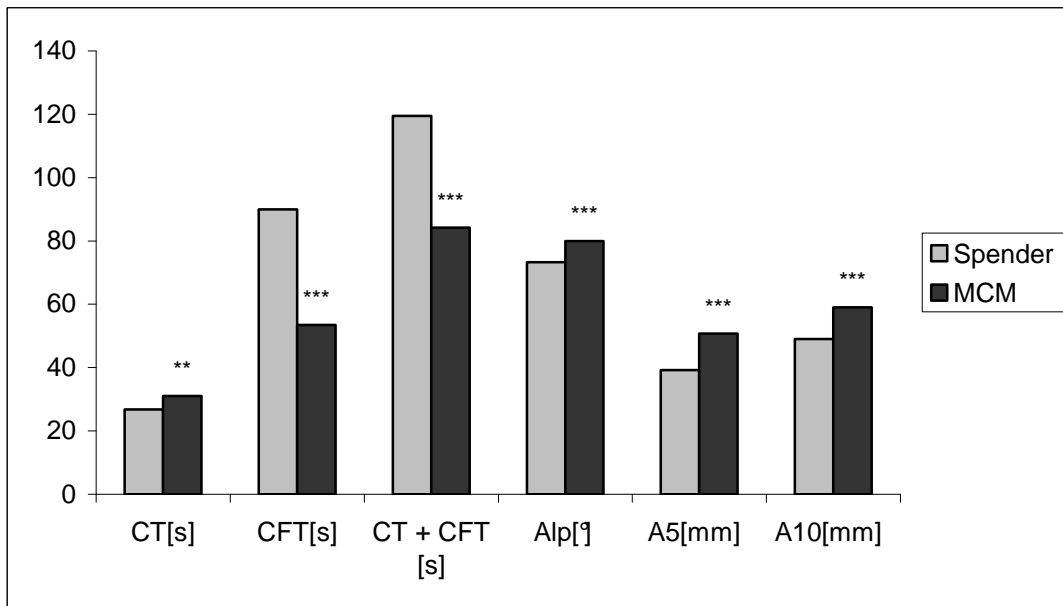


Abb. 3-64 EXTEM-Parameter bei Patienten (n = 38) unter Marcumar im Vergleich zu gesunden Blutspendern (n = 18) bei Verwendung von ExTEG S

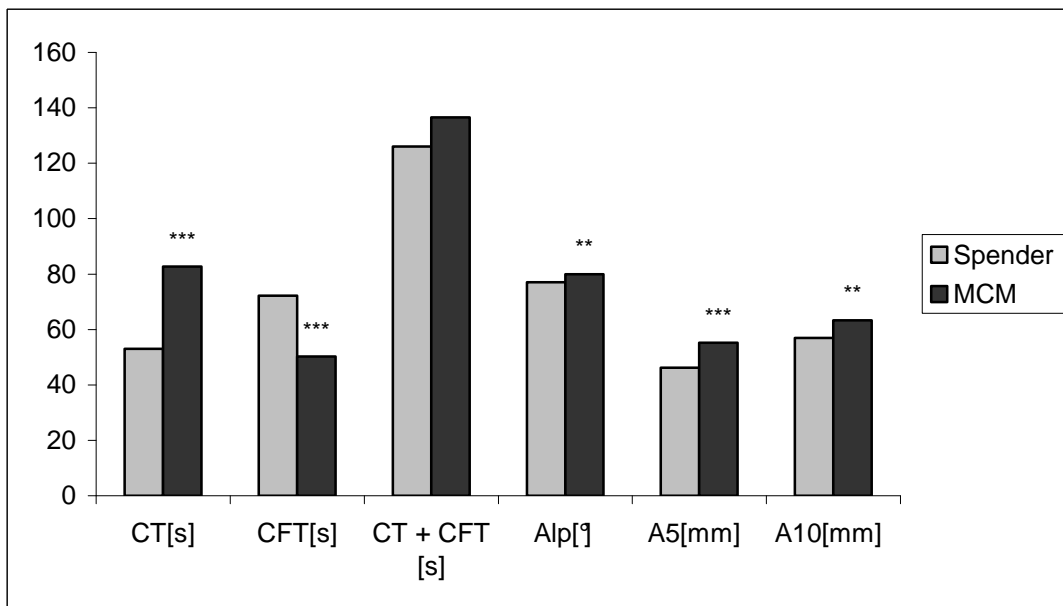


Abb. 3-65 Diaplastin - Medianwerte der Parameter bei Pat. mit Marcumar im Vergleich mit Spendern

Auch die Variationskoeffizienten waren mit Diaplastin für alle Parameter tendenziell kleiner. Bei A5 und A10 war das Ergebnis statistisch signifikant ( $p < 0,001$  – Abb.3-66).

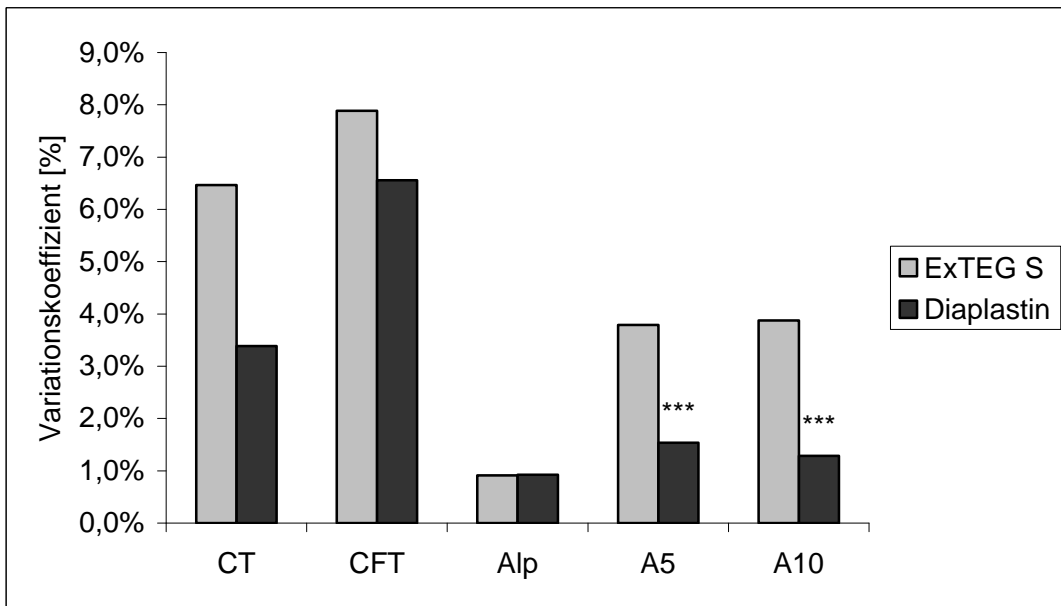


Abb. 3-66 Orale Antikoagulation, VK der Parameter, ExTEG S vs. Diaplastin, n=38

Die INR korrelierte allerdings mit der CT auch bei dieser Testversion mit dem Diaplastin Reagenz nur mäßig -  $r^2=0,52$ , aber weit besser als mit ExTEG S ( $r^2=0,38$ ; Abb 3-67 und 3-68).

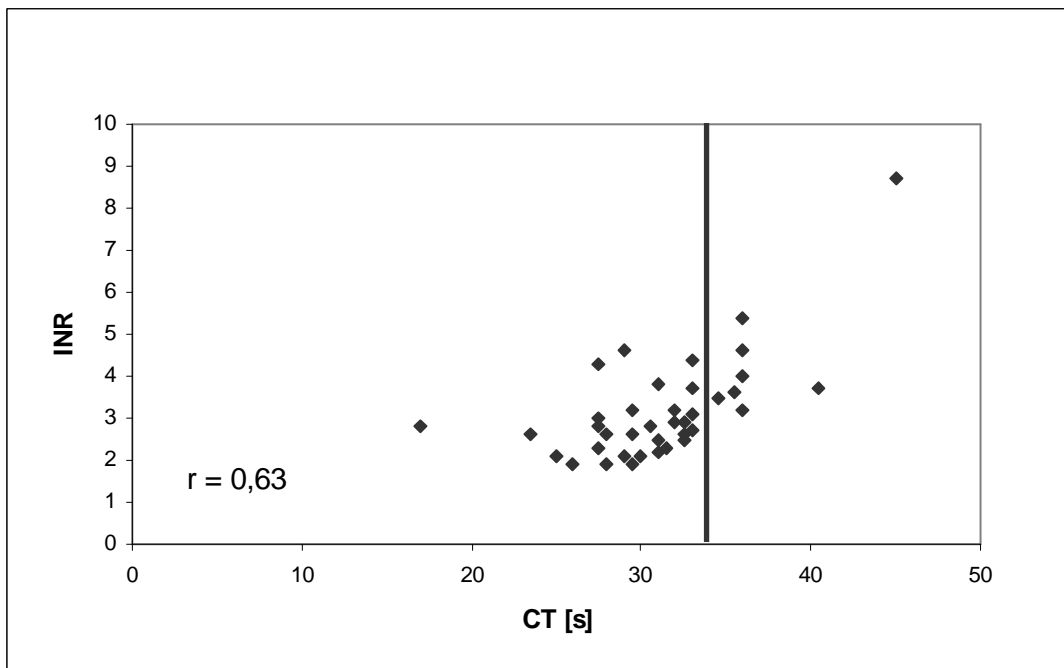


Abb.3-67 Korrelation von EXTEM-CT bei Verwendung von ExTEG S mit der INR bei Patienten unter Marcumar (n=38)

- die vertikale Linie in der Abbildung markiert den oberen Grenzwert (95% Konfidenzintervall) der CT für Gesunde (34)

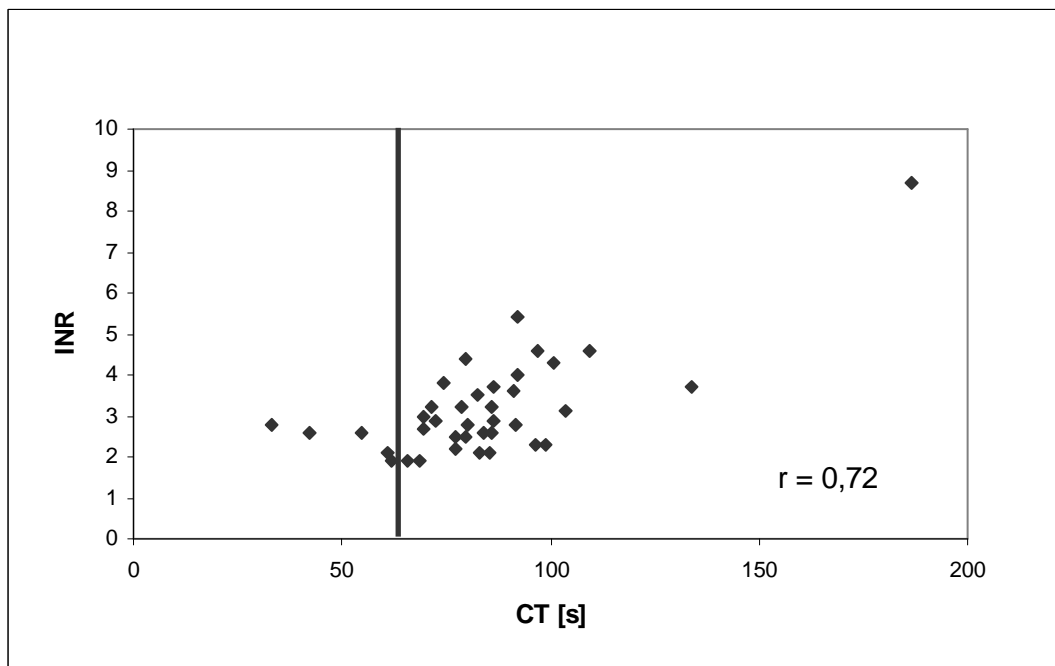


Abb. 3-68 Korrelation von EXTEM-CT bei Verwendung von Diaplastin mit der INR bei Patienten unter Marcumar (n=38)

- die vertikale Linie in der Abbildung markiert den oberen Grenzwert (95% Konfidenzintervall) der CT für Gesunde (62)

Tabelle 3-7 informiert über weitere Korrelationen, die zwischen den ROTEM Parametern und den anderen hämostaseologischen Befunden errechnet wurden. Die engsten Korrelationen wurden zwischen Fibrinogen und den Amplitudenwerten (A5/A10, MCF) ermittelt. Es folgen die Korrelationen mit dem Hämatokrit. Dagegen ließen sich keine Korrelationen zu den Thrombozytenwerten im Normalbereich herstellen. Auch mit der aPTT ergaben sich erwartungsgemäß keine Korrelationen. Zwischen den beiden getesteten Aktivatorreagenzien ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Korrelationen.

Tabelle 3-7 Korrelationskoeffizienten(r) bei Diaplastin und entspr. Gerinnungsparameter

Korrelation mit	ExTEG S					Diamed				
	CT	CFT	Alp	A5	A10	CT	CFT	Alp	A5	A10
INR	<b>0,63</b>	0,01	-0,07	0,01	0,03	<b>0,72</b>	0,21	-0,28	-0,13	-0,12
FBR	0,12	<b>-0,68</b>	<b>0,65</b>	<b>0,74</b>	<b>0,73</b>	0,35	-0,50	0,52	<b>0,69</b>	<b>0,71</b>
Hkt	0,35	0,55	-0,53	-0,55	-0,56	-0,02	0,57	-0,51	-0,53	-0,50
Thro	-0,28	-0,04	0,08	0,08	0,09	-0,29	-0,22	0,22	0,17	0,17

### 3.6.6. Patienten mit Leberfunktionsstörungen

In dieser Versuchsreihe wurden 8 Patienten mit Hämostasestörungen im Rahmen von Leberschäden untersucht. Als wesentliches Auswahlkriterium wurden erhöhte Transaminasen zugrunde gelegt. In der Tabelle 3-8 sind die wichtigsten Laborbefunde der Patienten sowie die Ergebnisse des ROTEM Tests dargestellt. Die pathologischen Ergebnisse des ROTEM Tests sind hervorgehoben.

Bei manchen Patienten (z.B. L8) ist die Leberfunktionsstörung aufgrund des Krankheitsverlaufs bekannt (in diesem Fall Multiorganversagen), pathologisch verändert waren die CHE (2530 U/l) und das AT.

Auch in dieser Versuchsreihe wurde EXTEM mit beiden Aktivatorreagenzien parallel untersucht. Wie bei allen anderen Personen, getestet mit Diaplastin, fand sich auch hier eine um ca. 50% längere CT so wie eine um 30% kürzere CFT. Der Alpha-Winkel, A5 und A10 waren mit Diaplastin leicht, aber signifikant vergrößert (für alle Parameter  $p < 0,05$ , Abb. 3-68).

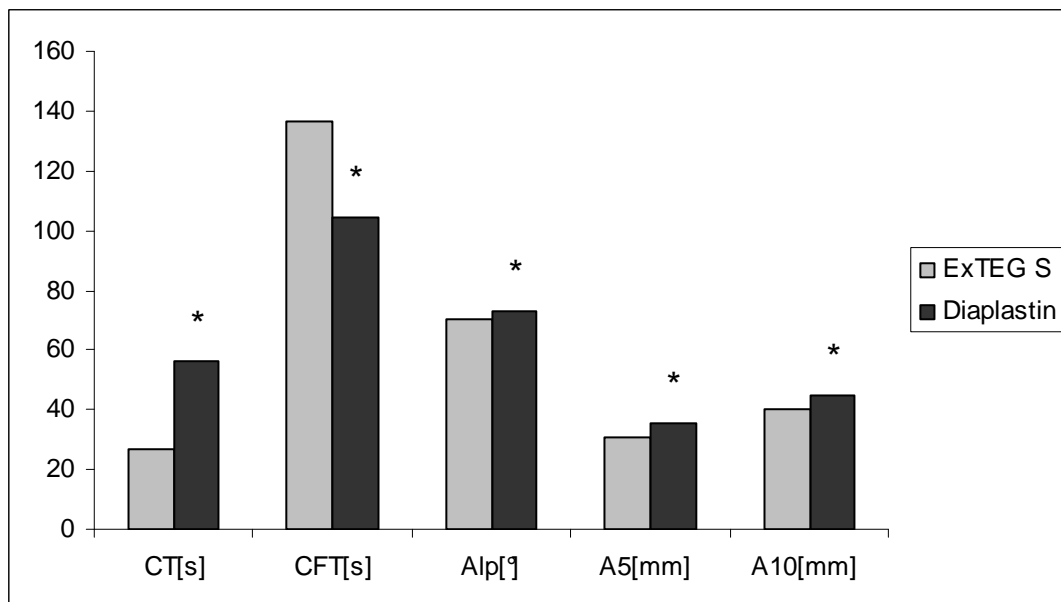


Abb.3-68 EXTEM-Ergebnisse (Mediane) mit zwei verschiedenen Aktivatorreagenzien bei Pat. mit erhöhten Leberwerten (n = 8)

Die Präzision der Messungen war zwischen ExTEG S und Diaplastin vergleichbar bzw. waren die Unterschiede der VK statistisch nicht signifikant (Abb. 3-69).

Tab. 3-8 Transaminasenwerte, Hämostaseologische Eckdaten und Ergebnisse der ROTEM Tests (Diaplastin und ExTEG S) bei Patienten mit gestörter Leberfunktion,

Method	Parameter	Normwert	L1-w	L2-w	L3-m	L4-w	L5-m	L6-w	L7-m	L8-m
Transaminasen	GGT [U/l]	W 4-18 U/l m 6-28 U/l	16	16	73	72	90	24	121	15
	GOT(AST) [U/l]	w 5-15 U/l m 5-17 U/l	88	23	99	8	51	78	31	9
	GPT(ALT) [U/l]	w 5-19 U/l m 5-23 U/l	478	15	127	19	107	108	13	9
Blutbild	Hb [g/dl]	w 12,3-15,3 m 14,0-17,5 g/dl	13,6	8,6	11,4	11,2	12,3	13,7	11,4	12,3
	Hkt [%]	w 34,7-44,7 m 36,0-48,2 %	34,9	22,7	26,6	29,5	27,1	36,4	29,1	24,2
	Thro [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	150-400 $\times 10^3/\mu\text{l}$	122	103	35	267	84	145	44	69
Gerinnung	Quick [%]	70-130 %	57	76	56	100	92	100	67	92
	INR	0,85-1,15	1,7	1,4	1,7	1	1,2	1,1	1,5	1,2
	aPTT [s]	< 38 s	48	35	43	33	52	30	70	48
	FBR [g/l]	1,8-5 g/l	1,9	1,5	3,1	4,5	3,7	2,8	3,9	2,6
	AT Aktivität [%]	80-120%	26	56	59	78	57	70	17	47
ROTEM-MV2 Diaplastin/Diamed	CT [s]	42-62 s	54	57	61	47	55	41	<b>93</b>	<b>71</b>
	CFT [s]	27-134 s	109	<b>158</b>	100	56	84	73	<b>180</b>	<b>183</b>
	$\alpha$ -Winkel [°]	66-85 °	69	68	79	79	77	77	<b>58</b>	<b>58</b>
	A5 [mm]	33-56 mm	37	<b>29</b>	35	<b>58</b>	41	45	<b>28</b>	<b>28</b>
	A10 [mm]	44-66 mm	47	<b>38</b>	<b>43</b>	<b>67</b>	51	54	<b>38</b>	<b>39</b>
ROTEM-MV2 ExTEG S Nobis	CT [s]	21-34 s	33	29	25	24	<b>20</b>	26	27	<b>43</b>
	CFT [s]	21-194 s	141	<b>210</b>	132	59	95	82	<b>258</b>	<b>217</b>
	$\alpha$ -Winkel [°]	57-87 °	65	57	77	79	77	76	50	54
	A5 [mm]	26-51 mm	32	<b>25</b>	31	<b>56</b>	38	41	<b>22</b>	<b>24</b>
	A10 [mm]	35-61 mm	42	<b>34</b>	40	<b>64</b>	47	50	<b>31</b>	<b>34</b>

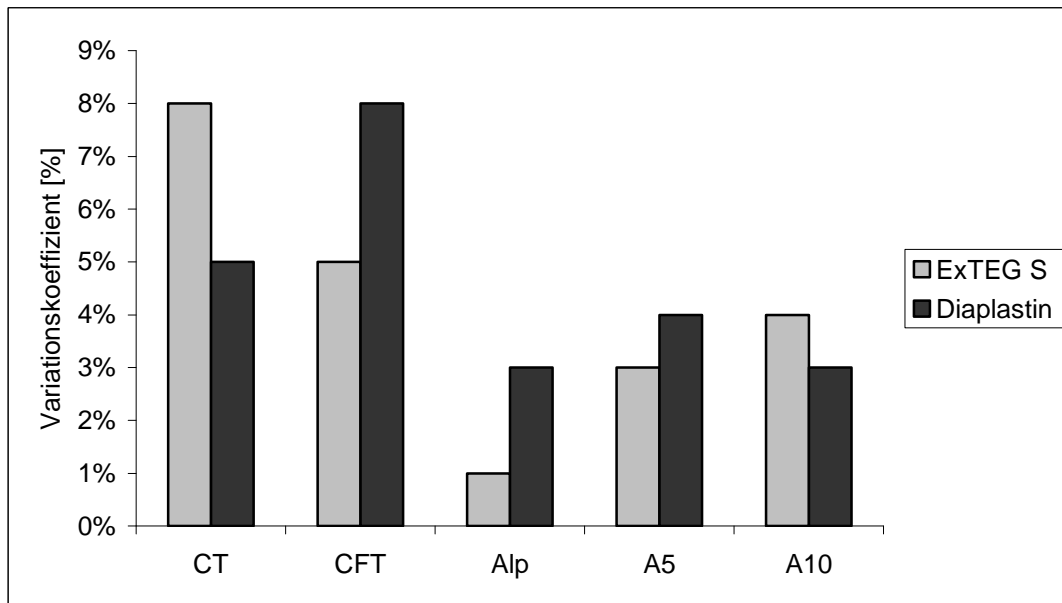


Abb. 3-69 Variationskoeffizienten für Doppelbestimmungen von EXTEM mit zwei verschiedenen Aktivatorreagenzien bei Patienten (n=8) mit erhöhten Leberwerten

Insgesamt ergaben sich engere Korrelationen zwischen den verschiedenen hämostaseologisch relevanten Laborbefunden und den EXTEM-Parametern. Überraschenderweise korrelierten diese aber kaum mit der INR. Die beste Korrelation bestand zwischen ExTEM-CT und PTT ( $r=0,87$ ) bei Verwendung von Diaplastin sowie dem Hkt und der Amplitudenbreite (A5/A10) im ExTEM ( $r=0,86/0,87$ ). Mäßige Korrelationen konnten darüber hinaus zwischen AT III und fast allen EXTEM-Parametern festgestellt werden (s.Tabelle 3-9)

Tabelle 3-9 Korrelationskoeffizienten(r) bei ExTEG bzw. Diaplastin und entspr. Gerinnungsparameter

Korrelation mit	ExTEG					Diaplastin				
	CT	CFT	Alp	A5	A10	CT	CFT	Alp	A5	A10
Quick	-0,10	-0,44	0,30	0,57	0,57	-0,42	-0,33	0,20	0,53	0,56
INR	0,13	0,42	-0,28	-0,61	-0,60	0,38	0,33	-0,20	-0,57	-0,59
aPTT	0,09	0,62	-0,55	-0,57	-0,56	<b>0,87</b>	0,57	-0,63	-0,53	-0,52
AT III	-0,38	<b>-0,73</b>	<b>0,73</b>	<b>0,73</b>	<b>0,71</b>	<b>-0,75</b>	<b>-0,67</b>	<b>0,74</b>	<b>0,68</b>	<b>0,66</b>
DD	-0,38	-0,38	0,48	0,52	0,51	-0,16	-0,43	0,50	0,53	0,47
FBR	-0,16	-0,47	0,35	0,40	0,41	-0,39	-0,52	0,31	0,46	0,48
HCT	-0,22	-0,65	0,47	<b>0,86</b>	<b>0,87</b>	-0,64	-0,63	0,46	<b>0,86</b>	<b>0,87</b>
Thro	0,13	0,42	-0,28	-0,61	-0,60	0,38	0,33	-0,20	-0,57	-0,59

### 3.6.7 Intensivpatienten

In dieser Versuchsreihe wurden 22 Patienten von Intensivstationen untersucht. Bezüglich der Hämostasestörungen war der Tests mit Diaplastin sensitiver als mit ExTEG S. Bei Patienten mit erhöhter aPTT wurde mit Diaplastin interessanterweise die CT bei 7/11 pathologisch gemessen, mit ExTEG S war dieser Parameter nur bei 2/11 erhöht. Mit Diaplastin war die A5 und A10 bei den 5 thrombopenischen Patienten in 4 Fälle pathologisch verschmälert, wogegen dass für ExTEG S in 3/5 Fälle für A10 und 2/5 für A5 zutraf. In der Tabelle 3-10a und -10b (S. 79 und 80) sind die hämostaserelevante Laborbefunde der Patienten sowie die Ergebnisse des ROTEM Tests dargestellt. Die pathologischen Werte - vor allem für die Parameter des ROTEM Tests sind hervorgehoben.

Die Untersuchung der Proben von 22 Intensivpatienten mit ROTEM bestätigte die schon vorher erhobenen Ergebnissen bezüglich der CT in Relation. Die CT bei Diaplastin war hier ebenfalls größer, um durchschnittlich 55% ( $p < 0,001$ ). Die CFT war um 14% kleiner ( $p < 0,001$ ). Die anderen Parameter waren ebenfalls mit Diaplastin gegenüber ExTEG S erhöht (mind.  $p < 0,01$ ).

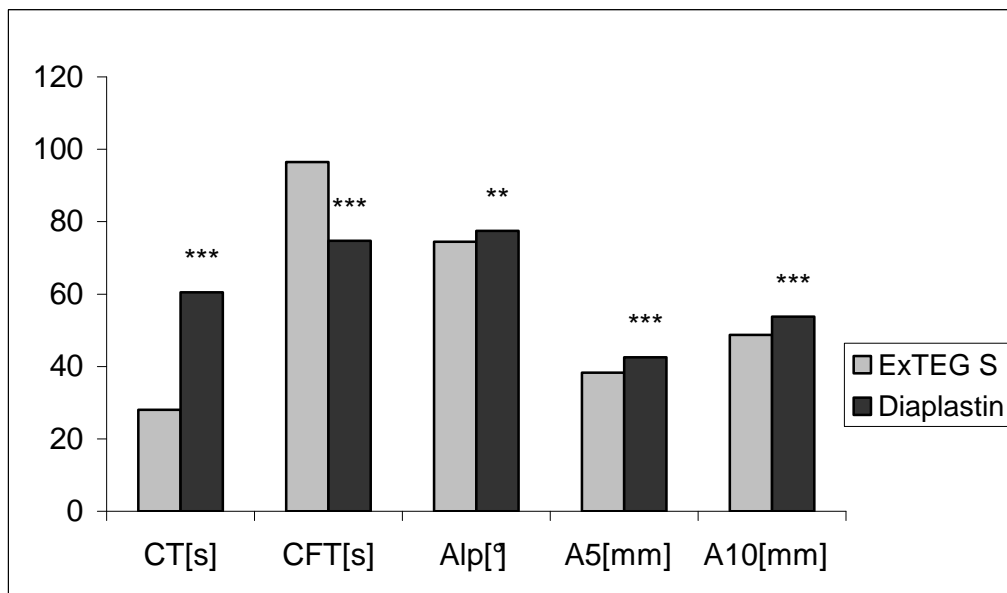


Abb. 3-83 Intensivpatienten, Medianwerte der Parameter, ExTEG S vs. Diaplastin, n=22

Tab.3-10a Hämostaseologische Eckdaten und Ergebnisse des ROTEM Tests mit Diaplastin bei Patienten von Intensivstationen

Patienten	Quick [%]	INR	aPTT [sec]	FBR [g/l]	AT [%]	Heparin [IU/ml]	Hb [g/dl]	Hkt [%]	Thro 10 <sup>3</sup> /µl	CT [s]	CFT [s]	Alp [g]	A5 [mm]	A10 [mm]
I1	100	1,0	32	3,4	92	0,05	11,4	41,1	137	57,5	48,5	80,5	53,0	62,0
I2	93	1,2	30	4,1	61	0,05	11,9	33,7	125	50,0	63,5	79,5	47,5	58,0
I3	70	1,4	<b>127</b>	2,3	46	0,22	9,0	21,7	<b>57</b>	<b>77,0</b>	<b>139,5</b>	66,0	<b>31,0</b>	<b>41,0</b>
I4	98	1,1	32	3,5	KW*	0,05	8,7	23,6	216	55,5	52,0	80,5	54,0	63,5
I5	97	1,1	36	2,6	KW	0,05	11,5	28,3	198	56,5	100,0	70,5	43,0	55,0
I6	93	1,2	<b>53</b>	5,0	KW	0,05	13,1	32,7	107	56,5	77,5	77,0	42,0	52,5
I7	47	1,9	<b>160</b>	1,4	58	0,15	14,4	39,8	166	57,0	126,0	66,5	33,5	<b>43,0</b>
I8	100	1,1	<b>65</b>	4,9	55	0,15	9,3	24,2	141	<b>68,5</b>	72,0	78,0	45,5	56,5
I9	96	1,1	32	1,8	80	0,05	12,5	30,8	107	59,5	<b>145,0</b>	<b>63,0</b>	<b>32,5</b>	<b>43,0</b>
I10	88	1,3	37	1,9	49	0,05	9,9	24,7	<b>95</b>	61,5	<b>156,5</b>	<b>62,0</b>	<b>29,5</b>	<b>40,0</b>
I11	84	1,3	<b>73</b>	2,6	71	0,26	13,5	34,3	135	<b>78,0</b>	<b>154,0</b>	<b>64,0</b>	<b>30,0</b>	<b>41,0</b>
I12	84	1,3	<b>52</b>	5,9	58	0,05	10,0	25,4	117	<b>63,0</b>	54,0	80,0	52,0	62,0
I13	87	1,3	<b>71</b>	6,0	52	0,05	10,2	25,4	101	62,0	64,0	79,0	46,5	56,5
I14	94	1,2	<b>43</b>	6,2	69	0,05	10,2	27,3	208	53,0	42,5	81,5	<b>59,0</b>	<b>67,5</b>
I15	81	1,3	<b>57</b>	8,0	60	0,05	11,3	28,4	<b>93</b>	<b>72,0</b>	53,0	79,0	53,0	63,5
I16	83	1,3	<b>47</b>	3,4	54	0,05	10,3	26,0	112	<b>66,5</b>	85,0	76,5	39,5	50,5
I17	99	1,1	33	4,3	67	0,05	12,0	29,9	103	56,5	68,5	80,0	41,5	52,0
I18	96	1,1	37	5,9	67	0,05	11,6	31,0	188	<b>68,5</b>	44,0	81,5	<b>56,5</b>	65,0
I19	94	1,2	34	2,8	69	0,05	10,0	24,2	105	55,0	83,5	76,5	41,0	51,5
I20	88	1,3	38	2,2	60	0,05	10,9	26,3	<b>57</b>	<b>125,5</b>	<b>354,0</b>	<b>43,5</b>	<b>17,5</b>	<b>26,0</b>
I21	92	1,2	<b>48</b>	2,6	47	0,05	9,6	24,2	<b>69</b>	<b>71,0</b>	<b>182,5</b>	<b>58,0</b>	<b>27,5</b>	<b>38,5</b>
I22	99	1,1	34	2,5	80	0,05	12,0	31,8	231	52,5	52,5	80,5	52,0	61,0

\*- KW = kein Wert



Tab.3-10b Hämostaseologische Eckdaten und Ergebnisse des ROTEM Tests mit ExTEG S bei Patienten von Intensivstationen

Patienten	Quick [%]	INR	aPTT [sec]	FBR [g/l]	AT [%]	Heparin [IU/ml]	Hb [g/dl]	Hkt [%]	Thro 10 <sup>3</sup> /μl	CT [s]	CFT [s]	Alp [g]	A5 [mm]	A10 [mm]
I1	100	1,0	32	3,4	92	0,05	11,4	41,1	137	26,0	66,0	78,5	46,5	56,5
I2	93	1,2	30	4,1	61	0,05	11,9	33,7	125	23,0	69,5	80,0	44,5	53,5
I3	70	1,4	<b>127</b>	2,3	46	0,22	9,0	21,7	<b>57</b>	32,0	165,5	60,5	28,5	39,5
I4	98	1,1	32	3,5	KW	0,05	8,7	23,6	216	23,5	68,5	78,5	48,5	59,5
I5	97	1,1	36	2,6	KW	0,05	11,5	28,3	198	34,0	117,5	66,5	38,5	49,0
I6	93	1,2	<b>53</b>	5,0	KW	0,05	13,1	32,7	107	27,0	100,0	74,5	36,5	45,0
I7	47	1,9	<b>160</b>	1,4	58	0,15	14,4	39,8	166	<b>45,0</b>	123,0	66,5	32,5	41,5
I8	100	1,1	<b>65</b>	4,9	55	0,15	9,3	24,2	141	26,5	93,0	74,5	40,5	51,0
I9	96	1,1	32	1,8	80	0,05	12,5	30,8	107	<b>41,0</b>	<b>197,5</b>	<b>55,0</b>	26,5	36,0
I10	88	1,3	37	1,9	49	0,05	9,9	24,7	<b>95</b>	31,5	159,5	66,0	29,0	39,5
I11	84	1,3	<b>73</b>	2,6	71	0,26	13,5	34,3	135	31,5	158,5	61,5	29,5	39,5
I12	84	1,3	<b>52</b>	5,9	58	0,05	10,0	25,4	117	29,0	64,0	79,0	47,0	57,5
I13	87	1,3	<b>71</b>	6,0	52	0,05	10,2	25,4	101	26,5	74,0	79,0	43,0	53,5
I14	94	1,2	<b>43</b>	6,2	69	0,05	10,2	27,3	208	24,5	41,5	82,0	<b>57,5</b>	<b>65,5</b>
I15	81	1,3	<b>57</b>	8,0	60	0,05	11,3	28,4	<b>93</b>	29,5	45,5	82,5	51,0	<b>61,5</b>
I16	83	1,3	<b>47</b>	3,4	54	0,05	10,3	26,0	112	30,0	129,5	65,5	33,5	44,0
I17	99	1,1	33	4,3	67	0,05	12,0	29,9	103	26,0	91,0	79,0	38,0	48,5
I18	96	1,1	37	5,9	67	0,05	11,6	31,0	188	25,5	46,0	82,0	54,0	63,0
I19	94	1,2	34	2,8	69	0,05	10,0	24,2	105	25,0	101,5	73,0	37,5	48,5
I20	88	1,3	38	2,2	60	0,05	10,9	26,3	<b>57</b>	<b>41,5</b>	<b>374,0</b>	<b>38,5</b>	<b>16,5</b>	<b>25,0</b>
I21	92	1,2	<b>48</b>	2,6	47	0,05	9,6	24,2	<b>69</b>	<b>42,5</b>	<b>216,5</b>	<b>54,0</b>	<b>24,0</b>	<b>34,0</b>
I22	99	1,1	34	2,5	80	0,05	12,0	31,8	231	21,5	72,0	77,5	45,0	54,0

- die pathologischen Werte für aPTT, Thrombozytenzahl und ROTEM Parameter sind fett markiert

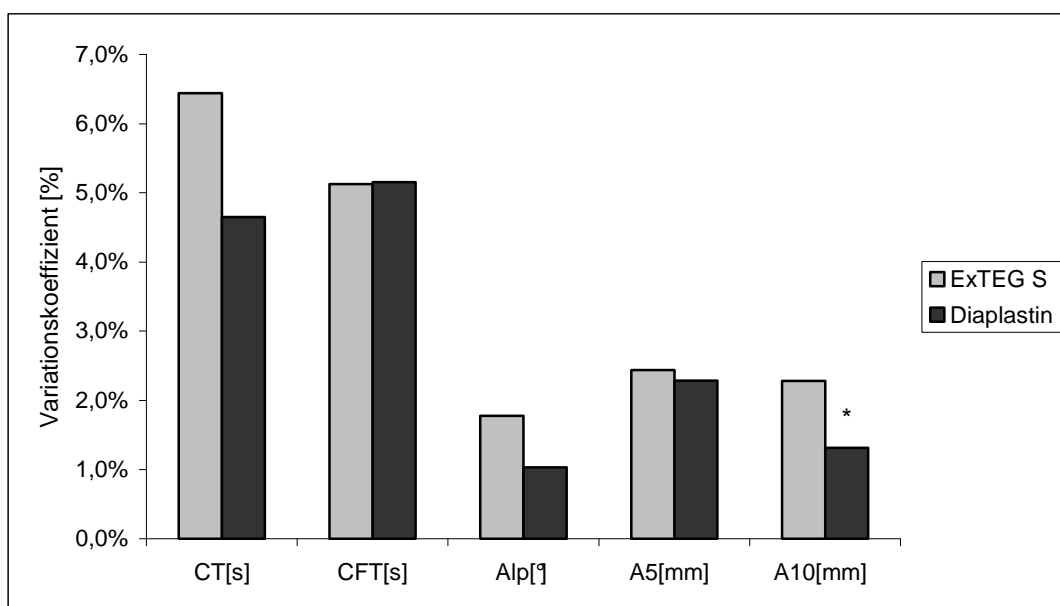


Abb. 3-84 Intensivpatienten, VK der Parameter, ExTEG S vs. Diaplastin, n=22

Die Präzision war auch hier mit Diaplastin besser, wobei der VK nur für A10 statistisch signifikant kleiner war.

Bis auf die mäßige Korrelation zwischen AT und den meisten anderen Hämostaseparametern ergaben sich keine relevanten Korrelationen.

Tabelle 3-25 Korrelationskoeffizienten(r) bei ExTEG S bzw. Diaplastin und entspr. Gerinnungsparameter

Korrelation mit	ExTEG					Diaplastin				
	CT	CFT	Alp	A5	A10	CT	CFT	Alp	A5	A10
Quick	-0,53	-0,16	0,24	0,28	0,28	-0,17	-0,23	0,30	0,36	0,37
INR	0,53	0,20	-0,24	-0,30	-0,31	0,16	0,28	-0,33	-0,39	-0,40
aPTT	0,43	0,07	-0,16	-0,23	-0,23	0,10	0,12	-0,19	-0,29	-0,29
AT III	-0,52	-0,61	<b>0,69</b>	<b>0,73</b>	<b>0,73</b>	-0,13	-0,56	<b>0,63</b>	<b>0,69</b>	<b>0,70</b>
DD	-0,28	-0,24	0,23	0,31	0,29	-0,26	-0,26	0,29	0,37	0,35
FBR	-0,05	-0,21	0,21	0,25	0,25	-0,12	-0,20	0,20	0,29	0,27
HCT	0,07	-0,19	0,16	0,13	0,09	-0,24	-0,15	0,13	0,13	0,11
Thro	-0,41	-0,55	0,50	0,63	0,61	-0,51	-0,53	0,52	0,64	0,63

## 4. Diskussion

### 4.1 Entwicklung von ROTEM

Die Thrombelastographie (TEG) wurde von Hartert in Heidelberg entwickelt. Die Methode wurde offiziell im Jahre 1948 vorgestellt. In der Literatur werden als Entstehungsjahre 1947-48 erwähnt [13]. Einen kleinen Exkurs in die Vorgeschichte von TEG macht Hett et al. im Artikel „Sonoclot analysis“ [50]. Er beschreibt, dass Hayem [48] 1889 die Veränderung der Blutviskosität als Grundlage für einen Gerinnungsfunktionstests sah. 1910 stellte Koffmann [60] einen Koaguloviskosimeter vor, mit dem es möglich war, die Veränderungen der Viskosität des Blutes während des Gerinnungsprozesses kontinuierlich aufzuzeichnen. 1923 stellte Kugelmass [71] einen modifizierten Viskosimeter vor, der die Grundlage für den heutigen Thrombelastographen war.

Initial wurde die Thrombelastographie (TEG) in der Forschung verwendet. Dreißig Jahre danach bahnte sich die Methode langsam den Weg in die Chirurgie. In den 80er wurde sie von Kang in Pittsburgh, USA bei Lebertransplantationen benutzt [57]. Später fand sie auch Einzug in die Kardiochirurgie, Gynäkologie, Intensivmedizin. Die Rotationsthrombelastometrie ist eine Weiterentwicklung der konventionellen TEG. Über mehrere Jahre (bis 2004) wurde der Begriff Rotationsthrombelastographie (RoTEG) verwendet. Danach wurde die Methode aus patentrechtlichen Gründen in ROTEM umbenannt [74].

### 4.2 TEG versus ROTEM

Die Thrombelastographie misst dynamisch die viskoelastischen Eigenschaften einer gerinnenden Vollblut- (oder Plasma-) Probe in vitro.

Die Thrombelastographie erfasst die Blutgerinnung komplex. Nach Start des Tests kommt es zur Kontaktaktivierung an Küvettenwand und Stempel als Fremdoberflächen. Zusätzlich kann durch Zugabe von entsprechenden Aktivatorreagenzien das plasmatische Gerinnungssystem mehr oder weniger spezifisch aktiviert werden. Diese Möglichkeit wird bei ROTEM genutzt. Durch die Interaktion der Thrombozyten mit Fibrin entsteht ein Gerinnsel, das sich mit der Zeit

verfestigt. Im weiteren Verlauf tritt die Fibrinolyse auf, die das Gerinnsel teilweise wieder auflöst. Diese verschiedenen Prozesse werden durch die gemessenen Parameter sowohl bei TEG wie ROTEM erfasst. R-Zeit oder CT, k-Zeit oder CFT und Alp bzw. Alpha-Winkel liefern Informationen über Beginn und Dynamik des Gerinnungsprozesses, Bildung der Fibrinmonomere und Verbindung mit den Thrombozyten (CT) sowie die Quervernetzung der Fibrinmonomere (CFT); Rückschlüsse über die mechanischen Eigenschaften des Gerinnsels werden durch MA bzw. MCF gewonnen. Der Lyseindex (in dieser Arbeit nicht untersucht) gibt Information über die Fibrinolyse. Durch gezieltes Einsetzen weiterer Reagenzien können zusätzliche Einzelheiten über die Hämostaseprozesse in der Probe gewonnen werden z.B. durch Zusatz von Inhibitoren der Thrombozyten (Cytochalasin) kann im Rahmen des FIBTEM eine genauere Aussage über die Fibrinbildung gemacht werden.

Die Vorteile des ROTEM coagulation Analyzers gegenüber dem klassischen TEG sind vielfältig. Durch die Fixation des Stempels an das Gerät ist das System relativ unempfindlich gegenüber Erschütterungen. Durch die Integration einer elektronischen Pipette ist die Methode auch für ungeübtes Personal leicht zu bedienen. Durch den Anschluss an ein Computersystem werden ständig Plausibilitätskontrollen durchgeführt. Die Ergebnisse können langfristig gespeichert und zur Bearbeitung z.B. mit Excel exportiert werden.

Die Beurteilung der mit dem ROTEM System durchgeführten Untersuchungen, erlaubt analoge Aussagen wie beim konventionellen TEG. Die Korrelation der Ergebnisse zu denen des TEG ist sehr gut [16]. Somit sind Ergebnisse von TEG und ROTEM gut vergleichbar.

#### 4.3 Präanalytik

Bei der Durchführung von Gerinnungsuntersuchungen, unter Anderem auch mit dem ROTEM System, können präanalytische Faktoren die Ergebnisse beeinflussen [114]. Solche Faktoren sind z.B.:

- Art der Blutentnahme (venös, arteriell, kapillär)
- Dauer der Stauung

- Antikoagulanzen, Mischungsverhältnis von Antikoagulanzenlösung zu Blut
- Größe des erzeugten Sogs bei der Blutentnahme
- Material bzw. Oberflächenbeschichtung der Probenröhrchen
- Zeitintervall zwischen Blutentnahme und Testbeginn
- Lagerungsbedingungen für die Blutproben
- Durchmischen der Probe vor Testbeginn

#### 4. 3.1. Zeitintervall zwischen Blutentnahme und Testbeginn

Eine zentrale Frage bei Gerinnungsuntersuchungen ist, wie lange eine Probe nach Blutentnahme stabil bleibt bzw. wie viel Zeit von der Blutentnahme bis zum Ansetzen der Probe verstreichen darf, ohne dass sich der Gerinnungsstatus der Probe wesentlich ändert.

Wir untersuchten nicht antikoagulierte (Nativ-) und Citratblutproben von jeweils 20 Spendern mit INTEM, EXTEM und NATEM 1,3,5 und 7 Min. nach BE. Signifikante Unterschiede zwischen den Zeitintervallen fanden sich überwiegend mit Nativblut, aber auch vereinzelt mit Citratblut. Die CT verlängerte sich tendenziell bei INTEM und EXTEM. Darüber hinaus ergab sich überraschenderweise kein bestimmtes Muster oder linearer Trend, denn natürlich war für Nativblut eine deutlich stärkere Instabilität über diesen Zeitraum erwartet worden. Insgesamt zeigt die Untersuchung, dass sich in den ersten Minuten nach BE signifikante Veränderungen hinsichtlich des Gerinnungsstatus der Blutproben ergeben. Diese Veränderungen sind aber mit Proben von gesunden Probanden relativ gering, aber in ihrer Auswirkung im Einzelfall nicht voraussagbar. Daher sollten fixe Zeitintervalle v.a. für Nativblutproben und insbesondere für TEG-Modifikationen mit langer Laufzeit (z.B. NATEM) festgelegt und konstant eingehalten werden.

Der Einfluss relativ kurzer Zeitintervalle bis zur Durchführung des Tests wurde auch von Orlikowski et al untersucht [84]. Dabei wurde Nativblut ohne Zusatz von Antikoagulantien sofort, 3 und 6 Minuten nach BE untersucht. Aktivator der Gerinnung wurden nicht benutzt. Die Proben wurden von gesunden Probanden (n = 15) entnommen und bis zur Messung in Polystyrenröhrchen in aufrechter Position aufbewahrt.

Proben, die 6 Min. nach BE gemessen wurden zeigten längere CT Zeiten, kürzere CFT Zeiten und größere MCF Werte als solche Proben, die bereits nach 3 Min. untersucht wurden. Die Autoren interpretierten die durch verzögerte Untersuchung ausgelösten Veränderungen im Sinne einer gewissen Hyperkoagulabilität.

Die Autoren empfahlen die 3-minütige Lagerung der Blutproben in Polystyrenröhrchen als optimale Variante.

Im Unterschied zu Orlikowski et al. zeigte sich bei uns im NATEM ein signifikanter Unterschied nur für MCF. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte das Mischen der Probe vor der Messung sein.

Im Übrigen ist die Verwendung von Nativblut für den Einsatz im Labor natürlich ungeeignet, da die Proben in der Regel geronnen sein dürften, wenn sie das Labor erreichen. Daher interessierte uns auch, welche Lagerungsbedingungen mit antikoagulierten Blutproben einzuhalten sind. Als nächstes untersuchten wir, ob die mit Natriumcitrat antikoagulierten Proben genauso wie für die Untersuchungen der Thrombozytenfunktion mindestens 30 Min. ruhen müssen, um die im Rahmen der Blutabnahme erfolgte Thrombozytenaktivierung rückgängig zu machen.

Aufgrund unserer Ergebnisse müssen die Proben nicht mindestens 30 Min. ruhen. Offensichtlich spielen die Funktionsstörungen der Thrombozyten infolge Blutentnahme auf Grund der geringeren Sensitivität des ROTEM in dieser Hinsicht im Gegensatz zu der Situation bei PFA-100® und Thrombozytenaggregationstest keine Rolle.

Insgesamt kann man daher schlussfolgern, dass auch mit Citratblut die stärksten Veränderungen in den ersten 5 Minuten nach BE stattfinden. Die Citratblutproben können aber bereits 10 Min. nach BE untersucht werden.

Im Folgenden werden weitere Studien kurz diskutiert, die u.a. auch den Einfluss des Zeitintervalls bei Citratblut nach BE untersuchen. Leider war in den meisten Fällen auf Grund des abweichenden Studiendesign bzw. der gewählten Zeitintervalle kein entsprechender Vergleich zu den von uns ermittelten Ergebnissen möglich.

Camenzind et al [21] verglichen Citratblutproben von 30 Probanden im TEG (NaTEG) sofort, 15 und 30 Min. nach BE. Die nach längerem Intervall nach BE gemessenen Proben zeigten kürzere CT und CFT ( $p < 0,05$ ), sowie größere Alp und MCF ( $p < 0,05$ ). Man beobachtete also mit der Zeit eine Verschiebung der Hämostase

in Richtung relativer Hyperkoagulabilität. Unsere Ergebnisse (EXTEM) stimmen mit denen der Autoren zumindest hinsichtlich CFT und Alp überein. Allerdings ist ein direkter Vergleich unserer Ergebnisse mit dieser Studie nicht möglich, da wir aktivierte Tests einsetzten (EXTEM, INTEM).

Deshalb ist zu erwarten, dass durch Beschleunigung der Gerinnung mittels Aktivatoren eventuelle Unterschiede, die durch unterschiedliche Zeitintervalle hervorgerufen werden, nivelliert werden.

Im Rahmen der zitierten Studie wurden aber bei weiteren 30 Citratblutproben auch Untersuchungen mit 1% Celite als Aktivatorreagenz 1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach BE untersucht. Dieses beschleunigt als Oberflächenaktivator den Gerinnungsprozess und modifiziert damit den Test im Sinne des INTEM. Die CT wurde mit der Dauer der Lagerung insgesamt immer kürzer ( $p < 0,05$ ) Die CFT zeigte bis 8 Std. dieselbe Tendenz ( $p < 0,05$ ), wurde aber nach 48 Std. wieder länger. Der Alpha-Winkel verhielt sich logischerweise umgekehrt zur CFT. MA bzw. MCF zeigten nach einer anfänglichen Verschmälerung ( $p < 0,05$ ) während einer und 8 Std. nach BE keine Veränderung, um danach deutlich abzunehmen. Insgesamt zeigten sich folglich mit dem Celite-aktivierten TEG bei Lagerung der Proben im Großen und Ganzen die gleichen Veränderungen wie im NaTEG, also eine gesteigerte Gerinnung.

Durch die Verwendung eines Aktivators entspricht dieser Teil der Studie unseren Untersuchungen schon eher, obwohl unterschiedliche Aktivatoren verwendet wurden. Interessant ist, dass nach anfänglichen Veränderungen innerhalb der ersten Std. die Parameter des Tests bis zu 8 Stunden nach BE stabil blieben. Das zeigt bei der allgemein bekannten Lagerungsinstabilität von Thrombozyten, dass das TEG wenig von der Funktion der Thrombozyten beeinflusst wird.

Bowbrick und Mitarbeiter verglichen die Ergebnisse im NaTEG von Nativblut ( $n = 8$ ), das sofort nach BE untersucht wurde, mit denen von Citratblut ( $n = 8$ ), das entweder 30 bzw. 120 Minuten bei Raumtemperatur (RT) oder 45 bzw. 150 Minuten bei 4 °C bis zum Testbeginn gelagert wurde [12]. Lediglich die über 120 Minuten bei RT gelagerten Blutproben wichen signifikant ab, indem sich die CFT verkürzte und der Alpha-Winkel zunahm.

Die Autoren kamen daher zu folgendem Schluss

1. Nativblutproben sollten innerhalb 6 Min. nach BE angesetzt werden

2. Die Ergebnisse mit Citratblutproben sind im Falle der Lagerung bei Raumtemperatur nach Zeitintervallen von  $\geq 120$  Minuten nicht mehr verlässlich.

Durch die gewählten Zeitintervalle sind die Ergebnisse durchaus mit denen von Camenzind et al [21] vereinbar. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit unseren ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Testansätze wiederum nicht möglich. Auffällig ist, dass auch bei dieser Studie nach einer gewissen Zeit Veränderungen im Sinne einer relativen Hyperkoagulabilität eintraten.

Von Vig et al. [118] wurden u.a. Citratblutproben mittels NaTEG und ExTEG an einem CTEG Gerät (Haemoscope Corp., Skokie, Illinois, USA) gemessen. Die Proben wurden vor Messung durch vorsichtiges Schwenken gemischt.

In einer Teilstudie wurden Messungen 5, 15, 30, 40, 50, 60, 75 und 90 Min. nach BE durchgeführt (n=10 Proben). Für jeden Messzeitpunkt wurde von jedem Probanden jeweils eine separate Probe entnommen (8 Proben pro Person).

Die CT verkürzte sich nach 30 Minuten signifikant. Zwischen 30 und 90 Min. blieb dieser Parameter unverändert. Für die anderen Parametern (CT, MCF, Alpha-Winkel) ergaben sich innerhalb der genannten Zeitspanne keine signifikanten Unterschiede.

Auch hier fand sich eine mit längerem Zeitintervall zunehmende relative Hyperkoagulabilität. Im Unterschied zu unserer Studie veränderte sich hier die CT signifikant.

In einer weiteren Teilstudie wurde von 10 Probanden jeweils nur eine Probe entnommen und nach 45, 90, 135 und 180 Min mittels NaTEG und ExTEG untersucht. Mit der Länge der Zeitintervalle nahmen auch die Veränderungen im Sinne einer Hyperkoagulabilität zu: CT und CFT wurden kürzer und MCF bzw. Alpha-Winkel nahmen zu. Die statistische Auswertung zeigte signifikante Veränderungen zwischen 45 und 180 Min. nach BE, am ausgeprägtesten für CT.

In einer 3. Teilstudie dieser Autoren wurden von 10 Probanden jeweils 6 Proben entnommen und 30 Min. nach BE gleichzeitig an 6 Kanälen im NaTEG gemessen. Dabei ergab sich eine geringe Variation der Messergebnisse. Zusammenfassend



sehen die Autoren daher den Zeitpunkt nach 30 Min. für NaTEG/Citratblut als optimal an, weil sich dann die Probe am ehesten stabilisiert und „beruhigt“ hat.

Die Zeitintervalle dieser Studie, sowie die verwendeten Tests erlauben wiederum leider keinen direkten Vergleich mit den von uns erhobenen Ergebnissen.

Zusammenfassend sieht man jedoch, dass in den ersten 30 Min. nach BE die meisten Autoren im Vergleich zur Messung sofort nach BE signifikant unterschiedliche Werte gemessen haben - vor allem mit dem Test, zu dem von uns ebenfalls zeitweise eingesetzten NATEM equivalent ist. In den folgenden 2 bis 4 Stunden nach BE zeigen die Ergebnisse größere Abweichungen. Für die Einschätzung der Zeitintervalle mit EXTEM und INTEM sind jedoch noch weitere Studien notwendig, um den Einfluss des Zeitintervalls eindeutig einschätzen zu können.

#### **4.3.2 Einfluss des Zeitintervalls in Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl**

Die Ergebnisse mit thrombozytopenischen Proben zeigen, dass die Thrombozyten offensichtlich wenig die Lagerungsvariabilität beeinflussen. Daher zeigt sich bei Proben von thrombozytopenischen Personen kein Einfluss des Zeitintervalls auf die CFT, die an sich besonders von Zahl und Funktion der Thrombozyten abhängig ist. Allerdings war die Präzision diesbezüglich bei den Proben, gemessen <10 Min. nach BE besser.

#### **4.3.3. Citrat- vs. Nativblut**

Grundsätzlich kann ROTEM sowohl mit Citrat- wie Nativblut durchgeführt werden. Vergleicht man die Ergebnisse hinsichtlich der Zusammensetzung der Blutproben, stellt man fest, dass sich die Parameter zwischen Nativ- und Citratblut bei allen Tests signifikant unterscheiden (meist  $p < 0,001$ ). Die größten Unterschiede fanden sich bei NATEM. Somit sind die gemessenen Werte für Nativ- und Citratblut nicht direkt vergleichbar. Daraus ergibt sich, dass unterschiedliche Referenzwerte zugrunde gelegt werden müssen.

Bis zur siebten Minute trat bei den Nativblutproben keine sichtbare Gerinnung im Probenröhrchen ein. Trotzdem sollte nicht antikoaguliertes Blut möglichst sofort nach Probengewinnung getestet werden. Citratblut hat den Vorteil, auch über mehrere Stunden weitgehend stabile Ergebnisse mit geringerer Variation als Nativblut zu ermöglichen.

Vielerorts werden die Untersuchungen mittels TEG im OP grundsätzlich mit Nativblut durchgeführt [89]. Als Grund wird angeführt, dass nur die Ergebnisse von frischem, nicht antikoaguliertem Blut als wirklich repräsentativ für die in vivo Situation angesehen wird [74]. Richtig ist, dass die Nativ- und Citratblutproben deutlich voneinander abweichende Messwerte im TEG ergeben, wie wir und auch andere zeigen konnten [z.B. 86]. Andererseits korrelieren insgesamt die Ergebnisse mit Citrat- und Nativblut aber bei INTEM und EXTEM sehr gut miteinander. Daher ist bei diesen Tests lediglich erforderlich, jeweils die für die verwendeten Blutproben entsprechenden Referenzwerte zu ermitteln und zu berücksichtigen.

Camenzind et al [21] verglichen unter anderem auch Nativblutproben (aktiviert mit Celite) mit Citratblutproben, gemessen sofort nach BE. Diese Studie ist vergleichbar mit den von uns durchgeführten Untersuchungen mit INTEM. Ähnlich wie in unserer Studie waren die Werte teilweise signifikant unterschiedlich - mit Citratblut waren CT und CFT länger sowie Alp und MCF kleiner, aber die Werte von Nativ- und Citratblut korrelierten gut miteinander.

#### **4.3.4. Modifikation des Pipettiervorgangs. Referenzwerte.**

Es wurden zwei Pipettiermethoden verglichen, die sich v.a. durch das Mischen des Testansatzes unterschieden. Mit beiden Verfahren testeten wir Proben von 30 Spendern mittels INTEM, EXTEM und NATEM in Doppelansätzen. Überraschenderweise erbrachten die beiden Methoden signifikant unterschiedliche Mittel- und Medianwerte für die verschiedenen Parameter. Die Methode mit der automatischen Durchmischung zeigte darüber hinaus geringere Präzision (höhere  $V_k$  in den Doppelbestimmungen). Die manuelle Durchmischung war wahrscheinlich

gründlicher. Offensichtlich führte die automatische Durchmischung auch zu einer stärkeren Aktivierung, denn die Mittel- und Medianwerte von CT und CFT lagen signifikant niedriger als bei der manuellen Durchmischung. Eine mögliche Ursache könnte der hohe Sog beim automatischen Aufziehen mit der Pipette sein. Dennoch wurde das automatische Pipettierverfahren in die Routine übernommen, um von individuellen Faktoren unabhängiger zu sein, was insbesondere für die Anwendung der Methode als Patienten nahes Verfahren (POCT) in der Hand verschiedener Untersucher vorteilhaft ist. Die im Rahmen dieser Untersuchungsreihe ermittelten Ergebnisse wurden als Referenzwerte für die weiteren Untersuchungen herangezogen. Überraschender Weise unterschieden sich die ermittelten Referenzwerte teilweise erheblich von den Angaben des Herstellers (siehe Tab. 4-1), die von vielen Anwendern kritiklos bei der Bewertung der Ergebnisse herangezogen werden. Auch die von Bohner und Pape [6] 2003 publizierten Referenzwerte eines Kollektivs von 59 gesunden Probanden wichen ebenfalls von den Herstellerangaben ab und deckten sich mit den von uns ermittelten Referenzintervalle eher. Wenn die Testverfahren aber von Klinikern als POCT ohne entsprechende Laboruntersuchungen eingesetzt werden, fehlen die entsprechenden Kontrollen, die eine unkritische Interpretation der Ergebnisse verhindern.

Tab. 4-1 Referenzwerte für InTEG und ExTEG (Benutzerinfo, 1999; unsere Ergebnisse für Mischverfahren 1 und 2; Ergebnisse von Bohner und Pape)

		CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]
Benutzerinfo, 1999	InTEG	<160	<180	53-74
	ExTEG	<50	<180	53-74
ROTEM MV1	InTEG	122-182	47-117	51-67
	ExTEG	27-51	65-174	45-64
ROTEM MV2	InTEG	122-172	34-91	50-69
	ExTEG	23-43	46-180	39-64
Bohner und Pape	InTEG	117-157	37-101	50-70
	ExTEG	45-89	42-149	51-70

Die ROTEM-Methode wurde in den letzten Jahren mehrfach geändert. Insbesondere wurden die Reagenzien immer wieder modifiziert, was die Unterschiede durchaus erklären kann. Weiterhin wurde die Mechanik des Systems verbessert und andere Pipettenspitzen eingesetzt (300µl statt 1000µl), Faktoren, die sich auf die Referenzwerte auswirken können. Das Resümee aus diesen Daten ist, dass von den Anwendern jeweils neue Referenzwerte ermittelt werden müssen, wenn hinsichtlich der Reagenzien oder Geräte Veränderungen eintreten, weil geringe Veränderungen doch erhebliche Abweichungen der Ergebnisse nach sich ziehen können. Außerdem müssen die Referenzwerte in größeren Abständen überprüft werden. Weiterhin sind regelmäßig interne Kontrollen mitzuführen. Seit Anfang 2008 werden sogar regelmäßige Ringversuche angeboten.

#### **4.3.5. Vergleich zweier Aktivatorreagenzien für EXTEM**

Die getesteten Reagenzien (EXTEG S Nobis und Diaplastin, Diamed) lieferten sehr unterschiedliche Ergebnisse (vor allem bezogen auf die CT). Daher müssen für jedes Reagenz eigene Referenzwerte erstellt und herangezogen werden. Prinzipiell scheint das Diaplastin für Untersuchungen besser geeignet, weil die Ergebnisse geringere Variation zeigen. Außerdem dürfte es durch die schwächere Aktivierung der Gerinnung (längere CT) empfindlicher auf plasmatische Gerinnungsstörungen ansprechen.

In Rahmen dieser Untersuchungsreihe wurde ROTROL als Qualitätskontrolle eingesetzt. Das ROTROL kann ohne größeren Aufwand eingesetzt werden und lieferte stabile, reproduzierbare Werte.

Allerdings erachten wir diese Kontrolle nicht als optimal, weil sie wesentlich von den Ergebnissen mit Blut abweicht, andererseits aber Blut und nicht Plasma untersucht wird. Es wäre wesentlich korrekter, standardisierte Blutproben für die Kontrollen zur Verfügung zu haben und dadurch das Verfahren konsequenter zu überprüfen, jedoch dürfte diese Forderung nur von wenigen Institutionen zu erfüllen sein.

#### 4.3.6. Blutverdünnung mit unterschiedlichen Infusionslösungen

Für die Volumensubstitution werden neben Kristalloiden (vorwiegend NaCl bzw. RL) auch kolloidale Lösungen (HAES, GEL) eingesetzt. Viele Arbeiten wurden publiziert, bei denen man die Effekte der Verdünnung und insbesondere auch der Infusionslösungen auf die Hämostase in vivo und in vitro untersucht hat [9, 10, 14, 31, 32, 38, 39, 44, 51, 52, 76] Mehrere Autoren zeigten, dass die Verwendung von HAES in vivo eine gestörte Gerinnung nach sich zieht. Durch die Verdünnung wird v.a. die Konzentration von Fibrinogen (FBR) reduziert, durch HAES Infusion soll die Fibrinpolymerisation gestört werden. Darüber hinaus soll HAES die Expression von GP IIb-IIIa von Thrombozyten hemmen [110]. Diese Veränderungen sollen sich im TEG durch Verringerung der Gerinnselfestigkeit und –elastizität dokumentieren. Die Verschmälerung der Maximalamplitude im TEG bzw. von MCF ist Ausdruck von Fibrinogen- und/oder Thrombozytenverminderung. Daher wird aus einer deutlichen Verschmälerung der Amplitude im TEG bzw. Verminderung von MCF im ROTEM bei Patienten mit großem Blutverlust der Substitutionsbedarf für Fibrinogen und evtl. Thrombozyten abgeleitet [52]. Dabei sind die im TEG bzw. ROTEM beobachteten Effekte ausgeprägter bei Substitution höhermolekularer HAES-Lösungen [32]. Calatzis et al berichteten, dass ExTEG sensibel die Gerinnungsstörungen erfasst (CT und CFT signifikant verlängert, MCF signifikant reduziert), die bei Blutverdünnung und Substitution von HAES auftreten. [20].

Andere Autoren fanden bei milder Dilution (bis 30%) mit Kristalloiden aber eine gesteigerte Gerinnung, ein Befund, der schon seit 1950 bekannt ist [113]. Boldt et al berichteten 2002 bei Untersuchungen mittels InTEG auch über eine milde Hyperkoagulabilität bei Verdünnung mit RL und 0,9% NaCl [8].

In weiteren Studien mit dem TEG fanden sich ebenfalls Ergebnisse, die bei mäßiger Hämodilution Zeichen der Hyperkoagulabilität entsprachen. Ruttman et al (1996) beschrieben bei einer 20%igen Verdünnung von nativem Blut in-vitro mit 0,9% NaCl oder GEL eine gesteigerte Gerinnung [96] Vergleichbare Ergebnisse erhielten sie bei Untersuchung von Patienten, die entsprechend mit Infusionslösungen substituiert wurden [90]. Auch Boldt et al konnten diese Befunde an Patienten bestätigen [9]. Zu analogen Ergebnissen kamen Egli et al (1997), die ebenfalls die Messungen von verdünnten Blutproben mit dem TEG durchführten [31]. Dies betraf Verdünnung um

30% mit NaCl. Die Verdünnung mit HAES und GEL, sowie stärkere Verdünnungen (60%) ergaben dagegen eine verminderte Gerinnbarkeit. Zusätzlich beschrieben Ruttman und Mit. einen stärkeren Abfall von FBR und AT, der nicht alleine mit der Verdünnung zu erklären war. Die beschriebene Gerinnungsaktivierung ließ sich nicht durch Acetylsalizylsäure hemmen [89]. Deswegen vermuteten die Autoren, dass bei Hämodilution eine vermehrte Thrombinbildung zustande kommt. Da wir ähnliche Veränderungen bei unseren Untersuchungen fanden, aber im Gegensatz zu diesen Autoren Citratblut untersuchten, erscheint eine durch die Hämodilution ausgelöste vermehrte Thrombingeneration schwer vorstellbar.

Ng et al (2002) fanden analoge Befunde wie die zitierten Autoren [83]. Es wurde die Patienten vor einer Leberoperation mittels TEG untersucht. Zusätzlich wurden vermehrt Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) bei Hämodilution festgestellt. Andererseits veränderten sich die üblichen Laborbefunde der Hämostase entsprechend der Verdünnung [94].

Insgesamt suggerieren alle diese Studien mit dem TEG, dass Verdünnung zu einer Hyperkoagulabilität führt. Dagegen existieren schon seit vielen Jahren Daten, die bei Hämodilution für eine erhöhte Blutungstendenz sprechen bzw. eine Reduktion der Blutungsneigung nach Anheben des Hämatokrits zeigen.

Hellem et al. Beschrieben schon 1961 eine Verkürzung der in-vivo Blutungszeit nach Erythrozytentransfusion bei 5 Patienten mit chronischer Anämie [49]. Livio et al (1982) gelang es, einen positiven Effekt von Erythrozytentransfusionen auf die Hämostase bei Patienten mit Urämie nachzuweisen [73]. Fernandez et al (1985) fanden bei 33 Patienten mit Urämie eine umgekehrte Korrelation zwischen den Hämatokritwerten und Simplate® in-vivo Blutungszeiten ( $r=0,78$ ) [34]. Valeri et al (2001) zeigten, dass eine Verminderung des Hämatokrits um 15 % die in-vivo-Blutungszeit um 60% verlängert, während eine Verminderung der Thrombozytenzahl um 32% keinen Einfluss darauf hatte [121], was jedoch nicht überrascht, da die Thrombozytenzahl immer oberhalb 100.000/ $\mu\text{L}$  lag.

In keiner Studie mit dem TEG wurde autologes Plasma zur Verdünnung verwendet. Bei Zusatz von autologem Plasma, sind plasmatische Gerinnungsstörungen ausgeschlossen, da es zu keiner Veränderung der Konzentration und Aktivität der Gerinnungsfaktoren und –inhibitoren einschließlich AT kommt. Aber gerade bei Zusatz von PAP wurden in unserer Studie die deutlichsten Veränderungen im Sinne

gesteigerter Gerinnung in der Rotationsthromboelastometrie (NATEM) nachweisbar. Zusätzlich wurde die Gerinnungszeit mittel KC4 und SGC ermittelt, um unabhängige Tests als Vergleich hinzu zu ziehen. Bei diesen Tests besteht die Besonderheit, dass das Blut während der Messung kontinuierlich (mit dem Reagenz) vermischt wird. Im Unterschied zu den Befunden mit ROTEM fand sich eine signifikante Verlängerung der Gerinnungszeit bei Verdünnung mit NaCl, aber nicht mit PAP.

Ein wichtiger Unterschied unserer Studie, gegenüber den Untersuchungen der zitierten Autoren bestand darin, dass wir mit antikoagulierten Blutproben statt Nativblut arbeiteten. Grundsätzlich ist dagegen allerdings nichts einzuwenden, außer dass unterschiedliche Referenzwerte zugrunde zu legen sind. Im Gegenteil, durch Antikoagulation wurde eine unkontrollierte Gerinnungsaktivierung durch die Blutentnahme bzw. spätere Manipulationen vermieden. Durch den Zusatz von Natriumcitrat ergibt sich schon primär eine Verdünnung um 10%. Tatsächlich verglichen wir demnach um 28% verdünnte Proben mit um 10% verdünnten Proben. Damit lag die Verdünnung aber noch in dem Bereich, der z.B. von Egli und Mit. untersucht wurde [31]. Die Ergebnisse bestätigen dies, entsprachen sie doch denen der genannten Studien [31, 96]. Die Tatsache, dass in unserer Studie die größten Veränderungen im Sinne einer Gerinnungsaktivierung durch PAP zustande kamen, legt den Verdacht nahe, dass eine test-spezifische Besonderheit die Ergebnisse verfälscht. Wir beobachteten, dass verdünntes Blut die Küvettenoberfläche besser benetzt, sodass davon auszugehen ist, dass eine bessere Kontaktaktivierung ausgelöst wird, die sich bei bis zu 30% Verdünnung mit NaCl oder RL stärker als die Verdünnung der Gerinnungsfaktoren auswirkt, so dass eine Hyperkoagulabilität vorgetäuscht wird. Eine höhere Verdünnung führt dann jedoch zur Hypokoagulabilität. Bei Initiierung der Gerinnung mit PTT Reagenz, spielt die Kontaktaktivierung eine geringere Rolle, weshalb in INTEM die Verdünnung mit einer verzögerten Gerinnung einherging. Die mit KC4 und SGC ermittelten Gerinnungszeiten zeigten immer eine Störung der Gerinnung durch Verdünnung. Für die Verdünnungen mit HAES fanden wir dieselben Veränderungen im Sinne gestörter Hämostase wie die anderen Autoren. Die Veränderungen sind charakteristisch für eine Störung der primären Hämostase (Verschmälerung von Alpha-Winkel und MCF). Dazu passen unsere Ergebnisse in PFA-100® und VCP. Der negative Effekt der Hämodilution auf die primäre Hämostase kann nicht durch

die verminderte Thrombozytenzahl erklärt werden, da diese nie 100.000/ $\mu$ l unterschritt. Die Thrombozytenkonzentration von 100.000/ $\mu$ L stellt etwa den Grenzwert für eine normale Funktion der primären Hämostase dar [69]. Auch frühere in-vitro Studien zeigten, dass Hämodilution die primäre Hämostase im PFA-100® auch bei normaler Thrombozytenzahl signifikant beeinträchtigt [29]. Dabei wirkten sich die verschiedenen Infusionslösungen sehr unterschiedlich aus [28]. Die primäre Hämostase scheint bei Verdünnung durch niedrigere Blutviskosität und veränderte Rheologie des Blutes gestört zu werden. Diese Hypothese deckt sich mit den experimentellen Ergebnissen einer Reihe von Autoren [1, 4, 5, 33, 91, 119-121]. Reimers et al zeigten, dass eine direkte Beziehung zwischen Gerinnelbildung und Hämatokrit bei Scherkraft induzierter Thrombozytenaggregation besteht [91]. Escolar et al. bestimmten die in-vivo Blutungszeit und die Gerinnelbildung durch die Baumgartner'sche Perfusionskammer bei thrombozytopenischen Patienten vor und nach Transfusion von Erythrozytenkonzentraten [33]. Erhöhung des Hämatokrits verursachte eine Verkürzung der Blutungszeit und Verbesserung von Thrombozytenadherenz und Fibrinablagerung. In unserer Studie benutzten wir den PFA-100®, der die primäre Haemostase ex vivo simuliert sowie verlässlicher und sensitiver ist als die in-vivo Blutungszeit [22, 24, 37, 46, 64, 75]. Mit diesem Test konnte eine deutliche Störung der primären Hämostase durch Blutverdünnung nachgewiesen werden. Allerdings führt die Blutverdünnung auch zu einem beschleunigten Blutfluss, sodass die Bildung des Thrombozytenpfropfes erschwert wird. Diese Tatsache kann an der Zunahme des initialen Blutflusses festgestellt werden. Es war dadurch fraglich, ob die Ergebnisse direkt auf die in vivo Situation übertragen werden kann. Wir führten deswegen parallel Messungen mit einer Modifikation des PFA-100® durch, bei welcher der Blutfluss unabhängig vom Hämatokrit konstant gehalten werden kann (VCP) [66]. Die mit dem VCP ermittelten Ergebnisse entsprachen denen am PFA-100®, sodass die Störung der primären Hämostase bei Blutverdünnung von uns eindeutig nachgewiesen werden konnte. Zusammenfassend sind daher unsere Befunde dafür beweisend, dass die mit dem TEG bei milder Hämodilution (bis 30%) mit NaCl oder RL gefundene Aktivierung der Gerinnung methodisch bedingt ist und nicht der tatsächlichen Situation in vivo entsprechen dürfte. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass in unverdünntem Blut infolge geringerer Oberflächenbenetzung die Gerinnung in TEG/ROTEM schlechter aktiviert wird. Deswegen findet sich dieses Phänomen auch besonders ausgeprägt in



NATEM, wo die Gerinnung nur über Kontaktaktivierung in Gang kommt. Durch diese methodische Verschiebung der Ergebnisse in die Richtung gesteigerter Gerinnung muss der Test zwangsläufig an Empfindlichkeit verlieren und den Nachweis von anderen plasmatischen Gerinnungsstörungen bei Hämodilution erschweren [70, 118]. Unabhängig von der plasmatischen Störung führt die Hämodilution aber v.a. zu einer Störung der primären Hämostase, die sehr einfach und sensitiv mit dem PFA-100® und einer Testmodifikation davon (VCP) nachgewiesen werden konnte und zu deutlich pathologischen Veränderungen führt. Diese Störung scheint klinisch auch die entscheidende während der akuten Phase der Blutverdünnung zu sein, gleichgültig, ob diese als Folge gezielter Hämodilution oder infolge von Blutverlust auftritt.

#### 4.4. Nachweis von Hämostasestörungen

##### 4.4.1 ASS

Seit längerem ist es bekannt, dass TEG die Wirkung von ASS auf die Thrombozyten nicht bzw. nicht sensitiv erfasst [85, 115, 123]. Ob dies auch für den ROTEM gilt, wurde im Rahmen dieser Arbeit geprüft.

Wir untersuchten Proben von 4 freiwilligen Spendern vor und nach 3-tägiger Einnahme von ASS 100. Parallel dazu wurden Messungen mit PFA-100® und VCP durchgeführt. Bei PFA-100® wurden Verschlusszeit und Blutvolumen nach ASS Einnahme deutlich pathologisch. Dagegen blieben sämtliche ROTEM-Parameter normal. Offensichtlich gelingt es mit dem ROTEM nicht, eine der wichtigsten und häufigsten Hämostasestörungen zu erfassen.

##### 4.4.2. Patienten mit von Willebrand-Syndrom (vWS)

Bei Patienten mit vWS sind der von Willebrand Faktor (vWF) mehr oder weniger vermindert und/oder die Funktion des vWF gestört. Bei schweren Formen ist auch der Gerinnungsfaktor FVIII:C vermindert, da der vWF diesen Faktor vor Proteolyse schützt. Am häufigsten kommt das vWS als milde und mittelschwere Formen vor (ca.

1-2%), die nur im Rahmen von größeren Verletzungen bzw. operativen Eingriffen zu vermehrter Blutung führen. Die Blutungsneigung fällt erst auf, wenn weitere hämostaseologische Probleme z.B. Medikamente oder großer Blutverlust hinzukommen. Intraoperativ auftretenden Blutungskomplikationen liegt nicht selten ein unerkanntes vWS zugrunde.

Mit ROTEM konnte nur ein Teil der von uns untersuchten vWS anhand der Verlängerung der CFT - überwiegend im INTEM - erfasst werden. Besonders problematisch ist, dass selbst mittelschwere Formen (2 Patienten) gar nicht festgestellt wurden. Damit können intra- und postoperativ auftretende Blutungskomplikationen mit dem ROTEM nicht sicher erkannt werden, wenn ihnen ein vWS zugrunde liegt. Damit kann das ROTEM auch nicht ohne weiteres zur Therapieführung bei vWS herangezogen werden. Unsere Ergebnisse sind in dieser Hinsicht im Einklang mit publizierten Daten, die sich allerdings noch auf das TEG bezogen [14, 123]. Andererseits wurde das ROTEM durch die Verwendung von Aktivatoren der Gerinnung nicht sensitiver.

#### **4.4.3. Thrombozytopenie**

Salaj et al untersuchten Proben von thrombozytopenischen Patienten mit NaTEG und InTEG vor und 30 Min. nach Thrombozytensubstitution [98]. Sie konnten den Transfusionserfolg an der signifikanten Verkürzung der CT (NATEG) und CFT sowie der Verbreiterung der MCF dokumentieren (NATEG/INTEG). Es ist allgemein bekannt, dass TEG und TEM kaum in der Lage sind, Thrombozytenfunktionsstörungen bei Thrombozytenkonzentrationen  $>100.000/\mu\text{L}$  zu erfassen [12]. Da TEG/TEM v.a. für POCT perioperativ und posttraumatisch empfohlen werden, ist von besonderem Interesse, ob wenigstens die im Rahmen massiven Blutverlusts auftretende Thrombozytopenie ausreichend empfindlich erfasst wird. In der Regel werden Thrombozytenwerte von  $\leq 50.000/\mu\text{L}$ , bei neurochirurgischen Eingriffen bzw. cerebralen Traumen sogar  $\leq 80.000 - 100.000/\mu\text{L}$ , als kritisch angesehen [65, 67, 90]. Daher wurden Patienten mit Thrombozytopenie ( $\leq 55.000/\mu\text{L}$ ) im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass sich die Thrombozytopenie am ehesten in INTEM und EXTEM anhand der Parameter CFT und MCF nachweisen lässt. Die Thrombozytopenie

konnte dennoch nicht in allen Fällen mit ROTEM erkannt werden (Sensitivität 80-90%). Dies dokumentiert sich auch in der mäßigen Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und TEM-Parametern ( $r^2 = 0,36$  bis  $0,49$ ). Dabei spielte allerdings möglicherweise der gleichzeitig erniedrigte Hb eine Rolle, der wie vorher beschrieben, eine Verfälschung in umgekehrter Richtung bewirkt. Der sichere Nachweis gelang erst ab Thrombozytenwerten  $\leq 30,000/\mu\text{L}$  (Sensitivität 100%), was einen zu niedrigen Transfusionstrigger für perioperative und posttraumatische Situationen darstellt.

Dagegen zeigte der PFA/ADP bei diesen Thrombozytenkonzentrationen immer pathologische Befunde. Dieses Verfahren ist insbesondere bei gleichzeitiger Hämodilution bzw. niedrigem Hb-Wert eher zu empfindlich.

#### **4.4.4. Patienten unter Heparin**

Zmuda et al untersuchten in-vitro mittels NATEG den Einfluss von unfraktioniertem Heparin (UFH), LMWH (Enoxaparin-Na) und Heparinoid (Danaparoid-Na) auf die Gerinnung und stellten eine dosisabhängige Verzögerung des Gerinnungsprozesses (CT) bei allen drei Antikoagulanzen fest [128]. Dagegen führten nur hohe Dosen von Enoxaparin und Danaparoid zur Verlängerung der PTT. Die PTT ist bekanntlich zur Steuerung der Antikoagulation mit diesen Substanzen ungeeignet, weshalb es üblich ist, die Dosierung von LMWH durch Messung der Anti-Xa-Spiegel zu überprüfen.

Klein et al konnten sogar eine signifikante Korrelation zwischen Anti-Xa-Spiegeln von LMWH und CT/CFT feststellen.

Da die MCF während aller Messungen unverändert blieb, konstatierten die Autoren, dass LMWH nur minimalen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion haben [59].

Shinoda et al untersuchten 1990 mittels NaTEG 28 dialysepflichtige Patienten, die nacheinander mit UFH und LMWH antikoaguliert wurden [104]. Es fand sich eine gute Korrelation zwischen CT und der „dialysen Gerinnung“ (Maß für die Gerinnung, nach der Anzahl von vernetzten Fibrillen in Grade eingeteilt) für beide Heparine. Die

Autoren schlussfolgern daraus, dass sich die CT des TEG gut zur Überwachung der Effizienz der Antikoagulation bei dialysierten Patienten eignet.

Calatzis et al fanden 1996 in einer Untersuchung von 30 Patienten, dass aPTT und CT in InTEG gut korrelieren ( $r=0,85$ ) [19].

Wir untersuchten 22 Patienten, die subtherapeutisch ( $n = 8$ , aPTT 41-60 Sekunden) oder therapeutisch ( $n = 14$ , aPTT >60 Sekunden) mit Heparin antikoaguliert waren. Als einzig sensibler Parameter erwies sich die CT/INTEM. Die CT war bei den erstgenannten Patienten in 50% der Fälle pathologisch erhöht, bei den Patienten mit aPTT >60 Sekunden in 86% der Fälle. Allerdings bestand keine akzeptable Korrelation zwischen aPTT und CT. Somit können wir die Ergebnisse der erwähnten Autoren nur zum Teil bestätigen. Vor allem bei der subtherapeutischen Heparinisierung (50-60 Sek.) war die Sensitivität relativ gering. Auf Grund unserer Ergebnisse ist ROTEM für die Therapieüberwachung von Patienten mit Heparin nicht geeignet. Man erkennt damit allenfalls massive Überdosierungen.

#### **4.4.5. Patienten unter Marcumar**

In einer ersten Untersuchungsserie (12 Patienten) war die Sensitivität der eingesetzten Tests (NATEM, INTEM, EXTEM mit dem Thromboplastin ExTEG S, Mischverfahren 1) sehr gering. Obwohl die Quick-Werte zwischen 9 und 43% und die INR-Werte zwischen 2 – 7,3 betragen wurde die daraus resultierende Gerinnungsstörung überwiegend nicht erkannt. Die CFT war sogar verkürzt sowie MCF- und Alp-Werte gegenüber dem Normalkollektiv im Sinne einer gesteigerten Gerinnung verändert.

In einer weiteren Untersuchungsserie verglichen wir das verwendete EXTEM-Reagenz (ExTEG S Nobis) mit einem anderen (Diaplastin von Diamed). Wir untersuchten insgesamt 38 Patienten unter Marcumar mit INR-Werten  $\geq 2$  parallel. Mit Diaplastin betrug die Sensitivität 87% und die Korrelation zwischen CT und INR war mäßig gut ( $r^2=0,52$ ). Dennoch reicht diese Korrelation nicht, um Marcumar mit Hilfe dieses Tests einzustellen und zu überwachen, zumal vereinzelt Patienten mit sehr hoher INR eine normale CT zeigten. Daher ist das Verfahren, zumindest in den

bisher gewählten Testmodifikationen, auch nicht geeignet, um die Blutungsgefährdung dieser Patienten zuverlässig zu erfassen. Ob die gegenüber dem Normalkollektiv signifikant höheren Alpha-Winkel und verbreiterten Amplituden bzw. größere Gerinnselfestigkeit (Alp/MCF), die auch in der 2. Testserie festgestellt wurden, Ausdruck erhöhter thrombophiler Diathese dieser Patienten oder methodisch bedingt sind, ist schwer zu sagen. Es handelte sich bei den Patienten nicht ausschließlich um Patienten mit Zustand nach Thrombosen bzw. positiven Thrombophiliemarkern. Andererseits hatten die Patienten durchschnittlich deutlich höhere Fibrinogenwerte als die gesunden Blutspender, die wir für die Referenzwerte heranzogen. Da sich die Fibrinogenspiegel aber auf die Ergebnisse von TEG/TEM besonders stark auswirken, indem sie den Gerinnungsablauf positiv beeinflussen, kann diese Tatsache zumindest teilweise zur geringen Sensitivität beigetragen haben. Es ist zu überlegen, ob für die Normalkollektive, die für die Referenzwerte genommen werden, hämostaseologisch unauffällige Patientenkollektive mit höheren Fibrinogenspiegeln herangezogen werden sollten.

Im Übrigen finden sich wenige Publikationen hinsichtlich der Nachweisbarkeit von Marcumarwirkung in TEG/TEM. Ob aus der von uns gefundenen mangelnden Sensitivität hinsichtlich des Marcumareffektes auf eine zu geringe Sensitivität auch gegenüber anderen plasmatischen Gerinnungsstörungen geschlossen werden kann, ist nicht ohne weiteres zu beantworten. Studien wie die von Calatzis et al (1996) an 30 chirurgischen Patienten, können die Frage aber auch nicht sicher beantworten, denn dabei handelte es sich um Hämostasestörungen, die im Rahmen von Blutverdünnung (kein Marcumar) zustande kamen. Sie fanden eine sehr gute Korrelation zwischen Quick-Werten und CT in ExTEM ( $r=0,90$ ) [19]. Eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Sensitivität von TEG/TEM spielt die jeweilige Fibrinogenkonzentration, ohne dass diese kritisch erhöht oder erniedrigt sein muss. Die Verdünnungskoagulopathie basiert aber v.a. auf der Erniedrigung von Fibrinogen, so dass die von den Autoren beschriebene gute Korrelation dadurch erklärt werden kann. Infolgedessen ist auf Grund unserer Ergebnisse eher anzunehmen, dass andere Gerinnungsdefekte vom TEG wenig sensitiv erkannt werden. Die Erfahrungen haben dies inzwischen belegen können. Selbst schwerer Einzelfaktormangel anderer Gerinnungsfaktoren als Fibrinogen wird mit dem ROTEM kaum erkannt.

#### 4.4.6 Patienten mit gestörter Leberfunktion und Intensivpatienten

Lebererkrankungen führen laboranalytisch zu verminderten Werten der hepatisch synthetisierten Gerinnungsfaktoren und u.U. auch Zeichen eines vermehrten Umsatzes der plasmatischen Gerinnung und Fibrinolyse [92].

Die Hämostasestörungen bei den von uns untersuchten Patienten waren auch durch zusätzliche Faktoren beeinflusst: Heparin-gabe, erniedrigte Hämoglobin- bzw. Hämatokritwerte, Thrombozytopenie. Die verminderte Konzentration von Gerinnungsfaktoren (durch die gestörte Syntheseleistung der Leber) wurde indirekt durch die verminderte Konzentration/Aktivität von Antithrombin antizipiert.

Die Parameter von ROTEM (EXTEM) waren bei den Patienten mit Leberfunktionsstörung nicht in allen zu erwartenden Fällen pathologisch verändert. Die Korrelation der ROTEM-Parameter zu Quick-Wert und PTT war gering, und selbst bei pathologischem Quick-Wert fiel der ROTEM vereinzelt normal aus. Somit ist dies auch ein Hinweis, dass ROTEM plasmatische Gerinnungsstörungen nicht sensitiv genug aufdeckt. Andererseits zeigten zwei Patienten trotz nahezu normaler Gerinnungswerte (Quick und PTT) deutlich pathologische Werte sowohl mit ExTEG S als auch mit Diaplastin. Diese hatten jedoch auch deutlich erniedrigte Thrombozytenzahlen (sowie AT). Alleine kann dies die pathologischen ROTEM Werte andererseits nicht erklären, weil bei ähnlicher Konstellation ein anderer Pat. keine Auffälligkeiten im ROTEM zeigte.

Im Kollektiv der Intensivpatienten beeinflussten u.a. ebenso Heparin-gabe, Blutverdünnung und Thrombozytopenie die Hämostase. Da alle Intensivpatienten eine INR < 2 hatten, war die Aktivität der Faktoren II, VII und X nicht wesentlich beeinträchtigt bzw. spielte eine Störung im extrinsischen System keine wesentliche Rolle.

Eine bessere Sensitivität konnte man mit Diaplastin gegenüber ExTEG S bei den Intensivpatienten mit Thrombozytopenie für die Parameter CFT, A5, A10 erkennen. Man sah auch hier – ähnlich wie bei den Patienten mit gestörter Leberfunktion – mehrere Fälle, in denen die ROTEM Parameter normal waren, obwohl z.B. die Thrombozytenzahl, das Fibrinogen oder das AT deutlich pathologisch waren. Umgekehrt sah man auch mehrere Fälle, bei denen einzelne oder mehrere ROTEM

Parameter pathologisch verändert waren, obwohl die untersuchten Gerinnungsparameter normal waren

Es wurden rein rechnerisch gute Korrelationen zwischen AT und allen ROTEM Parameter sowie zwischen HCT und MCF (A5/A10) gefunden. Es ist davon auszugehen, dass voneinander abhängige Faktoren ähnliche Korrelationen erbringen. So dürfte die Korrelation von AT zu den verschiedenen TEM-Parametern nicht durch einen kausalen Zusammenhang bedingt sein, da AT als Progressivinhibitor zu langsam aktiviert wird, sondern Ausdruck der Tatsache, dass bei AT-Verminderung eine Leberfunktionsstörung (v.a. der Synthese) vorlag, die auch die anderen Hämostaseparameter betraf.

Beim Vergleich der verwendeten Reagenzien war die Sensitivität mit ExTEG S und Diaplastin bei den Patienten mit Leberfunktionsstörung nahezu gleich. In den Fällen, in denen pathologische Ergebnisse mit dem einen Reagenz gefunden wurden, waren meistens auch die Ergebnisse mit dem anderen Reagenz pathologisch.

Im Gegensatz dazu reagierte der Test mit Diaplastin bei den Intensivpatienten in vielen Fällen deutlich sensitiver, wobei der Grund für die pathologischen Werte nicht immer ersichtlich war.

Zusammenfassend waren die im ROTEM gemessenen pathologischen Werte bei den Patienten mit Leberfunktionsstörung und bei Intensivpatienten meist durch mehrere Faktoren verursacht. Bei den Fällen, bei denen pathologische ROTEM Ergebnisse erhoben wurden, die nicht zu erklären waren, könnte es sich um methodisch bedingte Messfehler oder aber auch um komplexe Störungen der Hämostase handeln, die nur anhand eines komplexen Hämostasetests erkannt werden können (z.B. Interaktion von Thrombozyten und Fibrinbildung). Dies sollte durch klinische Studien geklärt werden.

#### 4.5 ROTEM und POCT

In den letzten 10 Jahren gewinnen die Methoden zur Patienten nahen Testung (Point-of-Care Testing) immer mehr an Bedeutung [63, 88, 101, 106, 109]. Andere Begriffe dafür sind „patientennahe Analytik“ (Near-Patient-Testing, NPT) und

„alternative site testing“ (Durchführung der Analytik an anderen Orten als im Labor) [7],[13]. Dabei handelt es sich um Methoden/Geräte, die wichtige Laborparameter rasch und in Patientennähe erfassen können. Im Gegensatz zu den gängigen Labortests weisen sie u.a. folgende Vorteile auf [13],[56]:

- a. Deutlich schnellere Verfügbarkeit der Ergebnisse (kürzere „vein to brain“ Zeit)
- b. Weniger Irrtümer durch einfachere Logistik
- c. Keine besondere Probenaufbereitung
- d. Kleine Probenmengen
- e. Kleinerer Aufwand für Reagenzienvorbereitung
- f. Einfach zu bedienende Instrumente
- g. Analyse von garantiert frischen Proben
- h. Zielgerichtete Behandlung in Notfällen
- i. Diagnostische Befunde und Kenntnis der klinischen Umstände in einer Hand
- j. Überwachung der Therapie

Die Zeitverzögerung der Laborverfahren entsteht durch Beschriftung der Probe, Ausfüllen der Anforderung, Veranlassung und Durchführung des Probetransportes, Erfassung der Probe im Labor, Zentrifugation, Testdurchführung, serielle Abarbeitung, Ergebnisfreigabe und –übermittlung, sowie Entgegennahme der Ergebnisse. Für Gerinnungsanalysen wird in vielen Einrichtungen auch im Notfall mehr als eine Dreiviertelstunde benötigt.

In kritischen Situationen ist die schnelle bis sofortige Ergebnisverfügbarkeit teilweise entscheidend für den weiteren Verlauf des Geschehens. Als weiterer Vorteil wird häufig die Tatsache angeführt, dass das Ergebnis besser mit der aktuellen klinischen Situation am Patienten interpretiert werden kann.

Spezielle Vorteile von ROTEM für POCT sind:

- a. Hohe Empfindlichkeit bzgl. Fibrinogenmangel und Hyperfibrinolyse
- b. Schnelle und zuverlässige negative Prädiktion von Blutungsneigung in Folge Blutverlust bzw. Hämodilution
- c. Einschätzungsmöglichkeit, welche Blutkomponenten erforderlich sind
- d. Kleine Probenvolumina



Nachteile der hämostaseologischen POCT-Verfahren, insbesondere der ROTEM Methode, sind:

- a. Bisher keine systematische Validierung
- b. Sehr geringe Sensitivität bzgl. Thrombozytenfunktionsstörungen, geringe bzgl. Einzelfaktormangel, ungenügende Sensitivität bzgl. komplexem Faktorenmangel
- c. Sequenzielle Untersuchungen erforderlich, da Einzeluntersuchungen zu wenig aussagekräftig sind
- d. Viele Modifikationen, keine Standardisierung
- e. Unzureichende Qualitätssicherung bzw. Überwachung der Geräte und (labilen) Reagenzien
- f. Unterschiedliche Ergebnisse für venöse und arterielle Proben
- g. Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede [42]
- h. Unterschiede durch wechselnde Zeitintervalle zwischen Blutentnahme und Testbeginn
- i. Unterschiede durch Temperatureinflüsse
- j. Unterschiede zwischen Nativ- und Citratblut
- k. Notwendigkeit eigener Referenzwerte
- l. Durchführung durch mangelhaft eingewiesenes und ungeübtes Personal
- m. Interpretation durch unerfahrenes Personal
- n. Hohe Kosten (deutlich höher als die Laborkosten)

Durch unterschiedliche Aktivatorreagenzien sowie Inhibitoren von Heparin (Heparinase, HEPTTEST), Thrombozyten (Cytochalasin, FIBTEM) und Fibrinolyse (Aprotinin, APTEM) können die hämostaseologischen Störungen etwas konkretisiert werden und spezifischere Therapiemaßnahmen ergriffen werden.

Die Standardisierung und Qualitätssicherung sowie die häufig fehlenden eigenen Referenzwerte stellen dezentral in den Kliniken ein erhebliches Problem dar, sind aber im Hinblick auf wechselnde Reagenzien und Materialien insbesondere wegen des fehlenden Zugriffs der Experten und der Hersteller ein besonderes Problem. Die Qualitätskontrollen mit lyophilisiertem Plasma (ROTROL) sind den Vollblutmessungen nicht ebenbürtig, wie die vorgelegten Untersuchungen zeigen. Sie sind nur in begrenztem Maße dafür geeignet. Das heute übliche Qualitätsmanagement im Labor ist wesentlich besser entwickelt und schließt die

Aufdeckung von präanalytischen Fehlern mit ein. Trotz der guten Anwenderführung am Display des Computers können wesentliche Fehler gemacht werden, so dass auch dieses scheinbar einfache Verfahren auch von den Herstellern nur als POCT tauglich, nicht aber als echtes POCT betrachtet wird [14]. Ein besonderes Problem besteht darin rund um die Uhr ärztliches Personal vorzuhalten, das die Befunde korrekt interpretieren kann. Wenn nicht immer das gesamte Testspektrum (INTEM, EXTEM, FIBTEM und HEPTEM) eingesetzt wird, können erhebliche Fehlinterpretationen bei Überheparinisierung, Hämodilution, hohen Fibrinogenwerten etc. zustande kommen. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn das Verfahren in der Hand weniger sehr erfahrener Mitarbeiter unter Beachtung der klinischen Situation und der Laborbefunde eingesetzt wird.

Die Kosten betragen ein Mehr- bis Vielfaches der üblichen Gerinnungsdiagnostik im Labor. Es wird aber diskutiert, dass der Zeitgewinn und das einfachere „Processing“ der Proben die Mehrkosten wieder ausgleichen.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen kann ROTEM die Labordiagnostik nicht ersetzen, sondern nur ergänzen, da die wichtigsten und häufigsten Hämostasestörungen damit nicht oder zumindest nicht ausreichend sicher erkannt werden. Andererseits ist ROTEM gut geeignet, um perioperativ und posttraumatisch entstehende Hämostasestörungen v.a. durch stärkere Blutverdünnung und oder Hyperfibrinolyse schnell und ausreichend sensitiv zu erfassen, um therapeutisch adäquat intervenieren zu können. Für den Einsatz des Verfahrens sind aber Standards festzulegen und einzuhalten, da das Verfahren durch zahlreiche Variablen beeinflusst wird und im Einzelfall verfälschte Ergebnisse erbringen kann.

## 5. Zusammenfassung

Durch das Rotationsthrombelastometrie System (ROTEM) erlebt die Thrombelastographie Methode (TEG) eine Renaissance als Point of Care Diagnostik zur Erkennung von Hämostasesstörungen und Therapiesteuerung.

In dieser Studie untersuchten wir einige Einflussgrößen und variabilitätsbestimmende Faktoren, sowie die Empfindlichkeit der Methode gegenüber einzelnen thrombozytären und plasmatischen Gerinnungsstörungen. Wir verwendeten dafür das ROTEM System mit den Tests INTEM (Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsystems), EXTEM (Aktivierung des extrinsischen Gerinnungsystems) und NATEM (ohne Zugabe von gerinnungsaktivierende Substanzen). Die Ergebnisse wurden mit den Bestimmungen von Quick, aPTT, Fibrinogenkonzentration, Thrombozytenzahl, Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hkt) verglichen. Weiterhin wurden Methoden zur Messung der Thrombozytenfunktion zum Vergleich herangezogen.

Eine der untersuchten Einflussgrößen war das Zeitintervall von Blutentnahme (BE) bis Testbeginn. Die Ergebnisse der Tests, durchgeführt 1, 3, 5 und 7 Minuten nach BE, unterschieden sich signifikant, vor allem bei den Testreihen mit Nativblut, aber teilweise auch in geringerem Maße bei Tests mit Citratblut. Dabei wurde allerdings kein einheitlicher Trend beobachtet. Lediglich die CT (clotting time, Gerinnungszeit) in INTEM und EXTEM war tendenziell länger.

Die Tests mit Nativ- und Citratblut ergaben beim direkten Vergleich ganz unterschiedliche Referenzbereiche, welche aber für INTEM und EXTEM gut miteinander korrelierten. Die Ergebnisse der Messungen mit Citratblut zeigten eine signifikant kleinere Streubreite.

Bei einer weiteren Untersuchungsreihe wurden Messungen mit Citratblut mittels INTEM und EXTEM bei 10 Spendern und 10 thrombozytopenischen Patienten zügig nach der BE (<10 Min. nach BE) und >30 Min. (jedoch <40 Min.) nach BE durchgeführt. Bei beiden Probandengruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Testergebnisse.

Durch Änderung des Mischverfahrens beim Pipettieren konnte eine bessere Standardisierung des Testablaufes erreicht werden.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von Hämodilution getestet. Mit plättchenarmem autologen Plasma (PAP), 0,9% Kochsalzlösung (NaCl) oder Hydroxyethylstärke (HAES) um 20% verdünnte Proben wurden mittels NATEM und

INTEM vor und nach Verdünnung getestet. Die Verdünnung der Blutproben mit autologem PAP sowie mit NaCl veränderte die TEG Parameter überwiegend im Sinne einer gesteigerten Gerinnung: verkürzte CT und / oder CFT (Gerinnelbildungszeit), breitere maximale Amplitude (MCF), resp. alpha Winkel (Alp). Mit HAES waren die Parameter dagegen bei beiden Testmodifikationen überwiegend im Sinne einer verzögerten Gerinnung verändert. Zusätzliche Messungen mittels Kugel- und Häkchenkoagulometer ergaben mit allen drei Verdünnungslösungen eine deutliche, wenn auch nicht immer signifikante Verlängerung der Gerinnungszeit. In gleicher Weise zeigten PFA-100® (Plättchenfunktionsanalyser-100®, eine Weiterentwicklung des in-vitro Blutungstests) und VCP („Virtual Capillary Prototype“, ebenso ein modifizierter in-vitro Blutungstest) mit allen drei Lösungen – am stärksten bei Verdünnung mit HAES – eine deutliche Störung der primären Hämostase, erkennbar an einer signifikanten (oft pathologischen) Verlängerung der Verschlusszeit. Insgesamt sprechen die Daten daher für eine Störung der Hämostase im Sinne gesteigerter Blutungsneigung durch Verdünnung. Insbesondere durch die Ergebnissen mit PAP müssen methodische Fehler für die von mehreren Autoren beschriebenen und von uns bestätigten Befunde gesteigerter Gerinnung bei Verdünnung als Erklärung herangezogen werden.

Die Messung von Proben von vier Spendern vor und nach dreitägiger Einnahme von 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS 100), bzw. sechs Patienten mit vWS ergab, dass diese Hämostasestörungen durch ROTEM nicht erfasst werden. Dagegen konnten diese Störungen mittels PFA100®, VCP und Aggregometrie bei diesen Patienten eindeutig erkannt werden.

Bei der Messung von zehn Proben von thrombozytopenischen Patienten (Thrombozytenzahl < 50000/µl) waren in den meisten Fällen - sowohl bei INTEM als auch bei EXTEM – die CFT verlängert und MCF entsprechend pathologisch reduziert. Der sichere Nachweis gelang erst ab Thrombozytenwerten  $\leq 30000/\mu\text{L}$ , was erfahrungsgemäß einen zu niedrigen Transfusionstrigger für perioperative und posttraumatische Situationen darstellt. Eine normwertige CT zeigte, dass selbst bei Thrombozytenzahlen < 20000/µl keine Thrombozytenfunktionsstörung gemessen wird.

Bei Messungen der Proben von 22 Patienten, die mit hohen Dosen Heparin antikoaguliert waren, zeigte sich die CT bei INTEM als mäßig geeigneter Parameter

für die Erfassung dieser Gerinnungsstörung. Die Sensitivität bei subtherapeutischer Heparinabgabe (aPTT zwischen 41 und 60 s) war 50%, bei therapeutischer Heparinisierung (aPTT > 60 s) 86%. Allerdings ergab sich keine gute Korrelation zwischen der Größe von aPTT und der CT/INTEM. Insofern eignet sich ROTEM nicht zur Überwachung von heparinisierten Patienten.

In einer ersten Versuchsserie, bei der Proben von 12 Patienten unter Marcumartherapie gemessen wurden (INR 2,0-7,3), erwiesen sich INTEM, EXTEM und NATEM als ungeeignet, die medikamentös ausgelöste Gerinnungsstörung zu erkennen. Die Sensitivität für die CT oder CFT lag bei 0%. Bei Verwendung einer alternativen EXTEM Reagenz an weiteren 38 Patienten (INR 1,9-8,7) lag die Sensitivität für den Testparameter CT bei 86%. Da jedoch zwei Patienten mit einer INR > 2,5 nicht vom Test erfasst wurden, ist auch in diesem Fall eine sichere Überwachung durch ROTEM nicht gewährleistet.

Wir untersuchten acht Patienten mit gestörter Leberfunktion sowie 22 Intensivpatienten mittels EXTEM (ExTEG S und Diaplastin). Bei manchen Patienten wurden deutlich pathologische Ergebnisse gemessen. Ursächlich dafür waren komplexe Veränderungen der Hämostase, begründet nicht nur durch verminderte Konzentrationen und Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren, sondern auch Veränderungen von Hämatokrit, Thrombozytenzahl sowie Heparinabgabe. In manchen Fällen waren die ROTEM Parameter trotz deutlich pathologischer hämostaseologischer Befunde (niedrige Thrombozytenzahl, vermindertes Antithrombin u.a.) normal. Umgekehrt fanden sich vereinzelt stark pathologische Testergebnisse, die nicht zu erklären waren. Es muss durch klinische Studien geklärt werden, ob es sich dabei um methodisch bedingte Messfehler beziehungsweise Artefakte oder komplexe Störungen der Hämostase handelt, die nur anhand eines umfassenden Hämostasetests erkannt werden können (zum Beispiel Interaktion von Thrombozyten und Fibrinbildung).

Durch Weiterentwicklungen in Technik, Methodik und Reagenzien hat ROTEM wesentliche Fortschritte hinsichtlich einer Standardisierung des Testablaufes gemacht. Es erfüllt viele der Kriterien für eine Point-of-Care Methode: keine besondere Probenvorbereitung, kleine Probenmengen (<1ml), gebrauchsfertige Reagenzien, einfache Bedienung des Gerätes durch die elektronische Pipette, Gewinnung von wichtigen Ergebnissen innerhalb von fünf bis zehn Minuten, Qualitätssicherung durch die ROTROL Kontrolle. ROTEM kann allerdings die

Labordiagnostik nicht ersetzen, sondern nur ergänzen, da die wichtigsten und häufigsten Hämostasestörungen damit nicht oder zumindest nicht ausreichend sicher erkannt werden können. Andererseits ist ROTEM gut geeignet, um perioperativ oder posttraumatisch entstehende Hämostasestörungen vor allem durch stärkere Blutverdünnung oder Hyperfibrinolyse schnell und ausreichend sensitiv zu erfassen, um gegebenenfalls therapeutisch adäquat intervenieren zu können. Für den Einsatz von ROTEM sind aber Standards festzulegen und einzuhalten, da das Verfahren durch zahlreiche Variablen beeinflusst wird und im Einzelfall verfälschte Ergebnisse erbringen kann.

## Summary

The TEG (Thrombelastography) experiences a renaissance through the ROTEM System (Rotationthrombelastometry) as a point-of-care test for the diagnosis and management of different bleeding disorders.

In this study we examined several influencing variables and the sensitivity of the method with respect to different bleeding disorders, caused by changes in the function or the count of thrombocytes or the plasmatic coagulation factors. We used the ROTEM system with the tests INTEM (additional activation of the intrinsic pathway), EXTEM (additional activation of the extrinsic pathway) and NATEM (without additional activation). The results were compared with those, additionally determined by other methods: the platelet count, haemoglobin concentration (Hb), haematocrit (Hct), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), fibrinogen concentration, PFA-100® (Platelet Funktion Analyzer 100®, a modified in-vitro bleeding test), VCP ("Virtual Capillary Prototype", another modified in-vitro bleeding test), aggregometry and coagulometry.

One of the examined variables was the time interval between blood draw and the beginning of the measurement. The results, acquired 1, 3, 5 and 7 min. after blood draw, were significantly different predominantly with native blood, as well as with citrated blood, however to a smaller extent. All in all, there was no specific trend in the results except for the clotting time (CT) by INTEM and EXTEM.

The results with native blood were significantly different from those, obtained with citrated blood. But the results obtained by INTEM and EXTEM correlated well with each other. The precision was significantly higher when citrated blood was used.

A further investigation was conducted, using citrated blood from 10 healthy blood donors and 10 patients with thrombocytopenia (platelet count < 50000/ $\mu$ l). The tests were started shortly after blood draw, i.e. within 10 min., or about 30-40 min. after blood draw. There were no significant differences between the results of both groups. A better standardisation of the procedure was achieved by alteration of the mixing method during pipetting.

In another experiment we examined the influence of haemodilution. Anticoagulated blood samples from 3 groups, each consisting of 10 donors, were diluted by 20% with either autologous platelet poor plasma (PPP), 0,9% saline (NaCl) or hydroxyethyl starch 6% (HES), and were investigated in parallel with undiluted controls. Dilution with PPP and saline predominantly changed the ROTEM

parameters in a characteristic way for enhanced coagulability. The changes of the ROTEM parameter with HES indicated mainly a reduced coagulability. The examination with a ball and a hook coagulometer revealed an obvious, while not in every case significant prolongation of the coagulation time for all 3 diluents. Dilution always significantly (often abnormally) prolonged closure time in PFA-100® and VCP. The most pronounced changes were seen, when HES was used as diluent. We conclude, that the results show an impaired coagulation when blood is diluted. The hypercoagulability by haemodilution (mainly with PPP), described by many authors and also suggested by our ROTEM results, is presumably a measurement artefact.

The measurement of samples from 4 donors before and after an ingestion of 100 mg acetylsalicylic acid (ASS) for three days, and the measurement of samples from 6 patients with vWS showed, that these haemostatic disorders can not be revealed by ROTEM. On the contrary, they could easily be detected by PFA-100®, VCP and aggregometry.

By testing the samples of 10 patients with a platelet count below 50000/ $\mu$ l with INTEM and EXTEM we saw, that in most cases the clot formation time (CFT) was pathologically prolonged and the maximum clot firmness (MCF) was accordingly diminished.

Thrombocytopenia was only reliably detected with platelet counts below 30000/ $\mu$ l, which is too low a transfusion trigger for perioperative and posttraumatic situations. Even at platelet counts below 20000/ $\mu$ l a normal CT simulated a normal platelet function.

We conducted another experiment with 22 patients, anticoagulated with heparin. The CT with INTEM was a sensitive parameter to a certain extent. The sensitivity for subtherapeutical heparinisation (aPTT between 41 and 60 seconds) and therapeutical heparinisation (aPTT > 60 seconds) was 50% and 86%, respectively. But there was no adequate correlation between aPTT and CT/INTEM. Thus, ROTEM is not suitable for the monitoring of heparin therapy.

The results from a first study with samples from 12 patients taking phenprocoumon (INR 2,0-7,3) were disappointing. In most of the cases, the parameters of ROTEM with INTEM, EXTEM and NATEM were still in the normal range. A second study with an alternative EXTEM reagent with samples from another 38 patients, who were given phenprocoumon (INR 1,9-8,7), revealed a sensitivity of 86% for the CT. But there were also several patients with an INR >2,5, where the test results were in the



normal range. Thus, ROTEM is not a valid method for the monitoring of patients who are taking phenprocoumon.

We also examined 8 patients with an impaired liver function and 22 patients from intensive care units with ExTEG S and Diaplastin (two different reagents, activating the extrinsic pathway). The results of some of the patients were clearly pathological. The cause was in most cases a complex alteration in haemostasis, due not only to diminished concentrations and activity of coagulation factors, but also to changes in haematocrit, platelet count and heparin therapy. The ROTEM test parameters were in some cases normal, although one or more blood parameters were pathological. In contrast, there were also cases, where the ROTEM parameters showed a considerable impairment of haemostasis, which could not be explained. In conclusion, clinical trials need to be conducted to find out whether the latter are due to a methodical error or arise from a disorder of haemostasis, which could have been revealed only by extensive testing (e.g. Interaction of the thrombocytes with fibrin). Considerable progress has been achieved in the standardization of ROTEM by altering the technique, method and reagents. It fulfils many of the criteria for a point-of-care test: no special sample preparation (use of both native and citrated blood), small sample volume (<1ml), ready for use reagents, easy handling through the electronic pipette, acquiring of important results within 5-10 minutes, quality control with ROTROL. ROTEM cannot replace the laboratory tests. It can only be a complement to them because it can not reveal the most common haemostasis disorders with an adequate degree of certainty. However, ROTEM is a good and sensitive method for the examination of bleeding disorders, developing perioperatively or posttraumatically, like severe blood dilution or hyperfibrinolysis. By means of ROTEM, quick and important decisions could be made concerning the therapy in these cases. Standards for working with ROTEM have to be established and followed, since there are many variables, influencing the method, which can lead to incorrect results.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aarts P, Bolhuis PA, Sakariassen KS, Heethaar RM, Sixma JJ  
*Red blood cell size is important for the adherence of blood platelets to artery subendothelium.*  
Blood 1983;**62**:214-217.
2. Artang R, Jensen E, Pedersen F, Frandsen NJ  
*Trombelastography in healthy volunteers, patients with stable angina and acute chest pain.*  
Thromb Res 2000;**97**(6):499-503.
3. Bartels M, Poliwoda H  
*Gerinnungsanalysen.*  
Thieme 1998, 6 ed.
4. Baumgartner HR, Muggli R, Tschopp TB, Turitto VT  
*Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood: effect of surface properties and platelet function.*  
Thromb Haemost 1976;**35**:124-138.
5. Bergquist D, Arfors KE  
*Haemostatic plug formation in the isolated rabbit mesenteric preparation - an analysis of the red blood cell participation.*  
Thromb Haemost 1980;**44**:6-8.
6. Bohner J, von Pape KW  
*Method dependent reference values and preanalytical influences in rotation thromboelastography.*  
Ann Hematol 2003 Sup I;**82**:Abstr 013.
7. Boldt J  
*Point-Of-Care (POC) Monitoring in Anästhesie und Intensivmedizin - eine Übersicht über die zur Verfügung stehenden Möglichkeiten.*  
Anesthesiol Intensivmed Notfall 2003;**38**:158-164.
8. Boldt J, Haisch G, Suttner S, Kumle B, Schellhase F  
*Are lactated ringer's solution and normal saline solution equal with regard to coagulation.*  
Anesth Analg 2002;**94**:378-384.
9. Boldt J, Haisch G, Suttner S, Kumle B, Schellhaass A  
*Effects of a new modified, balanced hydroxyethyl starch preparation (Hextend) on measures of coagulation.*  
Br J Anaesth 2002;**89**:722-728.
10. Boldt J, Haisch G, Suttner S, Kumle B, Schellhase F  
*Are Lactated Ringer's Solution and Normal Saline Solution Equal with Regard to Coagulation?*  
Anesth Analg 2002;**94**(2):378-84.
11. Bonn C, Wetzka B, Zahradnik HP  
*The use of TEG with the roTEG in preeclampsia and HELLP syndrome.*  
Hypertension in Pregnancy 2002 Sup I;**21**:80.
12. Bowbrick VA, Mikhailidis DP, Stansby G  
*The use of citrated whole blood in thromboelastography.*  
Anesth Analg 2000;**90**(5):1086-1088.
13. Calatzis A, Heesen M, Spannagl M  
*Patientennahe Sofortdiagnostik von Hämostaseveränderungen in der Anästhesie und Intensivmedizin.*  
Anaesthesist 2003;**52**:229-237.

14. Calatzis A, Schramm W, Spannagl M.  
*Management of bleeding in surgery and intensive care.*  
31 st Hemophilia Symposium, 2002
15. Calatzis A, Toepfer M, Schramm W, Spannagl M, Schiff H  
*Citrate anticoagulation for extracorporeal circuits: effects on whole blood coagulation activation and clot formation.*  
Nephron 2001;**89**:223-236.
16. Calatzis An, Calatzis Al, Fritzsche P, Kling M, Hipp R, Stemberger A  
*An analysis of the correlation of the roTEG Coagulation Analyser and the Hellige Thrombelastograph D.*  
Ann Hematol 72 Sup I:P87.
17. Calatzis An, Calatzis Al, Kling M, Entholzner E, Stemberger A, Hipp R  
*Influence of fibrinogen concentration and platelet count on extrinsic activated thrombelastography (ExTEG).*  
Anesth Analg 1997;**84**:230.
18. Calatzis An, Calatzis Al, Kling M, Hipp R, Haas S, Stemberger A  
*Clarification of the physiologic basis of thrombelastography - factors influencing the TEG amplitude.*  
Ann Hematol 1996 Sup I:P89.
19. Calatzis An, Fritzsche P, Kling M et al.  
*A new technique for fast and specific coagulation monitoring.*  
European Surgical Research 1996;**28**(S1):89.
20. Calatzis An, Hipp R, Mößmer G, Stemberger A.  
*Monitoring blood clot polymerisation inhibition by hydroxyethyl starch via extrinsic activated thrombelastography.*  
Proceedings of the 16th international Congress of Clinical Chemistry - London, 1996
21. Camenzind V, Bombeli T, Burkhardt S, Jamnicki M, Popovic D, Pasch T, Spahn DR  
*Citrate storage affects thrombelastograph analysis.*  
Anesthesiology 2000;**92**(5):1242-1249.
22. Carcao M, Blanchette V, Dean J, He L, Kern M, Stain A, Sparling C et al.  
*The platelet function analyzer (PFA-100<sup>TM</sup>): a novel in-vitro system for evaluation of primary hemostasis in children.*  
Br J Haematol 1998;**101**:70-73.
23. Carr ME, Martin EJ  
*Evolving techniques for monitoring clotting in plasma and whole blood samples.*  
Clin Lab 2004;**50**:539-549.
24. Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, Agati B, Zighetti M, Lomardi R et al  
*Evaluation of the PFA-100 System in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease.*  
Thromb Haemost 1999;**82**:35-39.
25. Chau TN, YW Chan, Patch D, Tokunaga S, Greenslade L, Burroughs AK  
*Thrombelastographic changes and early rebleeding in cirrhotic patients with variceal bleeding.*  
Gut 1998;**43**:267-271.
26. Daraktchiev A, Kretschmer V, Lakner M.  
*Influence of time interval after sampling on variability of thromboelastography (TEG) - Results in normal and thrombocytopenic blood samples.*  
48. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung - Hamburg, 2004
27. Dietrich G, Kretschmer V, Orth D, Haupt W  
*Primary hemostasis in hemodilution - 1) hematocrit.*

- Infusionstherapie 1990;**17**:212-13.
28. Dietrich G, Orth D, Haupt W, Kretschmer V  
*Primary hemostasis in hemodilution -2) influence of infusion solution.*  
Infusionstherapie 1990;**17**:214-216.
  29. Dietrich GV, Kretschmer V, Weber D, Haupt W, Langen B, Huss B  
*Variables influencing the Thrombostat 4000: recommended standardization.*  
Semin Thromb Hemost 1995;**21**(suppl2):11-19.
  30. Downing LK, Ramsay MA, Swygert TH, Hicks KN, Hein HA, Gunning TC, Suit CT  
*Temperature corrected thrombelastography in hypothermic patients.*  
Anesth Analg 1995;**81**:608-611.
  31. Egli GA, Zollinger A, Seifert B, Popovic D, Pasch T, Spahn DR  
*Effect of progressive hemodilution with hydroxyethylstarch, gelatin and albumin on blood coagulation.*  
Br J Anaesth 1997;**78**:684-689.
  32. Entholzner EK, Mielke LL, Calatzis AN, Feyh J, Hipp R, Hargasser SR  
*Coagulation effects of a recently developed hydroxyethyl starch (HES 130/0.4) compared to hydroxyethyl starches with higher molecular weight.*  
Acta Anaesthesiol Scand 2000;**44**(9):1116-1121.
  33. Escolar G, Garrido M, Mazzara R, Castillo R, Ordinas A  
*Experimental basis for the use of red cell transfusion in the management of anaemic thrombocytopenic patients.*  
Transfusion 1988;**28**:406-411.
  34. Fernandez F, Goudable C, Sie P, Ton-That H, Durand D, Suc JM  
*Low hematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusion.*  
Br J Haematol 1985;**59**:139-148.
  35. Forestier F, Belisle S, Contant C, Harel F, Janvier G, Hardy JF  
*Reproducibility and interchangeability of the Thromboelastograph, Sonoclot and Hemochron activated coagulation time in cardiac surgery.*  
Can J Anaesth 2001;**48**(9):902-910.
  36. Francis JL, Francis DA, Gunathilagan GJ  
*Assessment of hyperkoagulability in patients with cancer using the sonoclot analyzer and thrombelastography.*  
Thromb Research 1994;**74**:335-346.
  37. Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, Trossaert M, Truchaud F, Wolf M et al  
*Therapeutic monitoring of von Willebrand disease: interest and limits of a platelet function analyser at high shear rates.*  
Br J Haematol 1999;**106**:777-783.
  38. Fries D, Innerhofer P, Klingler A, Berresheim U, Calatzis A, Schobersberger W  
*The effect of the combined administration of colloids and ringer's lactate on the coagulation system - an in vitro study using thrombelastography (roTEG).*  
Critical Care 2001 Sup I;**5**:P45.
  39. Fries D, Streif W, Haas T, Kühbacher G  
*Dilutional coagulopathy, an underestimated problem?*  
Transfusion Medicine and Hemotherapy 2004;**31**:237-242.
  40. Fritzsche P, Calatzis A, Stemberger A  
*The roTEG-4 coagulation analyzer - technology and precision.*  
Ann Haematol 1998 Sup I;**76**:P241.
  41. Gallmeier U, Calatzis A, Estner M, Hannekum A, Gödje O  
*Evaluation of a new bedside analyzer for intraoperative measurement of platelet function, plasmatic coagulation and fibrinolysis.*

- Thorac Cardiovasc Surg 2001;**FP35**.
42. Gorton HJ, Warren ER, Simpson AB, Lyons GR, Columb MO  
*Thrombelastography identifies sex-related differences in coagulation.*  
Anesth Analg 2000;**91**:1279-1281.
  43. Gottumukkala VNR, Sharma SK, Philip J  
*Assessing platelet and fibrinogen contribution to clot strength using modified thromboelastography in pregnant women.*  
Anesth Analg 1999;**89**:1453-1455.
  44. Haisch G, Boldt J, Krebs C, Kumle B, Suttner St, Schulz A  
*The influence of intravascular volume therapy with a new hydroxyethyl starch preparation (6% HES 130/0.4) on coagulation in patients undergoing major abdominal surgery.*  
Anesth. Analg 2001;**92**:565-571.
  45. Hall D, Mallett S, Royston D, Thornton M  
*Thrombelastography (TEG) shows more rapid clot formation and polymerisation in woman taking hormone supplements.*  
Thromb Haemost 2001 Sup;(07):Abstr P1461.
  46. Harrison P, Robinson M, Mackie I, Joseph J, McDonald S, Liesner R et al  
*Performance of the platelet function analyzer PFA-100<sup>TM</sup> in testing abnormalities of primary hemostasis.*  
Blood Coagulation & Fibrinolysis 1999;**10**:25-31.
  47. Hartert H  
*Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren.*  
Klin. Wochenschr 1948;**16**:257-60.
  48. Hayem G.  
*Du sang et de ses alterations anatomique.*  
Paris:Masson 1889:323.
  49. Hellem AJ, Borchgrevnik CF, Ames SB  
*The role of red cells in hemostasis: the relation between hematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness.*  
Br J Haematol 1961;(7):42-50.
  50. Hett DA, Walker D, Pilkington SN, Smith DC  
*Sonoclot analysis.*  
B J Anaesth 1995;**75**:771-776.
  51. Huraux C, Ankri AA, Eyraud D, Sevin O, Menegaux F, Coriat P, Samama CM  
*Hemostatic changes in patients receiving hydroxyethyl starch: the influence of ABO blood group.*  
Anesth Analg 2001;**92**(6):1396-1401.
  52. Innerhofer P, Fries D, Margreiter J, Klingler A, Kühbacher G, Oswald E, Salner E, Frischhut B, Schobersberger W  
*The effects of perioperatively administered colloids and crystalloids on primary platelet-mediated hemostasis and clot formation.*  
Anesth Analg 2002;**95**:858-865.
  53. Innerhofer P, Streif W, Kühbacher G, Fries D  
*Monitoring of perioperative dilutional coagulopathy using the ROTEM® analyzer: basic principles and clinical examples.*  
Transfus Med Hemother 2004;**31**:244-249.
  54. Iqbal O, Hoppenstaedt D, Lewis B, Leya F, Ma Q, Fareed J

- Differential behavior of anti-Xa adjusted low molecular weight heparins in native whole blood analysis as performed by thromboelastography and activated clotting time.*  
Blood 2000 ASH:1172.
55. Iselin BM, Willmann PFX, Seifert B, Casutt M, Bombeli T, Zalunardo MP, Pasch T, Spahn DR  
*Isolated reduction of hematocrit does not compromise in vitro blood coagulation.*  
B J Anaesth 2001;**87**(2):246-249.
  56. Jahn UR, Van Aken H  
*Near-patient testing - point -of-care or point of costs and convenience?*  
B J Anaesth 2003;**90**:425-427.
  57. Kang YG, Martin DJ, Marquez J, Lewis JH, Bontempo FA, al. BW Show et  
*Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation.*  
Anesth Analg 1985;**64**:888-896.
  58. Kettner SC, Kozek SA, Groetzner JP, Gonano C, Schellongowski A, Kucera M, Zimpfer M  
*Effects of hypothermia on thrombelastography in patients undergoing cardiopulmonary bypass.*  
B J Anaesthesia 1998;**80**:313-317.
  59. Klein SM, Slaughter TF, Vail PT, Ginsberg B, El-Moalem HE, Alexander R, D'Ercole F, Greengrass RA, Perumal TTM, Welsby I, Gan TJ  
*Thrombelastography as a perioperative measure of anticoagulation resulting from low molecular weight heparin: a comparison with anti-Xa concentrations.*  
Anesth Analg 2000;**91**:1091-1095.
  60. Koffmann K.  
*Der Kugelviskosimeter mit spezieller Berücksichtigung seiner klinischen Verwendbarkeit für Gerinnungsbestimmungen des Blutes.*  
Klinische Medizin 1910;**59**:415-421.
  61. Kolde HJ  
*Schnelle Diagnose von Hämostasestörungen mit Thromboelastometrie und Rotem-Analyse.*  
LaborMedizin & Diagnostik 2003;**01**:20-23.
  62. Kolde HJ, Strobel G  
*A whole blood global haemostasis assay via collagen mediated activation of the haemostasis system.*  
Ann Hematol 2003 Sup I;**82**:Abstr 147.
  63. Kost GJ  
*Preventing medical errors in point-of-care testing.*  
Arch Pathol Lab Med 2001;**125**:1307-1315.
  64. Kratzer MAA, Born GVR  
*Simulation of primary hemostasis in vitro.*  
1985;**15**:357-362.
  65. Kretschmer V  
*Perioperative Gerinnungstherapie und -diagnostik.*  
Infusionsther 1990;**17**(Suppl 2):9-19.
  66. Kretschmer V, Bade S, Weippert-Kretschmer M, Kratzer MAA  
*Measurement of primary haemostasis using a pressure clamp technique.*  
Platelets 2001;**12**:462-469.
  67. Kretschmer V, Haas C, Weippert-Kretschmer M  
*Prevention and therapy of hemostatic disorders in massive transfusion.*

- Infusion Therapy and Transfusion Medicine 2001;**28**:350-353.
68. Kretschmer V, Stangel W, Weißhaar D  
*Störungen der primären Hämostase durch Albumininfusion bei Hämodilution.*  
Transfusionsmedizin;Beitr. Infusionsther. Basel, Karger 1991;**28**:331-334.
  69. Kretschmer V, Weippert-Kretschmer M  
*Determination and treatment of disorders of primary hemostasis - experience with routine application of the in vitro bleeding test.*  
Hämostaseologie 1999;**19**:168-175.
  70. Kretschmer V, Weippert-Kretschmer M  
*Diagnostics and treatment of perioperative disorders of primary hemostasis.*  
Infus Ther Transfus Med 2001;**28**:108-110.
  71. Kugelmass IN  
*Contribution physico-clinique au mecanisme de la coagulation du sang.*  
Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie 1923;**21**:139-146.
  72. Liu G, McNicol PL, Macal I PR, Bellomo R, Przybylowski G, Bowkett J, Connellan J, McInnes F, Thurlow PJ  
*The effect of preoperative aspirin and/or heparin therapy on coagulation and postoperative blood loss after coronary artery bypass surgery.*  
Critical Care and Resuscitation 1999;(1):130-139.
  73. Livio M, Marchesi D, Remuzzi G, Gotti E, Mecca G, de Gaetano G  
*Uraemic bleeding:role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusion.*  
Lancet 1982;**II**:1013-1015.
  74. Luddington RJ  
*Thrombelastography/thromboelastometry.*  
Clin & Lab Haematology 2005;**27**:81.
  75. Marshall PW, Williams AJ, Dixon RM, Growcott JW, Warburton S, Armstrong J et al  
*A comparison of the effects of aspirin on bleeding time measured using the Simplate™ method and closure time measured using the PFA-100™ in healthy volunteers.*  
Br j Clin Pharmacol 1997;**44**:151-155.
  76. McLoughlin TM, Fontana JL, Alving B, Mongan PD, Bünger R  
*Profound Normovolemic Hemodilution: Hemostatic Effects in Patients and in a Porcine Model.*  
Anesth Analg 1996;**83**:459-465.
  77. McNicol PL, Liu G, Harley ID, McCall PR, Przybylowski GM, Bowkett J, Angus PW, Hardy KJ, Jones RM  
*Patterns of coagulopathy during liver transplantation: experience with the first 75 cases using thrombelastography.*  
Anaesth Intens Care 1994;**22**:659-665.
  78. Miller BE, Bailey JM, Mancuso TJ, Weinstein MS, Holbrook GW, Silvey EM, Tosone SR, Levy JH  
*Functional maturity of the coagulation system in children: an evaluation using thrombelastography.*  
Anesth Analg 1997;**84**:745-748.
  79. Mittermayr M, Margreiter J, Velik-Salchner C, Klingler A, Streif W, Fries D, Innerhofer P  
*Effects of protamine and heparin can be detected and easily differentiated by modified thrombelastography (Rotem®): an in vitro study.*  
B Jr Anaest 2005;**95**(3):310-316.
  80. Mousa S, Forsythe M

- Synergistic interactions between the low molecular weight heparin (LMWH) tinzaparin & different platelet GPIIb/IIIa antagonists: potential implication in thromboembolic disorders.*  
Blood 2000 ASH:4111.
81. Mousa S, Forsythe M, Larnkjaer A, Johansen K  
*Comparative efficiency between different low molecular weight heparin (LMWH) and various molecular weight distribution fractions in inhibiting platelet-fibrin clot retraction under shear-mediated by tissue factor and endotoxin using thromboelastography (TEG).*  
Blood 2000 ASH:4112.
  82. Mueller-Eckhardt, Kiefel  
*Transfusionsmedizin.*  
Springer 2004, 3.Auflage ed.
  83. Ng KFJ, Lam CCK, Chan LC  
*In vivo effect of haemodilution with saline on coagulation: a randomized controlled trial.*  
B J Anaesth 2002;**88**(4):475-480.
  84. Orlikowski CE, Murray WB, Rocke DA  
*Effect of delay and storage on whole-blood clotting analysis as determined by thrombelastography.*  
J Clin Monit 1993;**9**(1):5-8.
  85. Orlikowski CE, Payne AJ, Moodley J, Rocke DA  
*Thrombelastography after aspirin ingestion in pregnant and non-pregnant subjects.*  
B Jr Anaesthesia 1992;**69**(2):159-161.
  86. Orlikowski CEP, Rocke DA, Murray WB, Gouws E, Moodley J, Kenoyer DG, Byrne S  
*Thrombelastography changes in pre-eclampsia and eclampsia.*  
B J Anaesth 1996;**77**:157-161.
  87. Oshita K, Az-ma T, Osawa Y, Yuge O  
*Quantitative measurement of thromboelastography as a function of platelet count.*  
Anesth Analg 1999;**89**(2):296.
  88. Price CP  
*Point of care testing.*  
BMJ 2001;**322**:1285-1288.
  89. Rajwal S, al et  
*The use of recalcified citrated whole blood – a pragmatic approach for thromboelastography in children.*  
Paediatric Anaesthesia 2004;**14**:656-660.
  90. Reed RL, Ciavarella D, Heimbach DM, Baron L, Pavlin E, Counts RB, Carrico CJ  
*Prophylactic platelet administration during massive transfusion.*  
Ann Surg 1986;**203**:40-48.
  91. Reimers RC, Sutera SP, Joist JH  
*Potential by red blood cells of shear-induced platelet aggregation: relative importance of chemical and physical mechanism.*  
Blood 1984;**64**:1200-1206.
  92. Riess H., Bechstein W.O.  
*Hämostasedefekt im Rahmen von Leberfunktionsstörungen.*  
Intensivmedizin und Notfallmedizin 1998;**35**(Suppl D):109-117.
  93. Roche AM, James MFM, Grocott MPW, Mythen MG  
*Citrated blood does not reliably reflect fresh whole blood coagulability in trials of in vitro hemodilution.*



- Anesth Analg 2003;**96**:58-61.
94. Ruttman TG  
*Haemodilution enhances coagulation.*  
B J Anaesth 2002;**88**:470-472.
95. Ruttman TG, James MFM  
*Haemodilution and coagulation: a caveat.*  
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2000;**35**:707-709.
96. Ruttman TG, James MFM, Viljoen JF  
*Haemodilution induces a hypercoagulable state.*  
B J Anaesthesia 1996;**76**:412-414.
97. Ruttman TG, James MFM, Wells KF  
*Effect of 20% in vitro haemodilution with warmed buffered salt solution and cerebrospinal fluid on coagulation.*  
B J Anaesthesia 1999;**82**(1):110-111.
98. Salaj P, Marková M, Pohlreich D, Cetkovský P, Hrachovinová I.  
*Use of thromboelastography in monitoring of responses to rFVIIIa administration or platelet substitution in therapy of thrombocytopenic patients - in-vitro and in-vivo study.*  
7th Novo Nordisk Symposium on Haemostasis Management - Copenhagen, 2003
99. Salooja N, Perry DJ  
*Thrombelastography.*  
Blood Coagulation & Fibrinolysis 2001;**12**(5):327-337.
100. Samama CM  
*Thromboelastography: the next step.*  
Anesth Analg 2001;**92**(3):563-4.
101. Samama CM, Ozier Y  
*Near-patient testing of haemostasis in the operating theatre: an approach to appropriate use of blood in surgery.*  
Vox Sanguinis 2003;**84**:251-255.
102. Schild S, Riesenberger H, Kretschmer V, Lakner M.  
*Influence of time interval after drawing on variability of thromboelastography (TEG) - results in blood samples of patients with coronary bypass surgery.*  
48. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung - Hamburg, 2004
103. Sharma SK, Philip J, Whitten CW, Padakandla UB, Landers DF  
*Assessment of changes in coagulation in parturients with preeclampsia using thrombelastography.*  
Anesthesiology 1999;**90**(2):385-90.
104. Shinoda T, Arakura H, Katakura M, Shirota T, Nakagawa S  
*Usefulness of thrombelastography for dosage monitoring of low molecular weight heparin and unfractionated Heparin during Hemodialysis.*  
Artificial Organs 1990;**14**(6):413-415.
105. Shore-Lesserson L  
*New anticoagulants and antiplatelet agents.*  
Can Jr Anesth 2004;**51**:R9.
106. Shore-Lesserson L  
*Point-of-care coagulation monitoring for cardiovascular patients: past and present.*  
J Cardioth Vasc Anesth 2002;**16**:99-106.
107. Sorensen B, Johansen P, Christiansen K, Woelke M, Ingerslev J  
*Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation.*

- J Thromb Haemost 2003;(1):551-558.
108. Spiess BD  
*Coagulation monitoring in the perioperative period.*  
Acta Anaesthes Scand 1996 Sup;**109**:77-79.
  109. Stammers AH, Bruda NL, Gonano C, Hartmann T  
*Point-of-care coagulation monitoring: applications of the thrombelastograph.*  
Anaesthesia 1998;**53**(2):58-59.
  110. Stogermuller B, Stark J, Willschke H, Felfernig M, Hoerauf K, Kozek-Langenecker SA  
*The effect of hydroxyethyl starch 200 kD on platelet function.*  
Anesth Analg 2000;**91**(4):823-827.
  111. Stute R, Patek A.  
*Functional quality control of platelet concentrates using thrombelastography (TEG).*  
Internat. Congr. Immunohaematology - Paris, 2001
  112. Tan TS, Tan KHS, Ng HP, Loh MW  
*The effects of hypertonic saline solution(7.5%) on coagulation and fibrinolysis: an in vitro assessment using thromboelastography.*  
Anaesthesia 2002;**57**:644-648.
  113. Tocantins LM, Carroll RT, Holburn RH  
*The clot accelerating effect of dilution of blood and plasma. Relation to the mechanisms of coagulation of normal and haemophilic blood.*  
Blood 1951;**6**:720-739.
  114. Töpfer G, Funke U, Schulze M, Lutze G, Ziemer S, Siegert G, Frick U  
*Präanalytische Probleme bei Gerinnungsuntersuchungen im venösen Citratblut, Katheterblut und Kapillarblut.*  
J Lab Med 2000;**24**(11):514-520.
  115. Trentalange MJ, Walts LF  
*A comparison of thrombelastogram and template bleeding time in the evaluation of platelet function after Aspirin Ingestion.*  
J Clin Anesth 1991;(3):377-381.
  116. Tuman KJ, McCarthy RJ, Djuric M, Rizzo V, Ivankovich AD  
*Evaluation of coagulation during cardiopulmonary bypass with a heparinase-modified thromboelastographic assay.*  
J Cardiothorac Vasc Anesth 1994;**8**(2):144-149.
  117. Tuman KJ, Spiess BD, McCarthy RJ, Ivankovich AD  
*Comparison of Viscoelastic Measures of Coagulation after Cardiopulmonary Bypass.*  
Anesth Analg 1989;**69**:69-75.
  118. Tuman KJ, Spiess BD, McCarthy RJ, Ivankovich AD  
*Effects of progressive blood loss on coagulation as measured by thrombelastography.*  
Anaesth Analg 1987;**66**:856-863.
  119. Turitto VT, Baumgartner HR  
*Platelet interaction with subendothelium in a perfusion system: physical role of red blood cells.*  
Microvasc Res 1975;**9**:335-344.
  120. Turitto VT, Weiss HJ  
*Red blood cells: their dual role in thrombus formation.*  
Science 1980;**207**:541-543.
  121. Valeri RC Cassidy G, Pivacek, Le et al  
*Anemia-induced increase in the bleeding time: implications for treatment on nonsurgical blood loss.*  
Transfusion 2001;**41**:977-983.

122. Vig S, Chitolie A, Bevan DH, Halliday A, Dormandy J  
*Thromboelastography: a reliable test?*  
Blood Coagulation & Fibrinolysis 2001;**12**(7):555-561.
123. Vorweg M, Doehn M, Kolde HJ  
*Rapid diagnosis & differentiation of acute haemostasis disorders with whole blood global assays.*  
European Clinical Laboratory 2002;(8):12-15.
124. Watts DD, Trask A, Soeken K, Perdue P, Dols S, Kaufmann C  
*Hypothermic coagulopathy in trauma: effect of varying levels of hypothermia on enzyme speed, platelet function, and fibrinolytic activity.*  
J Trauma-Inj Inf & Crit Care 1998;**44**(5):846-854.
125. Weiß C  
*Basiswissen Medizinische Statistik.*  
Springer 2002, 2 ed.
126. Whitten CW, Greilich PE  
*Thromboelastography(R): past, present, and future.*  
Anesthesiology 2000;**92**:1223-1225.
127. Wiss. Beirat BÄK und PEI  
*Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion.*  
Deutscher Ärzte - Verlag 2000. Köln.
128. Zmuda K, Neofotistos D, Ts'ao CH  
*Effects of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and heparinoid on thromboelastographic assay of blood coagulation.*  
Am J Clin Pathol 2000;**113**(5):725-731.

## 7. Anhang

### 7.1. Aufklärungsbogen für Patienten

#### **Studie: Eignung von speziellen Testverfahren zur Dokumentation des Transfusionseffekts von Thrombozyten**

##### **Aufklärungsbogen**

Sehr geehrter Patient,

Im Rahmen Ihrer Erkrankung bzw. als Folge der Therapie ist die Blutplättchenzahl vermindert.

Blutplättchen (Thrombozyten) sind kleine im Blut schwimmende Zellen, die bei Verletzungen der Blutgefäße mit den Wundrändern und anderen Blutplättchen verkleben. Es entsteht ein Blutplättchenpfropf, der die Verletzung verschließt und damit einen weiteren Blutaustritt verhindert.

Zu wenige oder funktionsuntüchtige Blutplättchen sind ggf. nicht in der Lage, in angemessener Zeit einen Plättchenpfropf zu bilden. Daraus resultiert eine gewisse Bereitschaft auch ohne Verletzungen zu bluten.

Um dieses zu verhindern werden Ihnen bei Unterschreiten einer gewissen Thrombozytenzahl, Plättchen von ausgewählten Spendern transfundiert. Die transfundierten Zellen werden von unserer Abteilung in speziellen Verfahren gewonnen und so aufbereitet, dass sie Ihnen transfundiert werden können.

Während im Rahmen der Therapiekontrolle die Anzahl der Plättchen leicht feststellbar ist, gestaltet sich die Überprüfung der Funktionstüchtigkeit, die eine wesentliche Aussage über die Blutungsbereitschaft und der daraus resultierenden Transfusionsbedürftigkeit zulässt, bisher als äußerst schwierig.

Wir haben eine Untersuchungsmethode entwickelt und erprobt, von der wir annehmen, dass sie dieses Problem auf recht einfache Weise löst. Wir möchten nun überprüfen, ob sich mit Hilfe dieser Untersuchungsmethode Blutungsbereitschaft und Transfusionsbedürftigkeit besser einschätzen lassen.

Dazu würde Ihnen einmalig, jeweils vor und (ggf.) nach einer Transfusion je 10 ml Blut, verteilt auf 3 kleine Röhrchen, im Rahmen der morgendlichen Routineblutentnahme abgenommen werden.

Diese Studie hat keinen Einfluss auf die für Sie festgelegte Therapie. Die von Ihnen erhobenen Daten werden unter Berücksichtigung des Datenschutzes gespeichert und ggf. im Zusammenhang mit dieser Studie anonymisiert veröffentlicht.

Wir möchten ausdrücklich darauf hinweisen, dass Sie eine bereits erteilte Einverständniserklärung jederzeit zurückziehen können, ohne dass für Sie daraus Nachteile entstehen.

Ich habe den obigen Text gelesen und mir sind verbleibende Fragen beantwortet worden. Ich erkläre mich damit einverstanden an der oben beschriebenen Studie teilzunehmen.

Marburg, den

Unterschrift des Patienten

## 7.2. Tabellarischer Anhang

Tabelle a) Korrelationskoeffizient  $\rho$  beim Vergleich von Messungen mit Spendern <10 und >30 Min. nach BE

Test	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	Alp[°]
INTEM	0,67	0,57	0,90	0,66
EXTEM	0,74	0,84	0,91	0,81

Tabelle b) Korrelationskoeffizient  $\rho$  beim Vergleich von Messungen mit Thrombozytopenischen Patienten <10 und >30 Min. nach BE, n=10

Test	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	Alp[°]
INTEM	0,98	0,90	0,98	0,96
EXTEM	0,99	0,96	0,99	0,97

Tabelle c) Korrelationskoeffizienten beim Vergleich von Nativblut und Citratblut, INTEM

	INTEM			
Parameter	1 Min.	3 Min.	5 Min.	7 Min.
CT	0,51	0,66	0,62	0,18
CFT	0,80	0,83	0,87	0,89
CT+CFT	0,70	0,80	0,68	0,50
MCF	0,95	0,92	0,95	0,93
Alp	0,77	0,60	0,69	0,81
A10	0,95	0,94	0,96	0,95
A20	0,94	0,86	0,95	0,94

Tabelle d) Korrelationskoeffizienten beim Vergleich von Nativblut und Citratblut, EXTEM

	EXTEM			
Parameter	1 Min.	3 Min.	5 Min.	7 Min.
CT	0,28	0,35	0,71	0,27
CFT	0,86	0,91	0,79	0,86
CT+CFT	0,82	0,81	0,75	0,84
MCF	0,91	0,91	0,90	0,90
Alp	0,79	0,90	0,74	0,82
A10	0,95	0,91	0,92	0,95
A20	0,91	0,90	0,91	0,90

Tabelle e) Korrelationskoeffizienten beim Vergleich von Nativblut und Citratblut, NATEM

	NATEM			
Parameter	1 Min.	3 Min.	5 Min.	7 Min.
CT	-0,10	0,01	0,06	0,16
CFT	0,25	0,16	-0,18	0,33
CT+CFT	0,25	0,17	0,05	0,50
MCF	0,58	0,55	0,53	0,72
Alp	0,20	0,31	-0,10	0,74
A10	0,16	0,17	-0,30	0,51
A20	0,32	0,42	0,17	0,30

Tabelle f) Referenzwerte bei INTEM, Testdurchführung mittels Mischverfahren 1, Spender, n=30 – Statistik

Statistische Größen	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	MCE[mm]	Alp[°]
Mittelwert	152	82	59	148	74
Median	152	79	59	145	75
Standardabweichung	15	18	4	24	3
Minimum	124	55	52	107	66
Maximum	177	138	68	205	79
Spannweite	54	83	16	98	13
Oberer Grenzwert	182	117	67	195	80
Unterer Grenzwert	122	47	51	100	68

Tabelle g) Referenzwerte bei INTEM, Testdurchführung mittels Mischverfahren 2, Spender, n=30 - Statistik

Statistische Größen	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	MCE[mm]	Alp[°]
Mittelwert	147	62	60	153	78
Median	149	61	60	152	79
Standardabweichung	13	14	5	29	2
Minimum	106	41	49	98	74
Maximum	169	93	67	202	82
Spannweite	63	52	18	105	8
Oberer Grenzwert	172	91	69	210	83
Unterer Grenzwert	122	34	50	96	73

Tabelle h) Referenzwerte bei EXTEM, Testdurchführung mittels Mischverfahren 1, Spender, n=30 - Statistik

Statistische Größen	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	MCE[mm]	Alp[°]
Mittelwert	39	120	55	124	67
Median	39	120	54	119	67
Standardabweichung	6	28	5	25	5
Minimum	28	74	47	91	59
Maximum	53	172	64	178	76
Spannweite	25	98	17	87	17
Oberer Grenzwert	51	174	64	172	77
Unterer Grenzwert	27	65	45	75	58

Tabelle i) Referenzwerte bei EXTEM, Testdurchführung mittels Mischverfahren 2, Spender, n=30 - Statistik

Statistische Größen	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	MCE[mm]	Alp[°]
Mittelwert	33	113	51	109	69
Median	31	113	52	108	69
Standardabweichung	5	34	6	27	6
Minimum	25	57	40	70	57
Maximum	47	190	62	160	81
Spannweite	22	134	22	90	24
Oberer Grenzwert	43	180	64	162	82
Unterer Grenzwert	23	46	39	57	57

Tabelle j) Referenzwerte bei NATEM, Testdurchführung mittels Mischverfahren 1, Spender, n=30 - Statistik

Statistische Größen	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	MCE[mm]	Alp[°]
Mittelwert	801	296	53	116	47
Median	774	281	54	117	46
Standardabweichung	188	90	4	20	7
Minimum	529	112	44	79	37
Maximum	1311	498	62	162	68
Spannweite	782	386	18	83	32
Oberer Grenzwert	1169	473	62	156	61
Unterer Grenzwert	433	120	45	76	33

Tabelle k) Referenzwerte bei NATEM, Testdurchführung mittels Mischverfahren 2, Spender, n=30 - Statistik

Statistische Größen	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	MCE[mm]	Alp[°]
Mittelwert	782	337	51	104	43
Median	766	309	51	104	43
Standardabweichung	138	103	4	18	6
Minimum	501	211	42	72	30
Maximum	1070	605	59	142	54
Spannweite	570	394	17	70	25
Oberer Grenzwert	1053	539	59	140	55
Unterer Grenzwert	511	135	42	68	31

Tabelle l) Korrelationskoeffizient r zwischen Mischverfahren1 und Mischverfahren2

Test	CT	CFT	MCF	MCE	Alp
INTEM	0,77	0,83	0,91	0,91	0,70
EXTEM	0,44	0,93	0,81	0,86	0,90
NATEM	0,35	0,32	0,70	0,70	0,54

Tabelle m) Referenzwerte bei EXTEM S, Testdurchführung mittels Mischverfahren 2, Spender, n=30 - Statistik

Statistische Größen	CT[s]	CFT[s]	MCF[mm]	MCE[mm]	Alp[°]
Mittelwert	28	107	72	38	48
Median	27	90	73	39	49
Standardabweichung	3	44	8	6	7
Minimum	23	63	55	25	33
Maximum	35	228	81	47	57
Spannweite	12	165	26	22	24
Oberer Grenzwert	34	196	87	51	61
Unterer Grenzwert	21	19	56	26	35



Tabelle n) Referenzwerte bei Diaplastin, Testdurchführung mittels Mischverfahren 2, Spender, n=30 - Statistik

<b>Statistische Größen</b>	<b>CT[s]</b>	<b>CFT[s]</b>	<b>MCF[mm]</b>	<b>MCE[mm]</b>	<b>Alp[°]</b>
Mittelwert	52	80	76	44	55
Median	53	72	77	46	57
Standardabweichung	5	5	27	5	6
Minimum	44	50	61	31	43
Maximum	62	155	82	53	62
Spannweite	22	19	105	21	22
Oberer Grenzwert	43	62	135	86	56
Unterer Grenzwert	23	42	26	66	32

Tab. o) Mittelwerte und Standardabweichung der Parameter bei ROTEM, KC4, SGC, PFA und VCP vor und nach Hämodilution

Methode	Parameter	PAP		NaCl		HAES	
		vor	nach	vor	nach	vor	nach
NATEM (n=10)	CT [s]	762±104	652±142 **	779±141	703±138 *	688±174	587±81
	CFT [s]	300±113	244±92 *	324±138	292±113	311±117	389±174
	MCF [mm]	50±7	52±7 **	49±6	48±8	51±5	36±8 ***
	α-Winkel [°]	45±11	51±10 *	50±17	46±13	46±9	42±12
INTEM (n=10)	CT [s]	153±37	157±19	171±21	168±21	165±20	182±20 ***
	CFT [s]	102±26	84±26	102±30	101±28	104±37	214±78 ***
	MCF [mm]	55±5	56±5	55±6	52±5	55±5	43±7 ***
	α-Winkel [°]	71±4	74±5	71±5	68±13	71±6	56±10 ***
KC4 (n=10)	Gerinnungszeit [s]	99±16	108±17	97±16	121±24 ***	96±16	99±22
SGC (n=15)	Gerinnungszeit [s]	238±36	257±35	238±36	279±35 ***	238±36	253±35
PFA-EPI (n=10)	VZ [s]	133±31	179±43 **	130±23	184±40 **	121±21	203±33 ***
	BV [µl]	354±43	477±50***	359±37	533±84 ***	356±42	451±36 ***
VCP (n=5)	VZ [s]	118±13	159±27 *	126±28	180±38 *	128±15	223±28 *
	BV [µl]	250±33	347±42 *	265±62	401±73 *	275±42	455±56 *

p \* < 0,05; \*\* < 0,01; \*\*\* < 0,001 beim Vergleich der Werte vor und nach Hämodilution

## 8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

### **Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren**

Arnold, Back, Baum, Barth, Basler, Behr, Beyer, Brilla, Christiansen, Czubayko, Engenhardt-Cabillic, Eschenbach, Geus, Göke, Gotzen, Graul, Grimm, Griss, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Hellinger, Hofmann, Jungclas, Kienapfel, Klose, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuni, Lange, Lauer, Lennarzt, Lippert, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller U, Müller T, Mutters, Neubauer, Oertel, Printz, Pfeiffer, Remschmidt, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Seyberth, Sommer, Sturm, Thomas, Vogelmeier, Vogt, Vohland, Wagner, Werner, von Wichert, Wulf

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Volker Kretschmer für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen, bedanken. Weiterhin danke ich ihm für die wissenschaftliche Anleitung und die stetige, verlässliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt auch an Frau Dr. Monika Weippert-Kretschmer, Dr. Janos Slonka, Dr. Ralf Karger und Dr. Thomas Zeiler für die freundliche Hilfestellung während der Durchführung der Arbeit.

Ganz besonders danke ich Fr. Dorothee Lehmann und Fr. Renate Marschall für die Einarbeitung, der ständigen Hilfsbereitschaft und moralischen Unterstützung.

Ebenso danke ich herzlich Fr. Siegrid Marburger und Fr. Helga Staubitz für ihre freundliche Hilfe.

Vielen Dank auch an allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämoastaseologie, die diese Arbeit unterstützt haben.

Dem Personal der Spendeabteilung danke ich auch besonders für ihre Mithilfe bei den Probeentnahmen.

Allen Probanden danke ich herzlich für ihre Teilnahme an den Studien.

Ich danke auch Herrn Ralf Jäger aus dem Institut für Medizinische Biometrie für die statistische Beratung.

Ganz besonders danke ich auch der Friedrich-Naumann Stiftung, die mich während den letzten Jahren des Studiums finanziell unterstützte und meine persönliche und politische Entwicklung förderte.