



Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V. Ständige Kommission Labor (STA EKOLA)

Empfehlungen zur Präanalytik bei der Bestimmung thrombophiler Risikofaktoren aus Citratplasma (Antithrombinaktivität, chromogenes Protein C, freies Protein S)

1. Allgemeine Empfehlungen

Zeitpunkt der Blutentnahme		Unkritisch. Es sollten möglichst keine fettreichen Mahlzeiten vor der Blutentnahme eingenommen werden. Generell ist ein Einfluss des Zeitpunktes der Blutentnahme auf das Testergebnis nicht anzunehmen.
Punktionsstelle		Venöse Blutentnahme.
Blutentnahmesystem		Verwendung einer Kanüle oder eines Entnahmesystems mit kurzem Schlauch. Außendurchmesser der Kanüle: 20 G bis 23 G. Antikoagulanz: 3.2% Natriumcitrat (1:10).
Durchführung der Blutentnahme		Stauzeit < 1 min (<i>Lippi et al. Clin Chem Lab Med. 2005;43: 869-75</i>). Insbesondere bei der Verwendung von Schlauchabnahmesystemen sollte das Citrat-Röhrchen möglichst an zweiter Position abgenommen werden, um eine Unterfüllung aufgrund des Totvolumens des Schlauches zu vermeiden. Unabhängig hiervon stets auf eine korrekte Befüllung der Röhrchen achten, um das vorgegebene Mischungsverhältnis von 1:10 (1+9) einzuhalten. Anschließend Blutentnahmesysteme mit den stärkeren Antikoagulanzen wie z.B. EDTA, Hirudin, Lithiumheparin benutzen, um Verschleppung zu vermeiden. Entnahmeröhrchen mit Antikoagulanzen unmittelbar nach Entnahme 3-6x über Kopf schwenken, um eine ausreichende Vermischung zu gewährleisten.
Citrat-Vollblut: Probenlagerung und -transport		Die Lagerung bzw. der Transport des entnommenen Citrat-Vollblutes sollte nicht gekühlt in einem Temperaturbereich zwischen 15°C und 25°C unter geringer physikalischer Belastung erfolgen. Die hier behandelten Analyte zeigten eine hohe Stabilität in Citratvollblut von 48-52 h. Vor dem Hintergrund der Bestimmung weiterer, empfindlicherer Parameter aus demselben Material sollte die Lagerung bzw. der Transport von Citrat-Vollblutproben unter den oben beschriebenen Bedingungen jedoch möglichst kurz gehalten werden.
Probeneingang		Es sollte nur eindeutig zuzuordnendes Probematerial nach Einhaltung der beschriebenen Lagerungs- und Transportbedingungen angenommen werden. Folgende Citratblutproben sollten verworfen werden. - unterfüllte Proben (wegen Citrat-bedingtem Verdünnungseffekt) - Proben mit Anzeichen einer Kontamination oder Aktivierung
Hämatokrit		Unter 55%, ansonsten Citratüberschuss-Korrektur.
Zentrifugation		Die Zentrifugation der Citrat-Vollblutproben sollte in den ursprünglichen Entnahmeröhrchen bei 15°C bis 25°C erfolgen. Hierbei ist eine Zentrifuge mit entsprechendem Ausschwingrotor zu verwenden, wobei eine relative Zentrifugal-beschleunigung (RZB) von 1.500xg bis 3.000xg für zumindest 10-15 min anzulegen ist. Ziel der Zentrifugation ist die Herstellung von Plättchen-armem Plasma (PPP) mit einer Thrombozytenzahl von < 10/nl bei möglichst minimaler Kontamination mit Erythrozyten und Leukozyten. Zur Vermeidung erhöhter Zellzahlen sollte auf eine starke Abbremsung zum Ende der Zentrifugation verzichtet werden. Vor dem Hintergrund der potentiellen Lyse von Erythrozyten bzw. der Aktivierung von Thrombozyten sollte eine RZB von 3.000xg nicht überschritten werden (<i>Lippi et al. Blood Coagul Fibrinolysis. 2007; 18: 525-8</i>).
Plasmaprobe		Plasmaproben mit Anzeichen einer Kontamination oder Aktivierung /



Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V. Ständige Kommission Labor (STAEKOLA)

		Gerinnselbildung sollten verworfen werden. Das Vorliegen hämolytischer, ikterischer oder lipämischer Plasmaproben sollte dokumentiert und die Möglichkeit der fehlerfreien Analyse mittels des angewandten Testsystems entsprechend der Herstellerangaben kritisch überprüft werden. Einige Messsysteme verfügen diesbezüglich über eine automatisierte, optische Einrichtung (HIL-Check).
Citrat-Plasma: Analyse und Probenlagerung		Die hier behandelten Analyte können aus einfach zentrifugiertem Plasma, auch aus den originalen Abnahmeröhrchen heraus, bestimmt werden. Die Verwendung von doppelt-zentrifugiertem Plasma, wie es etwa zur Lupusantikoagulanzen-Diagnostik benötigt wird, ist ebenfalls möglich. Die Analyse sollte möglichst zeitnah/Arbeitsschicht nach Herstellung des Citratplasmas erfolgen. Ist eine zeitnahe Analyse nicht möglich, sollte das Plasma von den Zellen separiert und, wie auch für eine längere Lagerung, aliquotiert eingefroren werden. Separiertes Plasma sollte idealerweise in Gefäßen aus Polypropylen (PP) aufbewahrt bzw. eingefroren werden.
Citrat-Plasma: Auftauen und Analyse gefrorener Proben		Das Auftauen gefrorener Proben sollte grundsätzlich im Wasserbad bei 37°C (5 - 10min für Plasmavolumen < 1ml) erfolgen, für ausreichendes Vermischen sorgen. Anschließend sollten die Proben bei RT äquilibriert und möglichst zügig analysiert werden. Anschließend sollten die Proben verworfen werden.
Hämolyse, Ikterus, Lipämie (HIL)		Hämoglobin, Bilirubin und Lipide können die (optischen) Messungen beeinflussen. Im Rahmen kinetischer (≥ 2 -Punkt) Bestimmungen werden von den Herstellern hierbei durchaus unterschiedliche (geräteabhängige) Grenzwerte angegeben. Je nach verwendetem Testsystem muss bereits ab den folgenden Konzentrationen mit potentiellen Störeinflüssen gerechnet werden: AT-Aktivität (chromogen): Hämoglobin: > 3 mg/ml; Bilirubin: > 0,1 mg/ml; Lipide: > 1,2 mg/ml PC-Aktivität (chromogen): Hämoglobin: > 3 mg/ml; Bilirubin: > 0,1 mg/ml; Lipide: > 4 mg/ml PS-Ag-frei (LIA): Hämoglobin: > 2 mg/ml; Bilirubin: > 0,02 mg/ml; Lipide: > 10 mg/ml



Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V. Ständige Kommission Labor (STA EKOLA)

2. Spezifische Empfehlungen

	Antithrombin-Aktivität (FXa- bzw. FIIa basierend)	Protein C- chromogen	Protein S frei (LIA)
Citrat-Plasma: temperaturabhängige Stabilität der Analyte	RT: 48h -24°C: 24 Mo -40°C: - -80°C: 24 Mo	RT:48h -24°C: 18 Mo -40°C: - -80°C: 18 Mo	RT: 24h -24°C: 6-8 Mo -40°C: - -80°C: 8 Mo
Die vorstehend aufgeführten Werte beziehen sich auf: <i>Woodhams et al. Blood Coagul Fibrinolysis. 2001; 12: 229-36.</i> <i>Favaloro EJ. Thromb Haemost. 2008; 99: 1122-3.</i>			
Patienten-spezifische Einflussfaktoren	Cholestase, Vit K-Mangel (oder unter VKA-Therapie), KHK und Niereninsuffizienz (s. GK2 Barthels).	Geschlecht: widersprüchliche Literatur, eigene Messung zeigt keinen Unterschied bei n=30 (s. GK2, Tab. 9.3)	geschlechtsspezifische Unterschiede sind zwingend zu berücksichtigen – unterschiedliche Referenzbereich ausweisen; Anm: junge Frauen haben deutlich niedrigere Werte zwischen 50-55% noch normal; Abfall bereits sehr früh in der Schwangerschaft (ab SSWo 5) (Cave: Fehldiagnose Protein S-Mangel!)
Medikamente-spezifische Einflussfaktoren (außer gerinnungsaktiven Substanzen)	Asparaginase- Therapie, Ovulationshemmer /HRT – bedingen leichten Abfall (10%)		Abfall unter Einnahme eines östrogenhaltigen Kontrazeptivums u.U. auch in den subnormalen Bereich (cave: Fehldiagnose Protein S-Mangel!)
Einfluss von Antikoagulation (außer DOACs)	Vitamin K-Antagonisten (VKA) als auch Heparine (UFH/NMH) haben auch in therapeutischen Konzentrationen keinen Einfluss auf das Messergebnis. (<i>Rühl et al. Thromb Haemost 2018; 118: 381-7</i>).	Unter VKA sinken die Protein C- Aktivitätswerte ab. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Protein C (ca. 6 h) erfolgt ein rascher Wiederanstieg auf das Ausgangsniveau nach Absetzen des VKA. Je nach verwendetem Testsystem muss ab Heparin-Aktivitäten von > 1 IE/ml mit potentiellen Störeinflüssen gerechnet werden.	Vitamin K-Antagonisten senken Wert ab, Wiederanstieg auf Ausgangsniveau nach Absetzen des VKA erst nach >4-6Wochen! Dies ist nicht allein über die lange HWZ zu erklären. Bei einigen Pat kann in der stabilen Phase der Antikoagulation mit VKA PS frei in den unteren Normbereich wieder ansteigen. Je nach verwendetem Testsystem muss ab Heparin-Aktivitäten von > 1 IE/ml mit potentiellen Störeinflüssen gerechnet werden.



Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V. Ständige Kommission Labor (STAEKOLA)

	Antithrombin-Aktivität (FXa- bzw. FIIa basierend)	Protein C- chromogen	Protein S frei (LIA)
Einfluss von DOACs	Die direkte medikamentöse Hemmung von Faktor Xa bzw. Faktor IIa führt potentiell zu einer hierdurch bedingten Überschätzung der Antithrombin-Aktivität. Somit sollte unter Medikation mit einem direkten FXa-Inhibitor ein auf FIIa-basierender, und bei Medikation mit einem direkten FIIa-Inhibitor ein auf FXa-basierender AT-Aktivitätstest eingesetzt werden (<i>Rühl et al. Thromb Haemost 2018; 118: 381-7</i>). Alternativ hierzu kann eine Neutralisation des in der Plasmaprobe befindlichen DOACs ins Auge gefasst werden.	Kein Einfluss	Kein Einfluss
Streptokinasetherapie / Kontaktphasenaktivierung	Unter Streptokinasetherapie sowie bei Kontaktphasenaktivierung kann es zu unspezifischen Substratumsetzungen kommen, was zu einer Über- bzw. Unterbewertung der Protein-C bzw. Antithrombin-Aktivität führen kann.		Kein Einfluss
Rheumafaktoren und heterophile Antikörper	Kein Einfluss		Die Anwesenheit von Rheumafaktoren oder heterophilen Antikörpern kann aufgrund einer hiermit einhergehenden Partikelagglutination zu artifiziell erhöhten Messwerten führen. Einige Reagenzien enthalten entsprechende Blockierungsreagenzien, mit welchen dieser Effekt bis zu einer gewissen Grenze eingeschränkt werden kann.
Fibrinogen und Rest-Thrombozyten	Kein Einfluss		Je nach Testsystem können hohe Fibrinogenkonzentrationen (> 9 g/l) bzw. die Anwesenheit von Restthrombozyten (> 10 ¹¹ /l) einen Störeinfluss auf das Messergebnis haben.



**Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V.
Ständige Kommission Labor (STAEKOLA)**