

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Direktor: Prof. Dr. B. Zwissler

und

aus der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Direktor: Prof. Dr. A. Humpe



Viskoelastische Methoden in der Gerinnungsdiagnostik
- Vergleichende Untersuchungen in Plasma und Vollblut -

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. med. univ. Sebastian Adamowicz

aus
Olsztyn (Polen)

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: *PD Dr. Patrick Möhnle*

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Schulz

Prof. Dr. Bernd Engelmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Isabell Pekrul

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
Einleitung.....	11
Material und Methoden	19
<i>Überblick über das Studiendesign</i>	<i>19</i>
<i>Probengewinnung und Probenverarbeitung.....</i>	<i>22</i>
Probenrekrutierung.....	22
Abnahmezeitpunkt	22
Blutabnahme	23
Datenschutz	23
Probentransport	24
Probenverarbeitung und Herstellung der Plasmaproben.....	25
<i>Viskoelastische Messmethoden</i>	<i>26</i>
ROTEM®	26
ClotPro®	32
<i>Messung globaler Gerinnungsparameter</i>	<i>36</i>
Fibrinogenbestimmung	36
<i>Weitere Messungen</i>	<i>38</i>
Prothrombinzeit und aktivierte partielle Thrombinzeit (aPTT)	38
Automatisierte Zellzählung.....	38
<i>Ein- und Ausschlusskriterien</i>	<i>39</i>
<i>Datenanalyse.....</i>	<i>40</i>
Allgemeines.....	40
Berechnete Parameter.....	42
Ergebnisse.....	43
<i>Übersicht über das Probenmaterial.....</i>	<i>43</i>
<i>Intraoperatorvariabilität bzw. Messpräzision</i>	<i>45</i>
<i>Plasmatische Gerinnung und zelluläre Parameter</i>	<i>47</i>
Fibrinogen, Quick und aPTT.....	47
Hämatokrit, Hämoglobin und Thrombozyten	51
<i>Ergebnisse der viskoelastischen Messungen</i>	<i>52</i>
ClotPro®	52
ROTEM®.....	69
<i>Vergleich beider viskoelastischen Methoden.....</i>	<i>85</i>
<i>Weitere Ergebnisse</i>	<i>92</i>
Untersucherabhängigkeit.....	92
Probenherkunft.....	97
Untersuchung der Proben mit einer Liegedauer über 4 Stunden	101

Diskussion	109
<i>Einführung in die Diskussion: Problemstellung und Zielsetzung</i>	109
<i>Intraoperatorvariabilität</i>	111
Bisherige Studienlage.....	111
Unsere Daten.....	112
<i>Reproduzierbarkeit viskoelastischer Messergebnisse</i>	113
Bisherige Studienlage.....	113
Unsere Daten.....	113
Vereinbarkeit der Ergebnisse.....	114
<i>Nachweisbarkeit eines Fibrinolyseinhibitors</i>	117
<i>Hämoglobingehalt und die gemessene Gerinnselfestigkeit</i>	117
Bisherige Studienlage.....	117
Einordnung unserer Ergebnisse in die bisherigen Studien.....	119
Bedeutung für die Praxis.....	121
<i>Vergleichbarkeit beider Messverfahren</i>	121
<i>Diskussion der weiterführenden Ergebnisse</i>	124
Korrelation der MCF mit dem Plasmafibrinogen nach Clauss.....	124
Probenstabilität.....	124
Untersucherabhängigkeit der viskoelastischen Messungen.....	125
<i>Zusammenfassung</i>	127
Referenzen	131
Eidesstattliche Versicherung	137
Danksagung	138

Zusammenfassung

Einleitung

Viskoelastische Methoden (VEM) wie die Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®) finden seit Jahren als Point-of-Care-Verfahren (PoC) zunehmend Einzug in die klinische Praxis. VEM liefern gegenüber routinemäßig durchgeführten Globaltests der Gerinnung (SLT) einen schnelleren Überblick über die Gerinnungssituation des Patienten und bilden zusätzlich einen größeren Bereich der gerinnungsphysiologischen Prozesse ab. Diese Methoden verwenden als Testmaterial Vollblut, somit ergeben sich spezifische Limitationen wie z.B. eine Anwender- und Zeitabhängigkeit dieser Verfahren. Wäre eine retrospektive Reproduzierbarkeit der Messergebnisse auch aus einer Plasmaprobe möglich, ließen sich einige dieser Limitationen überwinden.

Methoden

Der Fokus der Studie lag auf der vergleichenden Untersuchung der Fibrinogenpolymerisierung und dem entsprechenden Parameter der maximalen Gerinnselfestigkeit (MCF) zwischen Vollblutproben, frischen plättchenarmen Plasmaproben und aufgetauten Plasmaproben in den funktionellen Fibrinogenassays der viskoelastischen Methoden (FIBTEM im ROTEM® und FIB-test im ClotPro®). Insgesamt wurden 100 Proben untersucht (77 herzchirurgische Patienten und 23 Patienten der hämostaseologischen Ambulanz). Ein Votum der Ethikkommission lag vor (Projekt-Nr. 19-686).

Ergebnisse

Die gemessene MCF in den Plasmaproben zeigte eine signifikante Abweichung von der gemessenen MCF in den Vollblutproben ($p < 0,05$). Die FIB-test MCF in den Plasmaproben war deutlich höher (Median 26 mm, IQA: 8 mm) als die korrespondierende MCF in den Vollblutproben (Median 17 mm, IQA: 7 mm). Insbesondere für das ClotPro® zeigte sich eine signifikante Korrelation der Hämoglobinkonzentration (Hb) mit der MCF im Vollblut ($r = -0,564$) und der Differenz der MCF zwischen Vollblut und Plasmaprobe ($r = 0,637$). Mittels linearer Regression konnte ein Modell entwickelt werden, mit dessen Hilfe eine gute Abschätzung der im Vollblut gemessenen MCF aus der getauten Probe erfolgen kann ($R^2 = 0,7 - 0,9$).

Diskussion

Eine retrospektive Überprüfung der MCF aus einer getauten Plasmaprobe erscheint möglich. Die Kenntnis des Hämoglobinwerts ist wichtig, da es durch die Erythrozyten in vitro zu einer Beeinflussung der gemessenen MCF in der Vollblutprobe kommt. Dieser Einfluss des Hämoglobingehalts auf die MCF ist auch vom Assay abhängig. Die Messwerte der einzelnen Parameter zwischen ClotPro® und ROTEM® sind nicht identisch und nur eingeschränkt vergleichbar. Das Vorhandensein eines Fibrinolysehemmers (Tranexamsäure) ließ sich retrospektiv in einer getauten Plasmaprobe mittels TPA-test im ClotPro® zuverlässig nachweisen.

Abstract

Introduction

With the development of Point-of-Care (PoC)-devices the viscoelastic hemostatic assays (VHA) such as rotational thrombelastometry (ROTEM[®]) have evolved massively over the last couple of years and have gained an important role in accessing a patient's coagulation status. In comparison to standard laboratory testing (SLT) the advantages of VHA are faster results and more detailed information on the whole process of secondary hemostasis including lysis as well as Clot-Quality. VHA uses citrated whole blood samples and therefore certain limitations have to be considered, such as a higher interoperator-variability and time constraints. The reproducibility of results measured primarily in whole blood from a stored and thawed plasma sample might help to overcome some of the mentioned limitations.

Methods

Focus of this study was to investigate polymerization of fibrinogen (expressed as maximum clot firmness, MCF) in whole blood, fresh platelet-poor plasma and stored and thawed plasma samples using functional fibrinogen assays with ROTEM[®] (FIBTEM) and ClotPro[®] (FIB-test). A total of 100 blood samples (77 from cardiosurgical patients and 23 from the coagulation outpatient clinic) were analyzed with ethics board approval (Project-Nr. 19-686).

Results

MCF measured in plasma samples differs significantly from MCF measured in whole blood ($p < 0,05$). FIB-test MCF was almost always higher in fresh or thawed plasma (median 26 mm, IQR: 8 mm) than in whole blood (median 17 mm, IQR: 7 mm). Especially for the FIB-test assay there was a significant correlation between hemoglobin (hb) and the difference of MCF in whole blood and plasma with a spearman coefficient of 0,637. Inclusion of hemoglobin in linear regression analysis resulted in a solid model ($R^2 = 0,90$) that allowed to estimate the corresponding whole blood MCF from a thawed plasma sample.

Discussion

Retrospective evaluation of a measured MCF from stored plasma samples seems to be feasible. However, knowledge of the hemoglobin concentration is necessary due to the significant impact of red blood cells on the in vitro measurement of MCF in functional fibrinogen assays. This impact of hemoglobin concentration varies between the two assays FIBTEM and FIB-test. Measurements of MCF in ClotPro[®] and ROTEM[®] differ significantly and are not interchangeable. The presence of an antifibrinolytic agent such as tranexamic acid can easily be detected in a stored and thawed plasma sample using the TPA-test in ClotPro[®].

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
aPTT	Aktivierter partieller Thromboplastinzeit
ATMZH	Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie
BE	Blutentnahme
CaCl ₂	Calciumchlorid
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CT	Clotting Time/Coagulation Time
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
EQC	External Quality Control
FFA	funktionelle Fibrinogenassays
fPPP	frische plättchenarme Plasmaprobe
gPPP	getaute plättchenarme Plasmaprobe
HB	Hämoglobin
HES	Hydroxyethylstärke
HKT	Hämatokrit
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IQA/IQR	Interquartilabstand
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LZ	Leukozyten
Max.	Maximum
MCF	Maximum Clot Firmness (maximale Gerinnselfestigkeit)
Mean	Mittelwert
Min.	Minimum
POC	Point-of-Care
PPP	Platelet Poor Plasma (plättchenarmes Plasma)
PT	Prothrombinzeit (Quick)
PZ	Thromboplastinzeit (Quick)
QC	Quality Control
r-tPA	Rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator
SLT	Serial Standard Laboratory Tests
STD	Standardabweichung
TXA	Tranexamic Acid (Tranexamsäure)
TZ	Thrombozyten
VEM	Viskoelastische Methoden
VET	Viscoelastic Coagulation Tests (<i>siehe VEM</i>)
VHA	Viscoelastic Haemostatic Assay (<i>siehe VEM</i>)
VK	Variationskoeffizient
vWF	von-Willebrand-Faktor
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Gegenüberstellung globaler Gerinnungstest (SLT) und viskoelastischer Methoden (VEM).....	11
Abbildung 2 Vereinfachtes Funktionsprinzip viskoelastischer Messverfahren (VEM)	12
Abbildung 3 Skizzen aktueller Geräte zur Messung viskoelastischer Parameter.....	13
Abbildung 4 Zunahme der Publikationen zum Thema viskoelastische Methoden.....	14
Abbildung 5 Schematischer Überblick über die Probenverarbeitung.....	20
Abbildung 6 Probenlaufzettel für Proben aus der Herzklirik	24
Abbildung 7 Herstellung der plättchenarmen Plasmaproben	25
Abbildung 8 Auftauen und Vorbereitung der getauten Plasmaproben.....	25
Abbildung 9 ROTEM® delta mit automatischer Pipette und FIBTEM Anzeige	26
Abbildung 10 Aufbau und Funktionsprinzip des ROTEM®	27
Abbildung 11 Verbrauchsmaterialien für ROTEM® Messungen.....	27
Abbildung 12 Vorbereitung der Pins und Cups am ROTEM®.....	29
Abbildung 13 Thrombelastogramm im ROTEM® und ClotPro®	31
Abbildung 14 Überblick über das ClotPro® System.....	32
Abbildung 15 Aufbau und Funktionsprinzip des ClotPro®.....	33
Abbildung 16 FIB-test und TPA-test Reagenz (ClotPro®) mit „active tip technology“	34
Abbildung 17 Messablauf am ClotPro® System	35
Abbildung 18 ACL TOP 500.....	37
Abbildung 19 Hämatologieanalysator KX-21 (Sysmex)	39
Abbildung 20 Zeit von Blutabnahme bis zur Verarbeitung der Proben (Übersicht).....	44
Abbildung 21 Variationskoeffizienten der Dreifachmessungen.....	46
Abbildung 22 Übersicht über die gemessenen Fibrinogenwerte.....	48
Abbildung 23 Globaltests: Korrelationen zwischen frischer und getauter Plasmaprobe.....	48
Abbildung 24 Korrelation zwischen Clauss Fibrinogen und abgeleitetem Fibrinogen	49
Abbildung 25 Korrelation zwischen Clauss Fibrinogen am ACL TOP und BCS XP.....	49
Abbildung 26 Fibrinogen nach Clauss und Differenz zu getauter Plasmaprobe.....	50
Abbildung 27 Globaltests: Messdifferenzen zwischen frischer und getauter Plasmaprobe.....	50
Abbildung 28 Globaltests: VK zwischen frischer und getauter Plasmaprobe	50
Abbildung 29 Überblick über die Verteilung der hämatologischen Parameter.....	51
Abbildung 30 Korrelation zwischen Hämoglobinkonzentration und Thrombozytenzahl.....	51
Abbildung 31 Verteilung der MCF- und CT-Werte im FIB-test.....	53
Abbildung 32 FIB-test: MCF und CT im Vollblut und getauten Plasma	54
Abbildung 33 Ergebnis der statistischen Tests für die FIB-test Untersuchungen.....	55
Abbildung 34 Korrelation der FIB-test MCF zwischen den untersuchten Proben	55
Abbildung 35 Korrelation der FIB-test CT zwischen den untersuchten Proben.....	55
Abbildung 36 VK, absolute und relative Abweichung der FIB-test-MCF zwischen den Proben.....	56
Abbildung 37 FIB-test-MCF in der Vollblutprobe und Abweichung zur frischen Plasmaprobe.....	57
Abbildung 38 FIB-test-MCF in der frischen Plasmaprobe und Abweichung zur getauten Plasmaprobe	57
Abbildung 39 Abhängigkeit der MCF-Differenzen im FIB-test vom Hämoglobinwert.....	58
Abbildung 40 Abhängigkeit der MCF-Differenzen im FIB-test von der Verarbeitungszeit	59
Abbildung 41 Korrelation zwischen Clauss-Fibrinogen und FIB-test-MCF	60
Abbildung 42 Korrelation zwischen Hämoglobingehalt und Thrombozyten mit der FIB-test-MCF	61
Abbildung 43 Homoskedastizität und Normalverteilung der Residuen für die ClotPro® Regression.....	62
Abbildung 44 Korrelation zwischen predicted MCF und gemessener FIB-test MCF.....	63
Abbildung 45 Vergleich der predicted FIB-test-MCF mit der MCF in Vollblut- und Plasmaprobe	64
Abbildung 46 Bland-Altman-Plot zum Vergleich der ClotPro® Regression	65
Abbildung 47 Vergleich der predicted FIB-test MCF bei Proben > 4 Stunden.....	66
Abbildung 48 Bland-Altman-Plot zum Vergleich der ClotPro® Regression (Proben > 4 Stunden)	67
Abbildung 49 Korrelation zwischen Lyseindex in Vollblutprobe und getauter Probe.....	68
Abbildung 50 Verteilung der MCF- und CT-Werte im FIBTEM.....	70
Abbildung 51 FIBTEM: MCF und CT im Vollblut und getauten Plasma	70
Abbildung 52 Korrelation der FIBTEM-MCF zwischen den untersuchten Proben.....	72
Abbildung 53 Korrelation der FIBTEM-CT zwischen den untersuchten Proben	72
Abbildung 54 VK, absolute und relative Abweichung der FIBTEM-MCF zwischen den Proben.....	73
Abbildung 55 Differenz der FIBTEM-MCF (Vollblut - Plasma) in Abhängigkeit von der MCF im Vollblut.....	74
Abbildung 56 Abweichung der FIBTEM-MCF in Abhängigkeit von der MCF in der Vollblutprobe.....	74
Abbildung 57 Hämoglobingehalt und MCF Differenz zwischen Vollblut und frischer Plasmaprobe	76
Abbildung 58 FIBTEM Messdifferenzen in Abhängigkeit von den Verarbeitungszeiten	76
Abbildung 59 Korrelation zwischen FIBTEM MCF und Fibrinogen.....	77

Abbildung 60 Korrelation zwischen FIBTEM MCF und Hämoglobin.....	77
Abbildung 61 Homoskedastizität und Normalverteilung der Residuen für die FIBTEM Regression	78
Abbildung 62 Anpassungsgüte der Regression in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration	79
Abbildung 63 Korrelation zwischen FIBTEM-MCF und predicted FIBTEM-MCF	80
Abbildung 64 Absolute und relative Differenz der predicted FIBTEM MCF.....	80
Abbildung 65 Vergleich der predicted-MCF mit der FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe.....	81
Abbildung 66 Bland-Altman-Plot zum Vergleich der predicted FIBTEM-MCF	82
Abbildung 67 Vergleich der predicted MCF zur FIBTEM-MCF (Proben > 4 Stunden)	83
Abbildung 68 Bland-Altman-Plot zum Vergleich der predicted FIBTEM MCF (Proben > 4 Stunden)	84
Abbildung 69 Direkter Vergleich der MCF Werte zwischen FIBTEM und FIB-test.....	85
Abbildung 70 Bland-Altman Plot zum Vergleich zwischen Rotem® und ClotPro®	86
Abbildung 71 Vergleich der MCF-Werte zwischen den Assays und den verschiedenen Proben.....	87
Abbildung 72 Korrelation zwischen FIBTEM-MCF und FIB-test-MCF.....	87
Abbildung 73 Voraussetzungen für die Regression zwischen FIBTEM und FIB-test	88
Abbildung 74 Korrelation zwischen erwarteter FIBTEM MCF und gemessener FIBTEM MCF.....	89
Abbildung 75 Bland-Altman-Plot zum Vergleich zwischen FIBTEM MCF und erwarteter FIBTEM MCF.....	90
Abbildung 76 Variationskoeffizient der MCF zwischen den beiden Messverfahren	90
Abbildung 77 Relative Differenzen zwischen den Proben in Abhängigkeit vom Messverfahren	91
Abbildung 78 Absolute Differenz/ VK zwischen Vollblut und Plasma in Abhängigkeit vom Untersucher	94
Abbildung 79 Korrelation zwischen FIBTEM-MCF und FIB-test-MCF in Abhängigkeit vom Untersucher	95
Abbildung 80 Vergleich der MCF im ClotPro® und ROTEM® in Abhängigkeit vom Untersucher	95
Abbildung 81 Absolute und relative Differenz der MCF zwischen beiden Systemen nach Untersucher	96
Abbildung 82 Vergleich der MCF im ROTEM® und ClotPro® in Abhängigkeit vom Untersucher	96
Abbildung 83 MCF-Differenz zwischen Vollblut- und getauter Plasmaprobe nach Probenherkunft.....	98
Abbildung 84 Differenz und VK der MCF zwischen ROTEM® und ClotPro® nach Probenherkunft	99
Abbildung 85 Korrelation der FIBTEM-MCF und der MCF Differenz zwischen beiden Assays.....	100
Abbildung 86 Übersicht über die Verarbeitungszeiten der Proben	101
Abbildung 87 Differenz der aPTT zwischen frischer und getauter Probe nach Verarbeitungszeit	104
Abbildung 88 Differenz der FIBTEM-MCF zwischen Vollblut und Plasma nach Verarbeitungszeit	104
Abbildung 89 Differenzen der FIB-test-MCF zwischen Vollblut und Plasma nach Verarbeitungszeit	105
Abbildung 90 Korrelation von Fibrinogen und MCF Differenz zwischen Vollblut und Plasma	106
Abbildung 91 Korrelation der MCF in Vollblut und frischer Plasmaprobe nach Verarbeitungszeit	107
Abbildung 92 Differenz und VK der FIBTEM MCF zwischen den Plasmaproben nach Verarbeitungszeit	108
Abbildung 93 Differenz und VK der FIB-test MCF zwischen den Plasmaproben nach Verarbeitungszeit	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Überblick über aktuelle Therapiealgorithmen	15
Tabelle 2 Erfasste Parameter	21
Tabelle 3 Überblick über die Herkunft der eingeschlossenen Proben	22
Tabelle 4 ROTEM® Assays und Reagenzien.....	28
Tabelle 5 Messparameter der viskoelastischen Parameter ROTEM® und ClotPro®	30
Tabelle 6 Normwerte für FIB-test und TPA-test (ClotPro®).....	33
Tabelle 7 ClotPro® Assays und Reagenzien	34
Tabelle 8 Übersicht über die Dauer bis zur Verarbeitung der eingeschlossenen Proben	43
Tabelle 9 Gemessene Parameter und Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests	45
Tabelle 10 Messpräzision der einzelnen Verfahren in Abhängigkeit von der Probe (Mittelwerte \pm SD)	46
Tabelle 11 Explorative Datenanalyse der plasmatischen Gerinnungsparameter	47
Tabelle 12 Korrelation zwischen Fibrinogen und den anderen SLTs	49
Tabelle 13 VK und prozentuelle Abweichungen (%) der SLTs zwischen frischen und getauten Proben.....	50
Tabelle 14 Ergebnisse der explorativen Datenanalyse aus dem Blutbild	51
Tabelle 15 Anzahl der untersuchten Proben im FIB-test und TPA-test	52
Tabelle 16 Deskriptive Statistik der gemessenen Parameter am ClotPro®	53
Tabelle 17 VK, absolute und relative Differenz der FIB-test-MCF zwischen den Proben	56
Tabelle 18 Korrelation zwischen den relativen Differenzen der FIB-test-MCF und anderen Parametern.....	59
Tabelle 19 Korrelation zwischen den absoluten Differenzen der FIB-test-MCF und anderen Parametern.....	59
Tabelle 20 Korrelation zwischen den Fibrinogenmessungen und der FIB-test-MCF.....	60
Tabelle 21 Korrelation der FIB-test-MCF mit Parametern des Blutbilds	61

Tabelle 22 Korrelation der FIB-test-MCF mit Parametern der Globaltests.....	61
Tabelle 23 Ergebnisse der ANOVA und Koeffizienten für die ClotPro® Regression.....	63
Tabelle 24 Vergleich der predicted FIB-test-MCF mit der MCF in Vollblut- und Plasmaprobe.....	64
Tabelle 25 Deskriptive Statistik der MCF-Differenzen zwischen den Proben.....	65
Tabelle 26 Vergleich der predicted FIB-test MCF bei Proben > 4 Stunden.....	66
Tabelle 27 Deskriptive Statistik der MCF Differenzen zwischen den Proben (Proben > 4 Stunden).....	67
Tabelle 28 Korrelation zwischen Lyseindex im Vollblut und getauter Plasmaprobe.....	68
Tabelle 29 Zusammengang zwischen Gabe von Tranexamsäure und Auftreten einer Lyse.....	68
Tabelle 30 Deskriptive Statistik der gemessenen Parameter am ROTEM®.....	69
Tabelle 31 Ergebnis der statistischen Tests für die FIBTEM Untersuchungen.....	71
Tabelle 32 VK, absolute und relative Differenz der FIBTEM-MCF zwischen den Proben.....	73
Tabelle 33 Korrelationen der Differenzen bzw. des VK zwischen Vollblutprobe und frischer Plasmaprobe.....	75
Tabelle 34 Korrelationen der Differenzen bzw. des VK zwischen frischer und getauter Plasmaprobe.....	75
Tabelle 35 Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen FIBTEM-MCF und den anderen Parametern.....	76
Tabelle 36 Regressionsanalyse zur Abschätzung der MCF aus der gefrorenen Plasmaprobe.....	79
Tabelle 37 Vergleich der predicted FIBTEM-MCF zur Vollblut- und Plasmaprobe.....	81
Tabelle 38 Deskriptive Statistik der FIBTEM-MCF Differenzen zwischen den Proben.....	82
Tabelle 39 Vergleich zwischen predicted und gemessener FIBTEM-MCF (> 4 Stunden).....	83
Tabelle 40 Deskriptive Statistik der FIBTEM-MCF Differenzen zwischen den Proben (Proben > 4 Stunden)....	84
Tabelle 41 Korrelation der MCF zwischen FIBTEM und FIB-test in den verschiedenen Proben.....	86
Tabelle 42 Korrelation der MCF-Differenz zwischen beiden Messmethoden und anderen Parametern.....	88
Tabelle 43 Parameter der Regressionsanalyse zwischen FIBTEM und FIB-test.....	89
Tabelle 44 Vier-Felder-Tafel: Untersucher und Herkunft der Proben.....	92
Tabelle 45 Vergleich der Messparameter in Abhängigkeit von Probenherkunft und Untersucher.....	92
Tabelle 46 Differenzen zwischen Vollblut- und getauter Plasmaprobe nach Untersucher.....	94
Tabelle 47 Korrelation der MCF zwischen Vollblut und frischer Plasmaprobe nach Untersucher.....	94
Tabelle 48 MCF und CT in den Vollblutproben in Abhängigkeit vom Untersucher.....	96
Tabelle 49 Korrelationen der MCF-Differenz zwischen ROTEM® und ClotPro®.....	97
Tabelle 50 Korrelation der MCF (Vollblut – frische Plasmaprobe) in Abhängigkeit von der Probenherkunft....	98
Tabelle 51 Korrelationen des VK und der abs. FIB-test Differenz (Vollblut – Plasma) nach Probenherkunft...	100
Tabelle 52 Korrelationen des VK und der abs. FIBTEM Differenz (Vollblut – Plasma) nach Probenherkunft..	100
Tabelle 53 Parameter der VEM und SLT in Abhängigkeit von der Verarbeitungszeit.....	102
Tabelle 54 Korrelation der MCF mit dem Clauss-Fibrinogen in Abhängigkeit von der Liegedauer.....	106
Tabelle 55 Korrelation der relativen MCF-Differenz (Vollblut - Plasma) mit dem Hb nach Verarbeitungszeit.	106
Tabelle 56 Korrelation der MCF (Vollblut - frische Plasmaprobe) in Abhängigkeit von der Liegedauer.....	107
Tabelle 57 Korrelation zwischen MCF im FIB-test und FIBTEM in Abhängigkeit von der Liegedauer.....	107

Einleitung

Die im Routinelabor häufig gemessenen „globalen“ Gerinnungsparameter (gelegentlich auch „SLT“ oder „serial standard laboratory tests“ genannt) wie die Thromboplastinzeit (PZ) bzw. Quick oder die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) bilden nach Aktivierung der extrinsischen bzw. intrinsischen Gerinnungskaskade nur die Initialisierung der plasmatischen Gerinnungsprozesse (sekundäre Hämostase) bis zur Fibrinnetzstellung ab (1). Insbesondere für die perioperative Situation konnte gezeigt werden, dass diese Parameter zur Prädiktion und Diagnostik von Gerinnungsstörungen nur mit Einschränkungen zu verwenden sind (2).

Während die Globalgerinnungsparameter (PZ und aPTT) den Prozess der Gerinnungsbildung also als einen einzelnen Zeitwert (Sekunden) bis zur Entstehung des Fibrins und dessen Polymerisierung zu einem Gerinnsel (auch „Clot“) erfassen, bestechen die viskoelastischen Methoden (VEM) durch eine graphische Darstellung der Gerinnungsbildung im zeitlichen Verlauf. Hierdurch können verschiedene Phasen der Gerinnungsbildung identifiziert werden und sind damit einer Bewertung mit einer daraus möglicherweise resultierenden therapeutischen Konsequenz zugänglich. Die primäre Hämostase (Thrombozytenaktivierung) wird weder durch Globaltests noch durch VEM erfasst. In *Abbildung 1* wird der zeitliche Testablauf der Globalgerinnungstestung (PZ und Quick) den verschiedenen Testphasen der viskoelastischen Methode gegenübergestellt (modifiziert nach Whiting D. und DiNardo JA).

Abbildung 1 Gegenüberstellung globaler Gerinnungstest (SLT) und viskoelastischer Methoden (VEM)

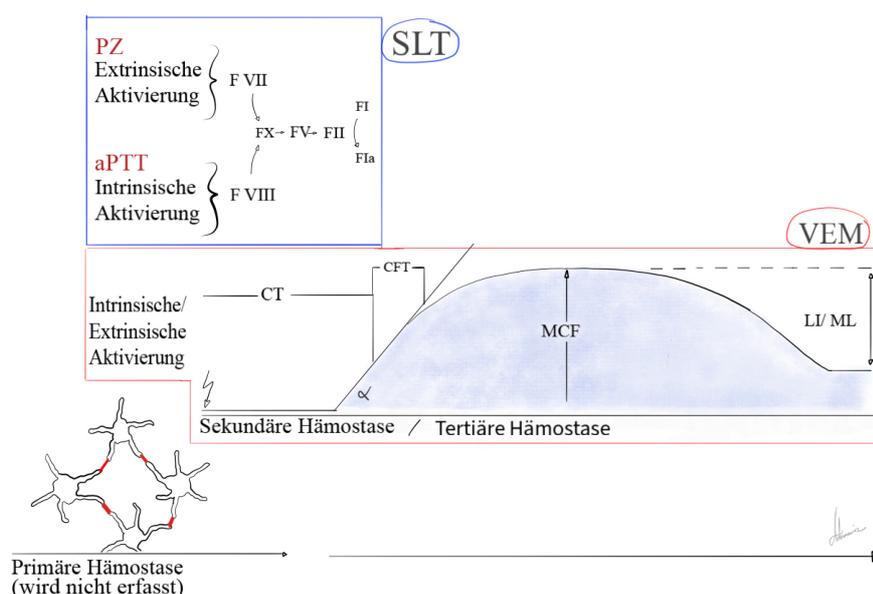


Abbildung modifiziert nach Whiting D. und DiNardo J.A (3)

Viskoelastische Testmethoden (auch “viscoelastic coagulation assays” (VCA) oder „viscoelastic haemostatic assays“ (VHA) genannt) verwenden anders als plasmatische Gerinnungstest (SLT) Vollblut als Probenmaterial. Damit sind VEM in der Lage, unter Einbeziehung aller gerinnungsrelevanter Faktoren der Blutprobe (z.B. Thrombozyten, Erythrozyten, inflammatorische Zytokine, fibrinolytische Faktoren) auch eine Aussage über die Qualität des entstehenden Gerinnsels zu liefern, wie beispielsweise die maximale Clotfestigkeit (MCF), und den Prozess der anschließenden Fibrinolyse graphisch darzustellen (4-7).

Das ursprüngliche Konzept der viskoelastischen Gerinnungsmessung wurde bereits 1948 in Deutschland von Prof. Hellmut Hartert als Thrombelastographie beschrieben und stand später als Thrombelastograph TEG[®] (Fa. Haemonetics) kommerziell zur Verfügung. Es basiert auf einem mit 340 µL Vollblut gefüllten, sich regelmäßig (alle 5 Sek.) in kleinen Amplituden (4°45‘) drehenden, auf 37 °C erwärmten, kleinen zylindrischen Gefäß (Cup), in den ein Stempel (Pin) eintaucht (4). Durch die einsetzende Gerinnung in der Probe kommt es zur Ausbildung von Fibrinsträngen zwischen Cup und Pin und mit zunehmender Gerinnselbildung zu einer Kraftausübung auf den Pin, welche im zeitlichen Kontext registriert und prozessiert wird (*Abbildung 2*).

Abbildung 2 Vereinfachtes Funktionsprinzip viskoelastischer Messverfahren (VEM)

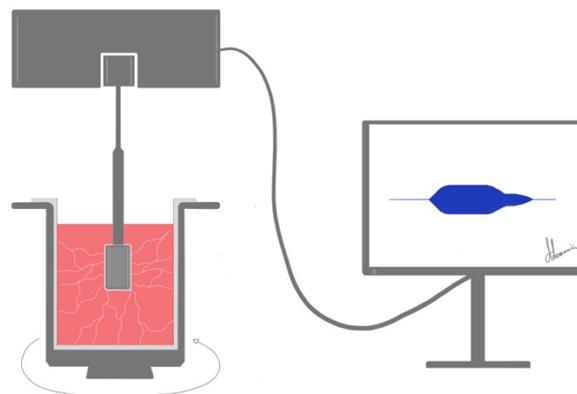


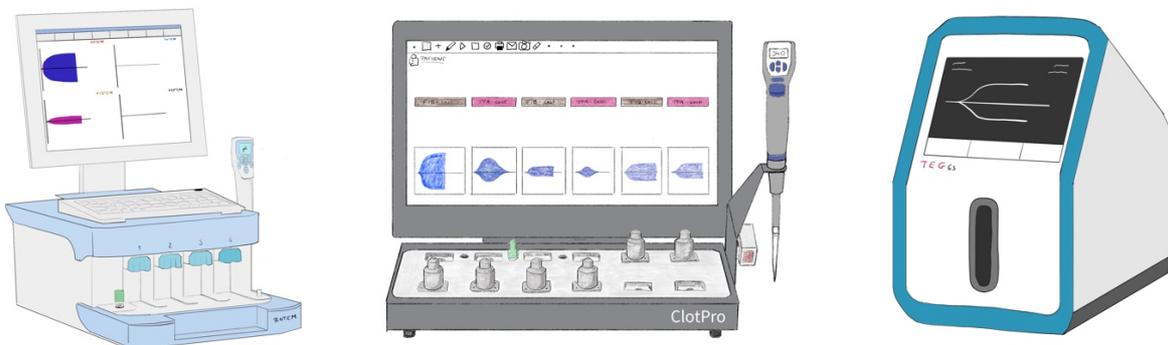
Abbildung modifiziert nach Hans G. et al. (7)

Die Aktivierung des Gerinnungsprozesses in der Probe erfolgt bei den viskoelastischen Methoden wie bei den SLTs auch zumeist durch Zugabe verschiedener Aktivatoren und Zusätze (Assays), um die Gerinnungsprozesse zu beschleunigen oder um bestimmte Schlüsselstellen der Gerinnung zu inhibieren/aktivieren und somit besser beurteilen zu können (*siehe unten*).

Ein weiterer großer Vorteil der viskoelastischen Methoden ist die im Vergleich zu den Globaltests viel schnellere Verfügbarkeit der Ergebnisse, in der Literatur auch als „turn-around time“ bezeichnet (5). Da die Messungen mit Vollblut erfolgen und bettseitig durchgeführt werden, entfällt der Transport und die präanalytische Probenverarbeitung (Zentrifugation), sodass erste Ergebnisse bereits innerhalb weniger Minuten zur Verfügung stehen. Gerade in zeitkritischen Situationen (z.B. Trauma oder im OP) haben diese Verfahren das Potential, die Patientenversorgung zu verbessern (2).

Mit der Entwicklung neuer Geräte, insbesondere als einfach handzuhabende Point-of-Care-Verfahren (z. B. ROTEM® Sigma oder TEG® 6s), stieg die Anwendung der viskoelastischen Gerinnungstests in den letzten Jahren insbesondere im perioperativen Bereich stetig an. Heute kommerziell verfügbare Geräte zur viskoelastischen Gerinnungsmessung sind das ROTEM®, das TEG® und das ClotPro® (siehe *Abbildung 3*).

Abbildung 3 Skizzen aktueller Geräte zur Messung viskoelastischer Parameter



ROTEM® delta

TEM Innovations GmbH
(München)
(www.rotem.de)

ClotPro®

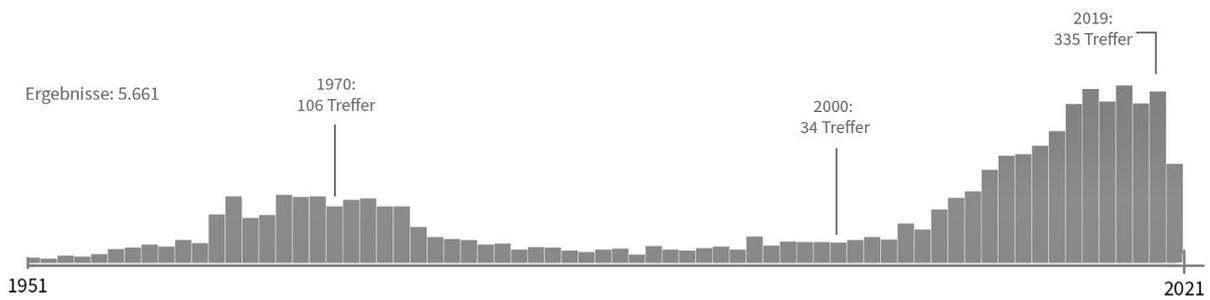
Haemonetics
(München)
(www.clot.pro)

TEG® 6s

Haemonetics
(München)
(www.teg.haemonetics.com)

Das Interesse und die zunehmende Anwendung der viskoelastischen Methoden spiegelt sich unter anderem auch in der deutlichen Zunahme an publizierten Studien in den letzten Jahren wider. *Abbildung 4* veranschaulicht das Ergebnis der Pubmed-Recherche mit dem Schlagwort „thrombelastography“.

Abbildung 4 Zunahme der Publikationen zum Thema viskoelastische Methoden



Bildquelle: www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov nach Suchbegriff: „thrombelastography“

Der Einsatz und der Nutzen dieser Verfahren wurde in vielen klinischen Bereichen untersucht und wird aktuell mit unterschiedlichem Empfehlungsgrad in den entsprechenden Leitlinienempfehlungen diskutiert. Insbesondere in der Kardiochirurgie (8, 9), der Traumatologie (10, 11) und der geburtshilflichen Anästhesie (12, 13) konnten sich VEM bereits als vorteilhaft erweisen. Viskoelastische Methoden erlauben eine gezielte hämostatische Therapie (goal-directed-therapy) und somit auch eine Reduktion der Fremdbluttransfusionen sowie der Kosten und sollen insgesamt eine Verbesserung des Patientenoutcomes ermöglichen (14). Neben den beschriebenen perioperativen Einsatzgebieten kommen viskoelastische Verfahren zunehmend auch in anderen Fachbereichen zum Einsatz, beispielsweise zur erweiterten Gerinnungsdiagnostik in der Hämostaseologie (15) oder zur Überwachung von Blutungskomplikationen bei internistischen Patienten mit Leberzirrhose (16).

Im Laufe der letzten Jahre wurden auf dieser vielversprechenden Basis zahlreiche, teils sehr komplexe Algorithmen zur individuellen, zielgerichteten hämostatischen Therapie für verschiedene viskoelastische Methoden (vorwiegend ROTEM® und TEG®) ausgearbeitet und in großen Studien untersucht. *Tabelle 1* fasst eine Auswahl einiger dieser publizierten Therapieebäume der letzten Jahre exemplarisch zusammen. Für das relativ neue ClotPro® sind unserer Kenntnis nach bisher keine validierten Algorithmen vorhanden.

Der Einsatz viskoelastischer Methoden zur Entscheidungsfindung in der Gerinnungstherapie wird nicht zuletzt auch in aktuellen Leitlinien wie der S3-Leitlinie zur Polytraumabehandlung empfohlen: „Im Rahmen der Schockraumversorgung von Schwerverletzten sollte zusätzlich zur Diagnostik und Therapie der trauma-induzierten Koagulopathie der frühzeitige Einsatz viskoelastischer Testverfahren durchgeführt werden.“ (S3 - Leitlinie Polytrauma / Schwerverletzten-Behandlung, AWMF Register-Nr. 012/019).

Tabelle 1 Überblick über aktuelle Therapiealgorithmen

Auswahl von publizierten Therapiealgorithmen zur hämostatischen Therapie mittels VEM		
Autor	Literatur	Gerät/ Einsatzgebiet
Maegele, Nardi, Schöchl Hemotherapy algorithm for the management of trauma-induced coagulopathy the German and European perspective (Current Opinion in Anaesthesiology 2017)	(17)	ROTEM®: Traumatologie
Inaba, Rizoli, Veigas et al. 2014 Consensus conference on viscoelastic test-based transfusion guidelines for early trauma resuscitation (Journal of Trauma and Acute Care Surgery 2015)	(18)	ROTEM®: Traumatologie
Schöchl, Maegele, Solomon, Görlinger, Völckel Early and individualized goal-directed therapy for trauma-induced coagulopathy. (Scandinavian Journal Trauma, Resuscitation an Emergency Medicine 2012)	(19)	ROTEM®: Traumatologie
Baksaas-Asen, Gall, Stensballe, Juffermans, Curry et al. Viscoelastic haemostatic assay augmented protocols for major trauma haemorrhage (ITACTIC): a randomized, controlled trial (Intensive Care Medicine 2021)	(20)	ROTEM®: Traumatologie
Mallaiah et al. Introduction of an algorithm for ROTEM-guided fibrinogen concentrate administration in major obstetric haemorrhage (Anaesthesia 2015)	(12)	ROTEM®: Geburtshilfe
Roullet et al. Management of bleeding and transfusion during liver transplantation before and after the introduction of a rotational thromboelastometry-based algorithm (LIVER TRANSPLANTATION 2015)	(21)	ROTEM®: Leberchirurgie
Scala et al. Comparison of ROTEM Sigma to Standard Laboratory Tests and Development of an Algorithm for the Management of Coagulopathic Bleeding in a Tertiary Center (Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia 2019)	(22)	ROTEM®: Diverse Patienten
Weber, Görlinger, Meininger et al. A Prospective, Randomized Clinical Trial of Efficacy in Coagulopathic Cardiac Surgery Patients (Anesthesiology 2012)	(23)	ROTEM®: Herzchirurgie
Rigal et al. Cost-effectiveness of point-of-care viscoelastic haemostatic assays in the management of bleeding during cardiac surgery: Protocol for a prospective multicentre pragmatic study with stepped-wedge cluster randomised controlled design and 1-year follow-up (the IMOTEC study) (British Medical Journal 2019)	(24)	ROTEM®/ TEG®: Herzchirurgie

Trotz der zahlreichen Vorteile der viskoelastischen Methoden sind diese Verfahren nicht frei von Limitationen. So gilt es beispielsweise Unterschiede zwischen den in-vivo- und in-vitro-Verhältnissen der Gerinnung zu beachten (6). In vitro und in vivo liegen beispielsweise unterschiedliche Flussverhältnisse vor, wobei die gemessenen Gerinnselbildungen in den VEM unter geringen Scherkräften (0,1/Sek.) stattfinden und denen in Gefäßsystemen wie z. B. der Vena Cava ähneln sollen (3). Darüber hinaus fehlt bei in-vitro-Aktivierung des extrinsischen Gerinnungswegs die gleichzeitige Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade über den Faktor IX; stattdessen kommt es hier direkt zur Aktivierung des common-pathways über den Faktor X. VEM (wie auch die SLTs) sind außerdem nicht in der Lage, die ebenfalls wichtige primäre Hämostase, also die Interaktion des von-Willebrand-Faktors (vWF) und der Thrombozyten mit dem subendothelialen Kollagen, zu erfassen und beurteilen (1). Ebenso lassen sich auch die Aktivitäten der Gerinnungsinhibitoren (Protein S und C sowie Antithrombin) mittels VEM nicht abbilden.

Eine 2017 publizierte Meta-Analyse von Wikkelsø und Kollegen untersuchte 17 Studien und bestätigte darin zwar die positiven Effekte der viskoelastischen Methoden hinsichtlich der Reduktion von Fremdbluttransfusionen, zeigte aber auch diverse Limitationen auf. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Evidenz bislang nicht ausreichend ist: „...*but the results are mainly based on trials of elective cardiac surgery involving cardiopulmonary bypass, with low-quality evidence.*“ (25).

Vor allem die Untersucherabhängigkeit und die fehlende retrospektive Nachvollziehbarkeit der erbrachten Ergebnisse stellen weitere häufige Limitationen dieser teils großen Studien dar: „*The disadvantages of viscoelastic hemostatic assays have historically included a relatively high coefficient of variation, poorly standardized methodologies*“ (26).

Im klinischen Alltag etablieren sich zunehmend komplexe Therapiealgorithmen, mit Empfehlungen wie beispielsweise: “*The cut-off point for fibrinogen administration is: MCF-ex < 50 mm with a MCF of FIBTEM (fib) < 12 mm. Platelet transfusion is indicated if MCF-ex < 50 mm and MCF-fib > 12 mm*“ (27). VEM werden nicht nur von qualifiziertem Laborpersonal, sondern zunehmend bettseitig von labormedizinisch ungeschultem Personal durchgeführt (28). Aufgrund der oben beschriebenen, teils recht hohen Variationskoeffizienten bzw. Inter- und Intraoperatorvariabilitäten könnten sich daraus durchaus therapeutische Konsequenzen ergeben, entsprechend dem oberen Beispiel, wenn die MCF-fib bei 11 mm statt 12 mm liegt.

Streng genommen können dadurch ärztliche Entscheidungen (z.B. die Gabe eines Gerinnungspräparats und/oder allogenen Blutprodukts) auf einem Messergebnis beruhen, welches in dieser Form im Nachhinein nicht mehr überprüfbar ist. Dieses Problem liegt vorwiegend auch darin begründet, dass VEM Vollblut als Testmaterial verwenden. Im Gegensatz zu Plasmaproben haben Vollblutproben nur eine kurze Stabilität und sollten aktueller Literatur folgend (CLSI-Richtlinien) innerhalb von 4 Stunden verarbeitet werden (26, 29). Eine Lagerung der Proben und die Rekonstruktion der Messungen ist im Nachhinein nicht möglich. Um diese Limitationen zu überwinden und den Stellenwert der viskoelastischen Methoden und der damit verbundenen Studien zu erhöhen, bestehen zahlreiche Bestrebungen, diese Verfahren weiter zu standardisieren und mit dem Wunsch eine spätere Überprüfbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen: „... *in the scientific setting, storage of samples for later batch analysis offers obvious advantages*“ (30).

Für Qualitätskontrollen und Ringversuche werden aus den gegebenen Gründen daher häufig lyophilisierte Plasmaproben verwendet. Plasmaproben sollen ohne weiteres mehrere Monate bei -24 °C bis -74 °C stabil gelagert werden können, ohne dass es dabei zu einer klinisch signifikanten Änderung der Gerinnungsaktivität kommt (31). Anforderungen für Qualitätskontrollen werden in der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen verbindlich festgelegt und sind auch für die viskoelastischen POC-Methoden gültig (2). Bisher gab es Versuche seitens der INSTAND e.V sowie der International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), diese Qualitätskontrollen im Bereich der viskoelastischen Verfahren voranzutreiben und Ringversuche mit lyophilisiertem Plasma und definierten Faktorenkonzentrationen zwischen mehreren Laboratorien durchzuführen, jedoch mit teils unterschiedlichen Ergebnissen (32)-(33).

Da Plasmaproben keine zellulären Komponenten enthalten, ist die direkte Vergleichbarkeit zur Vollblutprobe eingeschränkt. Ziel dieser Studie soll es sein, viskoelastische Messungen in Vollblut, frischen Plasmaproben sowie gefrorenen und aufgetauten Plasmaproben durchzuführen und zu prüfen, ob eine Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen aus Vollblutproben und den Plasmaproben gegeben ist. Außerdem soll gezeigt werden, dass eine retrospektive Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse möglich ist. Schließlich soll dadurch die Qualität zukünftiger Studien in der wissenschaftlichen Debatte gesteigert werden und bisherige Limitationen reduziert werden.

Im Verhältnis zu der Gesamtzahl der bisher publizierten Studien im Bereich der viskoelastischen Testverfahren gibt es bisher nur eine uns bekannte Untersuchung, die ein ähnliches Ziel verfolgte. Schörghofer et al. untersuchten 2016 anhand des ROTEM[®], wie sich die viskoelastischen Parameter im Vollblut, in frischen und in aufgetauten Plasmaproben von gesunden Probanden vor und nach Modifikation dieser Proben durch ex vivo spiking mit gerinnungshemmenden Medikamenten nach Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Gerinnungswegs im EXTEM- und INTEM-Assay verhalten (30).

Im Gegensatz zu der Studie von Schörghofer et al. fokussiert sich diese Arbeit dabei auf die Aspekte der Fibrinogenpolymerisierung in den funktionellen Fibrinogenassays (FFA) der viskoelastischen Methoden. Anhand von ROTEM[®] und ClotPro[®] wird das Verhalten der maximalen Gerinnselfestigkeit (MCF) in Vollblutproben, frischen und aufgetauten Plasmaproben untersucht und versucht, mögliche Umrechnungsfaktoren herauszuarbeiten. Als weiterer Aspekt der Studie soll gezeigt werden, dass das Vorhandensein eines Fibrinolysehemmers wie z.B. Tranexamsäure (TXA) auch in frischen und aufgetauten Plasmaproben nachgewiesen werden kann. Zuletzt stellt sich die Frage, ob die mit den beiden viskoelastischen Testverfahren (ROTEM[®] und ClotPro[®]) gemessenen Ergebnisse vergleichbar sind und somit eine gleiche Aussagekraft bezüglich Therapieentscheidungen erlauben.

Viele bisherige Studien erzielten die zu untersuchenden Effekte häufig durch in-vitro-Manipulation der Proben, was nicht selten auch einen limitierenden Faktor der Studien darstellte. So wurden Proben häufig artifiziell verdünnt, z.B. mit Ringer-Lactatlösung (34), NaCl 0,9% (35) oder autologem Plasma (36). Hierbei kommt es jedoch zur Verdünnung aller im Blut vorhandenen relevanten Faktoren. Mitunter wurden Proben in vitro aber auch große Mengen Fibrinogen (37) oder Heparin (30) zugesetzt. Unsere Studie sollte durch gezielte Rekrutierung der Proben an einem heterogenen Patientenkollektiv einen weiten Messbereich an Fibrinogenkonzentration erfassen, ohne die Proben in vitro modifizieren zu müssen.

Material und Methoden

Überblick über das Studiendesign

Die Arbeit war als monozentrische Studie am Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) angelegt. Am 30.09.2019 erfolgte das positive Votum der Ethikkommission (Projekt-Nr. 19-686) der LMU für das geplante Studienvorhaben. Die untersuchten Proben stammten von Patienten aus der Herzklinik der LMU am Augustinum München sowie aus der hämostaseologischen Ambulanz der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie (ATMZH) des Universitätsklinikums. Die Probenverarbeitung selbst erfolgte im hämostaseologischen Speziallabor der ATMZH. Von den derzeit auf dem Markt verfügbaren viskoelastischen Testverfahren wurden für diese Studie das ROTEM® *delta* (TEM Innovations GmbH, München) und das ClotPro® (Haemonetics, früher *enicor GmbH*) verwendet.

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Vergleichbarkeit der einzelnen Vollblutprobe mit der dazugehörigen Plasmaprobe lag, erfolgte keine Erfassung demographischer oder anthropometrischer Daten der Spender. Ebenso wurde die zur Probe korrelierende klinische Situation (z.B. das Vorliegen einer Blutung, die Art und Dauer des operativen Eingriffs, Medikamenteneinnahme und Vorerkrankungen) nicht berücksichtigt. Messrelevante intraoperative Einflüsse wie beispielsweise die Gabe von Hydroxyethylstärke (HES) (38) oder die Gabe von Tranexamsäure (TXA) und Gerinnungsprodukten wurden hingegen erfasst. Eine Übersicht über die erhobenen und gemessenen Parameter zeigt *Tabelle 2*.

Die gemessene maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) in den funktionellen Fibrinogenassays der viskoelastischen Verfahren ist fast ausschließlich von der Fibrinpolymerisierung und damit von der Fibrinogenkonzentration der Probe abhängig (39). Für die Studie wurde daher angestrebt, möglichst den gesamten Messbereich an Fibrinogenkonzentrationen („*lower Limit*“ bis „*upper Limit*“) in den Proben zu erhalten, ohne jedoch die Blutproben nachträglich bearbeiten (z.B. verdünnen) zu müssen. Um dieses breite Spektrum an Fibrinogenkonzentration zu realisieren, erfolgte die Probengewinnung vorwiegend bei herzchirurgischen Patienten. Bei diesen Patienten findet sich oft eine Hypofibrinogenämie durch Blutung oder Verbrauch von Faktoren an der Herz-Lungen-Maschine (HLM), andererseits lassen sich durch Substitutionstherapie oder postoperative Akute-Phase-Reaktion im weiteren Verlauf häufig auch Phasen der Hyperfibrinogenämie nachweisen (40-42).

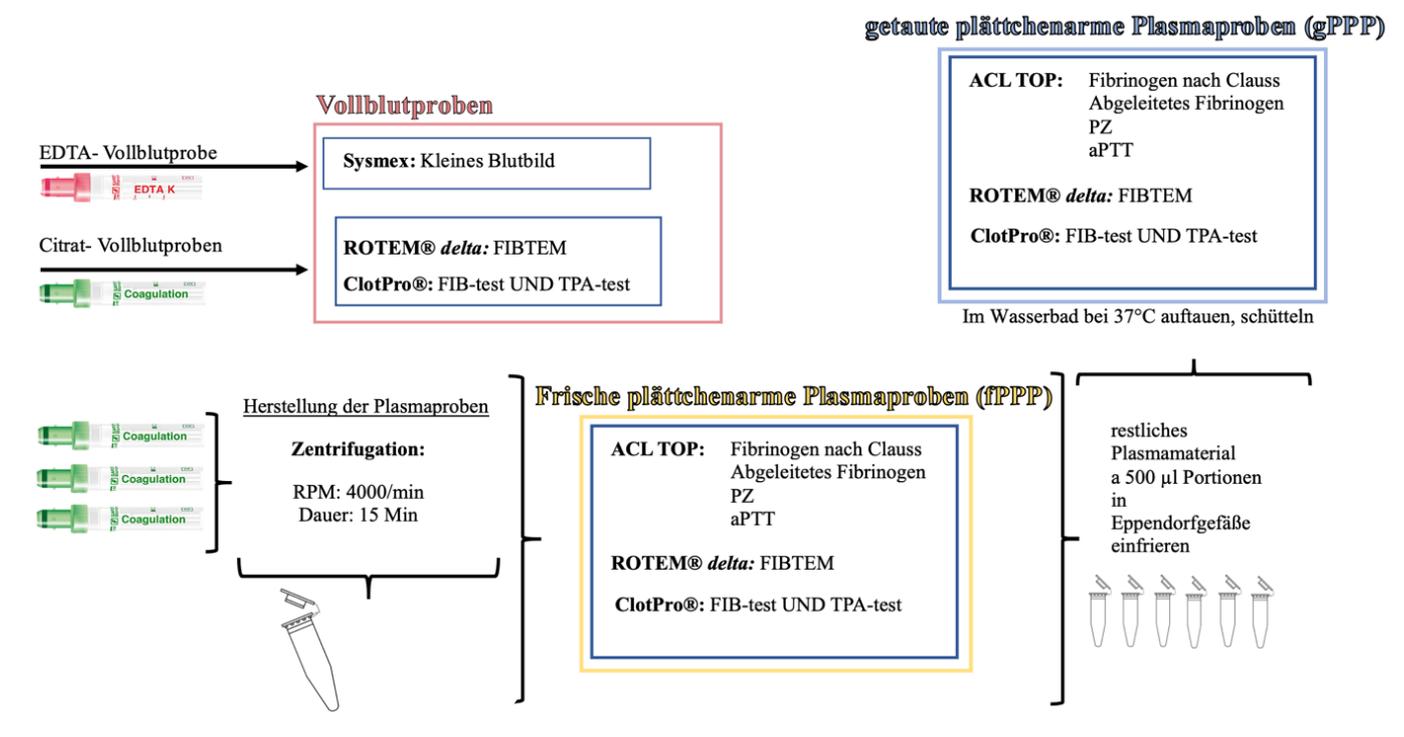
Ein weiterer Teil der Proben stammte von Patienten der hämostaseologischen Ambulanz mit erfahrungsgemäß normalen bis niedrignormalen Fibrinogenkonzentrationen.

Die Verarbeitung der gesammelten Proben gliederte sich zeitlich in 2 Phasen (Batch-Methode).

Den schematischen Untersuchungsablauf skizziert *Abbildung 5*:

1. Unmittelbar nach Probengewinnung erfolgten die viskoelastischen Messungen in der Citrat-Vollblutprobe sowie die Bestimmung der zellulären Parameter aus der EDTA-Vollblutprobe. Anschließend folgte die Herstellung von plättchenarmen Plasmaproben (PPP) und erneute Messung der viskoelastischen Parameter sowie die Globalgerinnungstests (Fibrinogen, abgeleitetes Fibrinogen, PZ, aPTT). Überschüssiges Probenmaterial wurde bei -30 °C eingefroren.
2. Nach ca. vier Wochen wurden die tiefgekühlten Proben aufgetaut und die viskoelastischen Messungen sowie Globalgerinnungstests wiederholt.

Abbildung 5 Schematischer Überblick über die Probenverarbeitung



Zusätzlich wurden drei Proben von gesunden Freiwilligen für die Erstellung einer 3x3-Matrix verwendet, um die Präzision der Messergebnisse („intraoperator variability“) abzuschätzen. Hierzu wurden alle zu untersuchenden Parameter dreimal hintereinander mit der gleichen Reagenziencharge gemessen (sowohl im Vollblut als auch in frischer und getauter Plasmaprobe) und anschließend der Variationskoeffizient (VK) berechnet.

Die in dieser Arbeit angewandten Messverfahren und alle dafür notwendigen Reagenzien bzw. Materialien wurden auch für den klinischen Routinebetrieb der hämostaseologischen Spezialambulanz verwendet und unterlagen damit den Qualitätskriterien nach den Richtlinien der Bundesärztekammer.

Alle gemessenen Parameter wurden in einer Excel-Tabelle (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) gesammelt und anschließend mit Hilfe des Programms SPSS Statistics 26 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) ausgewertet.

Tabelle 2 Erfasste Parameter

	Erhobene Parameter	Direkte Messungen		Batchverfahren
		VBP	fPPP	gPPP
Angaben zur Probe und Chargen	Anonymisierte Probennummer	✓	✓	✓
	Untersucher der Probe			
	Abnahmezeitpunkt der Probe			
	Verarbeitungszeitpunkt der Probe			
	Zeitpunkt der Batchmessung			
	Chargen der Testreagenzien			
	Gabe von TXA und HES intraop.			
ACL TOP 500	Fibrinogen nach Clauss (mg/dL)		✓	✓
	Abgeleitetes Fibrinogen (mg/dL)		✓	✓
	PZ/Quick (%)		✓	✓
	aPTT (Sek)		✓	✓
BCS [®] XP	Fibrinogen nach Clauss (mg/dL)			✓
ROTEM [®]	FIBTEM: Clotting Time (Sek)	✓	✓	✓
	FIBTEM: MCF (mm)	✓	✓	✓
ClotPro [®]	FIB-Test: Clotting Time (sek)	✓	✓	✓
	FIB-Test: MCF (mm)	✓	✓	✓
	TPA-Test: Lyseindex (%)	✓	✓	✓
Sysmex [®]	Hämoglobin (g/dL)	✓		
	Hämatokrit (%)	✓		
	Erythrozytenzahl (10 ³ /μL)	✓		
	Thrombozytenzahl (10 ³ /μL)	✓		

VBP: Vollblutprobe

fPPP: frische plättchenarme Plasmaprobe

gPPP: getaute plättchenarme Plasmaprobe

TXA: Tranexamsäure

HES: Hydroxyethylstärke

Probengewinnung und Probenverarbeitung

Probenrekrutierung

Die Rekrutierung der Proben erfolgte nach positivem Votum der Ethikkommission (s.o.).

Die Aufklärung der herzchirurgischen Patienten erfolgte präoperativ am Vortag der Operation auf Station, die Patienten der hämostaseologischen Ambulanz wurden vor ihrer geplanten routinemäßigen Blutabnahme über das Studienvorhaben aufgeklärt. Die Probenabnahme erfolgte nur nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung. Insgesamt wurden 123 Proben verarbeitet. 23 Proben (ausschließlich aus der Herzklinik) wurden ausgeschlossen, da aus logistischen Gründen eine Verarbeitung der Proben vor Ablauf von 4 Stunden nach Blutabnahme (wie im Studienplan angestrebt wurde) nicht erfolgen konnte. Die Probenrekrutierung erfolgte zwischen Dezember 2019 und Juli 2020. Einen Überblick über die Herkunft der eingeschlossenen Proben gibt *Tabelle 3*.

Tabelle 3 Überblick über die Herkunft der eingeschlossenen Proben

Hämostaseologische Ambulanz (ATMZH)		n = 23
Patienten	n = 20	
gesunde Probanden	n = 3	
Herzklinik der LMU am Klinikum Augustinum		n = 77
Intensivstation	n = 15	
vor oder ohne EKZ	n = 7	
an der EKZ	n = 10	
nach EKZ	n = 45	
GESAMT		n = 100

EKZ: Extrakorporale Zirkulation = **HLM:** Herz-Lungen-Maschine

Abnahmezeitpunkt

Die ersten Proben (n = 10) wurden während der Phase der HLM abgenommen und lieferten nicht plausible Fibrinogenkonzentrationen. Dies war auf eine Interferenz mit Heparin zurückzuführen. Eine supratherapeutische Heparinisierung, wie sie an der Herz-Lungen-Maschine zwangsläufig vorliegen muss (bis 1,8 U/mL), zeigte bereits in anderen Studien einen verfälschenden Einfluss auf die Fibrinogenbestimmung nach der Clauss-Methode (43). Die viskoelastischen Parameter waren jedoch durch die in den Assays vorhandene hohe Konzentration an Heparinase nicht betroffen und lieferten plausible Ergebnisse. Diese n = 10 Proben wurden daher für die Untersuchung der viskoelastischen Parameter eingeschlossen.

Als standardisierter Blutabnahmezeitpunkt wurde fortan die vollständige Antagonisierung der Heparinwirkung durch die Protamininfusion unmittelbar nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine) gewählt.

Wann immer klinisch vertretbar, erfolgte die Blutabnahme noch vor der Verabreichung von Blut- und Plasmaprodukten sowie Gerinnungspräparaten. Ein weiterer Teil der untersuchten Proben wurde im weiteren postoperativen Verlauf auf Intensivstation durch den Stationsarzt entnommen, nachdem hohe Fibrinogen-konzentrationen bereits laborchemisch bekannt waren. Die Abnahme der Proben aus der hämostaseologischen Ambulanz erfolgte unmittelbar nach Aufklärung und Einwilligung im Rahmen der routinemäßig geplanten Blutabnahme.

Blutabnahme

Die Blutabnahme (BE) erfolgte bei den herzchirurgischen Patienten sowohl im OP als auch auf Intensivstation im Rahmen einer ohnehin geplanten und klinisch erforderlichen Blutentnahme aus einem zur Operation angelegten arteriellen Katheter in der A. radialis (20 Gauge) bzw. A. femoralis (18 Gauge). Mindestens 2-4 ml mit Kochsalzlösung vermisches Blut wurden vor Befüllen der Probenröhrchen aspiriert und verworfen. In der hämostaseologischen Ambulanz erfolgte die Abnahme der Proben mittels einmaliger peripherer Venenpunktion nach kurzer venöser Stauung.

Es wurden jeweils vier kommerziell erhältliche Citrat-Röhrchen (S-Monovetten mit 3,2 % Natrium-Citrat, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entsprechend der angegebenen Markierung gefüllt, sodass ein Mischungsverhältnis von 1:9 vorlag. Für die automatische Zellzählung erfolgte darüber hinaus noch die Abnahme von 2 mL Blut in eine EDTA-haltige S-Monovette (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland).

Datenschutz

Unter strenger Beachtung des Datenschutzes erfolgte unmittelbar nach Blutabnahme die Pseudonymisierung der Proben mittels Zahlencodierung (z. B. HCI_001, HCI_002, etc.). Alle unterschriebenen Einwilligungserklärungen wurden in einem speziellen Studienordner abgeheftet und in einem verschließbaren Schrank der ATMZH aufbewahrt. Eine Rückverfolgung der Proben war im Nachgang somit nur den Studienärzten möglich.

Probentransport

Die Proben aus der Herzkllinik wurden mit einem Kurier in das 8,5 km entfernte Labor der hämostaseologischen Ambulanz transportiert, dies beanspruchte in der Regel 15-30 Minuten. Um der Probenstabilität Rechnung zu tragen, wurde unmittelbar nach Blutabnahme in der Herzkllinik ein Probenlaufzettel mit Informationen zu Datum und Uhrzeit der Blutabnahme ausgefüllt (siehe *Abbildung 6*). Weitere Informationen auf dem Probenlaufzettel umfassten die Gabe und Dosierung von Heparin und Protamin und sowie die Gabe von Hydroxyethylstärke (HES), Tranexamsäure (TXA) und Gerinnungsprodukten **vor** der Blutabnahme. Proben aus der hämostaseologischen Ambulanz wurden ohne Probenlaufzettel verarbeitet, da diese immer unmittelbar (< 1 Stunde) nach Abnahme verarbeitet worden waren. Weitere Informationen wie z. B. die Gabe von Heparin/Protamin waren hier nicht zutreffend und wurden somit nicht benötigt.

Abbildung 6 Probenlaufzettel für Proben aus der Herzkllinik

Vergleichende Untersuchungen viskoelastischer Methoden im Vollblut und Plasma

PROBENLAUFZETTEL

Probennummer: HCl_

----- Im OP auszufüllen -----

Datum der Blutabnahme: _____

Uhrzeit der Blutabnahme: _____

Weitere Angaben:

Heparin: _____

Protamin: _____

Tranexamsäure: ja/ nein _____ g

Hydroxyethylstärke: ja/ nein _____ ml

Fibrinogen: _____

PPSB: _____

Hinweis: Bitte Probenabnahme wenn möglich **NACH** Protamingabe und wenn möglich **VOR** Gabe von Gerinnungsprodukten.

Bitte nach Abnahme Stationsarzt informieren.

Vielen Dank!!!

----- Im Labor auszufüllen -----

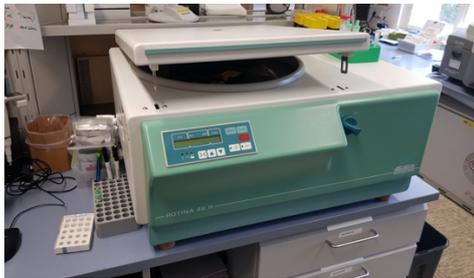
Probe verarbeitet um: _____

(Der Probenlaufzettel wurde nur für die Proben aus der Herzkllinik verwendet)

Probenverarbeitung und Herstellung der Plasmaproben

Alle Proben wurden ausschließlich im Labor der hämostaseologischen Ambulanz der ATMZH verarbeitet und gemessen. Bis zur Verarbeitung wurden alle Proben ungekühlt gelagert. Alle Proben waren regelrecht befüllt. Die Messungen erfolgten durch den Studienarzt oder das Laborpersonal. Nach Ankunft von Proben aus der Herzkllinik wurde der Verarbeitungszeitpunkt auf dem Probenlaufzettel dokumentiert (siehe *Abbildung 6*). Nachdem die Messungen aus den Vollblutproben erfolgt waren, wurde aus den Citratproben das frische plättchenarme Plasma (fPPP) für die weiteren Messungen hergestellt. Hierfür wurden die Proben nach laborinternen Standards für 15 Minuten bei 4000 RPM mittels Rotina 46 (Fa. Hettich) zentrifugiert (siehe *Abbildung 7*).

Abbildung 7 Herstellung der plättchenarmen Plasmaproben



Der Überstand der frisch zentrifugierten Proben wurde vorsichtig abpipettiert und in einem großen Eppendorfgefäß gesammelt. Anschließend folgte die Fibrinogenbestimmung, die Messung der Globaltests (SLTs) sowie erneute viskoelastischen Messungen. Das nach den Messungen noch vorhandene Plasma wurde bei -30 °C im Gefrierschrank eingefroren. Aus pragmatischen Gründen erfolgte die Messung im Batchverfahren nach ca. 30 Tagen bzw. einem Monat. Die gefrorenen Plasmaproben wurden hierfür im Wasserbad für ca. 10 Minuten bei 37 °C aufgetaut und mittels Vortex Mixer nochmals gut vermischt, bevor die abschließenden Messungen erfolgten (*Abbildung 8*).

Abbildung 8 Auftauen und Vorbereitung der getauten Plasmaproben



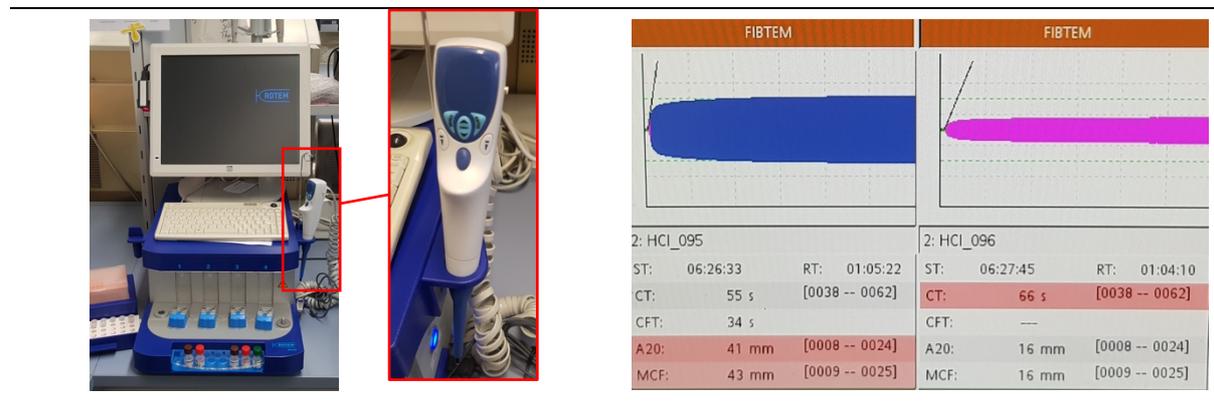
Viskoelastische Messmethoden

ROTEM®

Überblick

Verwendet wurde das ROTEM® *delta* der Firma Instrumentation Laboratory. Das Gerät verfügt über 4 Messkanäle zur parallelen Messung verschiedener viskoelastischer Testansätze. Das große Gehäuse beherbergt die gesamte Messelektronik und verfügt über einen integrierten Wärmeblock. Angeschlossen an das ROTEM® *delta* ist darüber hinaus eine elektronische Pipette, die je nach ausgewähltem Test/Assay das zu pipettierende Volumen automatisch vorgibt und somit die Arbeit erleichtert (*Abbildung 9 links*). Steuerung und Eingabe erfolgen über die Tastatur mit integriertem Trackball. Laufende Messungen werden in Echtzeit als Thrombelastogramm (*Abbildung 9 rechts*) und mit den relevanten Messparametern (CT, CFT, Alpha-Winkel, A5, A20, MCF, ML, LI) auf dem Monitor dargestellt. Alle Messdaten können anschließend gespeichert, exportiert und gedruckt werden.

Abbildung 9 ROTEM® *delta* mit automatischer Pipette und FIBTEM Anzeige

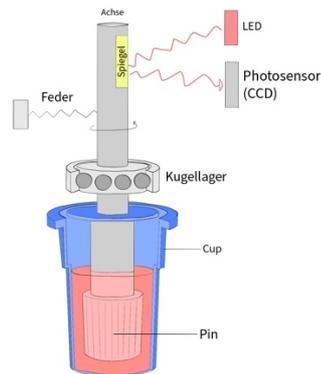


Funktionsprinzip

Die zu messende Probe wird in einen unbeschichteten Behälter (Cup) pipettiert und entsprechende Testreagenzien (siehe unten) zur schnelleren Initialisierung der Gerinnung hinzugefügt. Um in-vivo-Bedingungen zu simulieren erfolgt die Messung bei 37 °C. Ein alle 6 Sekunden um eine Achse von 4°75' rotierender Stempel taucht in den Cup ein. Durch die mit der Zeit zunehmende Gerinnelbildung und damit auch Zunahme der Viskosität der Probe wird die Rotation des Pins behindert. Ein am Pin angebrachter Spiegel reflektiert das von einer Lichtquelle einfallende Licht zurück auf einen lichtsensiblen CCD Sensor (Charge Couple Device). Die Zunahme der Viskosität wird im ROTEM® nicht wie ursprünglich elektromechanisch, sondern optisch gemessen (3), siehe *Abbildung 10*.

Die erhobenen Messzeiten und die der Rotation entgegengesetzten Widerstände als Ausdruck der zunehmenden Gerinnelbildung werden anschließend als Thrombelastogramm visuell dargestellt. Die Festigkeit des Blutgerinnsels wird per Definitionem in Millimetern auf einer Skala von 0 bis 100 angegeben, wobei 0 für keinerlei Viskositätszunahme bzw. Clotbildung steht (44).

Abbildung 10 Aufbau und Funktionsprinzip des ROTEM®

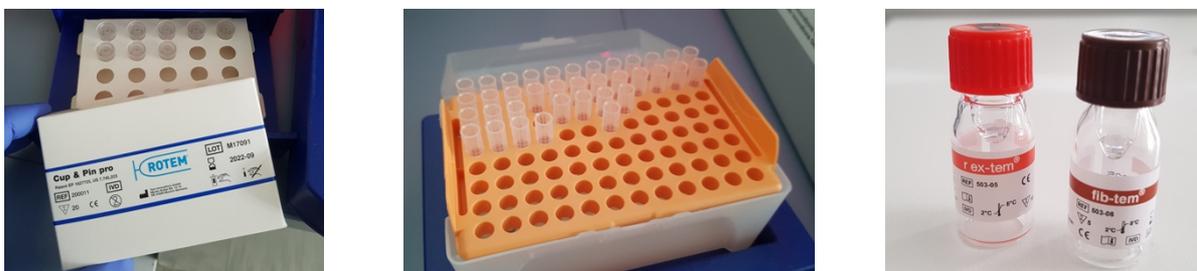


Modifiziert nach Whiting et al. (3)

Testansätze (Assays): Reagenzien sowie Materialien

Das Rotem® verfügt wie alle anderen viskoelastischen Methoden über verschiedene Testansätze (Aktivatoren und Inhibitoren), mit denen die unterschiedlichen Schlüsselstellen der Gerinnung genauer untersucht werden können und auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll. Zu den benötigten Verbrauchsmaterialien gehören neben den entsprechenden Reagenzien (Tabelle 4) auch die Cups und Pins sowie die Pipettenspitzen (Abbildung 11).

Abbildung 11 Verbrauchsmaterialien für ROTEM® Messungen



Im EXTEM-Assay wird mittels ex-tem®-Reagenz (Inhalt: tissue factor) der extrinsische Gerinnungsweg über den Faktor VII gestartet. Der gewählte Aktivierungsweg entspricht somit dem Aktivierungsweg der Prothrombinzeit (PZ, Quick).

Demgegenüber steht beim INTEM-Assay die Kontaktaktivierung durch die im in-tem[®]-Reagenz enthaltene Ellagsäure im Vordergrund und folgt damit dem Prinzip der aPTT-Messung (22, 45).

Nach der Initialisierung der Gerinnung, entweder über den intrinsischen (*INTEM-Assay*) oder den extrinsischen (*EXTEM-Assay*) Gerinnungsweg, können durch weitere Zugabe von verschiedenen Aktivatoren oder Inhibitoren bestimmter Schlüsselstellen der Gerinnung, diese Schlüsselstellen differenzierter abgebildet werden: Mittels einer Heparinase im hep-tem[®]-Reagenz wird im HEPTEM-Assay eine vorhandene Heparinwirkung neutralisiert und kann so im Vergleich mit dem INTEM-Assay detektiert werden. Für das FIBTEM Assay wird die extrinsische Gerinnungskaskade mittels ex-tem[®] aktiviert und die Thrombozytenfunktion durch das im fib-tem[®]-Reagenz vorhandene Cytochalasin D gehemmt, wodurch die darauffolgende Gerinnselbildung maßgeblich auf der Fibrinogenpolymerisierung beruht (5-7, 46). Alle Reagenzien enthalten CaCl₂ zur Rekalzifizierung der Citratprobe. Neben dem HEPTEM-Assay enthalten auch das EXTEM-Assay sowie alle darauf beruhenden Tests (APTEM und FIBTEM) einen Heparininhibitor (Polybrene) und sind dementsprechend gegenüber Heparin weitgehend unempfindlich (3). Für den Informationsgewinn aus diesen Zusatztests ist immer der vergleichende Blick auf die Gerinnselbildung im INTEM-Assay bzw. EXTEM-Assay notwendig.

Tabelle 4 ROTEM[®] Assays und Reagenzien

Assay	Reagenz	Inhalt	Informationsgewinn
EXTEM	r ex-tem [®]	Rekombinanter Gewebsfaktor + Heparininhibitor (Polybrene)	extrinsischer Gerinnungsweg
FIBTEM	fib-tem [®]	EXTEM + Cytochalasin D	Fibrinpolymerisation
APTEM	t ap-tem [®]	EXTEM + Aprotinin/TXA	Effekt von Antifibrinolytika
INTEM	in-tem [®]	Ellagsäure	Intrinsischer Gerinnungsweg
HEPTEM	hep-tem [®]	INTEM + Heparinase	Heparineffekt

Nicht aufgeführt: *NATEM* (natives Blut) und *ECATEM* (Detektion von direkten Thrombininhibitoren)

Tabelle mod. nach Görlinger et al.(46) und Hans et al.(7)

In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen ROTEM[®]-Messungen ausschließlich das FIBTEM-Assay verwendet um die (zumindest weitgehend) nur vom Fibrinogen abhängige Polymerisierung und Festigkeit des sich bildenden Gerinnsels zu untersuchen.

Hierfür wurden das r ex-tem[®]- und das fib-tem[®]-Reagenz benötigt (*Abbildung 11 rechts*).

Die Messungen erfolgten mit folgenden Chargen:

fib-tem[®]: 20694032, 42292601, 42302501, 42311401

r ex-tem[®]: 42282401, 42331701

Im FIBTEM-Assay wird die extrinsische Gerinnungskaskade (Aktivierung des Faktor VII) durch den im r ex-tem[®]-Reagenz enthaltenen rekombinanten tissue-factor initiiert. Darüber hinaus enthält das Reagenz noch Hexadimethrine Bromid, welches eine etwaig vorhandene Heparinwirkung in der Probe (bis zu einer Konzentration von 5 I.E./ml) neutralisiert. Durch das anschließend noch hinzugegebene Calciumchlorid und Cytochalasin D im fib-tem[®]-Reagenz wird die zu untersuchende Citratprobe rekalkifiziert und damit gerinnungsfähig gemacht sowie die Thrombozytenfunktion gleichzeitig gehemmt.

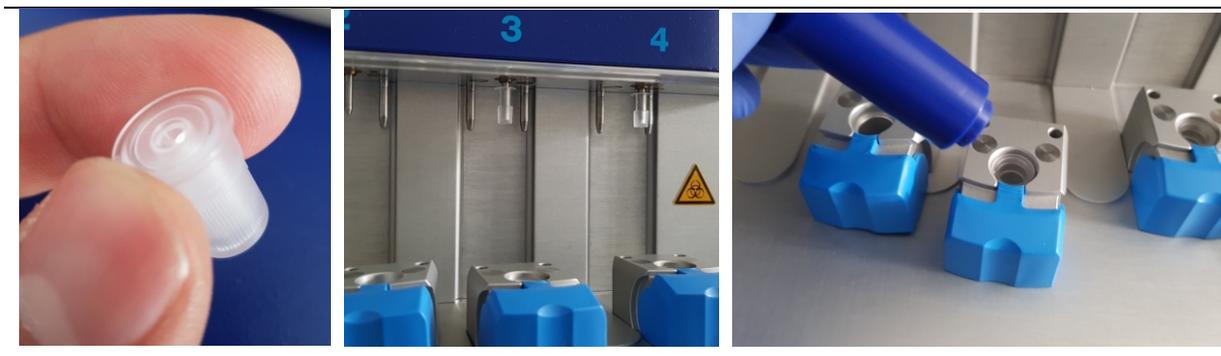
(Quelle: fib-tem[®] Packungsbeilage, 2017-12, V0012-DE).

Als Referenzwert für die maximale Gerinnselfestigkeit im FIBTEM wird eine MCF von 9-25 mm angegeben (47). Entsprechend wurden MCF Werte < 9 mm als „vermindert“ definiert.

Messablauf

Bezüglich der Probengewinnung und Präanalytik sei an dieser Stelle auf die vorherigen Abschnitte (Seite 25) verwiesen. Nach Eingabe der Patientendaten, Auswahl des Kanals und Auswahl des Testverfahrens erfolgte der Messablauf nach den Vorgaben auf dem Bildschirm des Geräts. Verwendet wurden die „Cup & Pin pro“ sowie die Pipettenspitzen der Firma ROTEM[®] (siehe *Abbildung 11 links und Mitte*), welche entsprechend den Herstellervorgaben vor den Untersuchungen am Gerät angebracht wurden (*Abbildung 12*).

Abbildung 12 Vorbereitung der Pins und Cups am ROTEM[®]



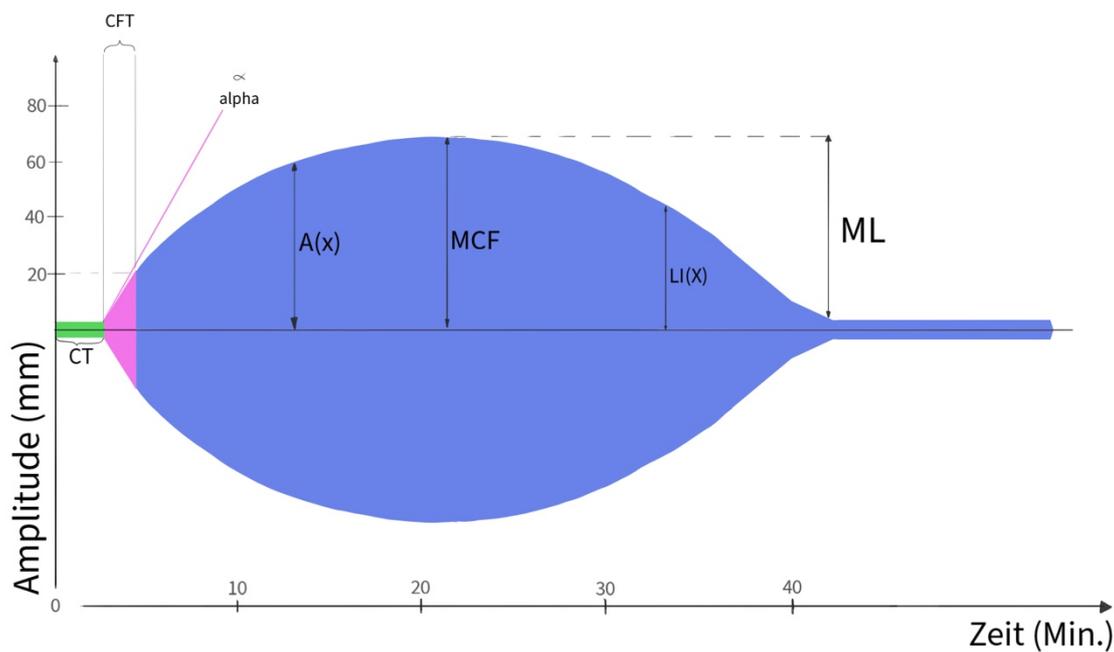
Die erforderlichen Volumina der Testreagenzien und Blut- bzw. Plasmaproben wurden durch die elektrische Pipette automatisch eingestellt. Zunächst wurden 20 µL r ex-tem[®]-Reagenz, gefolgt von 20 µL fib-tem[®]-Reagenz und 300 µL der zu untersuchenden Probe in den bereits vorher eingesetzten Cup pipettiert. Zwischen jedem Pipettierschritt wurden die Pipettenspitzen abgeworfen und erneuert. Abschließend wurde der gesamte Inhalt des Cups vor der Messung noch einmalig in die Pipette gesaugt und erneut abpipettiert, um eine gute Durchmischung des Testansatzes zu gewährleisten. Der Cup wird zügig auf den Pin geschoben und fixiert. Die Messung startete umgehend automatisch und lief im Mittel 57 (± 5) Minuten. Von Interesse war insbesondere die gemessene maximale Gerinnselfestigkeit (MCF). *Tabelle 5* gibt einen Überblick über alle relevanten Parameter von ROTEM[®] und ClotPro[®] und *Abbildung 13* stellt die gemessenen Parameter in Bezug zum Thrombelastogramm dar.

Tabelle 5 Messparameter der viskoelastischen Parameter ROTEM[®] und ClotPro[®]

	Parameter	Definition	Einheit
Parameter der Gerinnungsaktivierung	Coagulation Time (CT)	Zeit vom Start bis zu einer Amplitude von 2 mm	Sekunden (s)
	Clot Formation Time (CFT)	Zeit zwischen einer Amplitude von 2 mm und 20 mm	Sekunden (s)
	Alpha Winkel (Alpha)	Winkel zwischen der Basislinie und Tangente durch den 2 mm Punkt	Grad (°)
Parameter der Gerinnselfestigkeit	Maximum-Clot-Firmness (MCF)	Maximale Amplitude während des gesamten Tests	Millimeter (mm)
	Amplitude Zeitpunkt (x) A (x)	Amplitude zur bestimmten Zeit (X)	Millimeter (mm)
Parameter der Lyse	Maximum Lysis (ML)	Differenz zwischen MCF und niedrigster Amplitude nach Lyse	Prozent (%)
	Clot Lysis Index CLI (x)	Verhältnis der Amplitude zur MCF zu einer gegebenen Zeit (x)	Prozent (%)
	Lyseindex (LI)	Zeit von Beginn der Clotformation (CT) bis zur 50-%-Reduktion der MCF	Sekunden (s)

Tabelle modifiziert nach Calatzis A (48) und ClotPro[®] User Manual (49).

Abbildung 13 Thrombelastogramm im ROTEM® und ClotPro®



Qualitätskontrollen

Die Qualitätskontrollen wurden entsprechend Herstellerangaben regelmäßig mit Kontrollproben ROTROL N und ROTROL P vom Laborpersonal durchgeführt. Die Reagenzien wurden zwischen den Messungen stets kühl bei +4 °C gelagert und entsprechend Herstellerangaben zügig, innerhalb von spätestens 8 Tagen nach Anbruch verbraucht. Vor Messung wurden Citratblut/-Plasma und alle Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und vor Verwendung vorsichtig homogenisiert.

ClotPro®

Überblick

Das für diese Arbeit verwendete ClotPro® der Fa. Haemonetics (*ursprünglich enicor GmbH*) besteht neben der eigentlichen Instrumenteneinheit mit den sechs Messkanälen und Stempeln aus einem integrierten All-In-One-Computer mit Touchscreenfunktion, einem Keyboard und einer Maus. Auch beim ClotPro® ist eine automatische Pipette mit einem voreingestellten Volumen von 340 µL angeschlossen, um die korrekte Durchführung zu vereinfachen (siehe *Abbildung 14*).

Abbildung 14 Überblick über das ClotPro® System

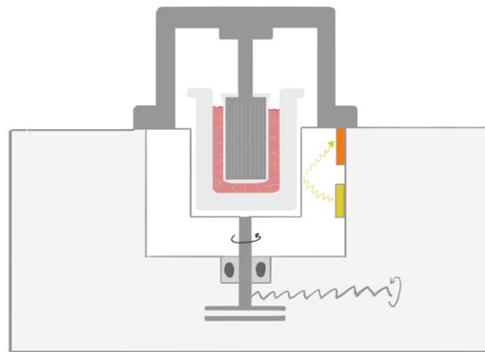


Die Nomenklatur und das aufgezeichnete Thrombelastogramm entsprechen dem des ROTEM® (siehe *Tabelle 5* und *Abbildung 13*). Unterschiede zum ROTEM® *delta* bestehen hier vor allem bei der Handhabung der Reagenzien (siehe Abschnitt „Materialien und Reagenzien“ weiter unten). Die mittels ClotPro® erhobenen Parameter waren die maximale Clotfestigkeit (MCF) im funktionellen Fibrinogenassay (FIB-test) und die maximale Lyse (ML) im TPA-test zur Detektion der bei herzchirurgischen Patienten standardmäßig verabreichten Tranexamsäure.

Funktionsprinzip

Das Funktionsprinzip unterscheidet sich nur geringfügig vom ROTEM® und ähnelt mehr der von Prof. Hartert ursprünglich entwickelten Technik der Viskoelastometrie. Beim ClotPro® wird nicht der Stempel, sondern die im Messblock platzierte Küvette mittels eines „elastischen Elements“ um einen geringen Winkel von ca. 5° nach links und rechts gedreht. Über Lichtsensoren wird auch hier die abnehmende Drehung der Küvette detektiert und graphisch vom System als Thrombelastogramm dargestellt (*Abbildung 15*).

Abbildung 15 Aufbau und Funktionsprinzip des ClotPro®



Modifiziert nach internationalem Patent WO, 2018/137766,A1(50)

Die im ClotPro® hinterlegten Referenzwerte entstammen gemäß Hersteller einer Untersuchung an 30 gesunden Patienten (siehe *Tabelle 6*, entnommen aus *ClotPro® User Manual, Rev 001, November 2018*). Wie auch beim ROTEM® wurde eine MCF unter 9 mm als „vermindert“ definiert.

Tabelle 6 Normwerte für FIB-test und TPA-test (ClotPro®)

Assay	CT (Sek.)	CFT (Sek.)	A5 (mm)	A10 (mm)	A20 (mm)	MCF (mm)	ML (%)	LT (Sek.)
FIB-Test	51-75	-	7-18	8-20	8-21	9-22	0-1	-
TPA Test	31-57	-	-	-	-	25-52	94-100 %	-

Quelle: *ClotPro® User Manual, Rev 001, November 2018 (49)*

Materialien und Reagenzien

Wie beim ROTEM® stehen auch beim ClotPro®-System verschiedene Reagenzien für verschiedene Testverfahren zur Verfügung. Aktuell verfügbare Reagenzien zeigt *Tabelle 7*. Im Gegensatz zum ROTEM® befinden sich die Reagenzien hier jedoch in getrockneter Form in der Spitze der Pipette, sog. „Active Tip Technology“ laut Hersteller (siehe *Abbildung 16*). Durch Pipettieren der Probe wird das Reagenz automatisch in der Probe gelöst und der Gerinnungsprozess gestartet bzw. je nach Test gewisse Prozesse inhibiert.

Für die vorliegenden Studie wurde folgende Assays und Chargen verwendet:

FIB-test: *FI43801AA, FI43843AA, FI43864AA, FI43913AA, FI43955AA, FI44004AA*

TPA-test: *TP43654AA, TP43850AA, TP43850RR, TP43900AA, TP43969AA*

Tabelle 7 ClotPro® Assays und Reagenzien

Assay	Funktionsweise und Informationsgewinn
EX-test	Nach Rekalzifizierung mittels CaCl ₂ und Heparinantagonisierung mittels Hexadimethrinbromid wird das extrinsische Gerinnungssystem durch rekombinanten Tissue Factor aktiviert.
IN-test	Nach Rekalzifizierung mittels CaCl ₂ wird das intrinsische Gerinnungssystem durch Ellagsäure aktiviert. Es erfolgt keine Heparinantagonisierung.
FIB-test	Erlaubt die Beurteilung einer von Thrombozyten unabhängigen Gerinnung, also vorwiegend der Fibrinogenpolymerisierung. Basierend auf dem EX-test erfolgt eine zusätzliche duale Thrombozytenhemmung mittels Cytochalasin D und einem rekombinanten GP2b3a-Antagonisten.
TPA-test	Aktiviert die Fibrinolyse durch r-tPA und dient dem Nachweis von Antifibrinolytika. Gestartet wird die Gerinnungskaskade durch rekombinanten Tissue Factor.
HI-test	Basiert auf dem IN-test, eine zusätzliche Heparinase deaktiviert jedoch Heparin.
AP-test	Basierend auf dem EX-test kann die Gerinnung nach Hemmung der Fibrinolyse mittels Aprotinin beurteilt werden.
RVV-test	Durch RVV (Russells-Viper-Venom) wird Faktor X und damit die Gerinnung aktiviert. Es dient damit dem Nachweis von Faktor-X-Antagonisten in der Blutprobe.
ECA-test	Enthält Ecarin, es aktiviert Prothrombin und ermöglicht den Nachweis von Dabigatran.
NA-test	Sog. „nicht-aktivierter Test“, die Citratprobe wird nur durch CaCl ₂ rekalzifiziert.

(Informationen der Tabelle entstammen den offiziellen Herstellerangaben auf www.clot.pro)

CaCl₂: Calciumchlorid; r-tPA: recombinant tissue-type plasminogen activator

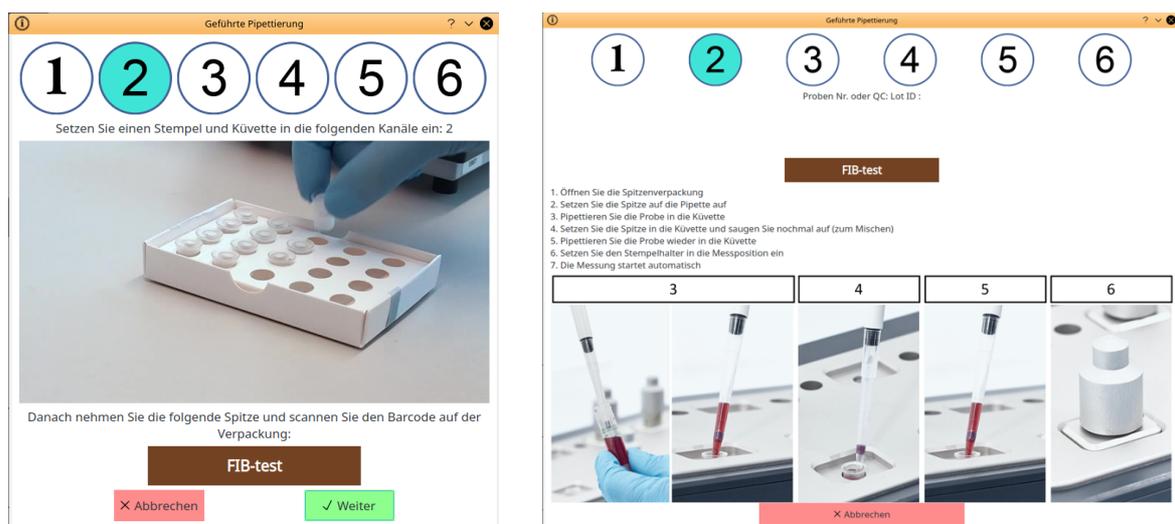
Abbildung 16 FIB-test und TPA-test Reagenz (ClotPro®) mit „active tip technology“



Messablauf

Die zu messenden Proben werden im Instrumentenblock gelagert und gewärmt. Nach Eingabe aller Probandaten und Auswahl des durchzuführenden Tests führt auch beim ClotPro® ein Menü durch alle weiteren Schritte (Abbildung 17). Zunächst werden die Cups und Pins eingesetzt, anschließend das Testreagenz mit dem QR-Code im mitgelieferten Scanner registriert. Die Probe wird mit der automatischen Pipette in die Pipettenspitze gezogen, wo sie sich automatisch mit dem Testreagenz vermischt. Das Gemisch wird in den Cup pipettiert und vor Eintauchen des Stempels zur besseren Durchmischung der Probe und des gelösten Testreagenz nochmals in die Pipette gesaugt und erneut in den Cup abpipettiert. Anschließend wird der Stempel mit dem Pin aufgesetzt und die Messung startet automatisch. Die Pipettenspitze ist Einwegmaterial und wird im Anschluss verworfen.

Abbildung 17 Messablauf am ClotPro® System



Mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von enicor GmbH

Qualitätskontrollen

Qualitätskontrollen wurden am ClotPro® mittels QC1 für Normalwerte und QC2 für pathologische Werte nach den Herstellerangaben regelmäßig durch das Laborpersonal durchgeführt und dokumentiert.

Messung globaler Gerinnungsparameter

Fibrinogenbestimmung

Fibrinogen (Faktor I) ist ein in der Leber synthetisiertes Glykoprotein und ein zentraler Bestandteil der Gerinnung. Durch Thrombin (Faktor II) wird Fibrinogen in Fibrin umgewandelt, welches unter Mitwirkung von Faktor XIII (plättchenstabilisierender Faktor) und Calcium in ein unlösliches, stabiles Fibrinpolymer umgewandelt wird. Die Fibrinpolymerisierung stellt die Endstrecke beider Gerinnungskaskaden (intrinsisch/extrinsisch) dar. Zudem bindet Fibrinogen an den thrombozytären G2b/3a-Rezeptor und hat somit einen Einfluss auf zelluläre Gerinnungsprozesse (40). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die gemessene Clotfestigkeit in viskoelastischen Methoden, insbesondere in den funktionellen Fibrinogenassays, sehr gut mit der laborchemisch gemessenen Fibrinogenkonzentration korreliert (37, 51, 52). Die Messung der Fibrinogenkonzentration erfolgte qualitativ nach der Clauss-Methode sowie abgeleitet von der gemessenen Prothrombinzeit (PZ).

Fibrinogenbestimmung nach der Clauss-Methode

Die Clauss-Methode ist die wohl am häufigsten eingesetzte Methode zur Fibrinogenbestimmung auf Basis eines gerinnungsphysiologischen Testansatzes. Einer verdünnten, thrombozytenarmen Plasmaprobe wird ein Überschuss an Thrombin zugegeben, wodurch die Fibrinpolymerisation initiiert wird. Es existieren verschiedene Detektionsarten der daraufhin einsetzenden Gerinnung (1, 43). Die in dieser Arbeit verwendeten vollautomatischen Gerinnungsanalytoren ACL TOP 500 (Fa. Werfen) und BCS[®] XP (Fa. Siemens) basieren auf der optischen Koagulometrie. Aus der gemessenen Zeit bis zur Bildung eines definierten Fibringerinnsels wird mit Hilfe einer Kalibrationskurve die Fibrinogenkonzentration bestimmt.

Nicht alle Reagenzien sind für die Fibrinogenbestimmung unter supratherapeutischer Heparinkonzentration (z.B. an der HLM) geeignet, da die Konzentration der in den Reagenzien enthaltenen Heparinase variabel ist. Dies kann zu nicht plausiblen Ergebnissen führen (43). So ist beispielsweise das „Fibrinogen-C“ Reagenz (mit dem am ACL TOP 500 gemessen wurde) unempfindlich auf Heparinkonzentration bis 1 U/mL (*Packungsbeilage Fibrinogen-C*) und das Reagenz „Multifibren U“ (mit dem am BCS[®] XP System gemessen wurde) ist unempfindlich gegenüber Heparinkonzentrationen von bis 2 U/mL (*Packungsbeilage Multifibren U*).

In unserer Studie lagen nicht plausible Ergebnisse durch hohe Heparinkonzentrationen bei 8 Proben vor, diese Werte wurden für die Untersuchung ausgeschlossen (siehe oben).

Die Fibrinogenkonzentrationen aus den frischen Plasmaproben (fPPP) wurden im Labor der hämostaseologischen Ambulanz der ATMZH am Analysegerät ACL TOP 500 der Firma Werfen (*Abbildung 18*) bestimmt. Verwendet wurde das Fibrinogen-C Reagenz der Firma HemosIL® (*Chargen: N0184997, N0897764, N1282415*). Die Fibrinogenbestimmung aus den getauten Plasmaproben (gPPP) erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben im Labor der hämostaseologischen Ambulanz. Zusätzlich erfolgte eine zweite Messung der Fibrinogenkonzentration nach der Clauss-Methode aus den gefrorenen Plasmaproben im Labor der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Augsburg am vollautomatischen BCS® XP System der Firma Siemens. Verwendet wurde hier das Multifibren U Reagenz der Firma Siemens (*Charge: 539050*).

Die Clauss-Methode ist keine quantitative Methode wie die ELISA-Bestimmung, sondern beruht auf gerinnungsphysiologischen Ansätzen. Limitationen/Einflüsse auf die Ergebnisse der Clauss-Methode können Faktoren sein, welche die optische Dichte erhöhen (z.B. Hyperlipidämie und Hyperbilirubinämie), siehe Winter et al. (*1*). Diese Störfaktoren waren allerdings nicht zu erwarten.

Abbildung 18 ACL TOP 500



Abgeleitetes Fibrinogen („derived Fibrinogen“)

Das sogenannte abgeleitete Fibrinogen stellt eine weitere Möglichkeit der quantitativen Fibrinogenbestimmung dar. Ausgehend von der Prothrombinzeit (PZ) kann mittels einer Kalibrationssubstanz das in der Probe vorhandene Fibrinogen ermittelt werden (*1*). Die Messung erfolgte ebenfalls am ACL TOP 500 mit dem Thromboplastin enthaltenden RecombiPlasTin 2G-Reagenz der Firma HemosIL® (*Chargen: N0286062, N1182217*).

Bei dem Reagenz handelt es sich um einen lyophilisierten rekombinanten Gewebefaktor (tissue factor) zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems. Während der Gerinnungsbildung wird im ACL TOP 500 die Absorption und Lichtstreuung in Beziehung zur Kalibrationssubstanz gesetzt und somit das abgeleitete Fibrinogen ermittelt (*Packungsbeilage RecombiPlasTin 2G Version 06/2017*).

Weitere Messungen

Prothrombinzeit und aktivierte partielle Thrombinzeit (aPTT)

Bezüglich der Messung der Prothrombinzeit (PZ) am ACL TOP 500 sei auf das vorherige Kapitel zur Messung des abgeleiteten Fibrinogens verwiesen (*S. 37*). Bei der Messung der aPTT wird die Citratplasmaprobe zunächst mit den Phospholipiden inkubiert (Phospholipide stellen die Reaktionsoberfläche für die Kontaktaktivierung dar) und nach einer definierten Zeit mit Calcium versetzt. Dies initiiert die intrinsische Gerinnungskaskade und die entstehende Gerinnungsbildung wird gemessen. (*Packungsbeilage SythASil Version 06/2017*). Die aPTT wurde ebenfalls am ACL TOP 500 gemessen. Verwendet wurde dafür das SythASil-Reagenz der Firma HemoSIL[®] (Chargen: *N0898100, N0980978*).

Automatisierte Zellzählung

Neben den Faktoren der plasmatischen Gerinnung spielen auch die zellulären Bestandteile des Blutes, insbesondere die Erythrozyten bzw. der Hämatokrit und die Thrombozyten eine entscheidende Rolle für die Hämostase (*53-55*). Dementsprechend erfolgte für die Auswertung der Daten zusätzlich die vollautomatische Zellzählung aus den EDTA-Proben mittels Hämatologieanalysator KX-21 der Firma Sysmex, siehe *Abbildung 19*. Die hiermit erhobenen Parameter umfassten die Erythrozytenzahl ($10^6/\mu\text{L}$), Hämoglobin (g/dL) und Hämatokrit (%) sowie Thrombozytenzahl ($10^3/\mu\text{L}$) und Leukozytenzahl ($10^3/\mu\text{L}$). Entsprechend der Gebrauchsanweisung des KX-21 wird zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration nach Lyse der Erythrozyten das am Häm-Molekül gebundene Eisen durch Zugabe zweier Ammoniumsalze oxydiert und anschließend photometrisch bei 555 nm gemessen. Die Messungen der Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen basieren demgegenüber auf einer elektronischen Widerstandsmessung nach Verdünnung der zu messenden Probe mit einer leitenden Flüssigkeit, dem Cellpack. Mittels sogenannter kumulativer Impulshöhenmessung wird im weiteren Verlauf aus diesen Daten auch der Hämatokrit berechnet.

Die Qualitätskontrollen des Geräts wurden mittels X-Kontrolle und speziellem Kontrollblut (Eightcheck-3WP) entsprechend der Herstellerangaben regelmäßig nach laborinternen Standards durchgeführt.

Abbildung 19 Hämatologieanalysator KX-21 (Sysmex)



Ein- und Ausschlusskriterien

Primäres Ziel war der direkte Vergleich der MCF in der Vollblutprobe mit der zugehörigen Plasmaprobe (fPPP und gPPP) unabhängig von anthropometrischen/demographischen Daten oder der klinischen Situation. Eingeschlossen wurden alle Proben von Patienten über 18 Jahren, mit vorliegender schriftlicher Aufklärung. Falsch gefüllte (über- oder unterfüllte) Citratproben wurden verworfen und nicht verwendet. Zur Sicherstellung der Probenstabilität wird aktuell empfohlen, dass Gerinnungsproben innerhalb von 4 Stunden zu verarbeiten sind (CLSI-Guidelines). Durch Verzögerungen im OP oder Notfalloperationen am Wochenende und in der Nacht kam es bei einigen Proben jedoch vereinzelt zu längeren Liegezeiten. Diese Proben wurden auch verarbeitet, jedoch entsprechend gekennzeichnet und in der Auswertung separat analysiert.

Datenanalyse

Allgemeines

Die Datenbank wurde mit Excel (Version 16.44, Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt. Die dabei erhobenen Parameter können der *Tabelle 2* entnommen werden. Für die weitere statistische Analyse wurde die Excel-Datei in SPSS Statistics (Version 26, IBM Corporation, Armonk, USA) importiert.

Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die erhobenen Parameter zunächst auf das Vorliegen einer Normalverteilung hin geprüft. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese (es liegt eine Normalverteilung vor) verworfen. Abhängig von der Verteilung der Messwerte erfolgte die Angabe der Lagemaße entweder als Mittelwert \pm Standardabweichung oder als Median mit dem dazugehörigen Interquartilabstand (IQA).

Bei zwei unverbundenen Stichproben und Vorliegen einer Normalverteilung wurden die Mittelwerte mit dem t-Test verglichen und bei nicht normalverteilten Parametern wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Zwei verbundene Stichproben wurden je nach Verteilung entweder mit dem t-Test für verbundene Stichproben (bei Vorliegen einer Normalverteilung) oder dem Wilcoxon-Test (keine Normalverteilung) analysiert. Bei mehreren (> 2) zu vergleichenden und nicht normalverteilten Stichproben kam entweder der H-Test nach Kruskal und Wallis (unabhängige Proben) oder der Friedman-Test (verbundene Proben) zum Einsatz.

Die Nullhypothese N_0 geht davon aus, dass kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Stichproben vorliegt. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen und angenommen, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen vorlag. Damit lag der Fokus der statistischen Untersuchung auf der Vermeidung des Alpha-Fehlers (Fehler 1. Art), also die Nullhypothese zu verwerfen, obwohl sie richtig war. Im Allgemeinen wird folgende Nomenklatur für die Signifikanz verwendet (56):

$p < 0,05$:	signifikant	(*)
$p < 0,01$:	sehr signifikant	(**)
$p < 0,001$:	höchst signifikant	(***)

Weitere Schritte in SPSS umfassten die Korrelationsanalysen. Bei normalverteilten Parametern wurde der Pearson-Koeffizient, ansonsten der Spearman-Koeffizient bestimmt, um die Stärke eines Zusammenhangs quantitativ zu beschreiben. Graphisch wurden die Sachverhalte als Punkt- bzw. Streudiagramm dargestellt. Für die Korrelationsstärke wurde folgende Nomenklatur verwendet (56):

r bis 0,5:	geringe Korrelationsstärke
r bis 0,7:	mittlere Korrelationsstärke
r bis 0,9:	hohe Korrelationsstärke
r über 0,9:	sehr hohe Korrelationsstärke

In weiterer Folge wurde bei korrelierenden Parametern zusätzlich eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, um die Art des Zusammenhangs zu beschreiben. Je nach Parameter kam die einfache lineare Regression ($y = b * x + a$) oder die multiple, schrittweise lineare Regression ($y = b_1 * x_1 + \dots + b_n * x_n + a$) unter Verwendung mehrerer unabhängiger Variablen in SPSS zum Einsatz. Für die Güte bzw. Genauigkeit der Regressionsgeraden wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben (56). Mithilfe der Regressionsgleichung wurden neue Variablen berechnet, z. B. „predicted values“.

Mittels Bland-Altman-Diagramm wurden zwei Messdifferenzen miteinander verglichen und so beispielsweise auf das Vorliegen einer systematischen Abweichung hin untersucht. Die im Allgemeinen als akzeptable Schwankung betrachteten Bereiche innerhalb $\pm 1,96 * \text{Standardabweichung}$ um den Mittelwert sind nur bei Vorliegen einer Normalverteilung der Messdifferenzen verwertbar (57).

Darüber hinaus wurden verbundene Stichproben mit dichotomen Variablen mittels Chi-Quadrat-Test nach McNemar analysiert und bei unabhängigen dichotomen Variablen der klassische Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewandt.

Für die Auswertung wurden zusätzlich zu den erhobenen Messparametern weitere Variablen für die statistische Auswertung berechnet. Diese werden im Folgenden am Beispiel der Maximalen-Clot-Firmness (MCF) dargestellt:

Berechnete Parameter

Absolute Differenzen zweier Messungen:

$$\Delta \text{MCF}_1 = \text{MCF}_{\text{Frischplasma}} - \text{MCF}_{\text{Vollblut}}$$

$$\Delta \text{MCF}_2 = \text{MCF}_{\text{Batch}} - \text{MCF}_{\text{Frischplasma}}$$

$$\Delta \text{MCF}_3 = \text{MCF}_{\text{Batch}} - \text{MCF}_{\text{Vollblut}}$$

Relative Differenz zweier Messungen:

$$\% \Delta \text{MCF}_1 = \left(\frac{100}{\text{MCF}_{\text{Vollblut}}} \times \text{MCF}_{\text{Frischplasma}} \right) - 100$$

$$\% \Delta \text{MCF}_2 = \left(\frac{100}{\text{MCF}_{\text{Frischplasma}}} \times \text{MCF}_{\text{Batch}} \right) - 100$$

$$\% \Delta \text{MCF}_3 = \left(\frac{100}{\text{MCF}_{\text{Vollblut}}} \times \text{MCF}_{\text{Batch}} \right) - 100$$

Variationskoeffizient mehrerer Messungen:

Die Berechnung der VK erfolgte automatisiert mithilfe der Cfvar-Funktion in SPSS, dieser Funktion liegt folgender Rechenschritt zugrunde:

$$VK_1 = \frac{\text{Standardabweichung} (\text{MCF}_{\text{Vollblut}} + \text{MCF}_{\text{Frischplasma}})}{\text{Mittelwert} (\text{MCF}_{\text{Vollblut}} + \text{MCF}_{\text{Frischplasma}})}$$

$$VK_2 = \frac{\text{Standardabweichung} (\text{MCF}_{\text{Frischplasma}} + \text{MCF}_{\text{Batch}})}{\text{Mittelwert} (\text{MCF}_{\text{Frischplasma}} + \text{MCF}_{\text{Batch}})}$$

$$VK_3 = \frac{\text{Standardabweichung} (\text{MCF}_{\text{Vollblut}} + \text{MCF}_{\text{Batch}})}{\text{Mittelwert} (\text{MCF}_{\text{Vollblut}} + \text{MCF}_{\text{Batch}})}$$

Ergebnisse

Übersicht über das Probenmaterial

Es wurden insgesamt 123 Proben gesammelt und gemessen. 23 Proben konnten erst 4 Stunden nach der Blutabnahme verarbeitet werden und wurden zunächst ausgeschlossen. Somit wurden insgesamt 100 Proben für die folgende statistische Auswertung eingeschlossen.

Eine detaillierte Übersicht über die Probenherkunft gibt *Tabelle 3* im Abschnitt Methoden. Die ersten 10 gemessenen Proben aus dem OP wurden während der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) abgenommen und enthielten entsprechend supratherapeutische Heparinkonzentrationen. Hieraus resultierten bei 8 Proben zunächst nicht plausible Fibrinogenwerte (nach Clauss und abgeleitet). Die Konzentration der Heparinase in den funktionellen Fibrinogenassays der VEM war jedoch ausreichend, um die Heparinwirkung vollständig zu neutralisieren. Die Fibrinogenwerte dieser Proben wurden nicht in die statistische Untersuchung eingeschlossen („listenweiser Fallausschluss“ in SPSS). Die plausiblen Werte der viskoelastischen Messungen wurden eingeschlossen. Der Abnahmezeitpunkt der intraoperativen Proben wurde daraufhin aber neu gewählt (*siehe Methoden*). Damit wurden letztlich 45 Proben nach der Protaminfusion und unmittelbar nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation abgenommen. 15 Proben stammten von postoperativen Patienten auf der Intensivstation (2-3 Tage nach OP). In 7 Fällen war eine Herz-Lungen-Maschine während der Operation nicht notwendig gewesen und die Probe wurde gegen Ende der Operation abgenommen. 20 Proben stammten von Patienten der hämostaseologischen Ambulanz der ATMZH und weitere 3 Proben wurden von gesunden Probanden zur Verfügung gestellt.

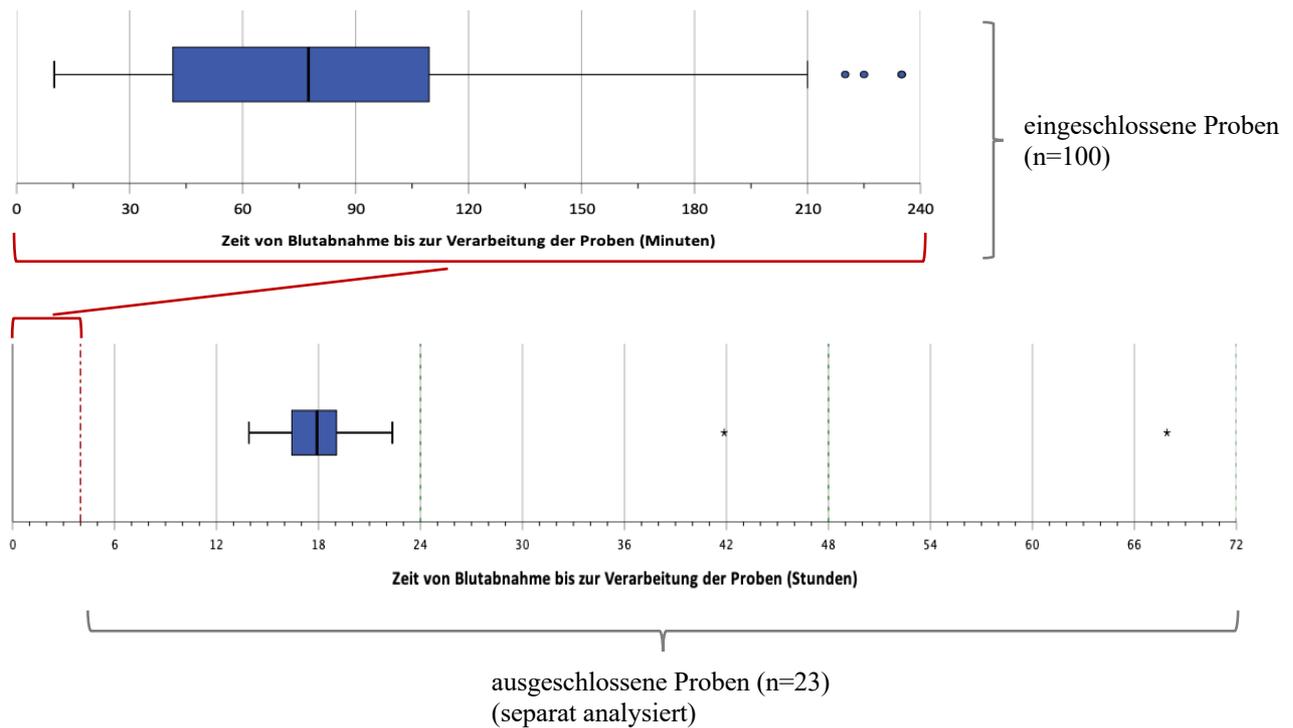
Die mediane Zeit bis zur Verarbeitung der Proben nach Blutentnahme betrug 77,5 Minuten (IQA: 69 Minuten) und maximal 235 Minuten (*Abbildung 20* und *Tabelle 8*). Die Messung im Batchverfahren fand im Median nach 33 Tagen (IQA: 8 Tage) statt.

Tabelle 8 Übersicht über die Dauer bis zur Verarbeitung der eingeschlossenen Proben

	n	Min.	Max.	Median	IQA	Mean	STD
Initiale Verarbeitung (Minuten)	100	10	235	77,5	69	85	55
Messung im Batchverfahren (Tage)	100	11	66	33	8	34	11

Beide Parameter waren nicht normalverteilt ($p < 0,001$)

Abbildung 20 Zeit von Blutabnahme bis zur Verarbeitung der Proben (Übersicht)



Nur ein Bruchteil der intraoperativen Patienten, deren Proben entnommen wurden ($n = 5$), erhielten vor Blutabnahme Hydroxyethylstärke (HES). Demgegenüber erhielt aber die überwiegende Mehrheit der Probenspender aus der Herzkllinik am Augustinum ($n = 57$) Tranexamsäure vor Abnahme der Blutprobe (in der Regel ca. 4 g intraoperativ). Bei 11 Proben wurde PPSB und bei 5 Proben Fibrinogen vor Blutabnahme verabreicht.

Die Antagonisierung der Heparinwirkung nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation erfolgte mit Protamin im Verhältnis 1:1 zu der vorher verabreichten Heparinmenge.

Tabelle 9 präsentiert die gemessenen Parameter und die Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Mit Ausnahme der Thrombozytenzahl zeigten alle Parameter eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung.

Tabelle 9 Gemessene Parameter und Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests

Intervallskaliertes Parameter	Probenmaterial
Fibrinogen Clauss (ACL TOP)	fPPP (p=0,004), gPPP (p<0,001)
abgeleitetes Fibrinogen (ACL TOP)	fPPP (p<0,001), gPPP (p<0,001)
aPTT (ACL TOP)	fPPP (p<0,001), gPPP (p<0,001)
Quick/ PZ (ACL TOP)	fPPP (p=0,005), gPPP (p=0,012)
Fibrinogen Clauss (BCS XP)	gPPP (p<0,001)
MCF im FIBTEM	Vollblut (p=0,001), fPPP (p=0,027), gPPP (p=0,011)
MCF im FIB-test	Vollblut (p<0,001), fPPP (p<0,001), gPPP (p=0,005)
CT im FIBTEM	Vollblut (p=0,017), fPPP (p<0,001), gPPP (p<0,001)
CT im FIB-test	Vollblut (p<0,001), fPPP (p<0,001), gPPP (p<0,001)
ML im TPA-test	Vollblut (p<0,001), fPPP (p<0,001), gPPP (p<0,001)
Hämoglobinkonzentration	Vollblut (p=0,002)
Thrombozytenzahl	Vollblut (p=0,200)
Verarbeitungszeit	p=0,006
Zeit bis Batch	p<0,001

Intraoperatorvariabilität bzw. Messpräzision

Probenmaterial (ca. 30 ml Vollblut) wurde von drei gesunden Probanden genommen, um die Intraoperatorvariabilität der Messungen anhand einer 3 x 3 Matrix abschätzen zu können und die Variationskoeffizienten (VK) zu berechnen.

Die Zeit bis zur Verarbeitung der Proben betrug maximal 35 Minuten. ClotPro[®]-Messungen dauerten 30 Minuten, ROTEM[®]-Messungen zwischen 45 und 60 Minuten. Die Zeit bis zur Messung der getauten Plasmaproben im Batchverfahren lag zwischen 11 und 20 Tagen.

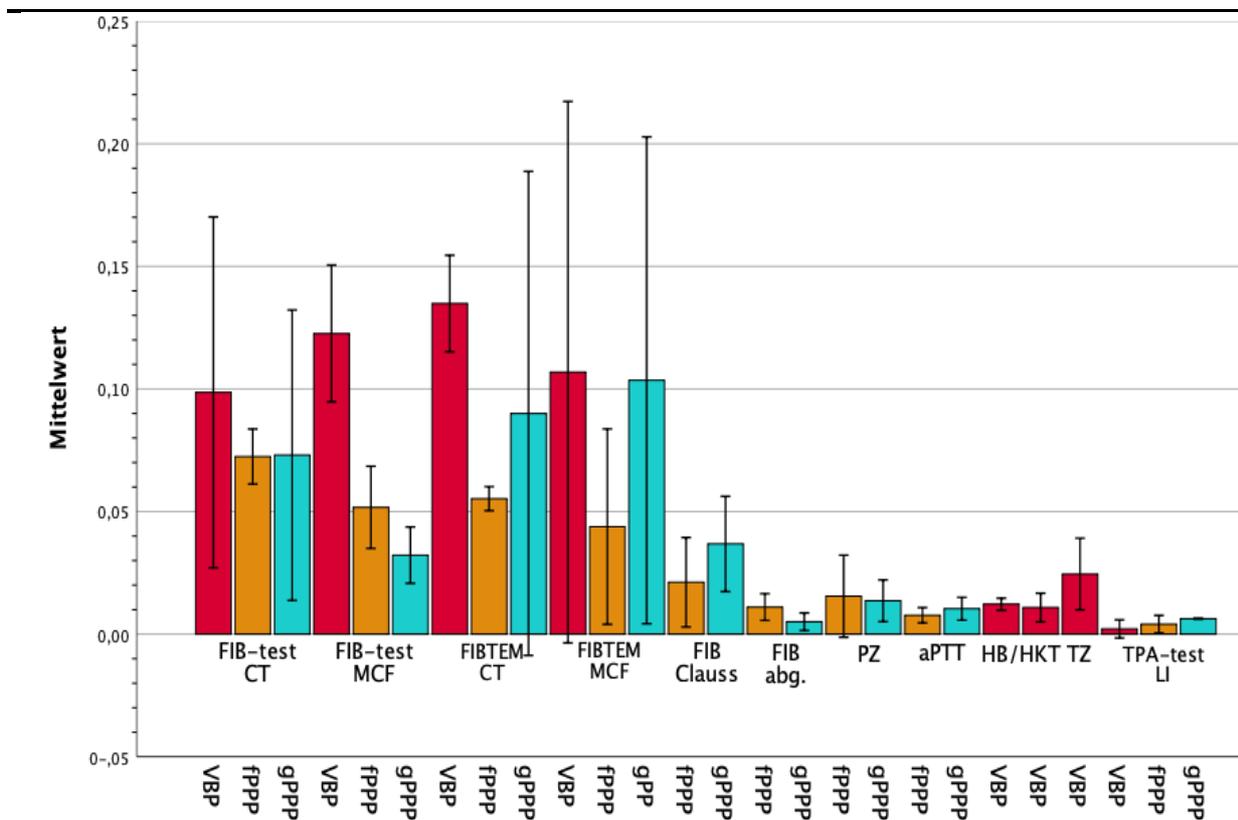
Beide viskoelastischen Methoden zeigten in den Vollblutproben höhere Variationskoeffizienten als in den zugehörigen Plasmaproben. Durchschnittlich lag der VK der MCF-Messung im Vollblut bei ca. 10 % für beide Geräte. Die Messungen der Globaltests zeigten im Vergleich geringere Messabweichungen mit durchschnittlichen VK zwischen 1 und 4 % (Tabelle 10). Abbildung 21 bildet die Mittelwerte der Variationskoeffizienten mit einfacher Standardabweichung (STD) aller Messungen graphisch dar.

Tabelle 10 Messpräzision der einzelnen Verfahren in Abhängigkeit von der Probe (Mittelwerte \pm SD)

		Vollblut	fPPP	gPPP
ClotPro[®]	FIB-test (CT)	0,10 (\pm 0,07)	0,07 (\pm 0,01)	0,07 (\pm 0,06)
	FIB-test (MCF)	0,12 (\pm 0,03)	0,05 (\pm 0,02)	0,03 (\pm 0,01)
	TPA-test (LI)	0,00 (\pm 0,00)	0,00 (\pm 0,00)	0,01 (\pm 0,00)
ROTEM[®]	FIBTEM (CT)	0,14 (\pm 0,02)	0,06 (\pm 0,01)	0,09 (\pm 0,10)
	FIBTEM (MCF)	0,11 (\pm 0,11)	0,04 (\pm 0,04)	0,10 (\pm 0,10)
ACL	Clauss Fibrinogen		0,02 (\pm 0,02)	0,04 (\pm 0,02)
TOP	abgeleitetes Fibrinogen		0,01 (\pm 0,01)	0,01 (\pm 0,00)
	Quick/ PZ		0,02 (\pm 0,02)	0,01 (\pm 0,01)
	aPTT		0,01 (\pm 0,00)	0,01 (\pm 0,01)
Symex	Hämatokrit	0,01 (\pm 0,01)		
	Hämoglobin	0,01 (\pm 0,00)		
	Thrombozyten	0,03 (\pm 0,01)		

fPPP: frische plättchenarme Plasmaprobe; gPPP: getaute plättchenarme Plasmaprobe

Abbildung 21 Variationskoeffizienten der Dreifachmessungen



Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung

HB: Hämoglobin, HKT: Hämatokrit, TZ: Thrombozyten

VPB (Rot): Vollblutprobe, fPPP (Orange) frische Plasmaprobe, gPPP (Türkis): getaute Plasmaprobe

Plasmatische Gerinnung und zelluläre Parameter

Fibrinogen, Quick und aPTT

Für das Gesamtkollektiv der Proben konnte ein Fibrinogenbereich (*nach Clauss*) von 140 – 632 mg/dL abgedeckt werden (siehe *Tabelle 11*). Einen graphischen Überblick über die Verteilung der Fibrinogenwerte in den frischen und getauten Plasmaproben liefert *Abbildung 22*. Beim Vergleich der Mediane im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben zeigten sich, trotz der in *Abbildung 22* optisch kaum wahrnehmbaren Unterschiede, zwischen frischer und getauter Plasmaprobe statistisch höchst signifikante Unterschiede (*Tabelle 11*). Auch zwischen den am ACL TOP 500 und am BCS XP gemessenen Fibrinogenwerten (*nach Clauss*) bestanden statistisch höchst signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Tabelle 11 Explorative Datenanalyse der plasmatischen Gerinnungsparameter

Messgerät	Parameter	Material	n	Min.	Max.	Median	IQA	Wilcoxon	Spearman	
ACL TOP 500	Fibrinogen (Clauss)	fPPP	86	140	632	256	120	$p < 0,001$	$r = 0,953$	
		gPPP	86	129	613	239	108			
	Fibrinogen (abgeleitet)	fPPP	87	185	902	343	153	$p = 0,002$	$r = 0,957$	
		gPPP	87	170	879	333	141			
	PZ/Quick		fPPP	79	38	123	79	46	$p < 0,001$	$r = 0,966$
			gPPP	79	28	119	73	48		
aPTT		fPPP	79	23	95	31	13	$p < 0,001$	$r = 0,767$	
		gPPP	79	25	146	34	14			
BCS XP	Fibrinogen (Clauss)	gPPP	97	118	711	245	143	$p < 0,001^*$	$r = 0,941^*$	

fPPP: frische Plasmaprobe, gPPP: getaute Plasmaprobe im Batchverfahren, n: Anzahl, IQA: Interquartilabstand

Einheiten: Fibrinogen Clauss und abgeleitet (mg/dL), PZ/Quick (%), aPTT (Sekunden)

Wilcoxon/ Spearman: Vergleich bzw. Korrelation zwischen frischer und getauter Plasmaprobe

** im Vergleich mit Fibrinogen nach Clauss im ACL TOP aus getauter Plasmaprobe*

Die Korrelationen der Messwerte zwischen frischer und getauter Plasmaprobe waren für alle gemessenen Parameter der Globaltests sehr stark (siehe *Tabelle 11* und *Abbildung 23a-d*). Die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Verfahren zur Fibrinogenbestimmung zeigten ebenfalls starke Korrelationen untereinander. Die Korrelation zwischen Fibrinogen nach Clauss und dem abgeleiteten Fibrinogen ($r = 0,950$; $p < 0,001$) ist in *Abbildung 24* und die Korrelation zwischen der Fibrinogenmessung am ACL TOP 500 und am BCS XP ($r = 0,941$; $p < 0,001$) in *Abbildung 25* dargestellt.

Abbildung 22 Übersicht über die gemessenen Fibrinogenwerte

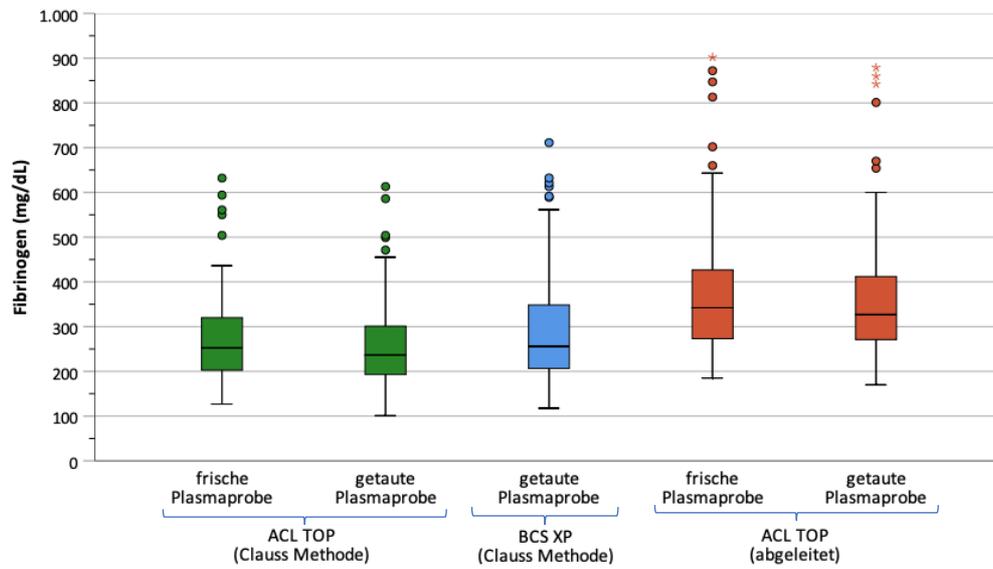
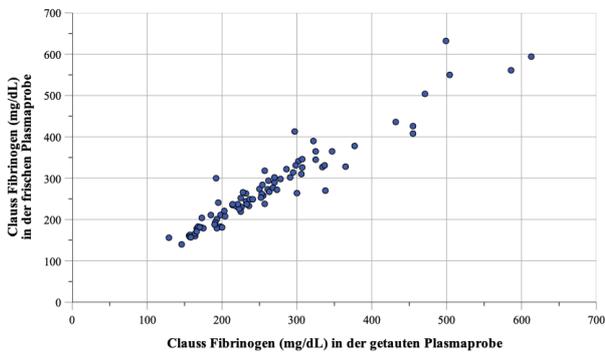
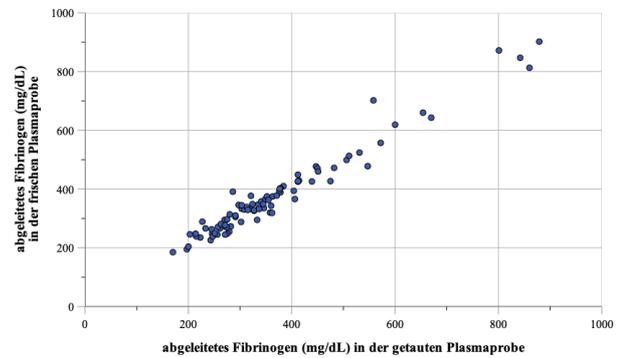


Abbildung 23 Globaltests: Korrelationen zwischen frischer und getauter Plasmaprobe

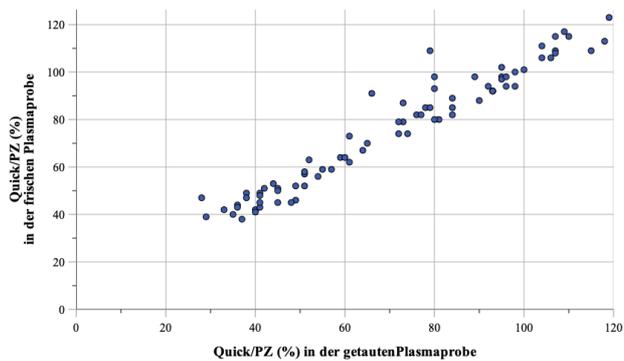
a) Fibrinogen nach Claus



b) abgeleitetes Fibrinogen



c) Prothrombinzeit/ Quick



d) aPTT

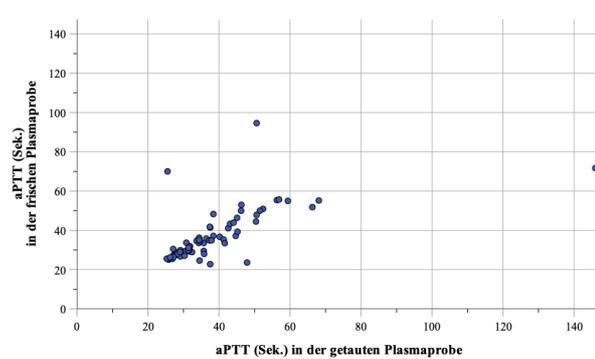


Abbildung 24 Korrelation zwischen Clauss Fibrinogen und abgeleitetem Fibrinogen

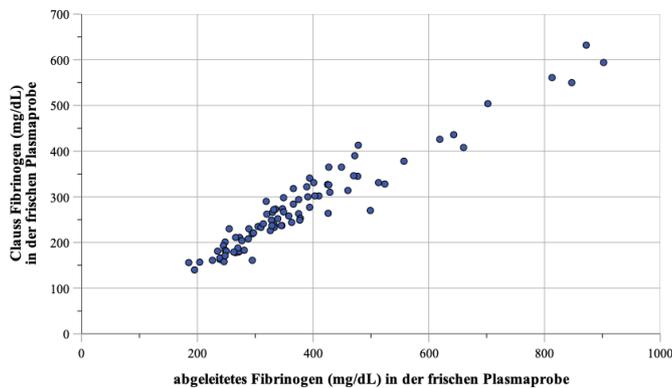
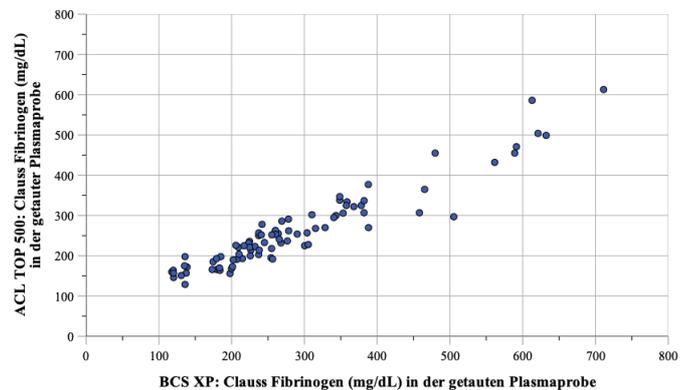


Abbildung 25 Korrelation zwischen Clauss Fibrinogen am ACL TOP und BCS XP



Zwischen den gemessenen Fibrinogenwerten und den Globaltests PZ/Quick und aPTT bestanden nur sehr schwache Korrelationen, siehe [Tabelle 12](#).

Tabelle 12 Korrelation zwischen Fibrinogen und den anderen SLTs

	Fibrinogen nach Clauss	Fibrinogen abgeleitet
PZ/Quick	$r = 0,430$ $p < 0,001$	$r = 0,343$ $p = 0,002$
aPTT	$r = - 0,314$ $p < 0,005$	$r = - 0,288$ $p < 0,010$

Der Variationskoeffizient zwischen der Fibrinogenmessung (Clauss) in frischer und getauter Plasmaprobe lag im Median bei 0,04 (IQA: 0,06) und maximal bei 0,31. Die entsprechende prozentuale Abweichung vom Ausgangswert lag im Median bei $- 4\%$ (IQA 8,8%). Die maximale Abweichung der getauten Plasmaprobe zum Ausgangswert in der frischen Plasmaprobe betrug $- 36\%$ (siehe [Tabelle 13](#)).

Es bestand kein Zusammenhang ($r = -0,287$) zwischen der Höhe der Fibrinogenkonzentration nach Clauss und der absoluten Differenz zur getauten Plasmaprobe (siehe [Abbildung 26](#)).

Mit Ausnahme der aPTT lagen die Messergebnisse in den getauten Plasmaproben häufig geringfügig unter den Messergebnissen in den frischen Plasmaproben ([Abbildung 27](#)). Der VK der Messungen zwischen frischen und getauten Plasmaproben lag zu großen Teilen (mindestens 75 % der Messungen) unter 0,1 bzw. 10%, siehe [Abbildung 28](#).

Tabelle 13 VK und prozentuelle Abweichungen (%) der SLTs zwischen frischen und getauten Proben

Abweichung (%) (Variationskoeffizient)	n	Min.	Max.	Median	IQA	Mean	STD
Clauss Fibrinogen	90	-36 % (0)	+25 % (0,31)	-4 % (0,04)	8,8 % (0,06)	-4,5 % (0,06)	8,9 % (0,05)
abgeleitetes Fibrinogen	89	-27 % (0)	+14 % (0,22)	-3 % (0,03)	8,7 % (0,05)	-2,3 % (0,05)	8 % (0,04)
PZ/ Quick	79	-40 % (0)	+7 % (0,36)	-6 % (0,05)	11 % (0,08)	-7,2 % (0,06)	8,8 % (0,07)
aPTT	79	-64 % (0)	+104 % (0,66)	2 % (0,03)	8 % (0,07)	5,8 % (0,07)	21,8 % (0,12)

Abbildung 26 Fibrinogen nach Clauss und Differenz zu getauter Plasmaprobe

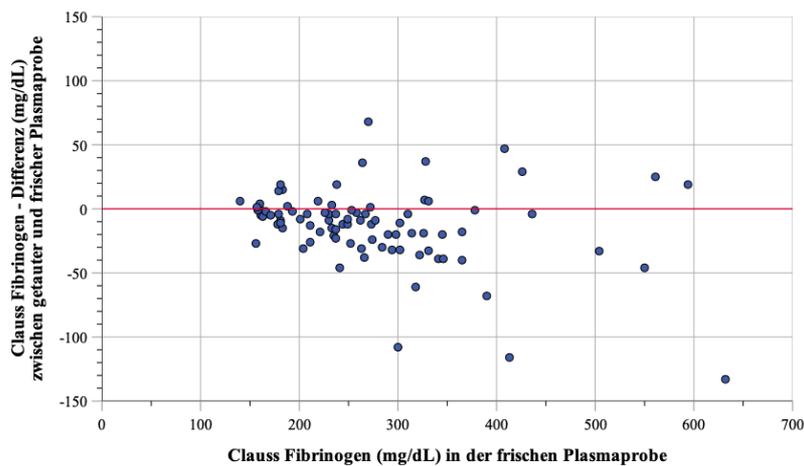


Abbildung 27 Globaltests: Messdifferenzen zwischen frischer und getauter Plasmaprobe

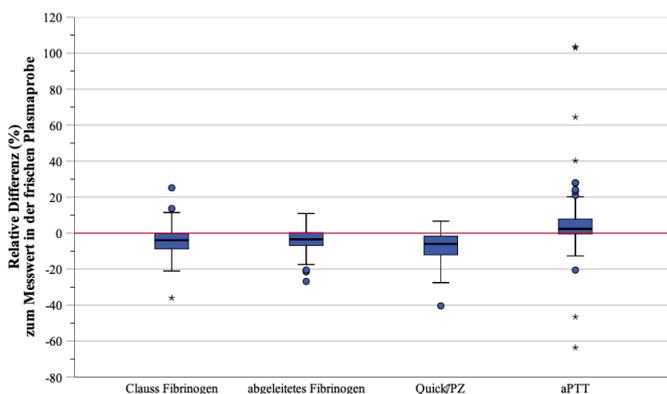
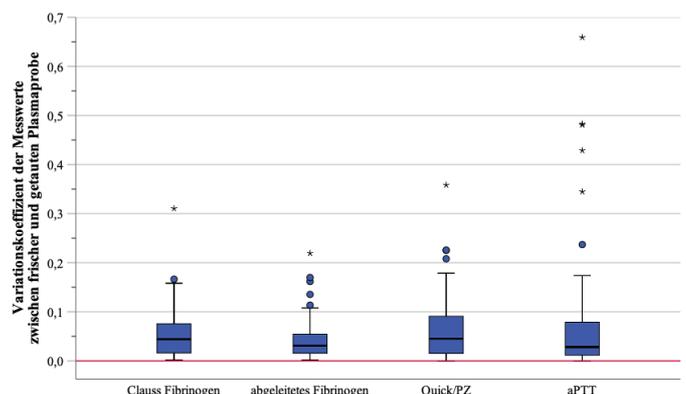


Abbildung 28 Globaltests: VK zwischen frischer und getauter Plasmaprobe



Hämatokrit, Hämoglobin und Thrombozyten

Insgesamt waren bei 99 Proben vollständige Messergebnisse vorhanden. Die mediane Hämoglobinkonzentration des Probenkollektivs lag bei 10,5 g/dL (IQA: 3,1). Die Thrombozytenzahl lag durchschnittlich bei 167.767 pro Milliliter (\pm 96.619). Zwischen Erythrozytenzahl und Thrombozytenzahl bestand eine schwache, aber statistisch signifikante Korrelation ($r = 0,519$; $p < 0,001$; *Abbildung 30*). *Tabelle 14* und *Abbildung 29* liefern eine detaillierte Übersicht über die Verteilung der erhobenen Parameter im untersuchten Probenmaterial.

Tabelle 14 Ergebnisse der explorativen Datenanalyse aus dem Blutbild

Blutbild	n	Min.	Max.	Median	IQA	Mean	STD
Hämoglobin (g/dL)	99	7.7	20,3	10,5	3,1	11,2	2,4
Hämatokrit (%)	99	21,5	57,5	30,7	8,4	32,1	6,3
Thrombozyten*	99	12.000	577.000	176.000	138.000	167.767	96.619
Leukozyten*	99	3.700	36.000	12.600	9.800	13.231	6.766

*Einheiten: Anzahl/mL

Abbildung 29 Überblick über die Verteilung der hämatologischen Parameter

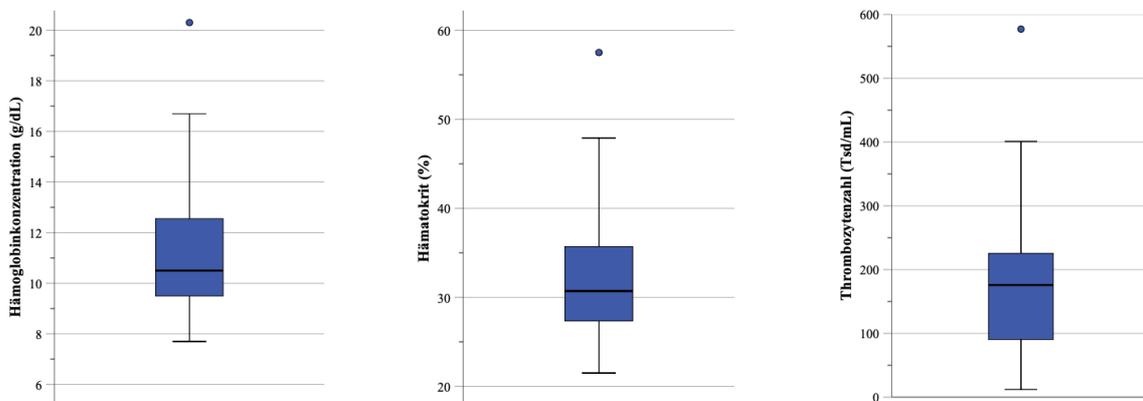
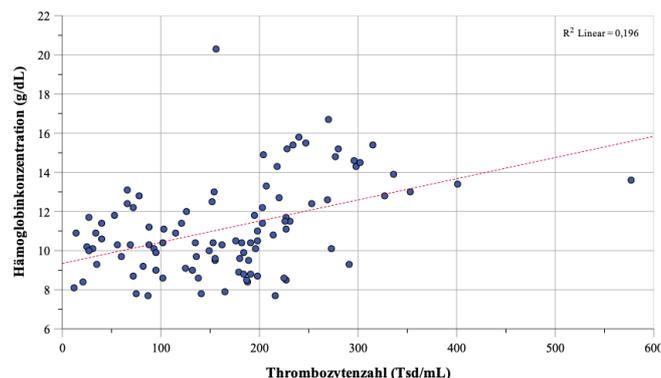


Abbildung 30 Korrelation zwischen Hämoglobinkonzentration und Thrombozytenzahl



Ergebnisse der viskoelastischen Messungen

ClotPro®

Allgemeine Angaben zu den Proben

Die Messdauer oder auch „running-time“ (RT) für den FIB-test beträgt maximal 30 Minuten. Diese Zeit wurde bei allen Proben eingehalten. Die Messdauer für den TPA-test beträgt bis maximal 60 Minuten. Bei Auftreten einer vollständigen Fibrinolyse ($ML > 94\%$) wurde der Test vor Ablauf der 60 Minuten abgebrochen, jedoch nicht vor 30 Minuten.

Die Variable ML wurde für die statistische Auswertung zudem in eine dichotome Variable transformiert: $ML < 94\%$ „unvollständige Lyse“ und $ML > 94\%$ „vollständige Lyse“ (siehe Methoden).

Bei einer Probe fehlten FIB-test und TPA-test in der Vollblutmessung, somit beläuft sich die verbleibende Anzahl an durchgeführten FIB-tests auf $n = 99$. Bei weiteren 10 Proben erfolgte keine TPA Messung im Vollblut und in der frischen Plasmaprobe aufgrund von fehlenden Reagenzien. Hier ergibt sich für den TPA-test eine Anzahl von $n = 89$ Messungen (siehe [Tabelle 15](#)). Für vergleichende statistische Untersuchungen wurden Proben mit fehlenden Werten ausgeschlossen („listenweiser Fallausschluss“ in SPSS).

Tabelle 15 Anzahl der untersuchten Proben im FIB-test und TPA-test

Assay:	Vollblutprobe	frische Plasmaprobe	getaute Plasmaprobe
FIB-test (n)	99	100	100
TPA-test (n)	89	90	91

Die Verteilung der erhobenen Parameter (CT, MCF und ML) zeigten im Kolmogorov-Smirnov-Test eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung ([Tabelle 9](#)).

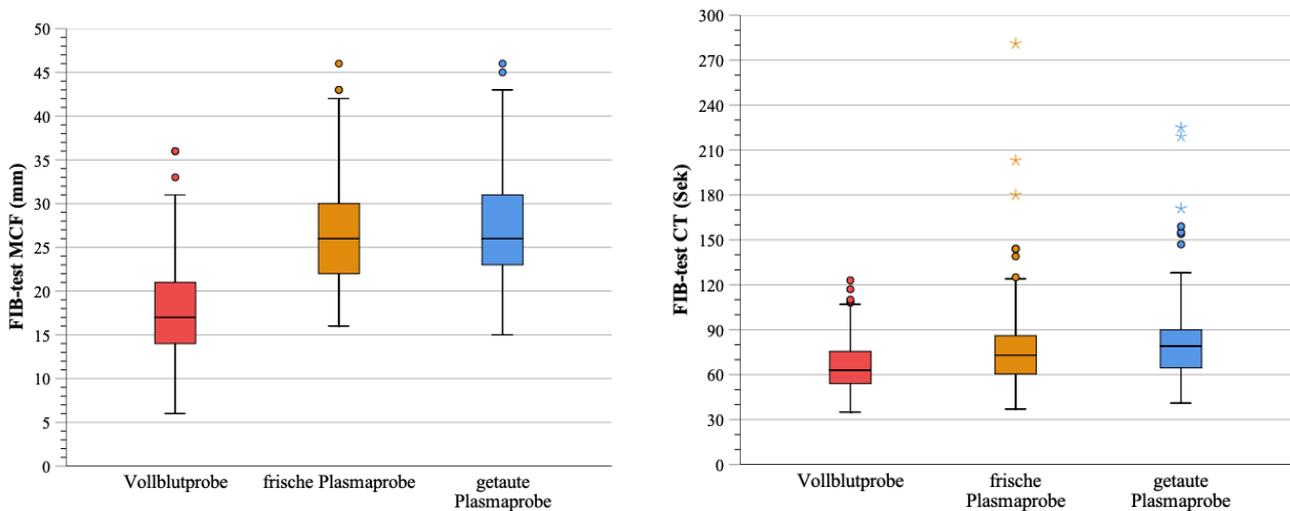
Deskriptive Datenanalyse

[Tabelle 16](#) präsentiert die Ergebnisse der explorativen Datenanalyse der untersuchten Parameter im ClotPro® in Abhängigkeit vom Probenmaterial (Vollblut, frische bzw. getaute Plasmaprobe). [Abbildung 31](#) veranschaulicht diese Daten graphisch anhand von Boxplot-Diagrammen.

Tabelle 16 Deskriptive Statistik der gemessenen Parameter am ClotPro®

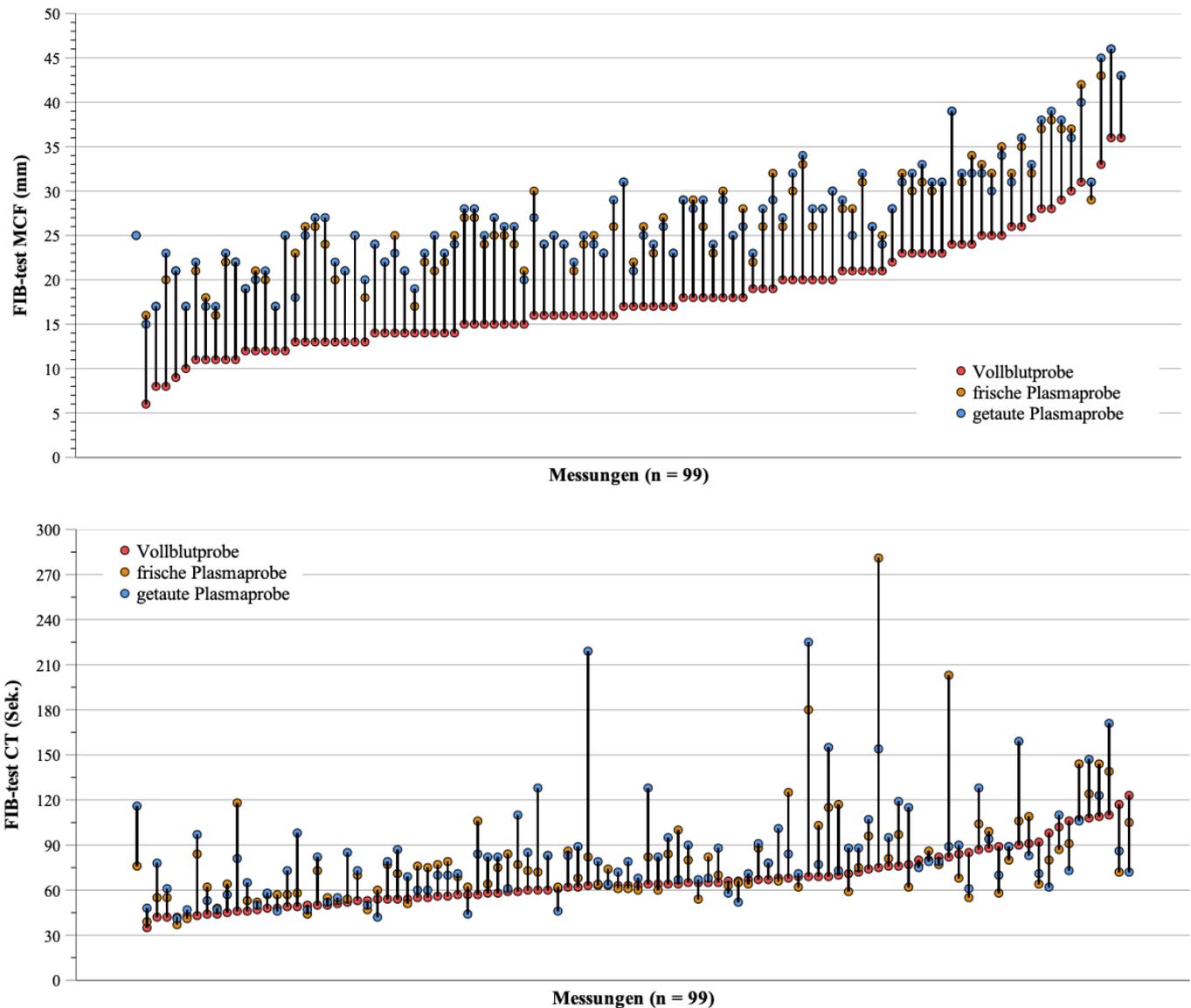
Parameter	Material	n	Min.	Max.	Median	IQA	Mean	STD
FIB-test MCF (mm)	Vollblutprobe	99	6	36	17	7	18,1	6,2
	frische Plasmaprobe	99	16	46	26	8	26,7	6,3
	getaute Plasmaprobe	99	15	46	26	8	26,9	6,2
FIB-test CT (Sek.)	Vollblutprobe	99	35	123	63	22	66,8	18,6
	frische Plasmaprobe	99	37	281	73	26	80,2	34,4
	getaute Plasmaprobe	99	41	225	79	26	84,0	33,2
TPA-test ML (%)	Vollblutprobe	89	0	97	8	91	38,9	43,5
	frische Plasmaprobe	89	0	97	2	93	36,8	44,8
	getaute Plasmaprobe	89	0	96	0	93	35,3	45,1

Abbildung 31 Verteilung der MCF- und CT-Werte im FIB-test



Die gemessenen Werte der MCF und CT waren in den Plasmaproben gegenüber den Vollblutproben häufig erhöht (Abbildung 31). Diese Differenz zeigte sich auch eindrucksvoll bei Betrachtung im Liniendiagramm. Mit einer Ausnahme (Probe HCl_097) zeigte sich ein konstant erhöhter Wert der MCF in den Plasmaproben (Abbildung 32 oben). Die Ergebnisse der CT lagen optisch betrachtet zwar enger beieinander, zeigten mitunter aber eine größere Streuung und stärker ausgeprägte Extremwerte (Abbildung 32 unten).

Abbildung 32 FIB-test: MCF und CT im Vollblut und getauten Plasma



Anwendung statistischer Tests und Korrelationsanalysen

Der in *Abbildung 31* optisch sichtbare Unterschied der FIB-test-MCF zwischen den einzelnen Proben (Vollblut, frische und getaute Plasmaprobe) bestätigte sich auch statistisch im Friedmann-Test für mehrere verbundene Stichproben ($p < 0,001$). Zwischen frischer und getauter Plasmaprobe ergab sich aber, wenn auch nur knapp, kein statistisch signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test ($p = 0,054$).

Auch die FIB-test CT zeigt im Friedmann-Test statistisch höchst signifikante Unterschiede zwischen den Proben ($p < 0,001$). Jedoch ergeben sich hier (im Gegensatz zur FIB-test MCF) auch zwischen frischer und getauter Plasmaprobe signifikante Unterschiede ($p = 0,030$).

Abbildung 33 fasst die Ergebnisse zusammen.

Abbildung 33 Ergebnis der statistischen Tests für die FIB-test Untersuchungen

$$FIB - test - MCF_{VOLLBLUT} \neq FIB - test - MCF_{fPPP} \sim FIB - test - MCF_{gPPP}$$

$$FIB - test - CT_{VOLLBLUT} \neq FIB - test - CT_{fPPP} \neq FIB - test - CT_{gPPP}$$

fPPP: frische Plasmaprobe; gPPP: getaute Plasmaprobe

Zwischen den untersuchten Probenmaterialien (Vollblut und Plasma) zeigten sich starke Korrelationen der gemessenen MCF Werte (*Abbildung 34*). Zwischen der FIB-test-MCF im Vollblut und der frischen Plasmaprobe ergab sich ein Spearman-Koeffizient von $r = 0,795$ ($p < 0,001$). Zwischen frischer und getauter Plasmaprobe war die Korrelation deutlich stärker ausgeprägt ($r = 0,949$; $p < 0,001$).

Abbildung 34 Korrelation der FIB-test MCF zwischen den untersuchten Proben

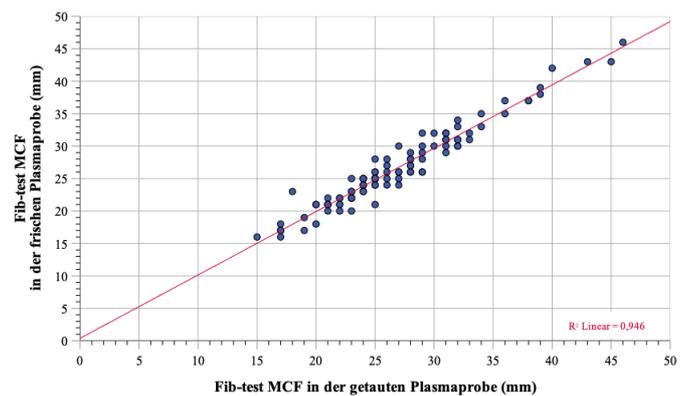
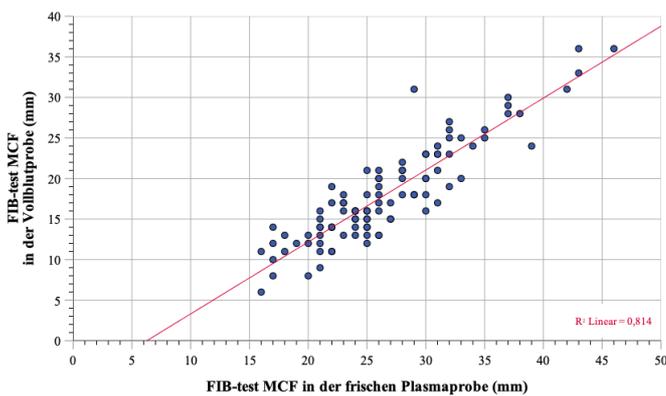
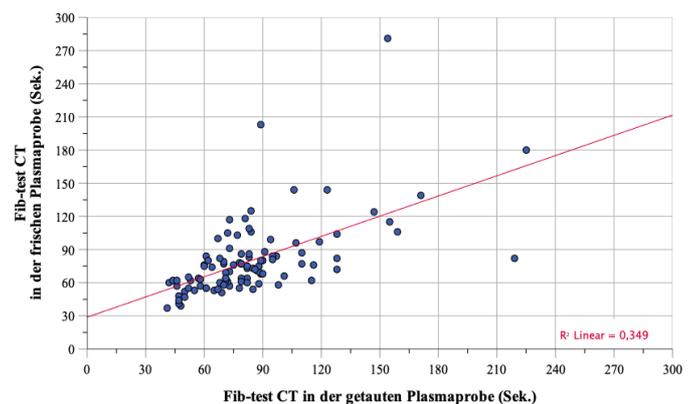
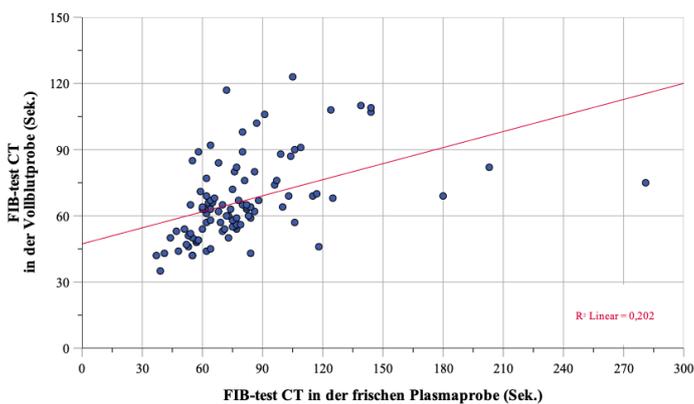


Abbildung 35 Korrelation der FIB-test CT zwischen den untersuchten Proben



Für die FIB-test-CT zeigte sich, verglichen mit der FIB-test-MCF, eine deutlich schwächere Korrelation zwischen den einzelnen Proben. Der Spearman-Koeffizient zwischen Vollblut und frischer Plasmaprobe lag bei $r = 0,595$ ($p < 0,001$) und zwischen frischer und getauter Probe bei $r = 0,630$ ($p < 0,001$), siehe *Abbildung 35*.

Messdifferenzen zwischen den Probenmaterialien

Im Weiteren wird auf das Ausmaß der Differenzen zwischen den Vollblut- und Plasmaproben detaillierter eingegangen. Hierfür wurden die errechneten Variablen absolute Differenz, relative Differenz und Variationskoeffizient (siehe Methoden, S.42) verwendet.

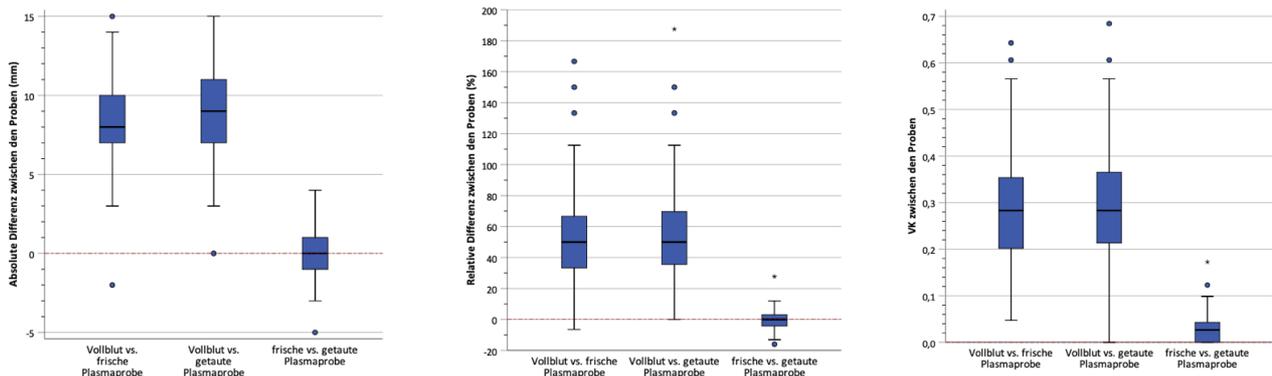
Zwischen Vollblut- und frischer Plasmaprobe zeigte sich für die MCF im Median eine absolute Differenz von + 8 mm (IQA 3 mm). Die maximale Abweichung betrug + 15 mm. Relativ zum Ausgangswert gesehen entsprach dies in der Plasmaprobe einer Abweichung von ca. 50 % (IQA von ca. 33-35 %). Der entsprechende Variationskoeffizient bewegte sich zwischen 0 und 0,68 mit einem Median bei 0,28 (IQA 0,15). Die absolute Abweichung zwischen frischer und getauter Plasmaprobe lag demgegenüber bei ± 0 mm (IQA 2 mm). *Table 17* präsentiert die Daten der explorativen Datenanalyse und *Abbildung 36* skizziert die Unterschiede nochmals graphisch.

Table 17 VK, absolute und relative Differenz der FIB-test-MCF zwischen den Proben

Vergleich		Min.	Max.	Median	IQA	Mean	SD
Vollblut vs. frische Plasmaprobe	Abs.	- 2 mm	15 mm	8 mm	3 mm	8,6 mm	2,8 mm
	Rel.	7 %	167 %	50 %	33,3 %	54 %	28,9 %
	VK	0,05	0,64	0,28	0,15	0,29	0,11
Vollblut vs. getaute Plasmaprobe	Abs.	0 mm	15 mm	9 mm	4 mm	8,8 mm	2,8 mm
	Rel.	0 %	188 %	50 %	34,7 %	56 %	30,2 %
	VK	0	0,68	0,28	0,15	0,30	0,12
frische vs. getaute Plasmaprobe	Abs.	-5 mm	4 mm	0 mm	2 mm	0,25 mm	1,47 mm
	Rel.	-16 %	28 %	0 %	7,5 %	-0,8 %	6,0 %
	VK	0,00	0,17	0,03	0,04	0,03	0,03

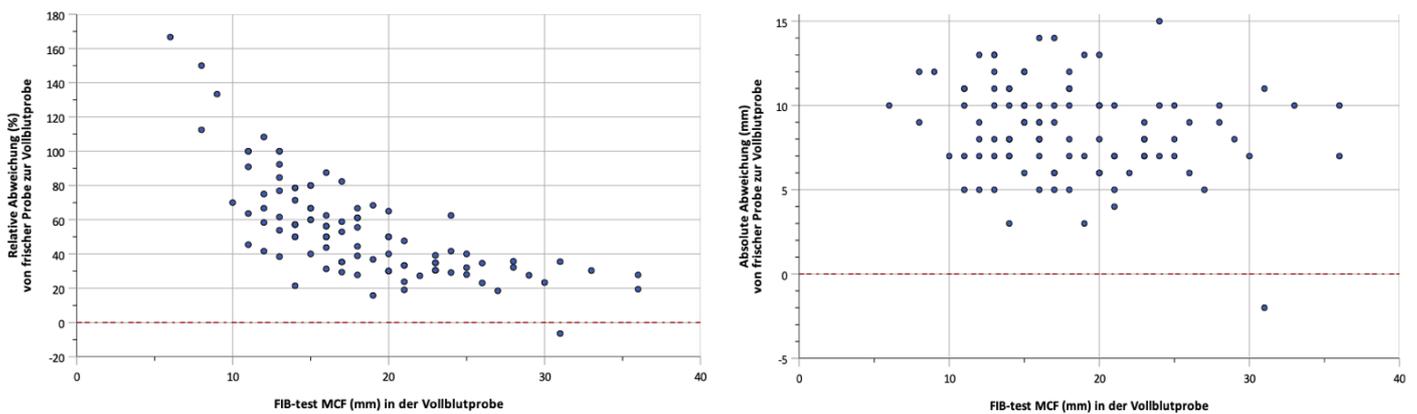
Abs.: absolute Differenz (mm), **Rel.:** Relative Differenz (%), **VK:** Variationskoeffizient

Abbildung 36 VK, absolute und relative Abweichung der FIB-test-MCF zwischen den Proben



Die relative Abweichung der gemessenen MCF in der frischen Plasmaprobe zur Messung in der Vollblutprobe zeigte eine statistisch höchst signifikante ($p < 0,001$) und hohe Korrelation ($r = -0,753$) mit der gemessenen MCF in der Vollblutprobe (siehe *Abbildung 37 links*). Ein entsprechendes Ergebnis fand sich auch für den VK ($r = -0,753$, $p < 0,001$) und wurde hier nicht explizit dargestellt. Die absolute Messdifferenz zeigte hingegen keine Korrelation mit der gemessenen MCF in der Vollblutprobe ($r = -0,184$, $p = 0,068$), *Abbildung 37 rechts*.

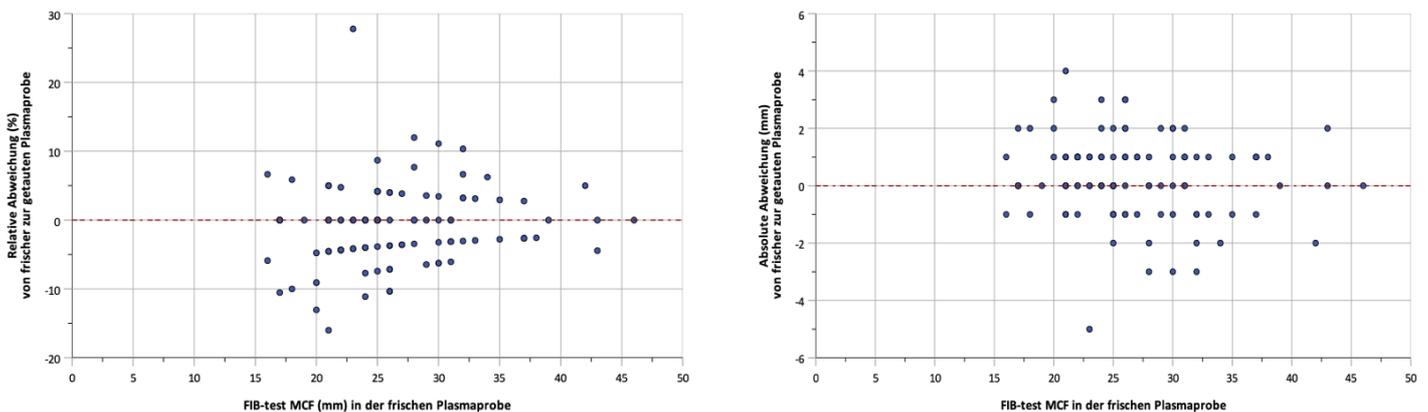
Abbildung 37 FIB-test-MCF in der Vollblutprobe und Abweichung zur frischen Plasmaprobe



Das Ausmaß der Messdifferenz der FIB-test-MCF zwischen Vollblut und frischer Plasmaprobe zeigte also bei relativer Betrachtung eine negative Korrelation mit der initial gemessenen MCF in der Vollblutprobe (nicht jedoch bei absoluter Betrachtung):

Je geringer die FIB-test-MCF in der Vollblutprobe war, desto höher fiel die prozentuale Abweichung der MCF zur Plasmaprobe aus.

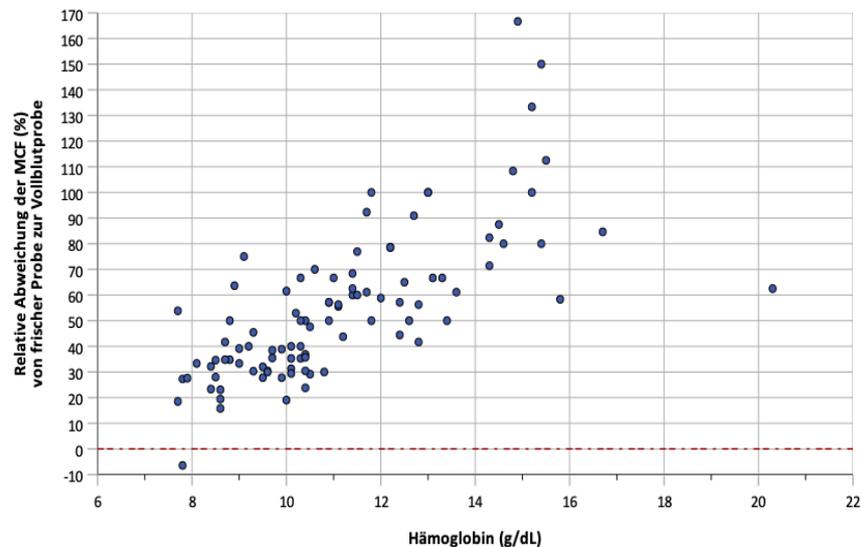
Abbildung 38 FIB-test-MCF in der frischen Plasmaprobe und Abweichung zur getauten Plasmaprobe



Dieser Zusammenhang zeigte sich nicht bei Betrachtung der geringfügigen Messdifferenzen zwischen der frischen und der getauten Plasmaprobe. Es bestand keine Korrelation zwischen gemessener MCF in der frischen Plasmaprobe und dem Ausmaß der Messabweichung zur getauten Plasmaprobe (*Abbildung 38*).

Eine starke Korrelation bestand auch zwischen dem Hämoglobingehalt der Probe und der relativ betrachteten MCF-Differenz zwischen Vollblut- und frischer Plasmaprobe ($r = 0,777$ $p < 0,001$) sowie in Bezug auf den Variationskoeffizienten zwischen Vollblutprobe und frischer Plasmaprobe ($r = 0,778$, $p < 0,001$).

Abbildung 39 Abhängigkeit der MCF-Differenzen im FIB-test vom Hämoglobinwert



Die Korrelationen der Messdifferenzen zu den anderen erhobenen Parametern sind *Tabelle 18* und *Tabelle 19* zu entnehmen. Der Variationskoeffizient wurde hier nicht explizit aufgeführt, da dieser Parameter das gleiche Verhalten und nahezu die gleichen Korrelationsstärken wie die relative Abweichung aufzeigte. Mit Ausnahme des Hämoglobingehalts bzw. der Erythrozytenzahl zeigte kein anderer Parameter eine vergleichbar starke Korrelation.

Insbesondere konnte anhand der vorliegenden Daten auch dargestellt werden, dass die Zeit bis zur Verarbeitung der Probe (hier untersucht bis max. 240 Minuten) keinen relevanten Einfluss ($r < 0,5$) auf die absolute oder relative Differenz der MCF zwischen Vollblut und Plasmaprobe hatte ($r = -0,361$; $p < 0,001$), *Abbildung 40 links*.

Die Dauer bis zur Bearbeitung der Proben im Batchverfahren zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die MCF-Differenz zwischen frischer und getauter Probe ($r = -0,009$; $p = 0,932$), siehe *Abbildung 40 rechts*.

Tabelle 18 Korrelation zwischen den relativen Differenzen der FIB-test-MCF und anderen Parametern

Relative MCF Differenz	FIB-test CT	Fibrinogen (Clauss)	Fibrinogen (abgeleitet)	Quick	aPTT	Thrombozyten	Leukozyten	Hb
Vollblut vs. frischer Plasmaprobe	0,018	-0,213*	-0,282 **	0,315**	-0,136	0,287	-0,357	0,777 **
frische vs. getaute Plasmaprobe	0,132	0,094	0,068	0,014	0,106	0,022	-0,119	0,033

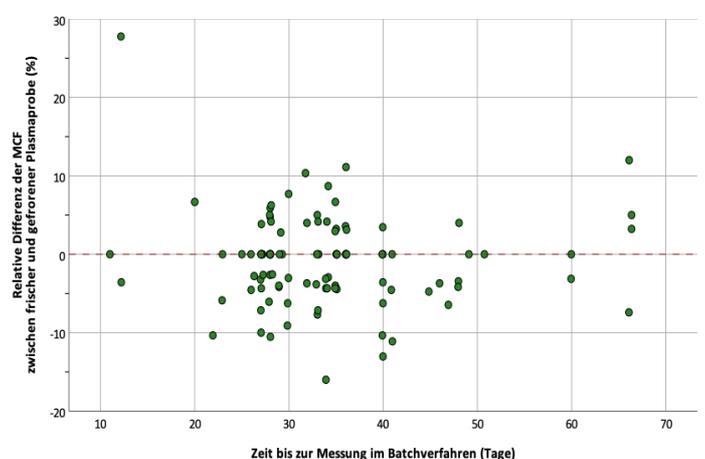
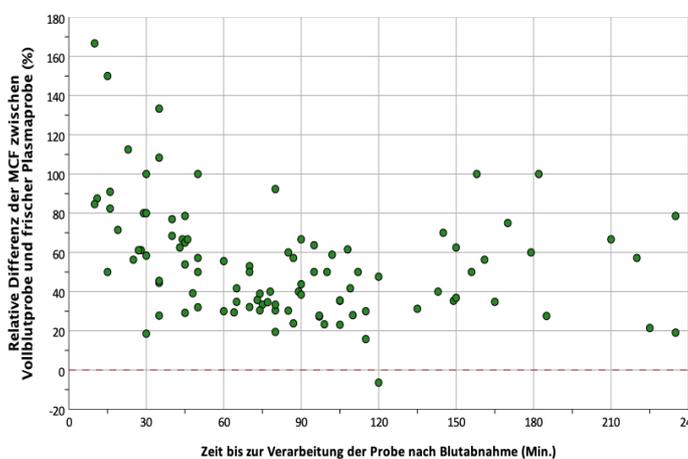
** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Tabelle 19 Korrelation zwischen den absoluten Differenzen der FIB-test-MCF und anderen Parametern

Absolute MCF Differenz	FIB-test CT	Fibrinogen (Clauss)	Fibrinogen (abgeleitet)	Quick	aPTT	Thrombozyten	Leukozyten	Hb
Vollblut vs. frische Plasmaprobe	-0,186	0,337**	0,261 **	0,427**	-0,238*	0,441 **	-0,464	0,637 **
frische vs. getaute Plasmaprobe	-0,158	-0,031	-0,012	0,010	0,160	0,005	-0,132	0,025

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Abbildung 40 Abhängigkeit der MCF-Differenzen im FIB-test von der Verarbeitungszeit



In den Plasmaproben zeigte sich eine stärkere Korrelation zwischen FIB-test-MCF und Fibrinogen nach Clauss ($r = 0,814$) als in der Vollblutprobe ($r = 0,658$), siehe *Tabelle 20* und *Abbildung 41*.

Zwischen der FIB-test-MCF und den Parametern der Globaltests wie Quick und aPTT zeigten sich hingegen keine signifikanten Korrelationen (*Tabelle 22*). Auch die Thrombozytenzahl zeigte erwartungsgemäß keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene FIB-test-MCF (*Abbildung 42 rechts*). Demgegenüber lag aber eine negative Korrelation der gemessenen MCF in der Vollblutprobe zur Hämoglobinkonzentration vor ($r = - 0,564$; $p < 0,001$; $n = 98$; siehe *Tabelle 21* und *Abbildung 42 links*).

Tabelle 20 Korrelation zwischen den Fibrinogenmessungen und der FIB-test-MCF

	FIB-test MCF (mm)		
	Vollblut	frische Plasmaprobe	getaute Plasmaprobe
Clauss-Fibrinogen (mg/dL)	$r = 0,658$ $p < 0,001$ $n = 89$	$r = 0,814$ $p < 0,001$ $n = 90$	$r = 0,815$ $p < 0,001$ $n = 90$
Abgeleitetes Fibrinogen (mg/dL)	$r = 0,706$ $p < 0,001$ $n = 90$	$r = 0,834$ $p < 0,001$ $n = 91$	$r = 0,833$ $p < 0,001$ $n = 91$

Abbildung 41 Korrelation zwischen Clauss-Fibrinogen und FIB-test-MCF

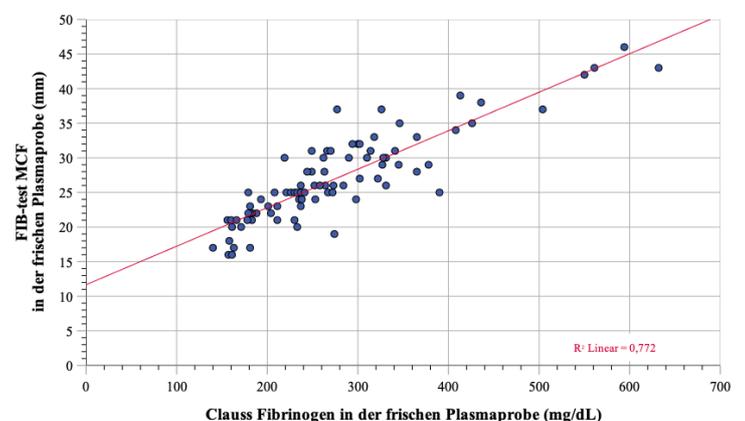
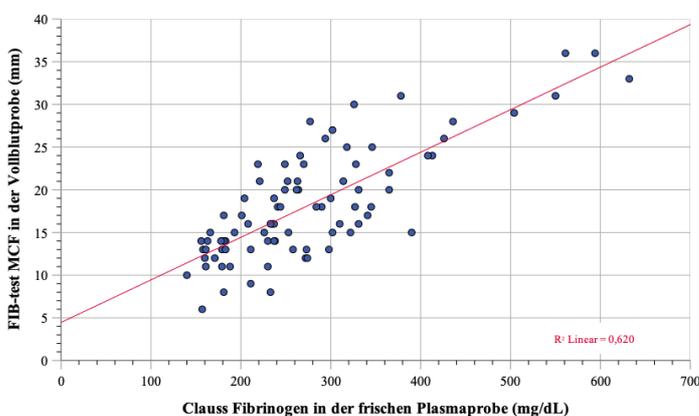


Tabelle 21 Korrelation der FIB-test-MCF mit Parametern des Blutbilds

	FIB-test-MCF (mm)		
	Vollblut	frische Plasmaprobe	getaute Plasmaprobe
Hämoglobin	r = -0,564 p < 0,001 n = 98	r = -0,273 p = 0,006 n = 99	r = -0,266 p = 0,008 n = 99
Thrombozyten	r = - 0,041 p = 0,685 n = 98	r = 0,167 p = 0,098 n = 99	r = 0,176 p = 0,081 n = 99

Abbildung 42 Korrelation zwischen Hämoglobingehalt und Thrombozyten mit der FIB-test-MCF

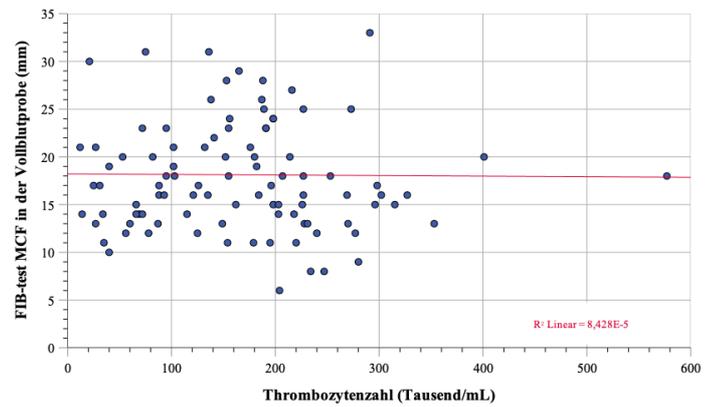
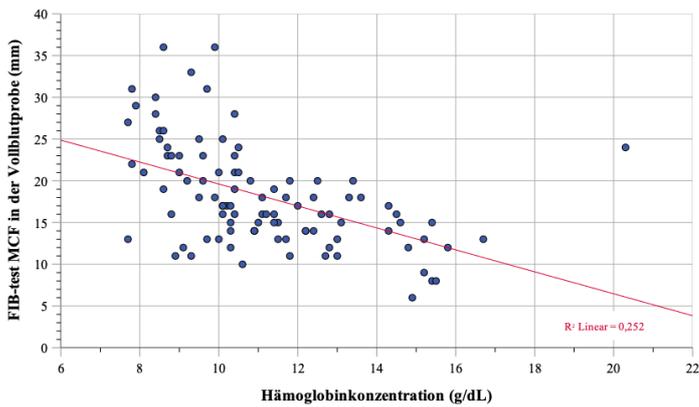


Tabelle 22 Korrelation der FIB-test-MCF mit Parametern der Globaltests

	FIB-test MCF (mm)		
	Vollblut	frische Plasmaprobe	getaute Plasmaprobe
PZ/Quick	r = -0,088 p = 0,441 n = 78	r = 0,123 p = 0,281 n = 79	r = 0,142 p = 0,210 n = 79
aPTT	r = - 0,008 p = 0,945 n = 78	r = 0,123 p = 0,282 n = 79	r = -0,145 p = 0,202 n = 79

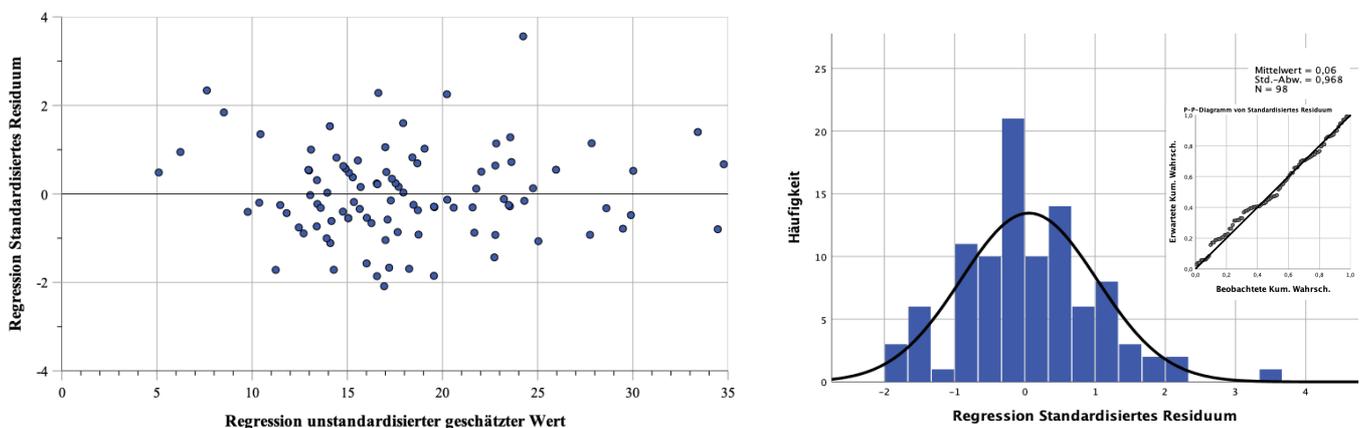
Regressionsanalyse

Mittels Regressionsanalyse sollte geprüft werden, ob sich die in den Vollblutproben gemessenen MCF-Werte im FIB-test auch aus den MCF-Werten der zugehörigen getauten Plasmaproben retrospektiv rekonstruieren lassen können. Zwischen der MCF in der Vollblutprobe und Plasmaprobe bestand ein linearer Zusammenhang ($r = 0,859$; $p < 0,001$). Als abhängige Variable wurde die gemessene MCF in der Vollblutprobe gewählt. Unabhängige Variablen waren die MCF in der getauten Plasmaprobe sowie die Hämoglobinkonzentration. Die Hämoglobinkonzentration wurde in die Regression inkludiert (schrittweise), da diese eine starke und signifikante Korrelation mit der Differenz der MCF zwischen der Vollblut- und der Plasmaprobe aufzeigte ($r = 0,777$; $p < 0,001$). Zwischen der Hämoglobinkonzentration und der im Vollblut gemessenen MCF bestand ebenfalls eine signifikante, aber negative Korrelation ($r = -0,564$, $p < 0,001$).

Statistische Voraussetzungen der Regressionsanalyse

Abbildung 43 demonstriert die Varianzgleichheit (Homoskedastizität) und die Normalverteilung der Residuen. Zwischen den beiden unabhängigen Variablen selbst, also zwischen der MCF in der getauten Plasmaprobe und der Hämoglobinkonzentration bestand nur eine sehr schwache Korrelation ($r = -0,266$; $p < 0,001$), so dass von keiner Autokorrelation der Residuen auszugehen war. Zudem lieferte die Durbin-Watson-Statistik einen Wert von 1,921. Multikollinearität konnte bei Toleranzen aller Koeffizienten von ca. 0,9 sowie VIF-Werten (Varianzinflationsfaktor) von ca. 1,0 ebenfalls ausgeschlossen werden. Lediglich eine Probe präsentierte sich als Ausreißer ($MCF_{VOLLBLUT} > 3x$ Standardabweichung), wurde aber nicht von der Regression ausgeschlossen.

Abbildung 43 Homoskedastizität und Normalverteilung der Residuen für die ClotPro® Regression



Ergebnisse der Regressionsanalyse

Die erklärte Varianz des errechneten Modells lag bei ca. 90% (korrigiertes R^2 von 0,902) und hatte damit eine sehr hohe Anpassungsgüte. Unter Kenntnis der Hämoglobinkonzentration ließ sich die MCF in der Vollblutprobe aus dem MCF-Wert in der getauten Plasmaprobe statistisch signifikant voraussagen: $F(2,95) = 448,805$; $p < 0,001$. *Formel 1* und *Tabelle 23* präsentieren die Ergebnisse der ANOVA- und Koeffizienten-Tabelle sowie die daraus resultierende Regressionsgleichung.

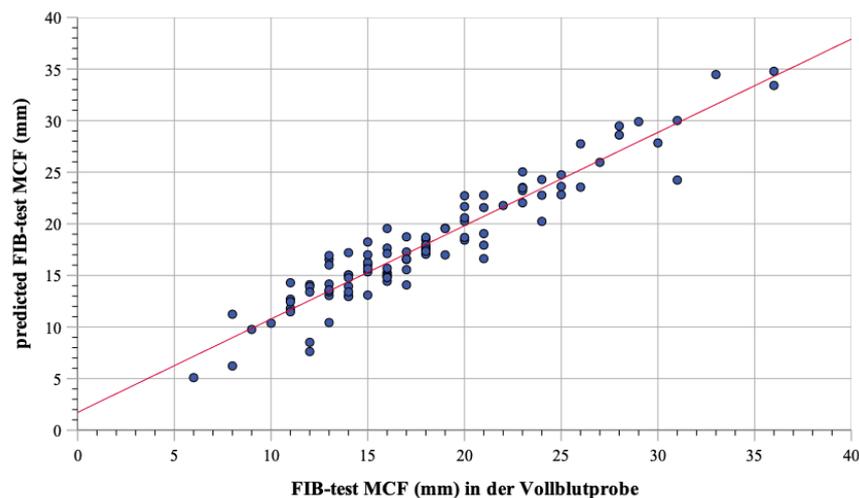
Formel 1 Rückrechnung der FIB-test-MCF aus der getauten Plasmaprobe

$MCF (mm)_{VOLLBLUT} = 0,821 \times MCF (mm)_{Batch} - 0,846 \times Hb \left(\frac{g}{dL}\right) + 5,383$			
r^2	0,902		
F	448,805		$p < 0,001$
Konstante	5,383	1,43 (Standardfehler)	$p < 0,001$
MCF	0,821	0,03 (Standardfehler)	$p < 0,001$
Hb	- 0,846	0,09 (Standardfehler)	$p < 0,001$

Tabelle 23 Ergebnisse der ANOVA und Koeffizienten für die ClotPro® Regression

Der multiple Korrelationskoeffizient (R), also die Korrelation zwischen den tatsächlichen Werten der MCF in der Vollblutprobe und den erwarteten Werten (predicted MCF) lag bei $R = 0,951$, der Korrelationskoeffizient nach Spearman lag bei $r = 0,937$ (*Abbildung 44*).

Abbildung 44 Korrelation zwischen predicted MCF und gemessener FIB-test MCF



Die Effektstärke konnte aus keiner Pilotstudie sinnvoll entnommen werden. Zur Berechnung der notwendigen Stichprobengröße wurde eine Poweranalyse mittels Online-Kalkulator¹ post-hoc durchgeführt. Unter Angaben einer Power von 0,9 und einem Alphaniveau von 0,05 sowie zwei Prädiktoren und einem R^2 von 0,2 war eine Stichprobengröße von mindestens $n = 54$ für ein signifikantes Gesamtmodell notwendig.

Zwischen der errechneten predicted MCF und der FIB-test-MCF in der Vollblutprobe bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,754$), siehe *Abbildung 45*. Die zugehörige vergleichende deskriptive Statistik der Daten wird in *Tabelle 24* präsentiert.

Abbildung 45 Vergleich der predicted FIB-test-MCF mit der MCF in Vollblut- und Plasmaprobe

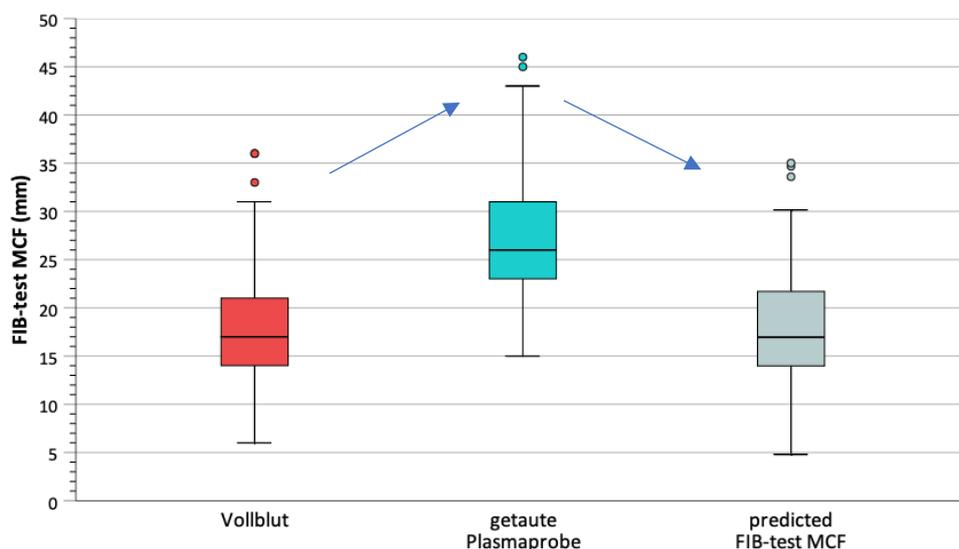


Tabelle 24 Vergleich der predicted FIB-test-MCF mit der MCF in Vollblut- und Plasmaprobe

	MCF in der Vollblutprobe	MCF in der getauten Plasmaprobe	Predicted MCF
Mittelwert	18,12	26,99	18,12
Median	17,00	26,00	17,10
Std. Abweichung	6,18	6,22	5,87
Minimum	6	15	5
Maximum	36	46	35
Interquartilabstand	7	8	8

Einheit der MCF: mm

¹ Hemmerich, W. (2019).

StatistikGuru: Poweranalyse und Stichprobenberechnung für Regression.

Retrieved from <https://statistikguru.de/rechner/poweranalyse-regression.html>

Abbildung 46 präsentiert die Differenzen zwischen der FIB-test-MCF in der Vollblutprobe und der getauten Plasmaprobe bzw. der errechneten predicted MCF anhand eines Bland-Altman-Plots und *Tabelle 25* gibt Informationen über die zugrunde liegende deskriptive Statistik.

Abbildung 46 Bland-Altman-Plot zum Vergleich der ClotPro® Regression

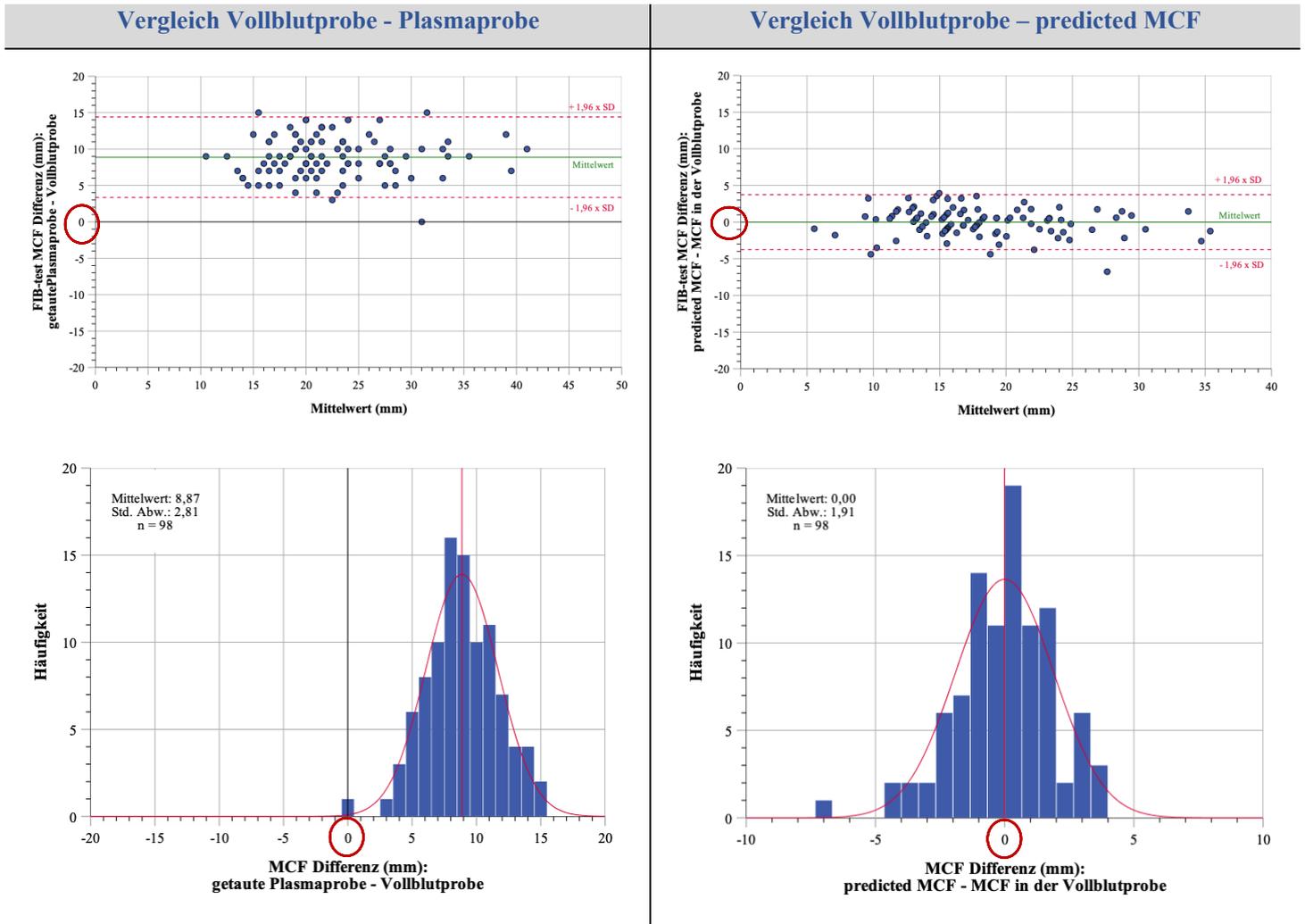


Tabelle 25 Deskriptive Statistik der MCF-Differenzen zwischen den Proben

	MCF Differenz (mm)	
	Getaute Plasmaprobe - Vollblutprobe	Predicted MCF - MCF in der Vollblutprobe
Mittelwert	8,87	0,00
Std. Abweichung	2,81	1,91
Median	9,00	0,30
Interquartilabstand	4,00	2,32
Minimum	0,00	- 6,76
Maximum	15,00	3,93

Anwendung des Regressionsmodell auf ein anderes Probenkollektiv

In einem weiterführenden Schritt wurde die predicted MCF auch für die Proben mit einer Verarbeitungszeit über 4 Stunden ($n = 22$) errechnet. Daten dieser Proben fanden keinen Einzug in die zuvor beschriebene Regressionsanalyse und das Regressionsmodell war entsprechend nicht an diese Proben angepasst. Auch in diesem Probenkollektiv konnte der zunächst bestehende signifikante Unterschied zwischen der FIB-test-MCF im Vollblut und der getauten Plasmaprobe ($p < 0,001$) durch Anwendung der *Formel 1* aufgehoben werden ($p = 0,808$), siehe hierzu auch *Abbildung 47*. Es bestand zwischen der FIB-test-MCF in der Vollblutprobe und der predicted MCF eine sehr starke Korrelation mit einem Spearman-Koeffizienten von $r = 0,970$ ($p < 0,001$). *Tabelle 26* enthält die Ergebnisse der deskriptiven Datenanalyse.

Abbildung 47 Vergleich der predicted FIB-test MCF bei Proben > 4 Stunden

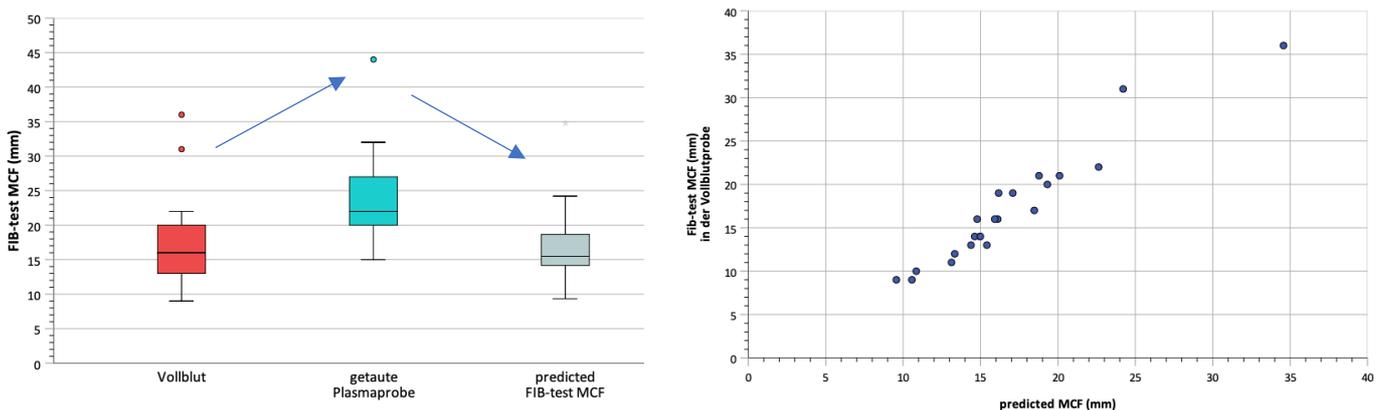


Tabelle 26 Vergleich der predicted FIB-test MCF bei Proben > 4 Stunden

	MCF in der Vollblutprobe	MCF in der getauten Plasmaprobe	Predicted MCF
Mittelwert	16,95	23,86	16,82
Median	16,00	22,00	15,66
Std. Abweichung	6,66	6,37	5,37
Minimum	9	15	10
Maximum	36	44	35
Interquartilabstand	8	8	4,8

Einheit der MCF: mm

Die Differenzen zwischen der FIB-test-MCF in der Vollblutprobe und der getauten Plasmprobe bzw. der errechneten predicted MCF wurden auch für die Proben mit einer Liegedauer über vier Stunden nochmals anhand eines Bland-Altman-Plots skizziert (*Abbildung 48*). Die deskriptive Statistik findet sich in *Tabelle 27*.

Abbildung 48 Bland-Altman-Plot zum Vergleich der ClotPro® Regression (Proben > 4 Stunden)

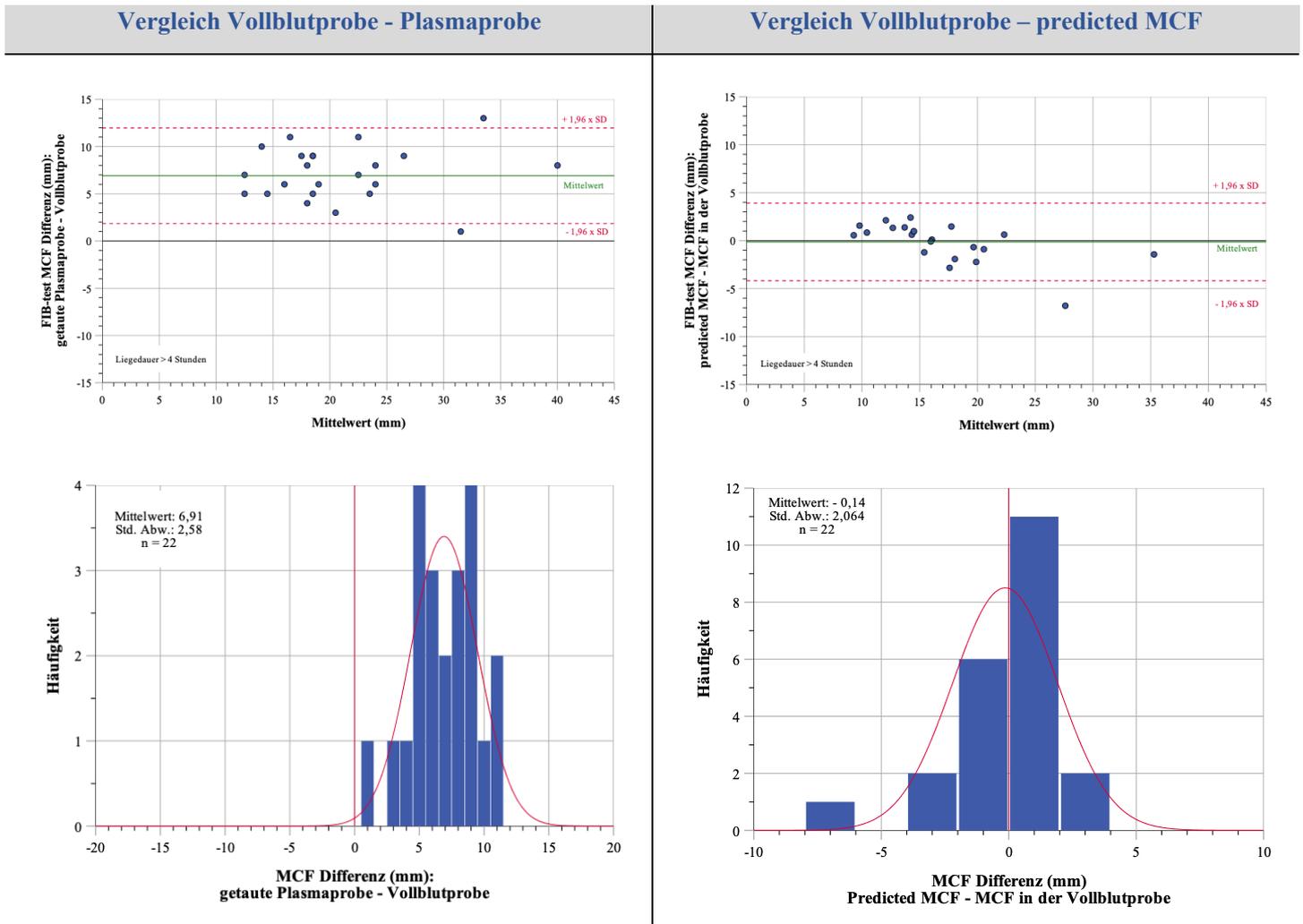


Tabelle 27 Deskriptive Statistik der MCF Differenzen zwischen den Proben (Proben > 4 Stunden)

	MCF Differenz (mm)	
	getaute Plasmprobe - Vollblutprobe	predicted MCF - MCF in der Vollblutprobe
Mittelwert	6,91	-0,14
Std. Abweichung	2,58	2,06
Median	7,00	0,59
Interquartilabstand	4,00	2,62
Minimum	1,00	-6,79
Maximum	11,00	2,41

Nachweis eines Fibrinolysehemmers in der getauten Plasmaprobe

Zwischen der maximalen Lyse (%) im TPA-test der Vollblutprobe und der getauten Plasmaprobe bestand eine hohe Korrelation ($r = 0,823$; $p < 0,001$; $n = 90$), siehe *Abbildung 49*. Alle 64 Proben die in der Vollblutprobe keine Lyse ($ML < 94\%$) aufwiesen, zeigten auch in den getauten Plasmaproben keine Lyse (*Tabelle 28*). Bei allen Proben von Patienten die Tranexamsäure erhielten, fand sich eine suffiziente Hemmung der Thrombolyse (*Tabelle 29*).

Abbildung 49 Korrelation zwischen Lyseindex in Vollblutprobe und getauter Probe

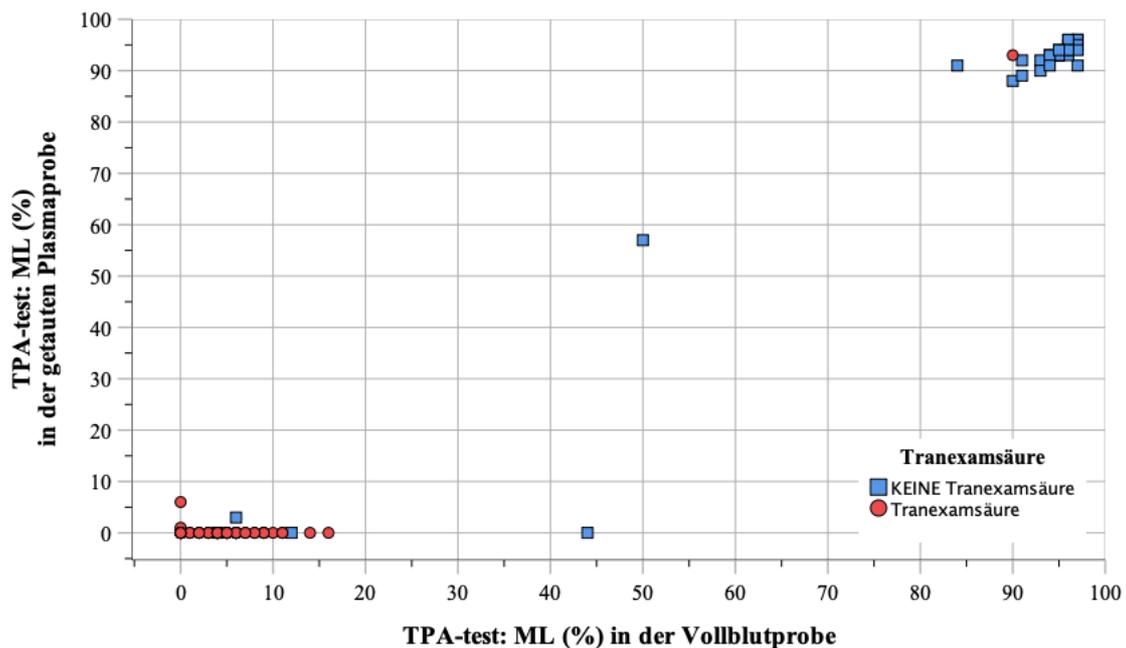


Tabelle 28 Korrelation zwischen Lyseindex im Vollblut und getauter Plasmaprobe

		getaute Plasmaprobe		
		Keine Lyse	Lyse	Summe
Vollblutprobe	Keine Lyse	64	0	64
	Lyse	11	15	26
Summe		75	15	90

Tabelle 29 Zusammengang zwischen Gabe von Tranexamsäure und Auftreten einer Lyse

		Tranexamsäure		
		Ja	Nein	Summe
Vollblutprobe	Keine Lyse	53	11	64
	Lyse	0	26	26
Summe		53	37	90

Keine Lyse = $ML < 94\%$, Lyse = $ML > 94\%$

ROTEM®

Allgemeine Angaben zu den Proben

Die Laufzeit der ROTEM®-Messungen lag im Median bei 60 Minuten (IQA: 0) und wurde bei einem Großteil der Proben nicht unterbrochen. Lediglich bei wenigen Proben wurden die Messungen vorher abgebrochen, die minimale Laufzeit lag hier bei 38 Minuten. Vollständige Messdaten lagen bei allen 100 Proben vor.

Deskriptive Statistik

Tabelle 30 präsentiert die Ergebnisse der explorativen Datenanalyse der untersuchten Parameter MCF und CT im FIBTEM in Abhängigkeit vom Probenmaterial (Vollblut, frische bzw. getaute Plasmaprobe). MCF und CT zeigten auch beim ROTEM® eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung im Kolmogorov-Smirnov-Test (*Tabelle 9*). Das untersuchte Probenkollektiv umfasste MCF-Werte im Vollblut zwischen 5 und 33 mm (IQA: 9 mm). *Abbildung 50* veranschaulicht die Verteilung der Daten nochmals graphisch anhand von Boxplot-Diagrammen.

Tabelle 30 Deskriptive Statistik der gemessenen Parameter am ROTEM®

Parameter	Material	n	Min.	Max.	Median	IQA	Mean	STD
FIBTEM MCF (mm)	Vollblutprobe	100	5	33	16	9	16,8	6,2
	frische Plasmaprobe	100	9	45	22	10	23,6	7,5
	getaute Plasmaprobe	100	12	46	23	11	23,9	7,6
FIBTEM CT (Sek.)	Vollblutprobe	100	15	108	65,5	15	66,4	15,2
	frische Plasmaprobe	100	40	166	58	16	61,7	16,8
	getaute Plasmaprobe	100	14	144	56,5	15	59,6	18,9

Ausgehend vom Sollwert (9 - 22 mm) für die FIBTEM-MCF wiesen insgesamt 84 Proben eine normwertige MCF auf. Demgegenüber zeigten aber 60 % der Proben eine verlängerte CT (> 62 Sekunden).

Auch beim ROTEM® fiel auf, dass sich die in den Plasmaproben gemessenen MCF-Werte deutlich von denen in der Vollblutprobe unterschieden und die MCF im Plasma gegenüber der Vollblutprobe häufig deutlich erhöht war (*Abbildung 51*). Diese Unterschiede waren auch im Friedman-Test statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$).

Abbildung 50 Verteilung der MCF- und CT-Werte im FIBTEM

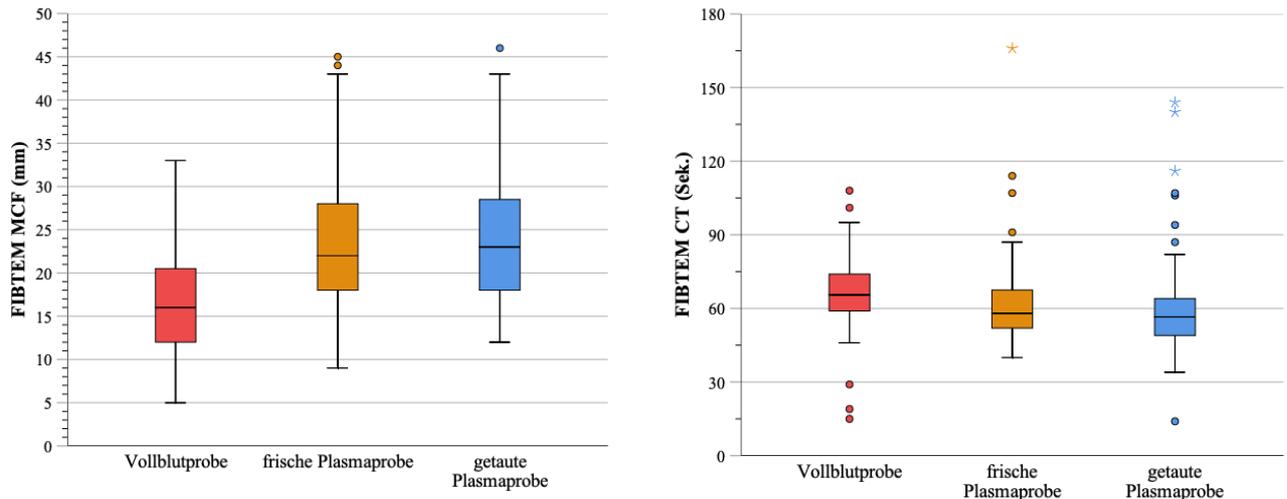
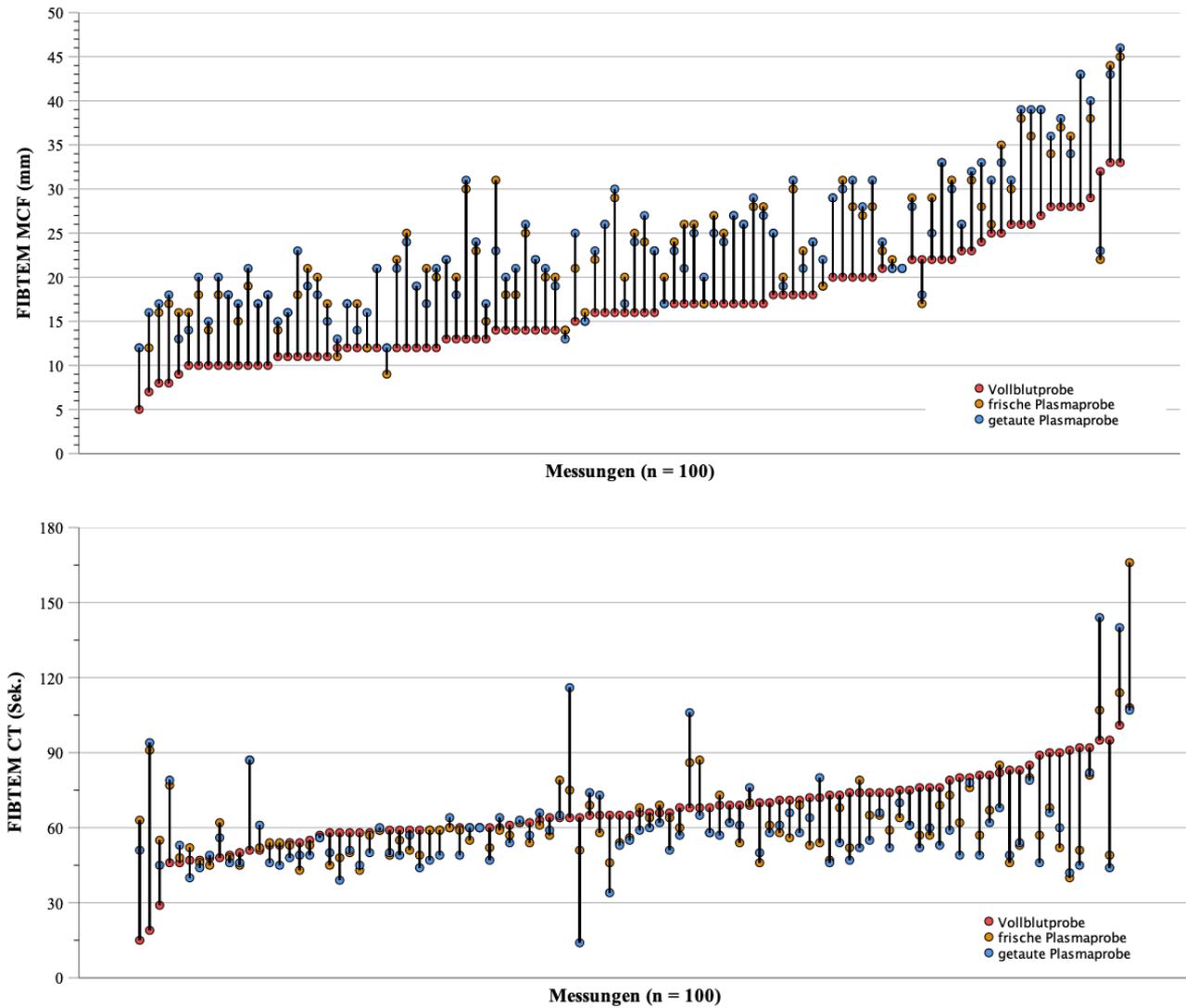


Abbildung 51 FIBTEM: MCF und CT im Vollblut und getauten Plasma



Anwendung statistischer Tests und Korrelationsanalyse

Zwischen den Messungen der MCF in der frischen und der getauten Plasmaprobe bestanden jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede im Wilcoxon-Test ($p = 0,196$). Im Unterschied zum ClotPro[®] zeigten vereinzelte Messungen in den Plasmaproben aber auch eine geringere MCF im Vergleich zur korrespondierenden Vollblutprobe.

Außerdem zeigte sich in den Plasmaproben, gegensätzlich zum ClotPro[®], eine gegenüber den Vollblutproben tendenziell verkürzte CT (*Abbildung 51*). Ähnlich wie im FIB-test zeigte der Parameter CT auch beim FIBTEM eine auffällige Streuung und ausgeprägte Extremwerte im Vergleich zum Parameter MCF. Sowohl zwischen den CT-Werten im Vollblut und den Plasmaproben ($p < 0,001$), als auch zwischen den CT-Werten in der frischen und der getauten Plasmaprobe bestanden statistisch signifikante Unterschiede im Wilcoxon-Test ($p = 0,024$).

Tabelle 31 präsentiert die zusammengefassten Ergebnisse der statistischen Tests.

Tabelle 31 Ergebnis der statistischen Tests für die FIBTEM Untersuchungen

$$FIBTEM - MCF_{VOLLBLUT} \neq FIBTEM - MCF_{fPPP} \sim FIBTEM - MCF_{gPPP}$$

$$FIBTEM - CT_{VOLLBLUT} \neq FIBTEM - CT_{fPPP} \neq FIBTEM - CT_{gPPP}$$

Auch beim ROTEM[®] korrelierten die MCF Werte zwischen den Vollblut- und Plasmaproben sehr gut. Vollblutprobe und frische Plasmaprobe korrelierten dabei etwas schwächer ($r = 0,795$; $p < 0,001$) als die frische mit der getauten Plasmaprobe ($r = 0,949$; $p < 0,001$), *Abbildung 52*. Diese Korrelationsstärken waren mit denen im ClotPro[®] vergleichbar.

Die gemessenen Werte der CT wiesen im Vergleich zur MCF deutlich schwächere Korrelationen zwischen der Vollblutprobe und den Plasmaproben auf ($r = 0,325$ mit $p = 0,001$), siehe *Abbildung 53*. Die Korrelationen der CT waren im ROTEM[®] auch schwächer ausgeprägt als im ClotPro[®] (*Abbildung 35*). Zwischen der frischen und getauten Plasmaprobe zeigte sich hingegen wieder ein stärkerer Zusammenhang der FIBTEM-CT mit einem Spearman Korrelationskoeffizienten von $r = 0,736$ ($p < 0,001$).

Abbildung 52 Korrelation der FIBTEM-MCF zwischen den untersuchten Proben

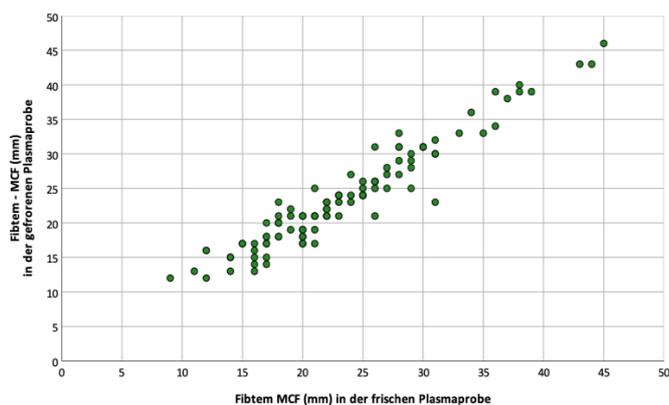
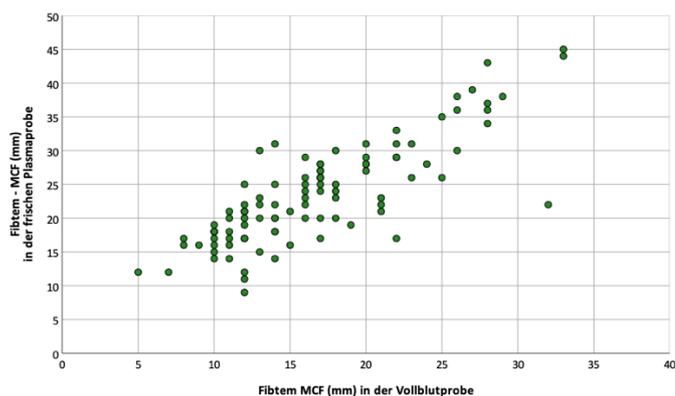
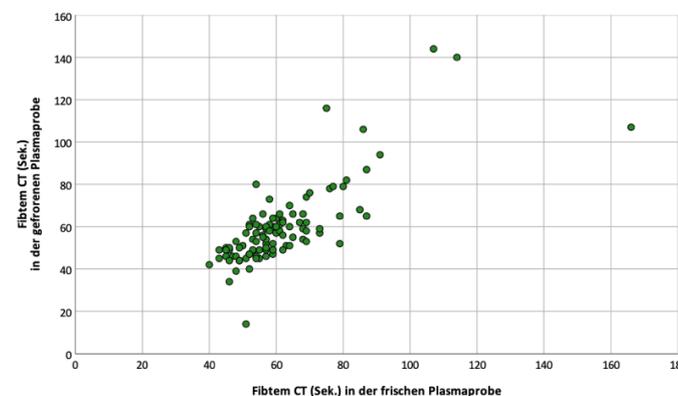
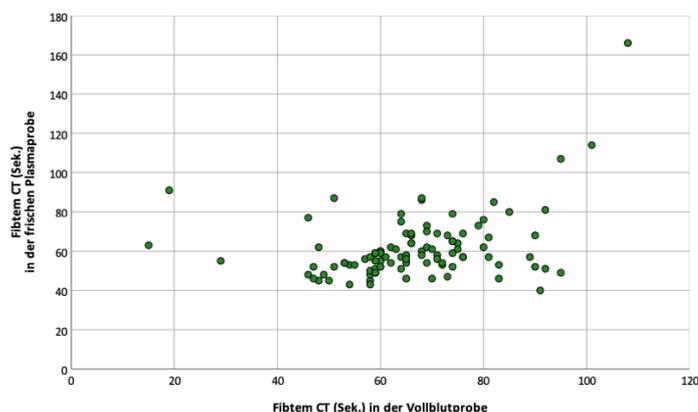


Abbildung 53 Korrelation der FIBTEM-CT zwischen den untersuchten Proben



Messdifferenzen zwischen den Probenmaterialien

Wie auch beim ClotPro[®] wurden auch für das ROTEM[®] die Differenzen zwischen den gemessenen Werten in der Vollblut-, frischen und getauten Plasmaprobe unter Verwendung der errechneten Parameter (siehe Methoden, S. 42) detaillierter betrachtet.

Zwischen der Vollblutprobe und der frischen Plasmaprobe zeigte sich für die MCF im Median eine absolute Messdifferenz von + 8 mm (IQA 3mm), die maximale Differenz betrug + 17 mm. Relativ gesehen bewegte sich die Abweichungen der MCF in der frischen Plasmaprobe also in einem weiten Bereich um -31 % bis +140 % von der gemessenen MCF in der Vollblutprobe. Der entsprechende Variationskoeffizient lag im Durchschnitt bei 0,26 (\pm 0,13). Zwischen der frischen und der getauten Plasmaprobe zeigte sich nur eine geringe Differenz. Der Median lag wie auch beim ClotPro[®] bei \pm 0 mm (IQA 2mm). Ohne Anwendung eines statistischen Tests, schienen die Lagemaße mit denen des ClotPro[®] zunächst vergleichbar gewesen zu sein (näheres siehe Seite 85 ff).

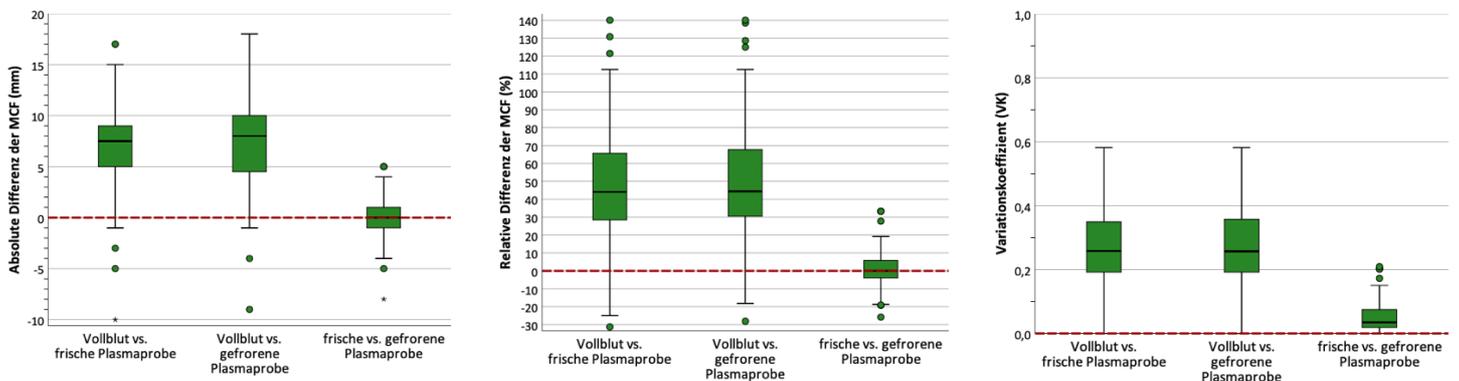
Table 32 präsentiert die Daten der explorativen Datenanalyse und *Abbildung 54* skizziert die Verteilung der Daten nochmals graphisch anhand von Boxplot-Diagrammen.

Table 32 VK, absolute und relative Differenz der FIBTEM-MCF zwischen den Proben

Vergleich		Min.	Max.	Median	IQA	Mean	SD
Vollblut vs. frische Plasmaprobe	Abs.	-10 mm	17 mm	7,5 mm	4 mm	6,8 mm	4,3 mm
	Rel.	-31 %	140 %	44 %	38 %	46,7 %	32,0 %
	VK	0,005	0,58	0,26	0,16	0,26	0,13
Vollblut vs. getaute Plasmaprobe	Abs.	-9 mm	18 mm	8,0 mm	6 mm	7,1 mm	4,2 mm
	Rel.	-28 %	140 %	44 %	38 %	48,4 %	32,8 %
	VK	0,00	0,58	0,26	0,17	0,27	0,14
frische vs. getaute Plasmaprobe	Abs.	-8 mm	5 mm	0,0 mm	2 mm	0,24 mm	2,2 mm
	Rel.	-26 %	33 %	0,0 %	10 %	1,8 %	10,8 %
	VK	0,00	0,21	0,04	0,06	0,05	0,05

Abs.: absolute Differenz (mm), *Rel.:* Relative Differenz (%), *VK:* Variationskoeffizient

Abbildung 54 VK, absolute und relative Abweichung der FIBTEM-MCF zwischen den Proben

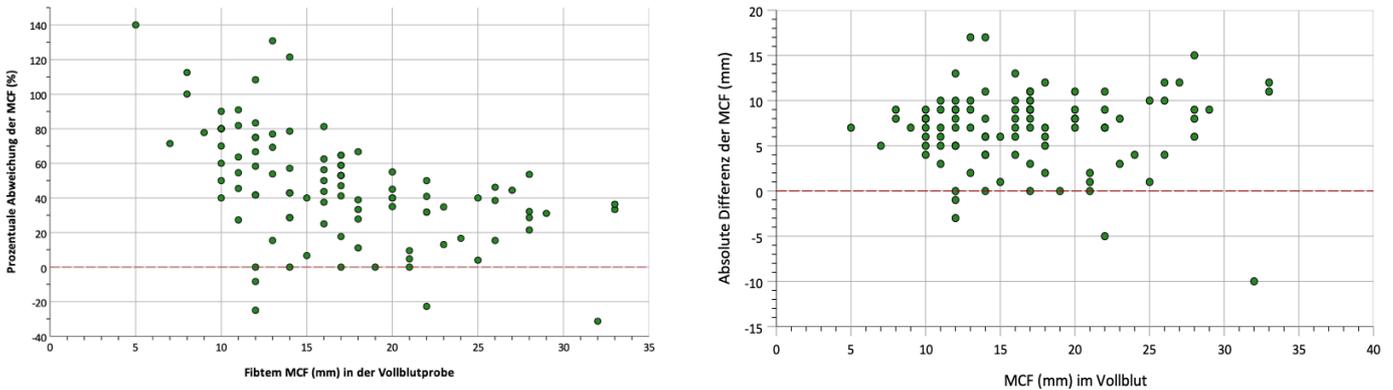


VK, absolute und relative Abweichung der gemessenen MCF-Werte zwischen den Messungen in der frischen und getauten Plasmaprobe waren signifikant geringer ($p < 0,001$) als zwischen den Vollblut- und den Plasmaproben (*Abbildung 54*).

Wie auch bereits beim ClotPro[®] zeigte der VK und die relative Abweichung der gemessenen MCF in der frischen Plasmaprobe eine negative Korrelation mit der MCF in der Vollblutprobe ($r = -0,569$; $p < 0,001$), nicht jedoch die absolute Messdifferenz ($r = 0,096$; $p = 0,431$), siehe *Abbildung 55* und *Table 33*.

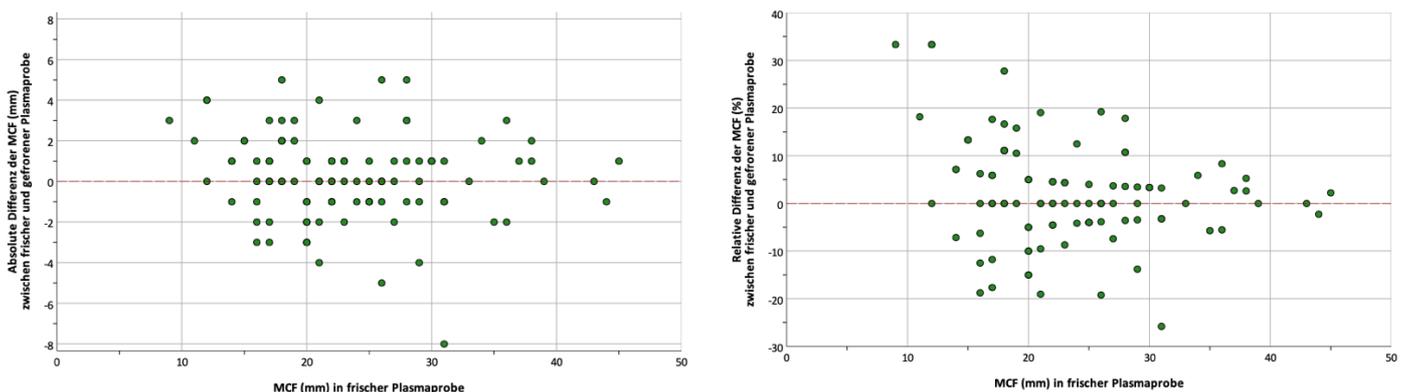
Je geringer die FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe war, desto höher war die prozentuale Abweichung der MCF zur Plasmaprobe.

Abbildung 55 Differenz der FIBTEM-MCF (Vollblut - Plasma) in Abhängigkeit von der MCF im Vollblut



Die Messdifferenz der MCF zwischen frischer und getauter Plasmaprobe wies, unabhängig ob relativ oder absolut betrachtet, keinen Zusammenhang mit dem Ausgangswert der MCF in der frischen Plasmaprobe auf, siehe [Abbildung 56](#) sowie [Tabelle 34](#).

Abbildung 56 Abweichung der FIBTEM-MCF in Abhängigkeit von der MCF in der Vollblutprobe



Ansonsten zeigten sich zwischen den errechneten Parametern (VK, absolute und relative Differenz) und den anderen erhobenen Parametern keine weiteren relevanten Korrelationen. Insbesondere lag beim FIBTEM anders als beim FIB-test im ClotPro[®], keine signifikante Korrelation der Messabweichung zwischen Vollblut und frischer Plasmaprobe mit dem Hämoglobingehalt der Probe vor ($r = 0,177$; $p = 0,08$), siehe [Abbildung 57](#) und [Tabelle 33](#).

Tabelle 33 Korrelationen der Differenzen bzw. des VK zwischen Vollblutprobe und frischer Plasmaprobe

	Variationskoeffizient	Relative Differenz (%)	Absolute Differenz (mm)
Clauss Fibrinogen	0,184	- 0,172	0,388 **
abgeleitetes Fibrinogen	0,173	- 0,172	0,419 **
Quick	- 0,327 **	- 0,351 **	- 0,237 *
aPTT	0,221	0,232 *	0,093
FIBTEM CT	0,137	0,131	- 0,013
FIBTEM MCF	- 0,561 **	- 0,569 **	0,096
Hämoglobin	0,197	0,177	- 0,095
Hämatokrit	0,181	0,165	- 0,081
Thrombozyten	- 0,202 *	- 0,207 *	- 0,113
Leukozyten	0,106	0,110	0,130
Verarbeitungszeit	0,184	0,214 *	0,199 *

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Tabelle 34 Korrelationen der Differenzen bzw. des VK zwischen frischer und getauter Plasmaprobe

	Variationskoeffizient	Relative Differenz (%)	Absolute Differenz (mm)
Clauss Fibrinogen	- 0,281 **	0,036	0,067
abgeleitetes Fibrinogen	- 0,332 **	- 0,008	0,024
Quick	- 0,060	0,049	0,009
aPTT	- 0,041	- 0,067	- 0,047
FIBTEM CT	- 0,026	- 0,055	- 0,020
FIBTEM MCF	- 0,246 *	- 0,040	0,009
Hämoglobin	0,045	0,017	0,008
Hämatokrit	0,031	0,020	0,016
Thrombozyten	- 0,026	- 0,046	- 0,056
Leukozyten	- 0,051	0,040	0,066
Verarbeitungszeit	- 0,087	- 0,173	- 0,172

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Auch bei den ROTEM®-Messungen zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit der Messdifferenzen von der Dauer bis zur Verarbeitung der Vollblutproben (*Abbildung 58 links*), oder der Dauer bis zur Messung im Batchverfahren (*Abbildung 58 rechts*).

Abbildung 57 Hämoglobingehalt und MCF Differenz zwischen Vollblut und frischer Plasmaprobe

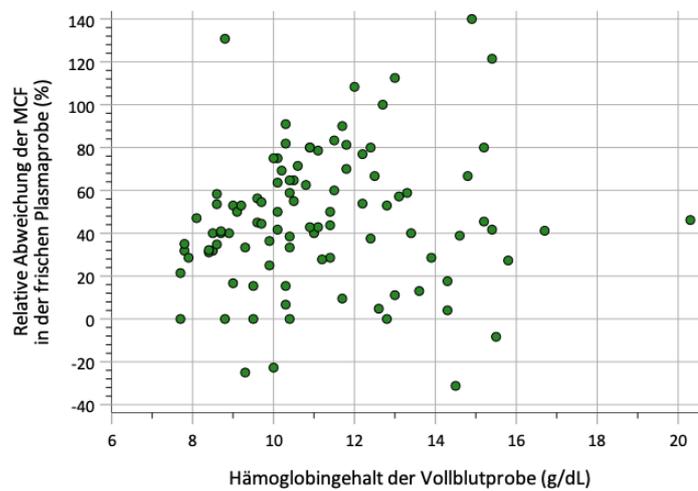


Abbildung 58 FIBTEM Messdifferenzen in Abhängigkeit von den Verarbeitungszeiten

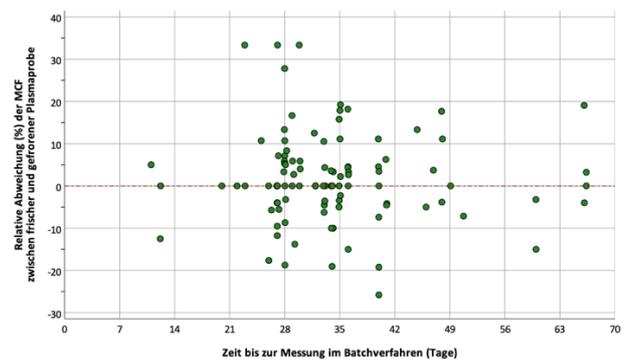
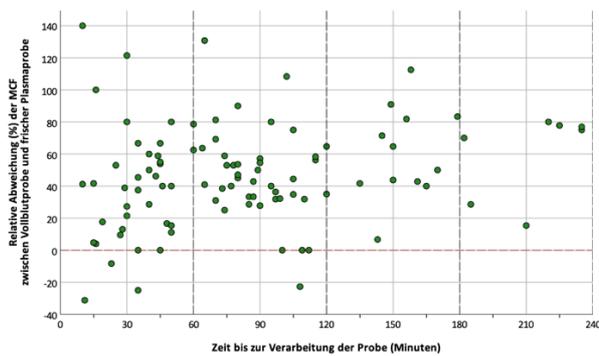


Tabelle 35 Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen FIBTEM-MCF und den anderen Parametern

	FIBTEM MCF					
	Vollblutprobe		frische Plasmaprobe		getaute Plasmaprobe	
Clauss Fibrinogen	0,703	**	0,774	**	0,785	**
abgeleitetes Fibrinogen	0,720	**	0,809	**	0,805	**
PZ	0,275	*	0,087		0,090	
aPTT	- 0,176		- 0,086		- 0,105	
Hämoglobin	- 0,320	**	- 0,243	*	- 0,257	**
Hämatokrit	- 0,284	**	- 0,275	**	- 0,276	**
Thrombozyten	0,232	*	0,121		0,112	
Leukozyten	- 0,079		0,015		0,042	
Verarbeitungszeit	- 0,131		- 0,012		- 0,037	

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Die stärkste Korrelation der MCF mit der gemessenen Fibrinogenkonzentration (abgeleitet) fand sich in der frischen Plasmaprobe mit einem Spearman-Koeffizienten von $r = 0,806$ (siehe *Abbildung 59*). Die Korrelation der MCF in den Vollblutproben mit dem Fibrinogen war geringfügig schwächer ($r = 0,70 - 0,72$). Auch beim ROTEM® war eine signifikante, wenn auch sehr schwache negative Korrelation ($r = - 0,320$) der gemessenen MCF in der Vollblutprobe mit dem Hämoglobingehalt der Vollblutprobe auszumachen (siehe *Abbildung 60*). Zwischen den Globaltests (PZ/Quick und aPTT) und der gemessenen MCF bestanden keine relevanten Korrelationen.

Tabelle 35 präsentiert die Ergebnisse der Korrelationsanalyse.

Abbildung 59 Korrelation zwischen FIBTEM MCF und Fibrinogen

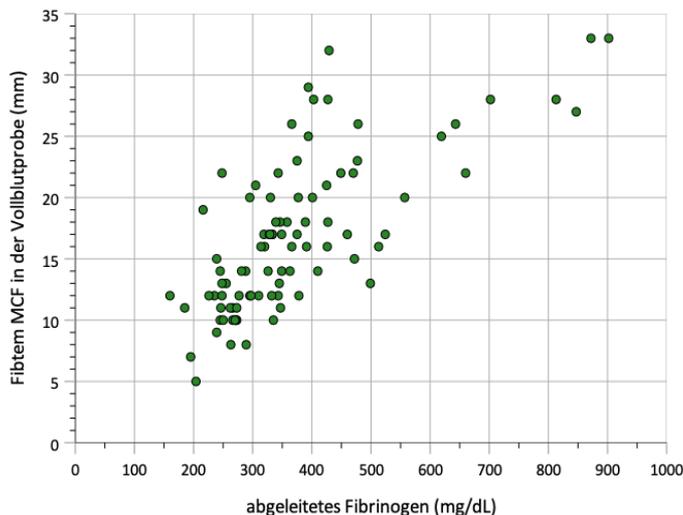
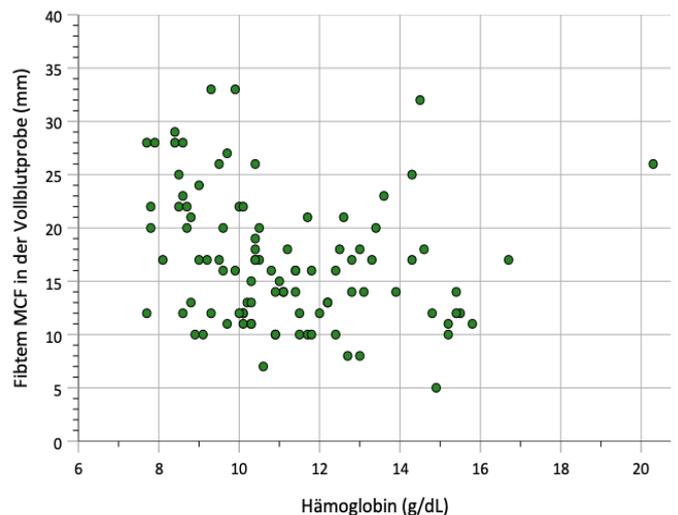


Abbildung 60 Korrelation zwischen FIBTEM MCF und Hämoglobin



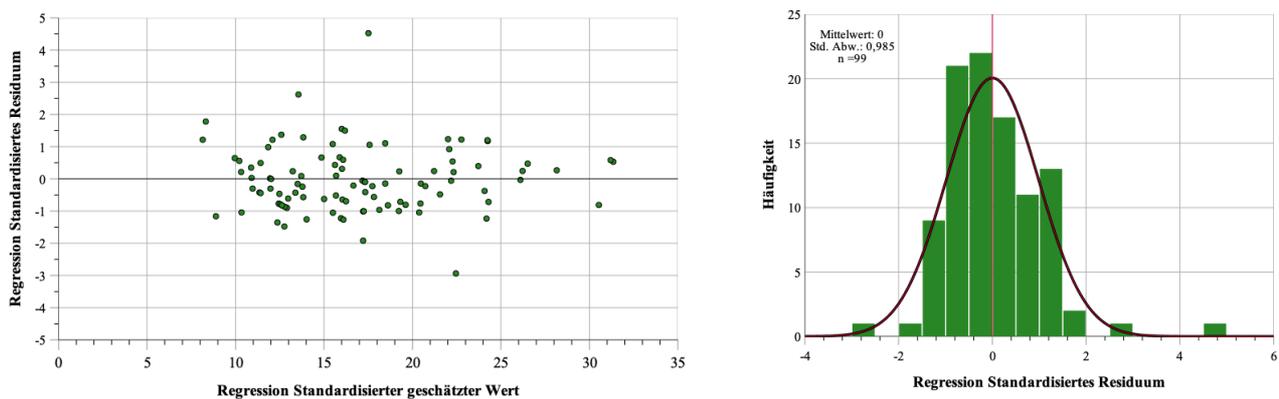
Regressionsanalyse

Zur Klärung der Frage, ob sich die in den Vollblutproben vorliegenden FIBTEM-MCF-Werte aus den korrespondierenden, getauten Plasmaproben retrospektiv herleiten lassen können, wurde auch für die ROTEM®-Messungen eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Als abhängiger Parameter wurde die FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe und als unabhängiger Parameter die FIBTEM-MCF in der getauten Plasmaprobe gewählt. Da sich Vollblutprobe und Plasmaprobe hauptsächlich durch die Anwesenheit von Thrombozyten und Erythrozyten (hier stellvertretend durch die Hämoglobinkonzentration) unterscheiden wurden diese beiden Parameter (wie zuvor beim ClotPro®) als unabhängige Koeffizienten in die multiple schrittweise lineare Regression inkludiert.

Voraussetzungen

Zwischen der abhängigen und den unabhängigen Variablen lagen lineare Zusammenhänge vor (*Tabelle 35*). Mit Blick auf *Abbildung 61* war von einer vorliegenden Varianzgleichheit (Homoskedastizität) und einer annähernden Normalverteilung der Fehlerwerte (Residuen) auszugehen. Zwischen den unabhängigen Variablen, also zwischen der MCF in der getauten Plasmaprobe und der Hämoglobinkonzentration sowie der Thrombozytenzahl bestand nur eine sehr schwache bzw. keine Korrelation (*Tabelle 35*). Zusätzlich lieferte die Durbin-Watson-Statistik einen Wert von 2,06, so dass hier von keiner Autokorrelation der Residuen auszugehen war. Bei Toleranz-Werten der Koeffizienten von ca. 0,705 - 0,861 sowie VIF-Werten (Varianzinflationsfaktor) von maximal 1,42 war eine Multikollinearität ebenfalls unwahrscheinlich. Probennummer GA_010 lag mit einer MCF von 32 mm als einziger Fall über dem 3-fachen der Standardabweichung, wurde bei einem Cook-Wert von 0,2 jedoch nicht von der Regression ausgeschlossen.

Abbildung 61 Homoskedastizität und Normalverteilung der Residuen für die FIBTEM Regression



Ergebnisse

Im F-Test ergab sich ein signifikantes Gesamtmodell ($F(3,95) = 81,516$; $p < 0,001$) mit einer hohen Anpassungsgüte (korr. $R^2 = 0,711$). Ca. 70% der im Vollblut gemessenen FIBTEM-MCF-Werte ließen sich somit aus den inkludierten Koeffizienten erklären (*Formel 2* und *Tabelle 36*). Die Fibrinogenkonzentration erreichte keine Signifikanz als Koeffizient.

Die Bedeutung der Hämoglobinkonzentration zeigte sich auch bereits bei Betrachtung der Korrelation und einfachen linearen Regression zwischen FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe und der getauten Plasmaprobe (*Abbildung 62*).

Formel 2 Abschätzung der FIBTEM-MCF aus der getauten Plasmaprobe

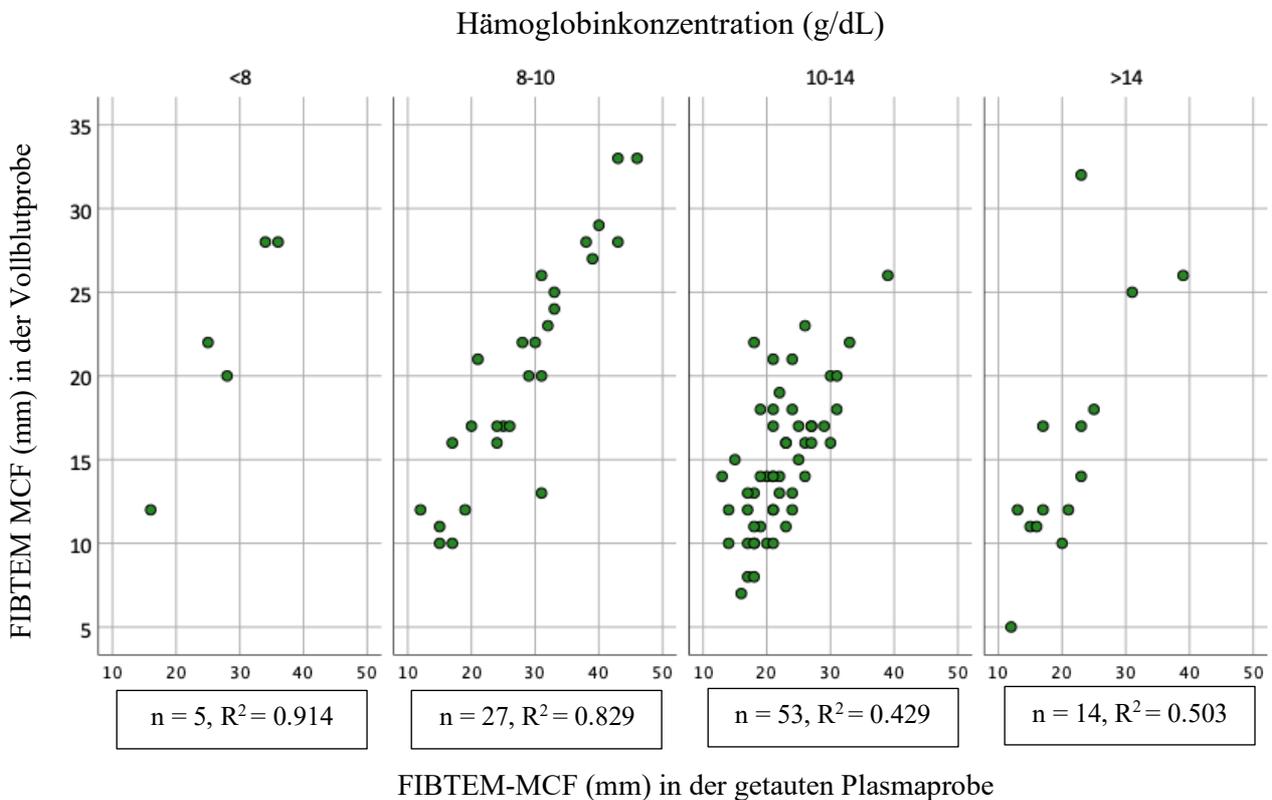
$$MCF (mm)_{VOLLBLUT} = 0,62 \times MCF (mm)_{Batch} + 0,014 \times TZ (Tsd./mL) - 0,37 \times Hb (g/dL) + 3,765$$

Korrigiertes R ²	0,711		
F	81,516		p < 0,001
Konstante	3,765	2,28 (Standardfehler)	p = 0,102
MCF	0,620	0,05 (Standardfehler)	p < 0,001
Hämoglobin	-0,373	0,17 (Standardfehler)	p = 0,029
Thrombozytenzahl	0,014	0,00 (Standardfehler)	p = 0,001

Tabelle 36 Regressionsanalyse zur Abschätzung der MCF aus der gefrorenen Plasmaprobe

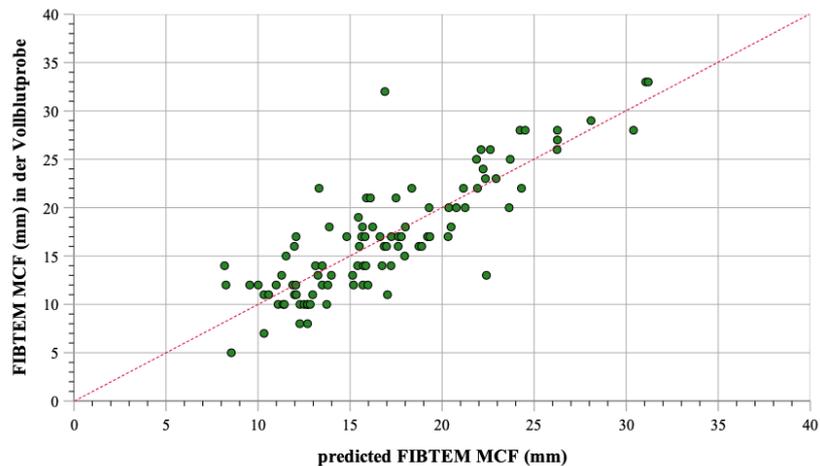
So lag die Anpassungsgüte bei Proben mit einem Hb unter 8 g/dL (n = 5) bei R² = 0,914 und bei Proben mit einem Hb zwischen 8-10 g/dL (n = 27) ergab sich ein R² von 0,829. In der Gruppe der Proben mit einem Hb über 10 g/dL lag die maximale Anpassungsgüte bei R² = 0,503.

Abbildung 62 Anpassungsgüte der Regression in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration



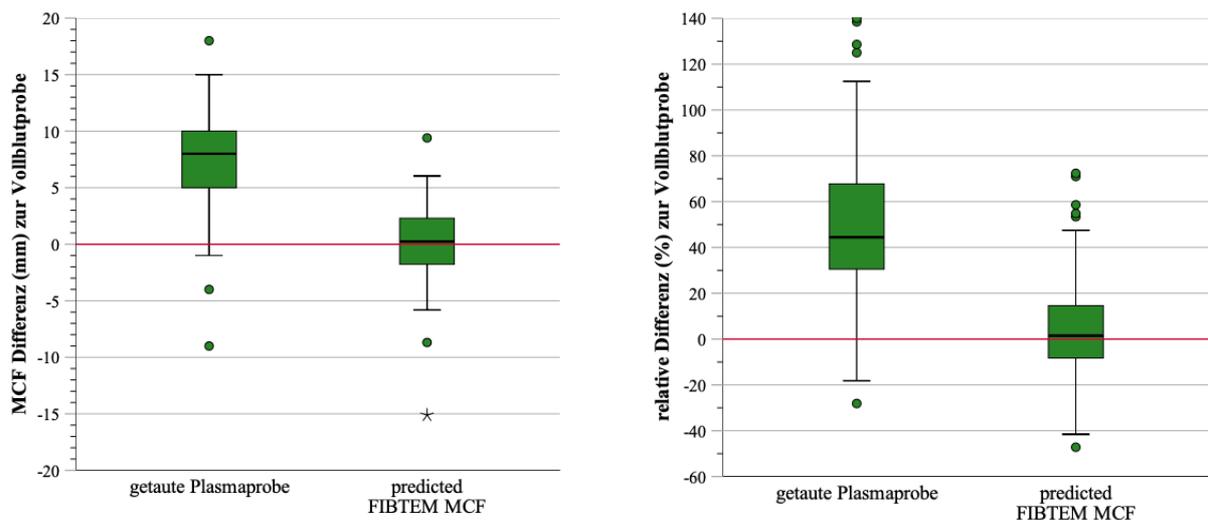
Die mittels *Formel 2* berechnete Variable „predicted FIBTEM-MCF“ korrelierte etwas stärker ($r = 0,820$; $p < 0,001$; *Abbildung 63*) mit der im Vollblut gemessenen MCF als die in der getauten Plasmaprobe gemessene MCF ($r = 0,792$; $p < 0,001$).

Abbildung 63 Korrelation zwischen FIBTEM-MCF und predicted FIBTEM-MCF



Die Differenz der predicted FIBTEM-MCF zur tatsächlich vorliegenden MCF in der Vollblutprobe war statistisch signifikant geringer als die Differenz der MCF zwischen getauter Plasmaprobe und Vollblutprobe (*Abbildung 64*). Durch Anwendung der *Formel 2* ließ sich die mediane Abweichung der MCF von + 8 mm auf + 0,24 mm bzw. von + 44 % auf ca. + 1,5 % reduzieren.

Abbildung 64 Absolute und relative Differenz der predicted FIBTEM MCF



Im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben zeigten sich nach Anwendung der *Formel 2* keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,618$) zwischen den gemessenen Werten der FIBTEM-MCF in den Vollblutproben und der errechneten Werten der predicted FIBTEM-MCF (siehe *Abbildung 65* und *Tabelle 37*).

Abbildung 65 Vergleich der predicted-MCF mit der FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe

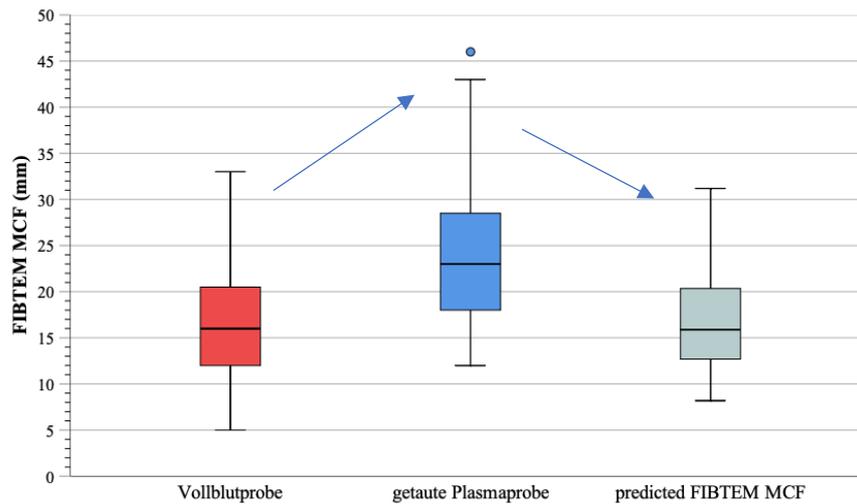


Tabelle 37 Vergleich der predicted FIBTEM-MCF zur Vollblut- und Plasmaprobe

	MCF in der Vollblutprobe	MCF in der getauten Plasmaprobe	Predicted MCF
Mittelwert	16,85	23,96	16,84
Median	16,00	23,00	15,89
Std. Abweichung	6,133	7,520	5,196
Minimum	5	12	8
Maximum	33	46	31
Interquartilabstand	9	11	8

Einheit der MCF: mm

Abbildung 66 präsentiert die Differenzen zwischen der FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe und der getauten Plasmaprobe bzw. der errechneten predicted FIBTEM-MCF und der Vollblutprobe nochmals anhand eines Bland-Altman-Plots. *Tabelle 38* liefert Informationen über die zugrunde liegende deskriptive Statistik.

Abbildung 66 Bland-Altman-Plot zum Vergleich der predicted FIBTEM-MCF

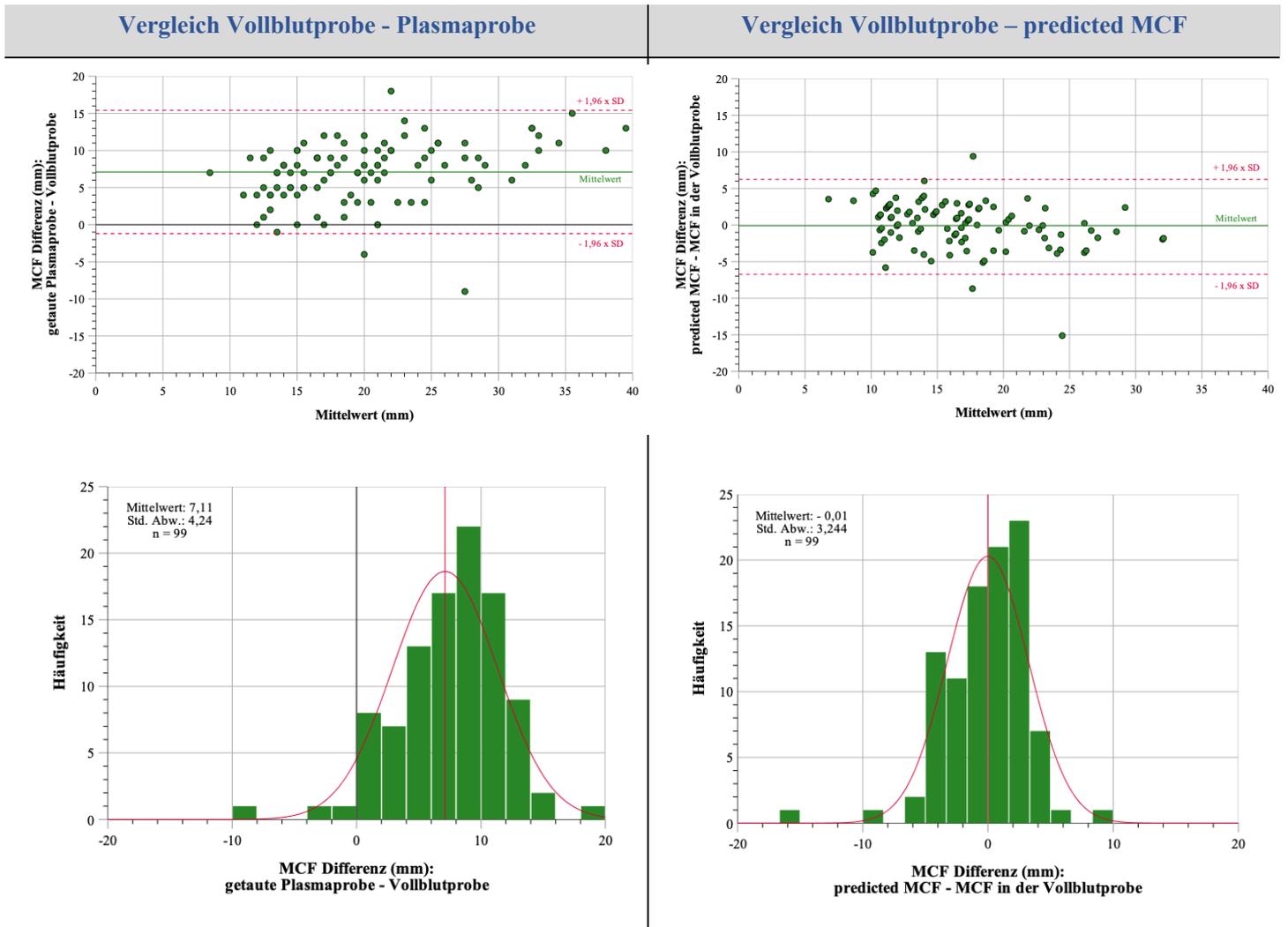


Tabelle 38 Deskriptive Statistik der FIBTEM-MCF Differenzen zwischen den Proben

	MCF Differenz (mm)	
	getaute Plasmaprobe - Vollblutprobe	predicted MCF - MCF in der Vollblutprobe
Mittelwert	7,11	- 0,01
Std. Abweichung	4,24	3,24
Median	8,00	0,24
Interquartilabstand	5,00	4,09
Minimum	-9,00	-15,1
Maximum	18,00	9,40

Anwendung des Regressionsmodell auf ein anderes Probenkollektiv

Die mittels *Formel 2* errechnete predicted-MCF wurde auch für die Proben mit einer Liegezeit über 4 Stunden untersucht (n = 22). Zwischen den MCF-Werten in den Vollblutproben und den errechneten Werten der predicted FIBTEM-MCF zeigte sich auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied mehr (p = 0,108). Die Korrelation zwischen FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe und der predicted FIBTEM-MCF war mit einem Spearman-Koeffizienten von $r = 0,856$ sehr stark (siehe *Abbildung 67 rechts*).

Abbildung 67 Vergleich der predicted MCF zur FIBTEM-MCF (Proben > 4 Stunden)

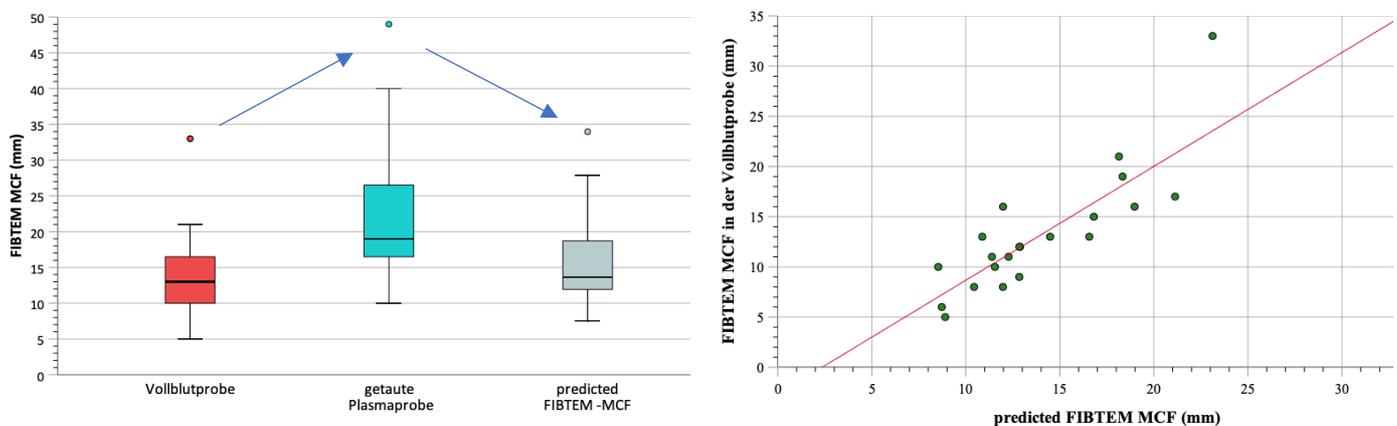


Tabelle 39 Vergleich zwischen predicted und gemessener FIBTEM-MCF (> 4 Stunden)

	MCF in der Vollblutprobe	MCF in der getauten Plasmaprobe	Predicted MCF
Mittelwert	14,14	21,18	14,82
Median	12,50	18,50	12,84
Std. Abweichung	7,29	8,45	5,78
Minimum	5	10	9
Maximum	33	49	33
Interquartilabstand	7	10	7

Einheit der MCF: mm

Die Differenzen zwischen der FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe und der getauten Plasmaprobe sowie zwischen der errechneten predicted FIBTEM-MCF sind auch hier nochmals anhand von Bland-Altman-Plots vergleichend dargestellt (*Abbildung 68*).

Abbildung 68 Bland-Altman-Plot zum Vergleich der predicted FIBTEM MCF (Proben > 4 Stunden)

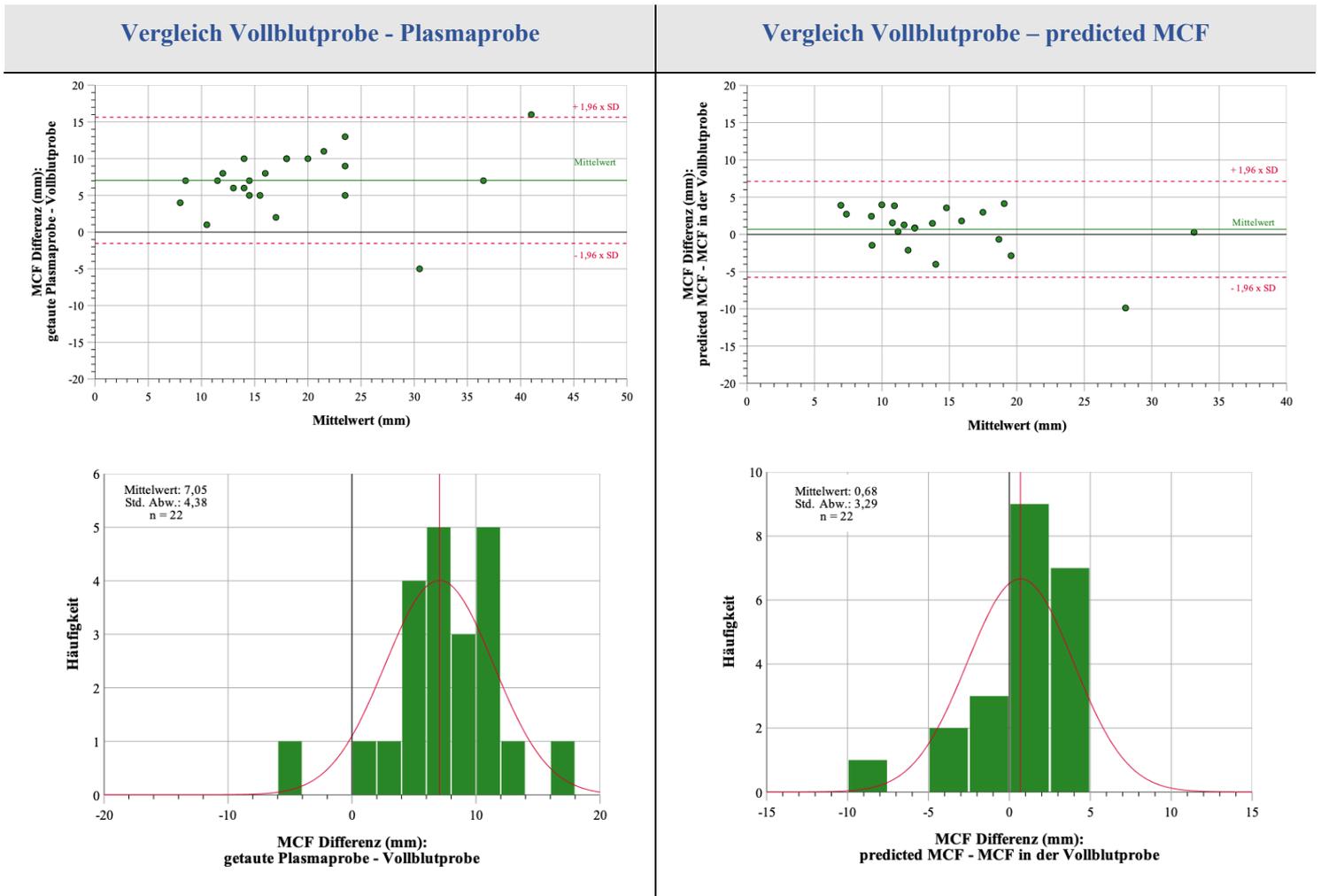


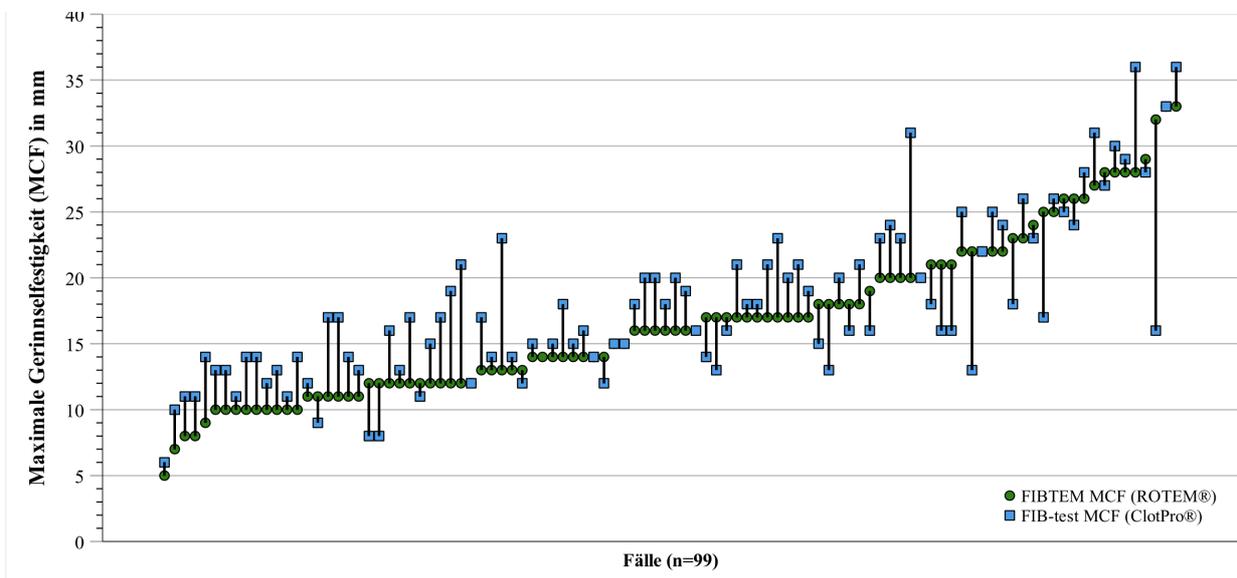
Tabelle 40 Deskriptive Statistik der FIBTEM-MCF Differenzen zwischen den Proben (Proben > 4 Stunden)

	MCF Differenz (mm)	
	getaute Plasmaprobe - Vollblutprobe	predicted MCF - MCF in der Vollblutprobe
Mittelwert	7,05	0,68
Std. Abweichung	4,38	3,29
Median	7,00	1,38
Interquartilabstand	5,00	3,99
Minimum	-5	-10
Maximum	16	4

Vergleich beider viskoelastischen Methoden

In 66 % der Fälle lag die gemessene FIB-test-MCF über der gemessenen FIBTEM-MCF. In diesen Fällen lag die Messdifferenz zwischen beiden Assays im Mittel bei ca. 3 (± 2) mm und maximal bei bis zu 11 mm. Nur in 8 Fällen stimmte die FIB-test MCF mit der FIBTEM-MCF exakt überein (Differenz = 0). In den restlichen 25 Fällen lag die gemessene FIBTEM-MCF über der gemessenen FIB-test MCF. Hier lag die Messdifferenz im Mittel bei ca. 4 (± 3) mm und maximal bei 16 mm (*Abbildung 69*). Die Proben dieser 25 Fälle kamen sowohl aus der Herzklinik (n = 12) als auch aus der hämostaseologischen Ambulanz (n = 13).

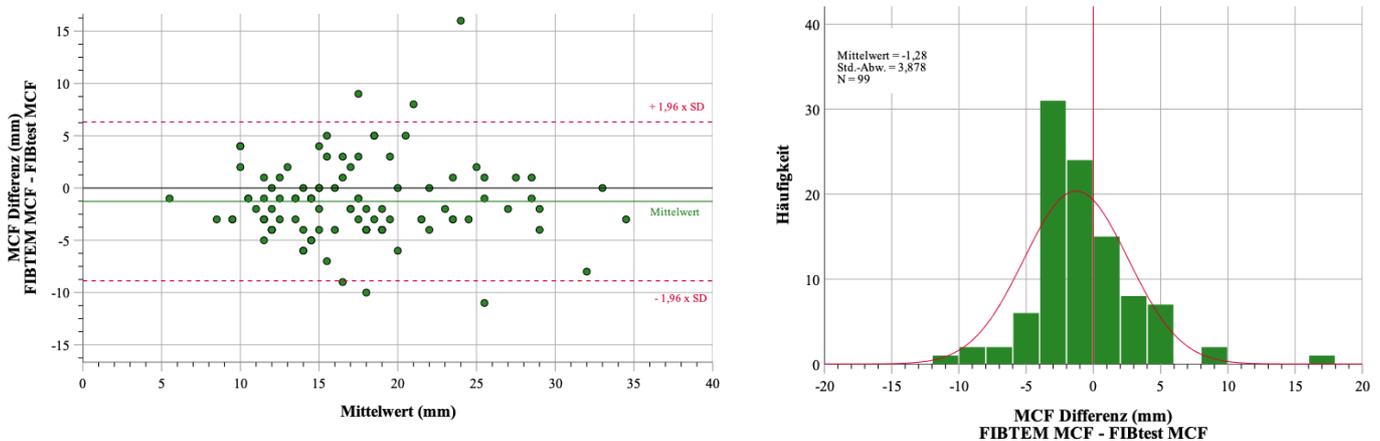
Abbildung 69 Direkter Vergleich der MCF Werte zwischen FIBTEM und FIB-test



Die Verarbeitungszeit der Proben in denen die MCF im FIB-test höher als im FIBTEM lag betrug im Mittel 98 (± 55) Minuten. Bei den Proben mit einer höheren FIBTEM-MCF gegenüber der FIB-test-MCF lag die mittlere Verarbeitungszeit bei 52 \pm 47 Minuten. Statistisch lag im Mann-Whitney-U-Test damit ein signifikanter Unterschied in der Verarbeitungszeit vor ($p < 0,001$). Es bestand auch eine schwache Korrelation zwischen Verarbeitungszeit der Probe und Messdifferenz ($r = -0,416$). In der Regressionsanalyse erreichte dieser Parameter allerdings keine Signifikanz zur Erklärung der Gesamtvarianz (siehe unten). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen fanden sich im Mann-Whitney-U-Test aber auch für den Quick-Wert ($p < 0,001$), die Hämoglobinkonzentration ($p < 0,008$) und die Thrombozytenzahl ($p = 0,001$).

Die Differenzen zwischen FIBTEM und FIB-test waren nicht normalverteilt (*Abbildung 70 rechts*) und der Methodenvergleich beider Assays anhand eines Bland-Altman-Plot somit formal nicht ohne Limitationen anwendbar (57). Ein Großteil der Messdifferenzen (ca. 94%, n = 93) befanden sich in einem Rahmen um die 1,96-fachen Standardabweichung vom Mittelwert der Messdifferenzen. Dieser Rahmen entsprach allerdings einer Messdifferenz von - 9 bis + 6 mm und erscheint damit für die klinische Praxis nicht praktikabel zu sein. Unabhängig davon schien auch keine Systematik in der Abweichung zwischen den beiden Assays vorzuliegen (*Abbildung 70 links*).

Abbildung 70 Bland-Altman Plot zum Vergleich zwischen Rotem® und ClotPro®



Zwischen den gemessenen MCF-Werten in den Vollblutproben, den frischen und den getauten Plasmaproben bestanden zwischen beiden Messverfahren statistisch hoch signifikante Unterschiede im Wilcoxon Test für verbundene Stichproben ($p < 0,001$), siehe *Abbildung 71*. Die Korrelation der gemessenen MCF Werte zwischen beiden Systemen bzw. Assays war jedoch sehr stark, insbesondere in den Plasmaproben, siehe *Tabelle 41* und *Abbildung 72*.

Tabelle 41 Korrelation der MCF zwischen FIBTEM und FIB-test in den verschiedenen Proben

		ClotPro®: FIB-test MCF (mm)		
		Vollblutprobe	frische Plasmaprobe	getaute Plasmaprobe
ROTEM®: FIBTEM MCF	Vollblutprobe	r = 0,771 **	r = 0,800 **	r = 0,794 **
	frische Plasmaprobe	r = 0,891 **	r = 0,941 **	r = 0,946 **
	getaute Plasmaprobe	r = 0,874 **	r = 0,946 **	r = 0,949 **

** $p < 0,001$

Abbildung 71 Vergleich der MCF-Werte zwischen den Assays und den verschiedenen Proben

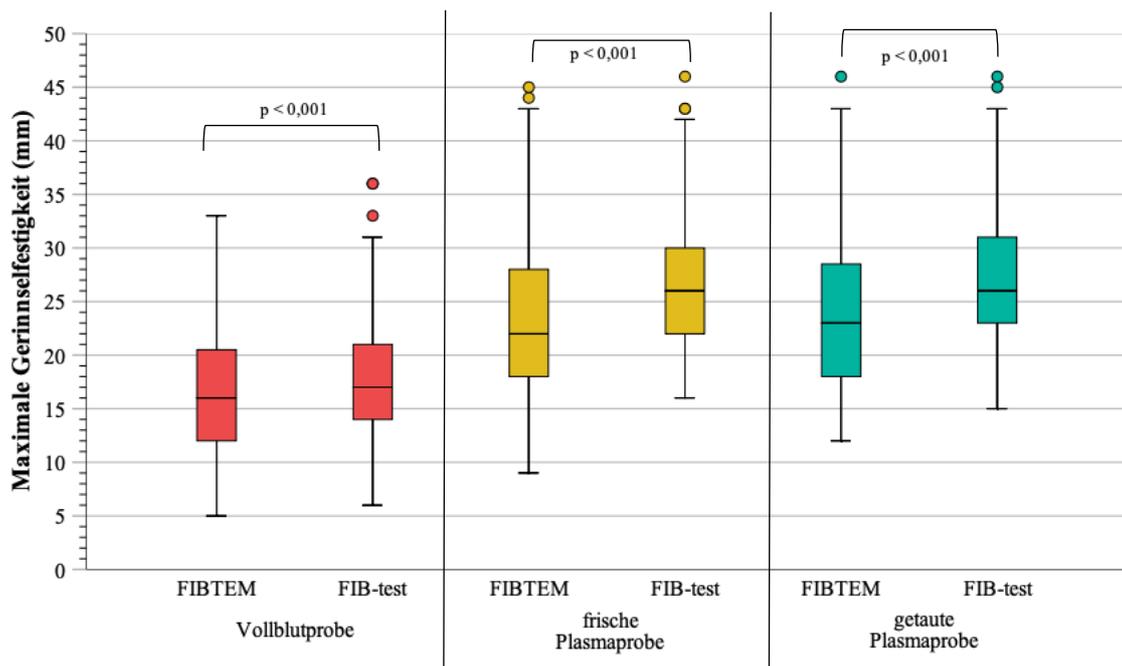
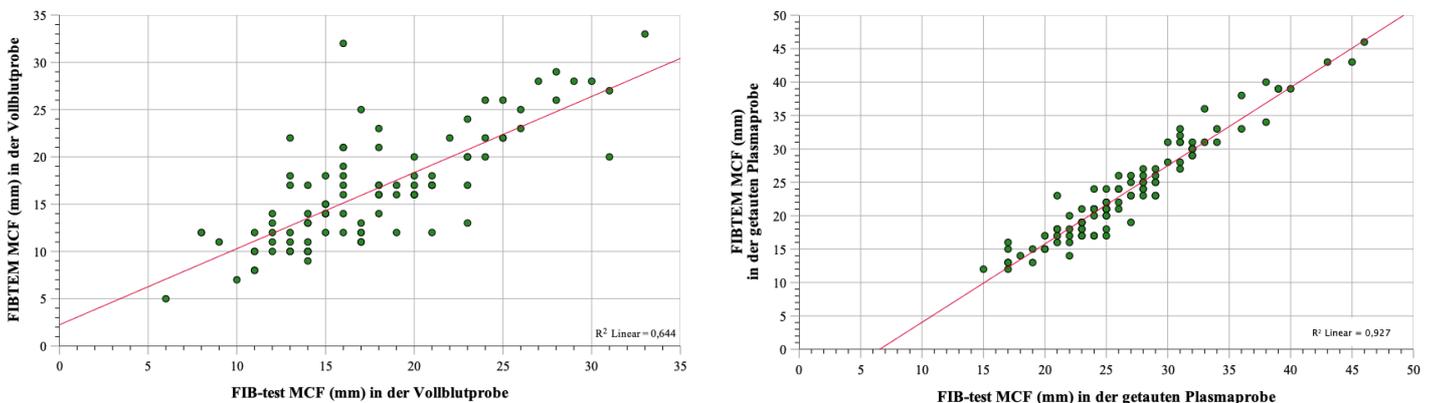


Abbildung 72 Korrelation zwischen FIBTEM-MCF und FIB-test-MCF



Wie in [Abbildung 72 links](#) ersichtlich bestand zwischen der MCF im FIBTEM und FIB-test ein linearer Zusammenhang. Die einfache lineare Regressionsanalyse mit der FIBTEM-MCF als abhängigen Variable und der FIB-test-MCF als unabhängigen Variable lieferte ein signifikantes Gesamtmodell mit $F(1,97) = 175,209$ und $p < 0,001$ welches in der Lage war ca. 65% der Varianz zu erklären (korrigiertes $R^2 = 0,64$). Aufgrund der in [Tabelle 42](#) dargestellten signifikanten Korrelationen von Quick, aPTT, Thrombozyten (TZ) und Hämoglobinkonzentration (Hb) sowie Liegezeit mit der gemessenen MCF-Differenz zwischen den beiden Verfahren ROTEM® und ClotPro® wurden diese Parameter in einem zweiten Schritt in die multiple lineare Regression schrittweise inkludiert.

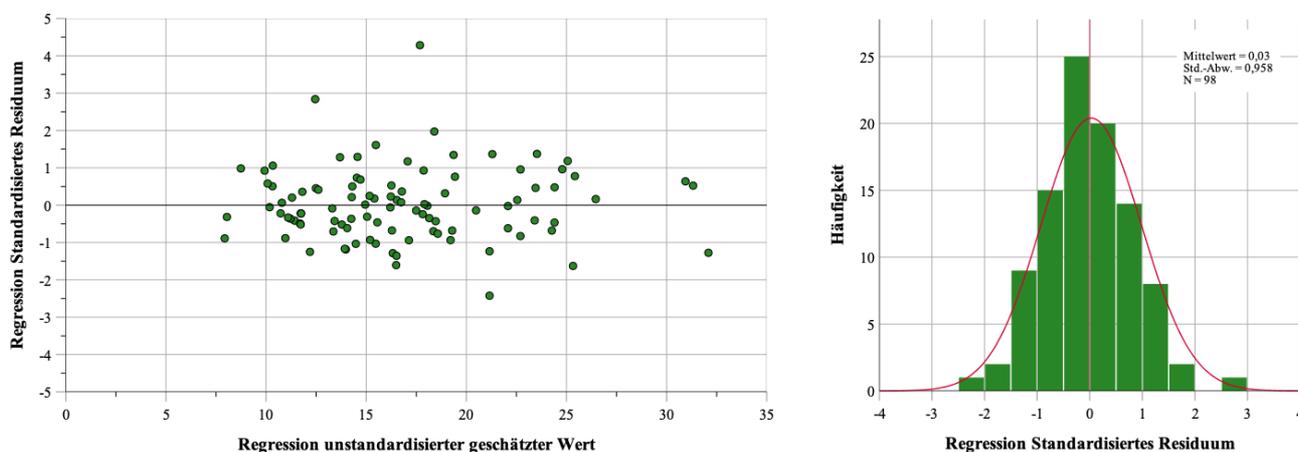
Tabelle 42 Korrelation der MCF-Differenz zwischen beiden Messmethoden und anderen Parametern

	Liegezeit	Clauss Fibrinogen	abgeleitetes Fibrinogen	Quick	aPTT	TZ	Hb	MCF
Delta MCF	-0,416**	0,082	0,026	0,510**	- 0,307**	0,435**	0,352**	0,313**
(n)	99	89	90	78	78	98	98	99

TZ: Thrombozyten

Wie in *Abbildung 73* dargestellt, waren die wesentlichen Voraussetzungen der Homoskedastizität und der Normalverteilung der Residuen gegeben. Auch in dieser Regression war die Probe GA_010 mit einer FIBTEM-MCF von 32 mm in der Vollblutprobe der einzige Ausreißer mit einem Wert über dem dreifachen der Standardabweichung (wurde nicht ausgeschlossen). Die Durbin-Watson-Statistik lieferte ein Wert von 1,916 und somit war auch von keiner nennenswerten Autokorrelation und damit einer Unabhängigkeit der Residuen auszugehen. Eine Multikollinearität lag ebenfalls nicht vor, denn alle partiellen Korrelationen lagen unter $r = 0,7$ und die Kollinearitätsstatistik der Regression lieferte Toleranzen um 0,99 bzw. VIF-Werte (Varianzinflationsfaktor) um 1,0.

Abbildung 73 Voraussetzungen für die Regression zwischen FIBTEM und FIB-test



Letztlich konnte durch Einschluss der Thrombozytenzahl (Einheit: Tausend/mL) eine Verbesserung des Bestimmtheitsmaßes auf ein korrigiertes R^2 von 0,724 erreicht werden. Die anderen Koeffizienten (siehe oben) erreichten keine Signifikanz und wurden ausgeschlossen. Im F-Test zeigte sich eine hohe Signifikanz für das Gesamtmodell: $F(2,74) = 100,926$, $p < 0,001$ (siehe *Tabelle 43*). Es ließen sich also ca. 70 % der gemessenen FIBTEM-Werte durch die Kombination aus FIB-test-MCF und Thrombozytenzahl erklären.

Formel 3 Umrechnung der FIB-test MCF in FIBTEM-MCF

$$FIBTEM\ MCF\ (mm)_{VOLLBLUT} = 0,79 \times FIBtest - MCF\ (mm)_{Vollblut} + 0,02 \times TZ\ (Tsd./mL) - 0,7$$

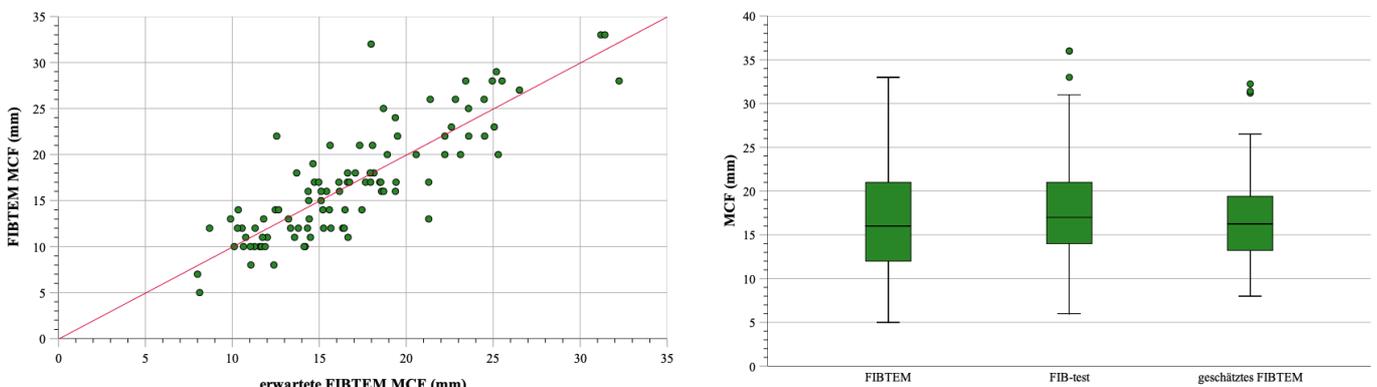
Korrigiertes R ²	0,724		
F	100,926		p < 0,001
Konstante	- 0,7	1,33 (Standardfehler)	p = 0,590
FIB-test MCF (mm)	0,79	0,06 (Standardfehler)	p < 0,001
Thrombozyten/ TZ (Tsd./mL)	0,02	0,004 (Standardfehler)	p < 0,001

Tabelle 43 Parameter der Regressionsanalyse zwischen FIBTEM und FIB-test

Der positive Koeffizient von 0,02 für die Thrombozytenzahl signalisierte eine nicht zu vernachlässigende statistische Abhängigkeit der FIBTEM-MCF von der Thrombozytenzahl in dem untersuchten Probenmaterial. In diesem mathematischen Modell hätte also eine Steigerung der Thrombozytenzahl von 100.000/mL auf 200.000/mL einen Anstieg der gemessenen FIBTEM-MCF von 2 mm zur Folge.

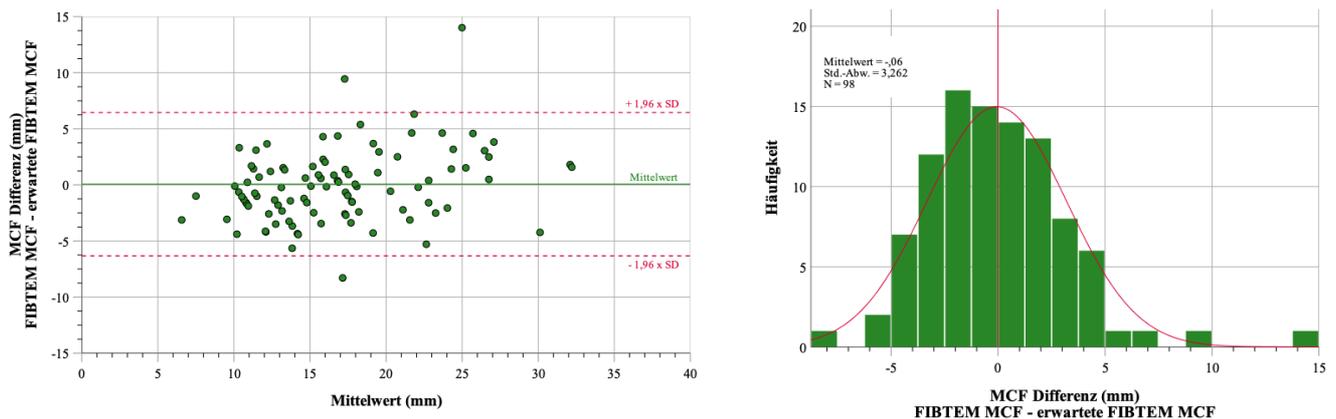
Zwischen der tatsächlich gemessenen FIBTEM-MCF und der mittels *Formel 3* errechneten erwarteten FIBTEM-MCF bestanden im Wilcoxon-Test keine signifikanten Unterschiede. Sowohl für das zur Regression herangezogene Probenkollektiv mit einer Verarbeitungszeit unter 4 Stunden (p = 0,482), als auch für das Probenkollektiv mit einer Verarbeitungszeit über 4 Stunden (p = 0,131). Die Korrelation zwischen der FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe und der erwarteten FIBTEM-MCF ist in *Abbildung 74* dargestellt und war sehr stark (r = 0,837). Für Proben über 4 Stunden Liegedauer lag die Korrelationsstärke bei r = 0,896.

Abbildung 74 Korrelation zwischen erwarteter FIBTEM MCF und gemessener FIBTEM MCF



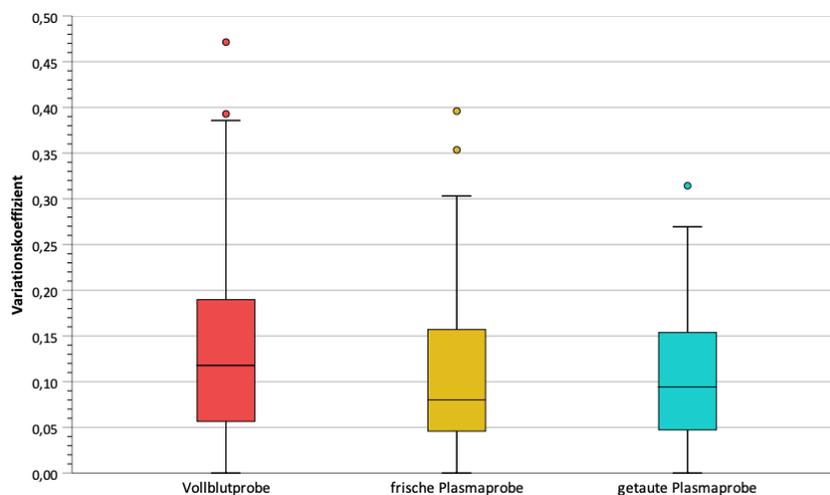
Zwischen den Messdifferenzen von FIBTEM und FIB-test sowie FIBTEM und erwartetes FIBTEM lag im t-Test für verbundene Stichproben ein statistisch hoch signifikanter Unterschied vor ($p < 0,001$). Mit Blick auf das Bland-Altman-Diagramm in *Abbildung 75* und dem Vergleich zu *Abbildung 70* zeigte sich aber, dass durch Anwendung der Regression keine praktisch relevante Reduzierung der Messdifferenzen erzielt werden konnte. Der Bereich der 1,96-fachen Standardabweichung um den Mittelwert lag bei ca. ± 6 mm.

Abbildung 75 Bland-Altman-Plot zum Vergleich zwischen FIBTEM MCF und erwarteter FIBTEM MCF



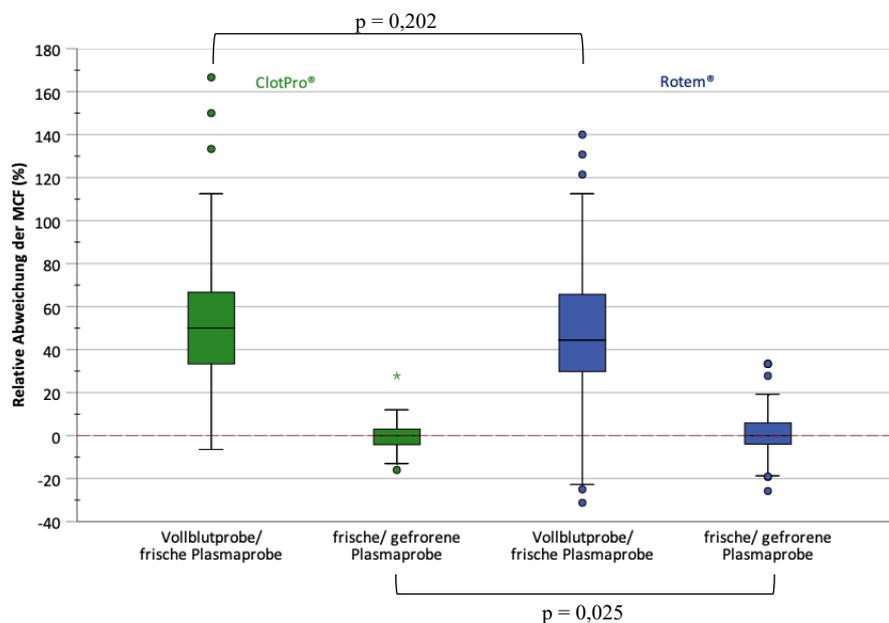
Bei Betrachtung der Variationskoeffizienten zwischen den beiden Messverfahren zeigte sich, dass diese in den Plasmaproben geringer waren als in der Vollblutprobe (*Abbildung 76*). So lag beispielsweise der VK in der Vollblutprobe im Median bei 0,12 (IQA: 0,13) mit einem Maximum bei 0,47 und der VK in den Plasmaproben geringfügig darunter.

Abbildung 76 Variationskoeffizient der MCF zwischen den beiden Messverfahren



Die relativen Messdifferenzen der MCF zwischen der Vollblut- und der Plasmaprobe aber auch zwischen der frischen und der getauten Plasmaprobe waren bei beiden Geräten ähnlich (*Abbildung 77*). Im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben ergaben sich zwischen beiden Verfahren keine statistisch signifikanten Unterschiede in der relativen MCF Abweichung zwischen der Vollblutprobe und der frischen Plasmaprobe ($p = 0,202$). Die Abweichung zwischen frischer und gefrorener bzw. getauter Probe erreichte zwischen den beiden Verfahren nur knapp einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,025$).

Abbildung 77 Relative Differenzen zwischen den Proben in Abhängigkeit vom Messverfahren



Weitere Ergebnisse

Untersucherabhängigkeit

Von den 100 untersuchten Proben wurden 57 Proben durch den Studienarzt verarbeitet und 43 Proben durch das Laborpersonal der Gerinnungsambulanz. Insbesondere die aus der Ambulanz stammenden Proben wurden durch das Laborpersonal und die aus der Herzkllinik stammenden Proben überwiegend durch den Studienarzt untersucht und verarbeitet. Es ergab sich dadurch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchenden ($p < 0,001$) im Chi-Quadrat-Test (siehe *Tabelle 44*).

Tabelle 44 Vier-Felder-Tafel: Untersucher und Herkunft der Proben

	Ambulanz	Herzkllinik	Summe
Studienarzt	4	53	57 (57%)
Laborpersonal	19	24	43 (43%)
Summe	23 (23%)	77 (77%)	100 (100%)

Die Proben aus der Ambulanz ($n = 23$) und der Herzkllinik ($n = 77$) unterschieden sich aufgrund des zugrunde liegenden, unterschiedlichen Patientenkollektivs erwartungsgemäß in der Ausprägung der gemessenen Parameter (*Ergebnisse des Mann-Whitney-U Test in Tabelle 45*).

Tabelle 45 Vergleich der Messparameter in Abhängigkeit von Probenherkunft und Untersucher

Parameter	Probenherkunft (Herzkllinik - Ambulanz)	Untersucher (Studienarzt – Laborpersonal)
Verarbeitungszeit (Min.)	$p < 0,001$	$p = 0,324$
<i>Zeit bis zur Messung im Batchverfahren (Tage)</i>	$p = 0,117$	$p = 0,717$
<i>Clauss Fibrinogen (mg/dL)</i>	$p = 0,357$	$p = 0,238$
<i>abgeleitetes Fibrinogen (mg/dL)</i>	$p = 0,891$	$p = 0,173$
PZ/ Quick (%)	$p < 0,001$	$p = 0,038$
<i>aPTT (Sek.)</i>	$p = 0,068$	$p = 0,071$
<i>FIBTEM MCF (mm)</i>	$p = 0,485$	$p = 0,961$
<i>FIBTEM CT (Sek.)</i>	$p = 0,520$	$p = 0,983$
FIB-test MCF (mm)	$p < 0,001$	$p = 0,182$
<i>FIB-test CT (Sek.)</i>	$p = 0,708$	$p = 0,001$
TPA-test ML (%)	$p < 0,001$	$p = 0,001$
Hämoglobin (g/dL)	$p < 0,001$	$p < 0,010$
Thrombozyten ($10^3/\text{mL}$)	$p < 0,001$	$p < 0,003$
Leukozyten ($10^3/\text{mL}$)	$p < 0,001$	$p = 0,006$

Zwischen Proben aus der Ambulanz und Proben aus der Herzklirik bestand ein signifikanter Unterschied in der Verarbeitungszeit ($p < 0,001$), nicht jedoch zwischen den Untersuchenden ($p = 0,324$).

Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der gemessenen FIB-test MCF zwischen der Herzklirik und der Ambulanz ($p < 0,001$), nicht aber zwischen den Untersuchenden ($p = 0,182$). Demgegenüber waren für die gemessene FIBTEM-MCF keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Probenherkunft ($p = 0,485$) und den Untersuchenden ($p = 0,961$) auszumachen. Die FIB-test CT verhielt sich gegensätzlich zur FIB-test MCF. Hier lag ein statistisch signifikanter Unterschied der FIB-test CT zwischen den Untersuchenden vor ($p = 0,001$), während sich die FIB-test CT zwischen den Proben der Herzklirik und der Ambulanz nicht signifikant unterschied ($p = 0,708$).

Der signifikante Unterschied der maximalen Lyse im TPA-test zwischen Probenherkunft und Untersuchenden war durch die Gabe von Tranexamsäure bei einem Großteil der Patienten aus der Herzklirik zu erklären ($n = 57$).

Die absolute Differenz der FIB-test-MCF (von getauter Probe zur Vollblutprobe) zeigte zwischen den Untersuchenden keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,356$; *Abbildung 78*). Für die FIBTEM-MCF war die Differenz zwischen den Untersuchenden signifikant ($p = 0,002$). Ein inhaltlich gleiches Ergebnis zeigte sich auch bei Betrachtung der relativen Abweichung zwischen Vollblut- und getauter Plasmprobe. Die Ergebnisse der explorativen Datenanalyse werden in *Tabelle 46* präsentiert. Zu beachten ist, dass die Messungen der getauten Proben im Batchverfahren aber ausschließlich vom Studienarzt durchgeführt wurden.

Die Korrelationsstärken zwischen der MCF in der Vollblutprobe und der frischen Plasmprobe waren unabhängig vom Untersucher in beiden Assays (FIBTEM/ FIB-test) sehr hoch (*siehe Tabelle 47*).

Zwischen der in den Vollblutproben gemessenen FIBTEM-MCF und FIB-test-MCF zeigte sich unabhängig vom Untersuchenden eine starke Korrelation. Die Regressionsgrade ließ sich für die durch den Studienarzt erhobenen Messwerte besser beschreiben ($R^2 = 0,786$), als für die durch das Laborpersonal erhobenen Werte ($R^2 = 0,474$), siehe *Abbildung 79*.

Tabelle 46 Differenzen zwischen Vollblut- und getauter Plasmaprobe nach Untersucher

			Min.	Max.	Median	IQA
ClotPro®	Absolute Differenz	Studienarzt	4 mm	15 mm	8 mm	3 mm
		Laborpersonal	0 mm	15 mm	9 mm	4 mm
	Relative Differenz	Studienarzt	19 %	150 %	47 %	30 %
		Laborpersonal	0 %	188 %	56 %	46 %
	Variationskoeffizient	Studienarzt	0,12	0,61	0,27	0,13
		Laborpersonal	0,00	0,68	0,31	0,19
ROTEM®	Absolute Differenz	Studienarzt	-4 mm	18 mm	9 mm	6 mm
		Laborpersonal	-9 mm	12 mm	6 mm	5 mm
	Relative Differenz	Studienarzt	- 18 %	140 %	50 %	38 %
		Laborpersonal	- 28 %	129 %	38 %	32 %
	Variationskoeffizient	Studienarzt	0,00	0,58	0,28	0,17
		Laborpersonal	0,00	0,55	0,23	0,15

Abbildung 78 Absolute Differenz/ VK zwischen Vollblut und Plasma in Abhängigkeit vom Untersucher

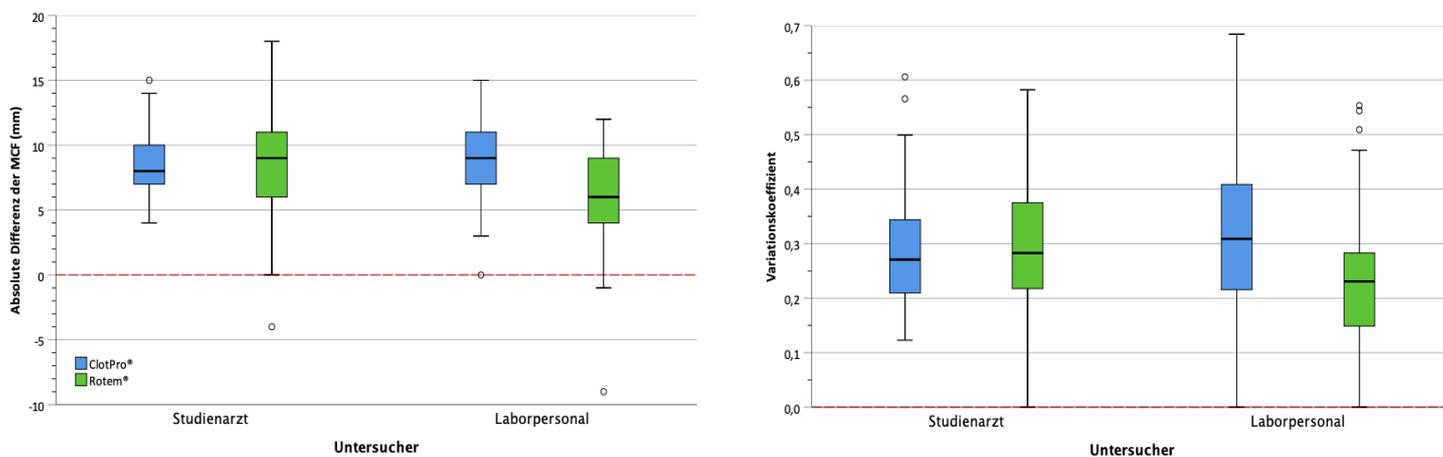
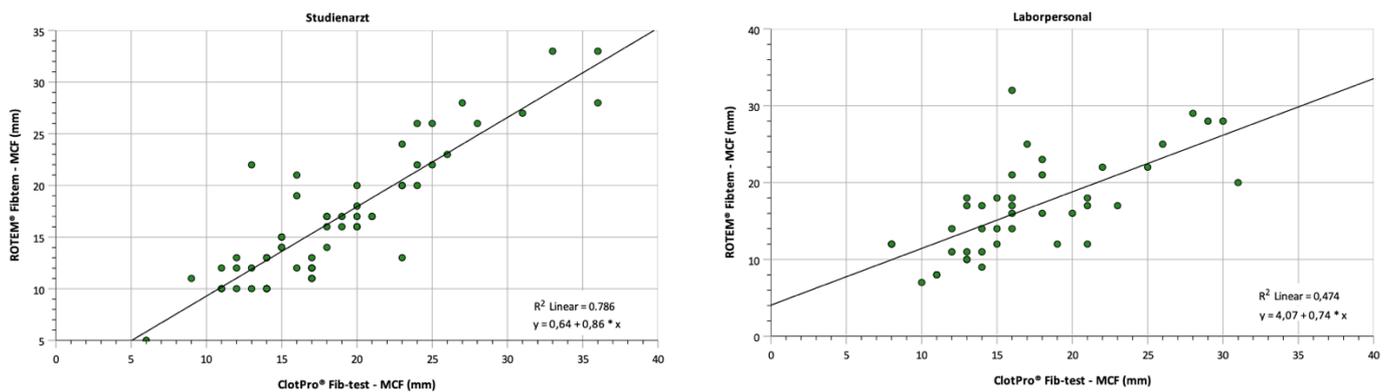


Tabelle 47 Korrelation der MCF zwischen Vollblut und frischer Plasmaprobe nach Untersucher

Studienarzt		Laborpersonal	
ROTEM®	ClotPro®	ROTEM®	ClotPro®
0,794 **	0,913 **	0,809 **	0,817 **
(n = 57)	(n = 57)	(n = 43)	(n = 42)

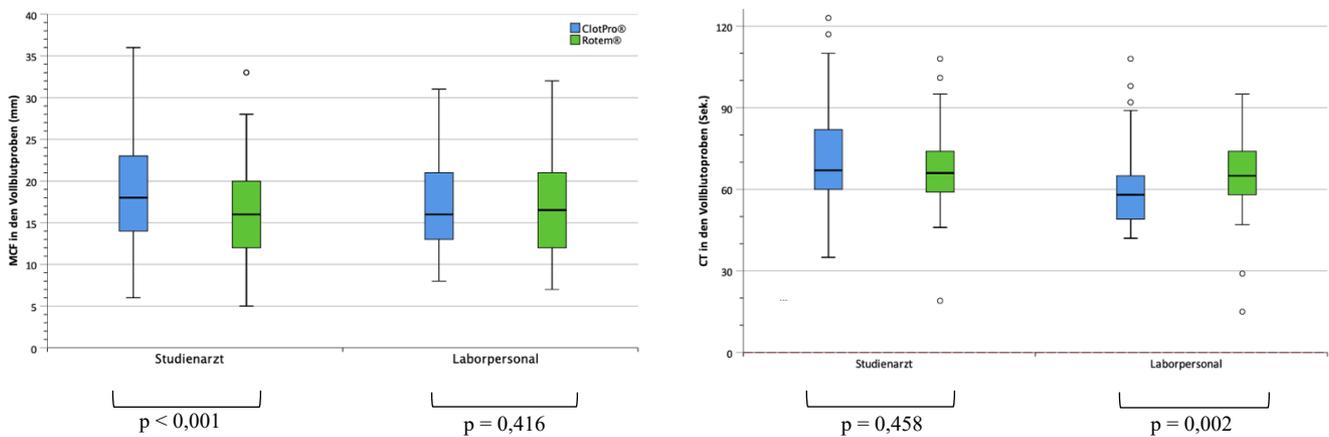
** $p < 0,001$

Abbildung 79 Korrelation zwischen FIBTEM-MCF und FIB-test-MCF in Abhängigkeit vom Untersucher



Im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der im ROTEM® und im ClotPro® gemessenen MCF für die durch den Studienarzt verarbeiteten Vollblutproben ($p < 0,001$), nicht jedoch für die durch das Laborpersonal verarbeiteten Proben ($p = 0,416$). Für die CT zeigte sich ein umgekehrtes Bild (siehe [Abbildung 80](#)).

Abbildung 80 Vergleich der MCF im ClotPro® und ROTEM® in Abhängigkeit vom Untersucher



Die folgende Differenz bezieht sich auf die Messung zwischen beiden Assays: Unabhängig vom Untersuchenden unterschied sich die absolute und relative Differenz der MCF zwischen FIB-test und FIBTEM in den Vollblutproben nicht signifikant ($p = 0,233$, siehe [Abbildung 81](#)). Im Median lag die MCF im ClotPro® beim Studienarzt um + 11 % (IQA 25 %) bzw. + 2 mm (IQA 4 mm) über der Messung im ROTEM®. Beim Laborpersonal waren es im Median + 7,1 % (IQA 43 %), bzw. + 1 mm (IQA +6 mm).

Tabelle 48 MCF und CT in den Vollblutproben in Abhängigkeit vom Untersucher

			Min.	Max.	Median	IQA
ClotPro®	MCF	Studienarzt	6 mm	36 mm	18 mm	9 mm
		Laborpersonal	8 mm	31 mm	16 mm	8 mm
	CT	Studienarzt	35 Sek.	123 Sek.	67 Sek.	25 Sek.
		Laborpersonal	42 Sek.	108 Sek.	58 Sek.	16 Sek.
ROTEM®	MCF	Studienarzt	5 mm	33 mm	16 mm	9 mm
		Laborpersonal	7 mm	32 mm	16,5 mm	9 mm
	CT	Studienarzt	19 Sek.	108 Sek.	66 Sek.	16 Sek.
		Laborpersonal	15 Sek.	95 Sek.	65 Sek.	17 Sek.

Abbildung 81 Absolute und relative Differenz der MCF zwischen beiden Systemen nach Untersucher

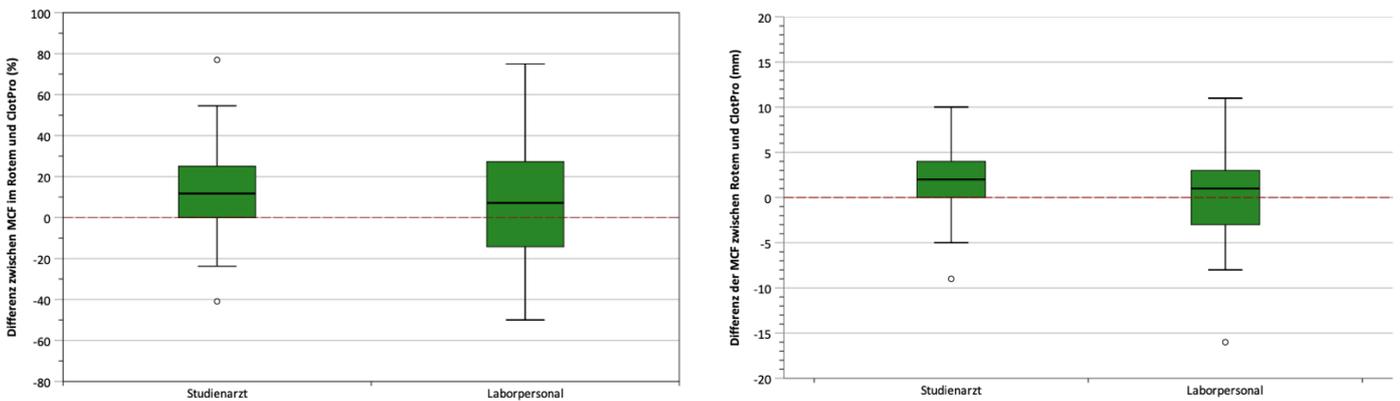
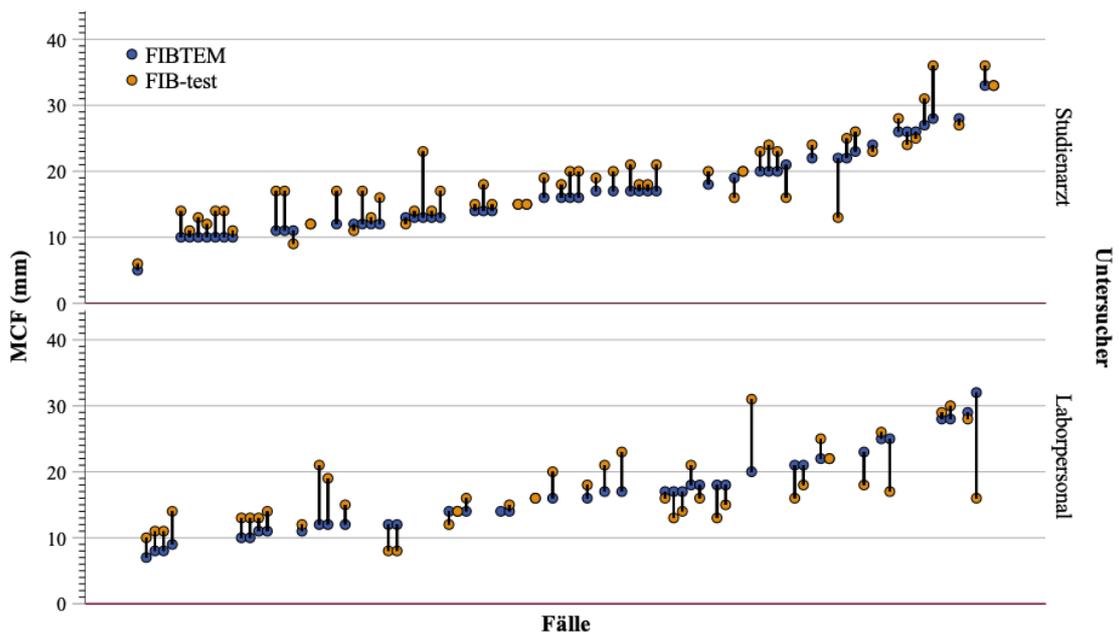


Abbildung 82 Vergleich der MCF im ROTEM® und ClotPro® in Abhängigkeit vom Untersucher



Die MCF-Werte in den Vollblutproben des FIB-test lagen beim Studienarzt größtenteils über den gemessenen MCF-Werten im FIBTEM (siehe *Abbildung 82*).

Diese aufgezeigten Differenzen zwischen den Untersuchenden könnten auf die signifikanten Unterschiede in der Hämoglobinkonzentration zurückzuführen zu sein. In der Gruppe des Laborpersonals korrelierte die Differenz der MCF zwischen ROTEM® und ClotPro® viel stärker mit dem Hämoglobingehalt ($r = -0,517$), als in der Gruppe der durch den Studienarzt verarbeiteten Proben ($r = 0,128$), siehe *Tabelle 45* und *Tabelle 49*.

Tabelle 49 Korrelationen der MCF-Differenz zwischen ROTEM® und ClotPro®

	MCF Differenz (ROTEM - ClotPro)						
	FIBTEM MCF	FIB-test MCF	Clauss Fibrinogen	PZ/ Quick	aPTT	Hb	Thrombozyten
Studienarzt	-0,387 **	0,061	-0,064	-0,429 **	0,465 **	-0,128	-0,307 *
Laborpersonal	-0,513 **	0,210	-0,252	-0,580 **	0,302	-0,517 **	-0,539 **

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

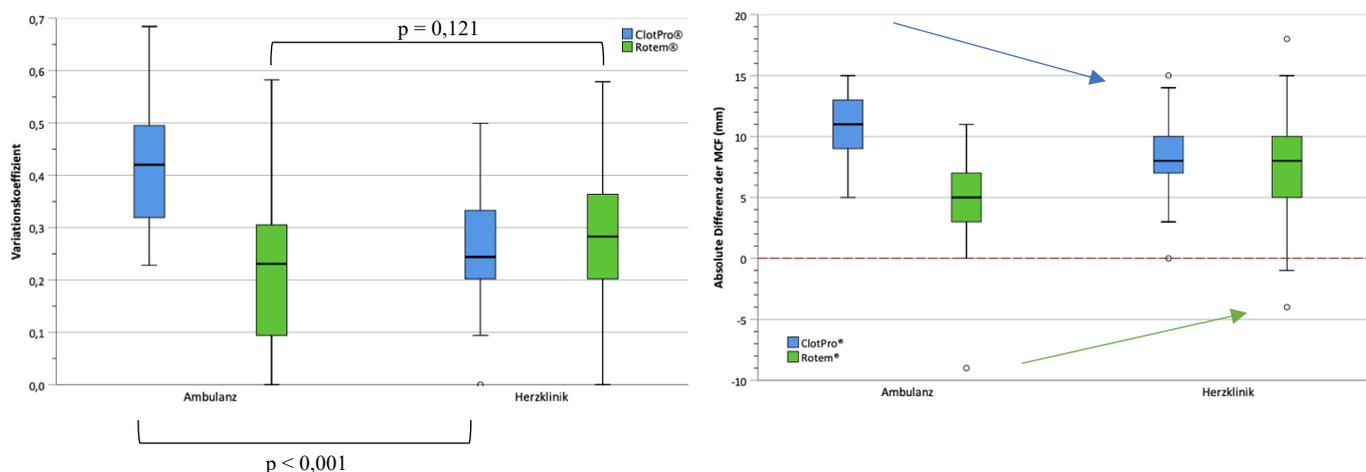
Probenherkunft

77 Proben stammten aus der Herzklinik und 23 Proben aus der Gerinnungsambulanz. Hinsichtlich der erhobenen Parameter bestanden die bereits im vorherigen Kapitel beschriebenen Unterschiede zwischen den Proben (siehe *Tabelle 45*).

In den Proben aus der Gerinnungsambulanz lag der mittlere VK der FIB-test-MCF zwischen der Vollblut- und der getauten Plasmaprobe bei durchschnittlich 0,42 ($\pm 0,12$). Proben aus der Herzklinik wiesen demgegenüber einen mittleren VK von 0,26 ($\pm 0,16$) auf. Für das ROTEM® bzw. das FIBTEM-Assay zeigten sich unabhängig von der Probenherkunft vergleichbare Variationskoeffizienten für die Messungen zwischen Vollblut- und getauter Plasmaprobe. Die VKs der Proben aus der Ambulanz lagen im Mittel bei 0,23 ($\pm 0,16$) und in den Proben aus der Herzklinik bei durchschnittlich 0,28 ($\pm 0,13$), *Abbildung 83 links*.

Unabhängig von der Probenherkunft und vom Messverfahren lag die, in der getauten Plasmaprobe gemessene MCF aber immer signifikant über der in der Vollblutprobe gemessenen MCF (siehe *Abbildung 83 rechts*).

Abbildung 83 MCF-Differenz zwischen Vollblut- und getauter Plasmaprobe nach Probenherkunft



Die Höhe der absoluten MCF-Differenz zwischen Vollblutprobe und getauter Plasmaprobe im FIB-test zeigte jedoch eine statistisch signifikante Abhängigkeit von der Probenherkunft (*Abbildung 83 rechts*). Gegenüber den Proben aus der Herzkllinik war in den Proben aus der Ambulanz eine signifikant höhere absolute und relative Abweichung zwischen der MCF in den Plasma- und den Vollblutproben auszumachen. Im Median lag die Differenz bei + 11 mm (IQA 4) in den Proben aus der Ambulanz und bei + 8 mm (IQA 3,5) in den Proben aus der Herzkllinik.

Im Unterschied zum FIB-test zeigte sich beim FIBTEM eine größere Abweichung zwischen Vollblut und getauter Plasmaprobe in den Proben aus der Herzkllinik. Die FIBTEM-MCF wies in den Proben aus der Ambulanz eine mediane Differenz von + 5 mm (IQA: 5) auf und war damit signifikant geringer als in den Proben aus der Herzkllinik ($p = 0,002$). Dort lag der Median bei + 8 mm (IQA: 5).

Für die Proben aus der Ambulanz, aber auch für die Proben aus der Herzkllinik bestanden starke Korrelationswerte zwischen der in der Vollblutprobe und der in den Plasmaproben gemessenen MCF (*Tabelle 50*).

Tabelle 50 Korrelation der MCF (Vollblut – frische Plasmaprobe) in Abhängigkeit von der Probenherkunft

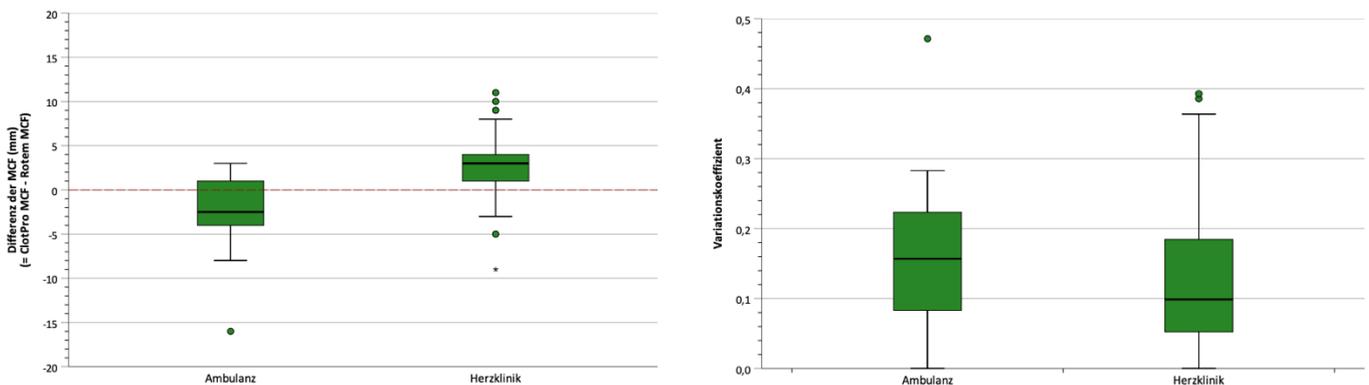
	Herzkllinik		Ambulanz	
	ClotPro® gPPP	ROTEM® gPPP	ClotPro® gPPP	ROTEM® gPPP
ClotPro®: MCF im VB	0,895**	0,890**	0,839**	0,846**
ROTEM®: MCF im VB	0,808**	0,819**	0,747**	0,788**

Spearman-Korrelationskoeffizienten; VB: Vollblutprobe; gPPP: getaute Plasmaprobe ** $p < 0,01$

Mittels einfacher linearer Regression konnte die Varianz zwischen der FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe und der frischen Plasmaprobe für die Proben aus der Ambulanz schlechter beschrieben werden ($R^2 = 0,515$; $n=22$), als für die Proben aus der Herz klinik ($R^2 = 0,758$; $n=76$). Auch im FIB-test zeigte sich eine bessere lineare Regression für die Proben der Herz klinik ($R^2 = 0,841$; $n=76$), als für die Proben aus der Ambulanz ($R^2 = 0,675$; $n=21$).

Die FIB-test-MCF im Vollblut lag bei den Proben aus der Herz klinik im Median um + 3 mm (IQA: 3) höher als die gleichzeitig gemessene FIBTEM-MCF. Bei Proben aus der Ambulanz lieferte jedoch das ROTEM[®] häufig höhere MCF-Werte. Hier lag die FIB-test-MCF im Median um 2,5 mm (IQA 5 mm) unter der des FIBTEM (*Abbildung 84*).

Abbildung 84 Differenz und VK der MCF zwischen ROTEM[®] und ClotPro[®] nach Probenherkunft

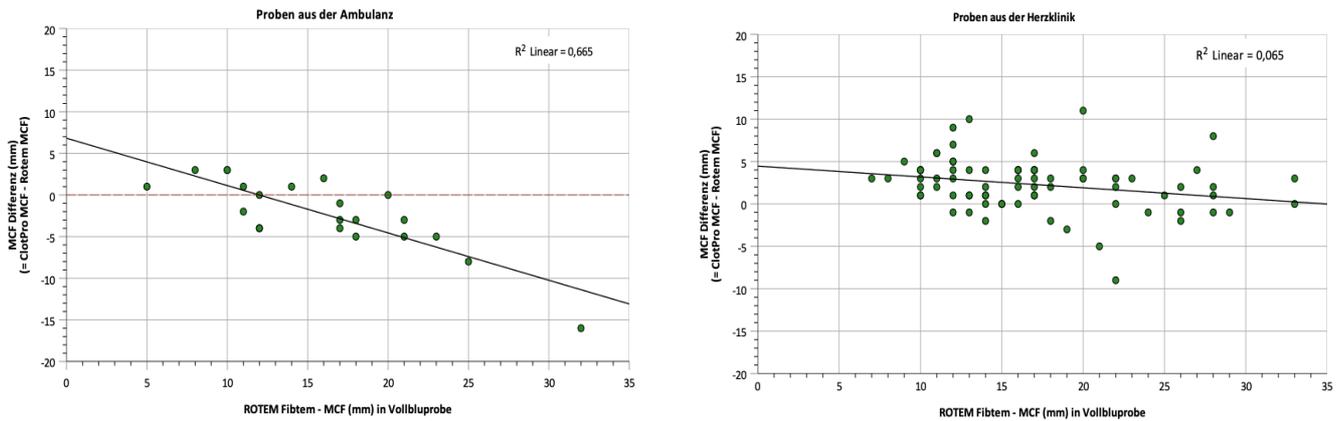


Es schien also eine Abhängigkeit von der Probenherkunft bzw. den Faktoren, welche die beiden Probengruppen unterscheiden, zu bestehen ($p < 0,001$).

Der Variationskoeffizient zwischen den MCF-Werten im Vollblut beider Assays lag in den Proben aus der Herz klinik im Median bei 0,1 (IQA: 0,13) und war damit im Vergleich zu den Proben aus der Ambulanz etwas geringer. Hier zeigte sich zwischen den Assays ein VK von im Median 0,16 (IQA: 0,15), *Abbildung 84*.

Proben aus der Ambulanz zeigten mit zunehmender FIBTEM-MCF in der Vollblutprobe auch eine zunehmende Abweichung der korrespondierenden FIB-test-MCF ($r = -0,776$; $p < 0,001$), siehe *Abbildung 85*. Bei den Proben aus der Herz klinik fand sich hingegen keine signifikante Korrelation ($r = -0,305$; $p = 0,07$).

Abbildung 85 Korrelation der FIBTEM-MCF und der MCF Differenz zwischen beiden Assays



In den Proben aus der Ambulanz zeigte sich außerdem noch eine signifikante, aber schwache Korrelation des VK zwischen FIB-test-MCF-Messungen im Vollblut und getauter Plasmaprobe mit der maximalen Lyse im TPA-test (Tabelle 51). Für die Proben aus der Herzklinik konnte diese Korrelation nicht gezeigt werden und auch im ROTEM® zeigte sich keine Korrelation mit der maximalen Lyse (Tabelle 52).

Tabelle 51 Korrelationen des VK und der abs. FIB-test Differenz (Vollblut – Plasma) nach Probenherkunft

		MCF _{VB}	LI	Hb	Thrombozyten	Quick	Liegezeit
Ambulanz	VK	-0,756**	-0,584**	0,641**	-0,181	-0,093	-0,239
	Differenz	-0,055	0,022	0,338	0,314	0,022	-0,036
Herzlinik	VK	-0,738**	-0,135	0,658**	-0,142	-0,142	0,091
	Differenz	-0,047	0,164	0,488**	0,201	0,169	-0,092

** $p < 0,001$, Spearman-Korrelationskoeffizienten

Tabelle 52 Korrelationen des VK und der abs. FIBTEM Differenz (Vollblut – Plasma) nach Probenherkunft

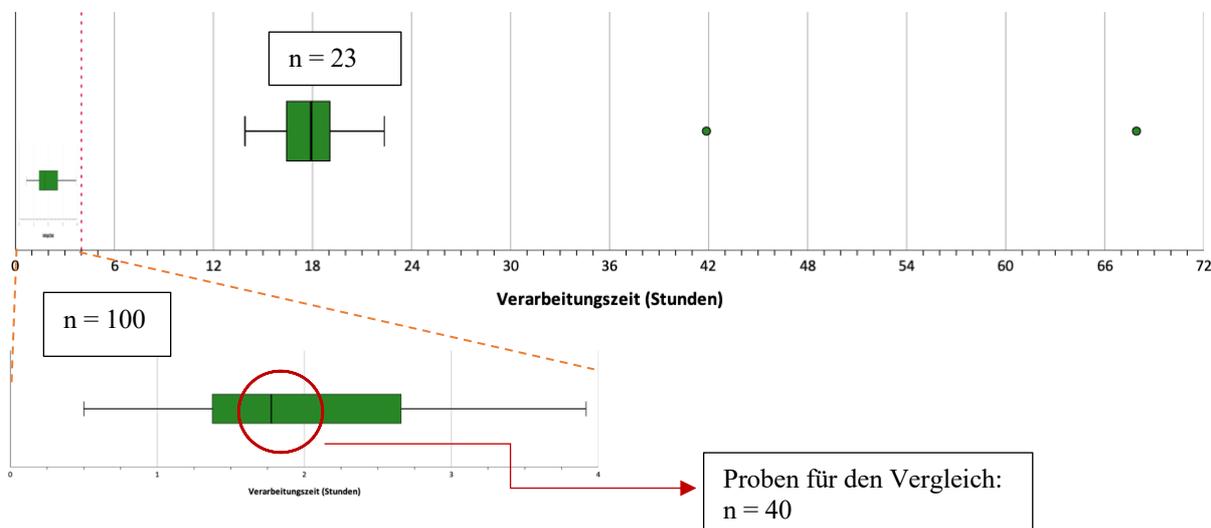
		MCF _{VB}	LI	Hb	Thrombozyten	Quick	Liegezeit
Ambulanz	VK	-0,616**	-0,317	0,184	-0,169	-0,238	0,180
	Differenz	-0,414**	-0,078	0,166	-0,003	-0,071	0,264
Herzlinik	VK	-0,501**	-0,220	0,458**	-0,125	-0,218	0,070
	Differenz	0,189	0,037	0,195	0,134	0,124	-0,232

** $p < 0,001$, Spearman-Korrelationskoeffizienten

Untersuchung der Proben mit einer Liegedauer über 4 Stunden

Von einer Probenverarbeitungszeit über 4 Stunden waren nur Proben aus der Herzklinik betroffen, die nach Beendigung der EKZ abgenommen wurden ($n = 23$). Für die hier durchgeführte, weiterführende Untersuchung wurden diese Proben daher ausschließlich mit Proben verglichen, die ebenfalls nach der Herz-Lungen-Maschine abgenommen wurden, aber die Kriterien der rechtzeitigen Probenverarbeitung (< 4 Stunden) erfüllten ($n = 40$). Alle Proben aus der Ambulanz sowie Proben von Patienten auf der Intensivstation und von Patienten mit Operationen ohne Herz-Lungen-Maschine ($n = 60$) wurden nicht berücksichtigt. Ein Überblick über die Verarbeitungszeiten aller gesammelten Proben gibt *Abbildung 86*. Erwartungsgemäß differierten die Liegezeiten der beiden untersuchten Gruppen im Mann-Whitney-U-Test statistisch höchst signifikant voneinander ($p < 0,001$). Im Median lag die Verarbeitungszeit der Proben bei 17,9 Std. mit einem Interquartilabstand (IQA) von 180 Minuten (entsprechend 3 Stunden). Das Maximum war ein Ausreißer und lag bei 67 Stunden (siehe *Abbildung 86*). 26 der untersuchten Proben wurden durch den Studienarzt und 37 Proben durch das Personal des Labors verarbeitet.

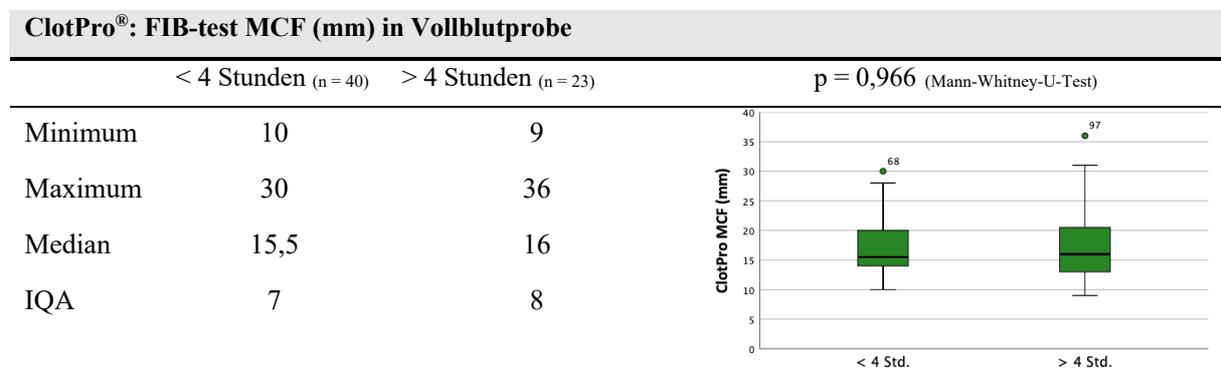
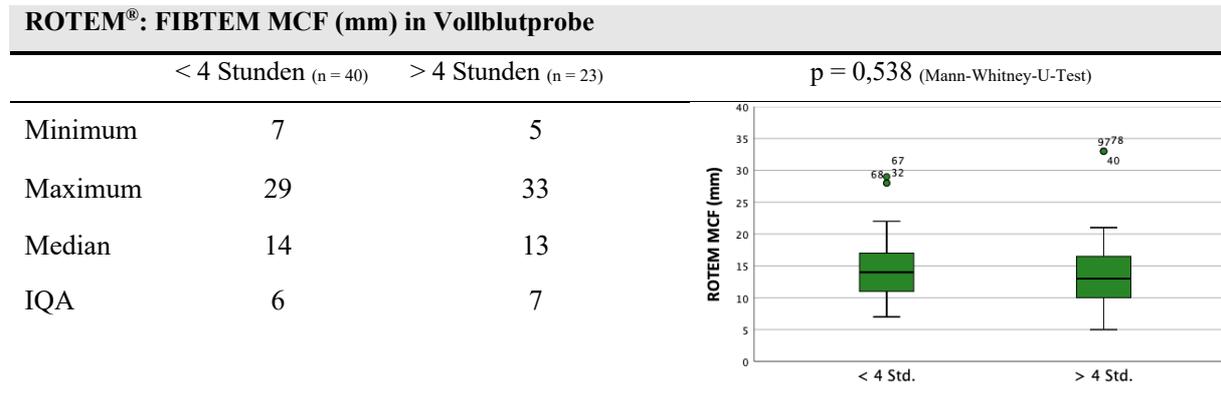
Abbildung 86 Übersicht über die Verarbeitungszeiten der Proben



Die globalen Gerinnungsparameter PZ/Quick und aPTT, das Fibrinogen nach Clauss und das abgeleitete Fibrinogen sowie die zellulären Bestandteile im Blutbild (Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten) waren in beiden Gruppen statistisch nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$). Auch die gemessene MCF in den Vollblutproben beider Messverfahren zeigte zwischen beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe *Tabelle 53*). Insgesamt war also davon auszugehen, dass die Proben beider Gruppen vergleichbar waren.

Tabelle 53 Parameter der VEM und SLT in Abhängigkeit von der Verarbeitungszeit

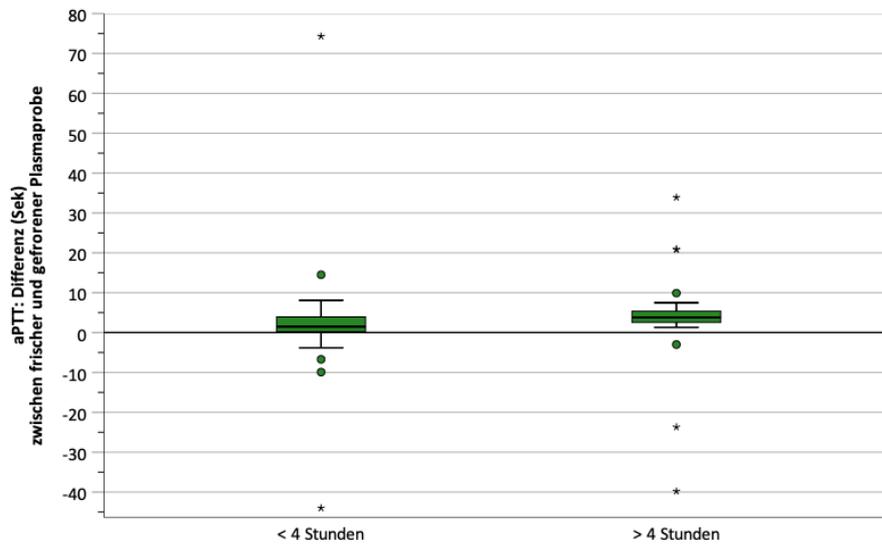
Fibrinogen nach Claus (mg/dL)			
	< 4 Stunden (n = 38)	> 4 Stunden (n = 23)	p = 0,835 (Mann-Whitney-U-Test)
Minimum	140	106	
Maximum	326	521	
Median	206	199	
IQA	71	83	
Fibrinogen abgeleitet (mg/dL)			
	< 4 Stunden (n = 38)	> 4 Stunden (n = 23)	P = 0,889 (t-Test für unabhängige Stichproben)
Minimum	185	151	
Maximum	460	699	
Mittelwert	305	309	
SD	65	112	
Quick (%)			
	< 4 Stunden (n = 38)	> 4 Stunden (n = 23)	p = 0,402 (Mann-Whitney-U-Test)
Minimum	38	23	
Maximum	98	76	
Median	50,5	50	
IQA	19	14	
aPTT (Sek.)			
	< 4 Stunden (n = 38)	> 4 Stunden (n = 23)	p = 0,737 (Mann-Whitney-U-Test)
Minimum	25,7	26	
Maximum	94,6	89,1	
Median	36,95	36	
IQA	20,2	16,9	



Bei Betrachtung der plasmatischen Gerinnungsparameter und ihrer absoluten Messdifferenzen zwischen den frischen und den getauten Plasmaproben zeigte sich für das Fibrinogen nach Clauss ($p = 0,858$), für das abgeleitete Fibrinogen ($p = 0,512$) sowie auch für den Quick-Wert ($p = 0,688$) kein Unterschied zwischen den Proben unterschiedlicher Liegedauer. Der VK aus den Messungen in der frischen und der getauten Plasmaprobe lag beispielsweise für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss bei den fristgerecht verarbeiteten Proben (unter 4 Stunden) im Median bei 0,04 (IQA: 0,06) und bei den verzögert verarbeiteten Proben (über 4 Stunden) im Median bei 0,05 (IQA 0,05).

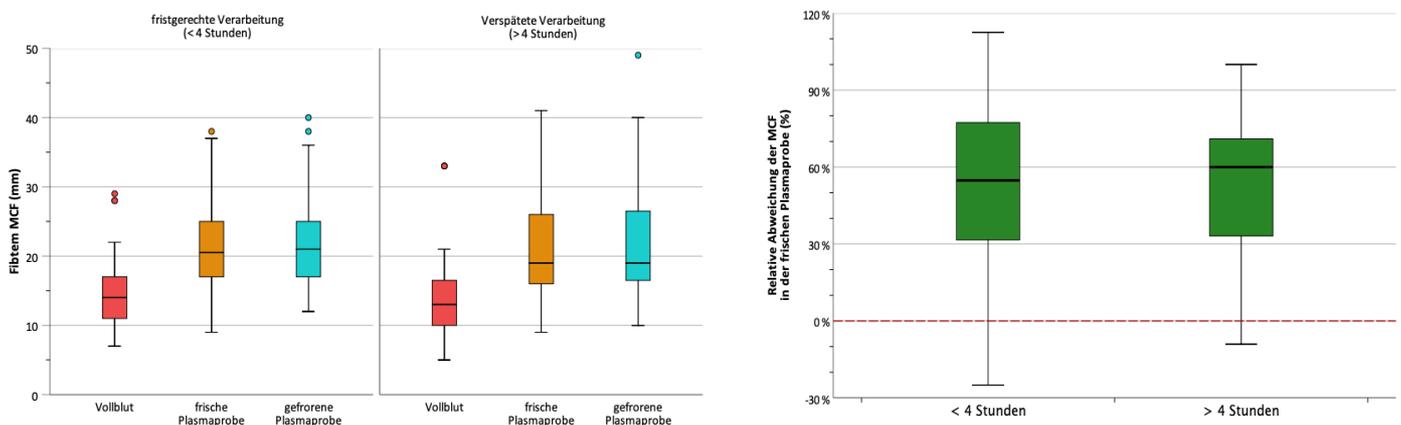
Hier kam es also durch die längere Zeit bis zur Probenverarbeitung hinsichtlich der Parameter Quick und Fibrinogen nicht zu einer höheren Streuung der später im Batchverfahren aus der getauten Plasmaprobe erhobenen Messwerte. Nur für die aPTT zeigte sich hingegen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,037$). Dieses Ergebnis war optisch jedoch weniger nachvollziehbar (siehe *Abbildung 87*).

Abbildung 87 Differenz der aPTT zwischen frischer und getauter Probe nach Verarbeitungszeit



Bei den Proben mit einer verzögerten Verarbeitung (> 4 Stunden) lag der Variationskoeffizient der FIBTEM-MCF zwischen Vollblut und getauter Plasmaprobe durchschnittlich bei 0,29 ($\pm 0,14$). Für die Proben mit fristgerechter Verarbeitung (< 4 Stunden) ergab sich ein VK von durchschnittlich 0,30 ($\pm 0,12$) zwischen Vollblut und getauter Plasmaprobe. Die korrespondierende relative Abweichung der FIBTEM-MCF in der frischen Plasmaprobe lag bei den verzögert gemessenen Proben im Median bei 60 % (IQA: 48,5 %) und bei den fristgerecht verarbeiteten Proben bei 54,8 % (IQA: 46,3 %). Damit zeigte sich zwischen beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,898$) im Mann-Whitney-U-Test (siehe [Abbildung 88](#)).

Abbildung 88 Differenz der FIBTEM-MCF zwischen Vollblut und Plasma nach Verarbeitungszeit

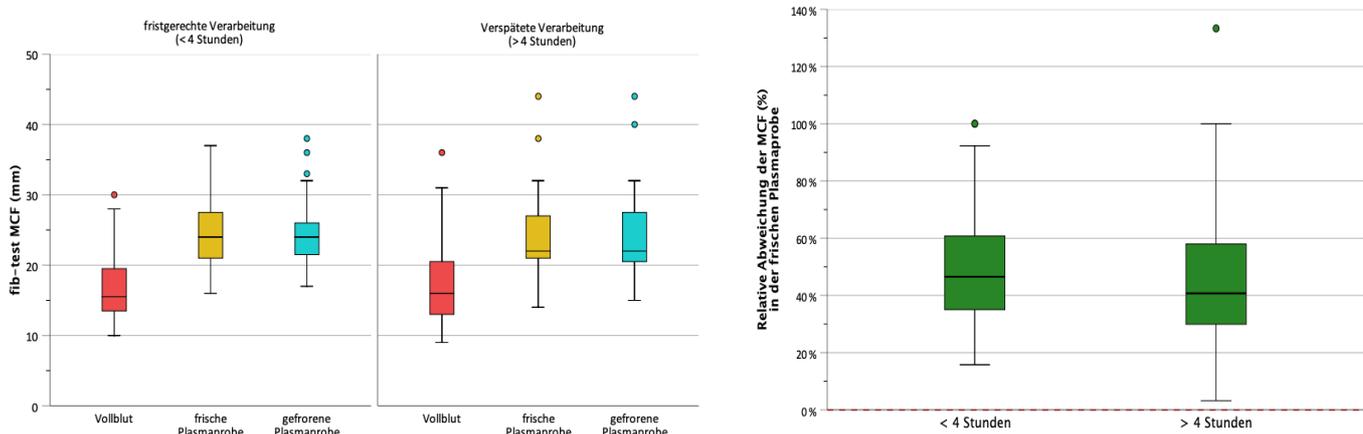


Auch die absolute Messdifferenz der FIBTEM-MCF zwischen Vollblut- und getauter Plasmaprobe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen im t-Test ($p = 0,571$). Durchschnittlich lag die FIBTEM-MCF in der Plasmaprobe um + 6,9 mm ($\pm 3,8$) höher als in der Vollblutprobe (Proben mit zeitnaher Verarbeitung unter 4 Stunden). Bei den Proben mit einer Liegezeit über 4 Stunden war die FIBTEM-MCF in den Plasmaproben durchschnittlich um + 6,5 mm ($\pm 3,6$) höher als in den Vollblutproben.

Die MCF-Messungen am ClotPro[®] zeigten prinzipiell ähnliche Ergebnisse, wie sie für das ROTEM[®] bereits beschrieben wurden (siehe *Abbildung 89*). Der durchschnittliche Variationskoeffizient der Messungen zwischen Vollblutprobe und Plasmaprobe lag bei den fristgerecht verarbeiteten Proben bei 0,27 ($\pm 0,1$) und bei den verzögert verarbeiteten Proben bei 0,26 ($\pm 0,13$). Auch hier bestand hinsichtlich der relativen Abweichung der MCF kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,685$). Die absolute Differenz der FIB-test-MCF zwischen frischer Plasmaprobe und Vollblutprobe lag im Mittel bei + 7,5 mm ($\pm 2,36$) für die zeitnah verarbeiteten Proben (unter 4 Stunden). Bei den verzögert verarbeiteten Proben (über 4 Stunden) lag die Differenz bei durchschnittlich + 7 mm (± 5). Auch hier lag kein signifikanter Unterschied im t-Test vor ($p = 0,330$).

Es zeigte sich also, dass es durch eine längere Liegezeit der Proben auch bei den viskoelastischen Verfahren bzw. der MCF zu keiner signifikanten Beeinflussung der Messdifferenzen zwischen Vollblut- und den im Batchverfahren gemessenen Plasmaproben kam.

Abbildung 89 Differenzen der FIB-test-MCF zwischen Vollblut und Plasma nach Verarbeitungszeit

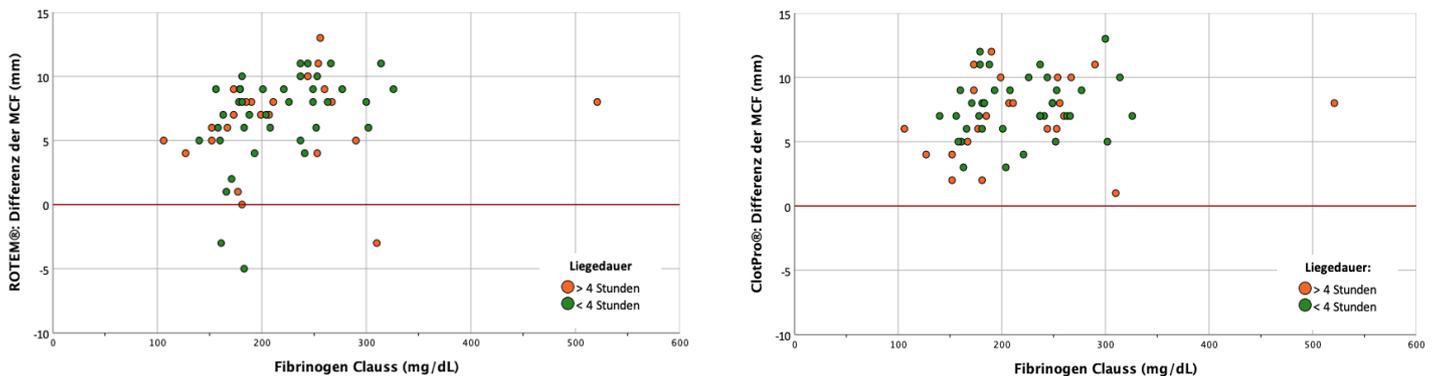


Unabhängig von der Dauer bis zur Verarbeitung der Proben blieb die bereits aufgezeigte starke Korrelation der MCF mit der Fibrinogenkonzentration bestehen (siehe [Tabelle 54](#)). Die Ausprägung der absoluten MCF-Differenz zwischen Vollblut- und frischer Plasmaprobe war für beide Assays unabhängig von der Liegedauer der Proben nicht von der Fibrinogenkonzentration abhängig ([Abbildung 90](#)).

Tabelle 54 Korrelation der MCF mit dem Clauss-Fibrinogen in Abhängigkeit von der Liegedauer

	< 4 Stunden	> 4 Stunden
FIBTEM MCF	0,772 **	0,856 **
FIB-test MCF	0,847 **	0,806 **

Abbildung 90 Korrelation von Fibrinogen und MCF Differenz zwischen Vollblut und Plasma



Als weiterer Punkt zeigte sich für alle Proben auch die ebenfalls zuvor beschriebene Korrelation der relativen MCF-Abweichung (zwischen Vollblut und frischer Plasmaprobe) von der Hämoglobinkonzentration (siehe [Tabelle 55](#)).

Tabelle 55 Korrelation der relativen MCF-Differenz (Vollblut - Plasma) mit dem Hb nach Verarbeitungszeit

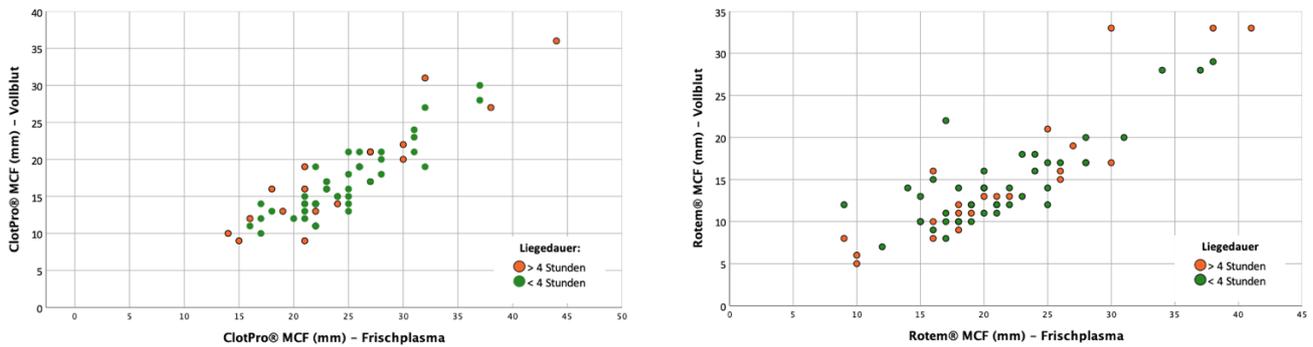
	< 4 Stunden	> 4 Stunden
FIBTEM MCF	0,407 **	0,472 **
FIB-test MCF	0,685 **	0,696 **

Auch war die Korrelationsstärke zwischen der gemessenen MCF in der Vollblutprobe und der gemessenen MCF in der frischen Plasmaprobe sowohl im ROTEM®, als auch im ClotPro® unabhängig von der Liegedauer der Proben sehr hoch (siehe [Abbildung 91](#) und [Tabelle 56](#)).

Tabelle 56 Korrelation der MCF (Vollblut - frische Plasmaprobe) in Abhängigkeit von der Liegedauer

	< 4 Stunden (n = 40)	> 4 Stunden (n = 23)
ROTEM®	0,685**	0,902 **
ClotPro®	0,857 **	0,844 **

Abbildung 91 Korrelation der MCF in Vollblut und frischer Plasmaprobe nach Verarbeitungszeit



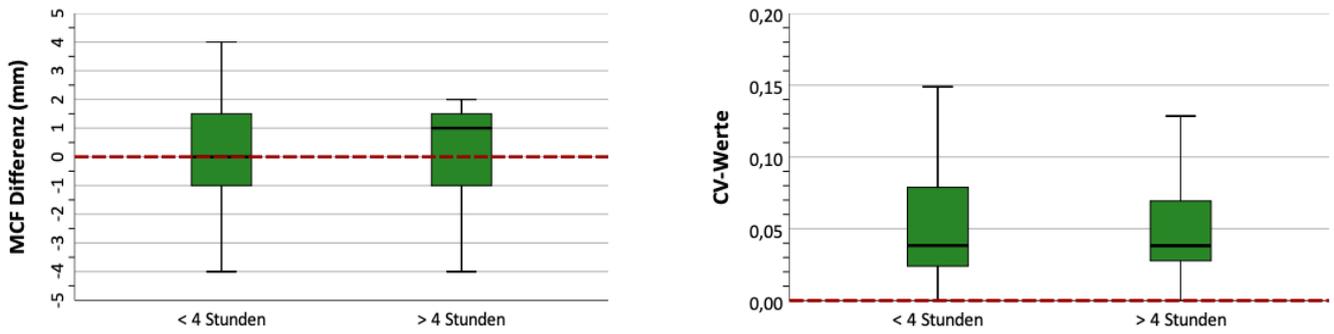
Die Korrelationen der FIB-test-MCF mit der FIBTEM-MCF sowohl in den Vollblutproben als auch in den frischen Plasmaproben waren ebenfalls unabhängig von der Liegedauer der Proben (*Tabelle 57*).

Tabelle 57 Korrelation zwischen MCF im FIB-test und FIBTEM in Abhängigkeit von der Liegedauer

	< 4 Stunden (n = 40)	> 4 Stunden (n = 23)
Vollblutprobe	0,721**	0,931 **
FrISCHE Plasmaprobe	0,933 **	0,971 **

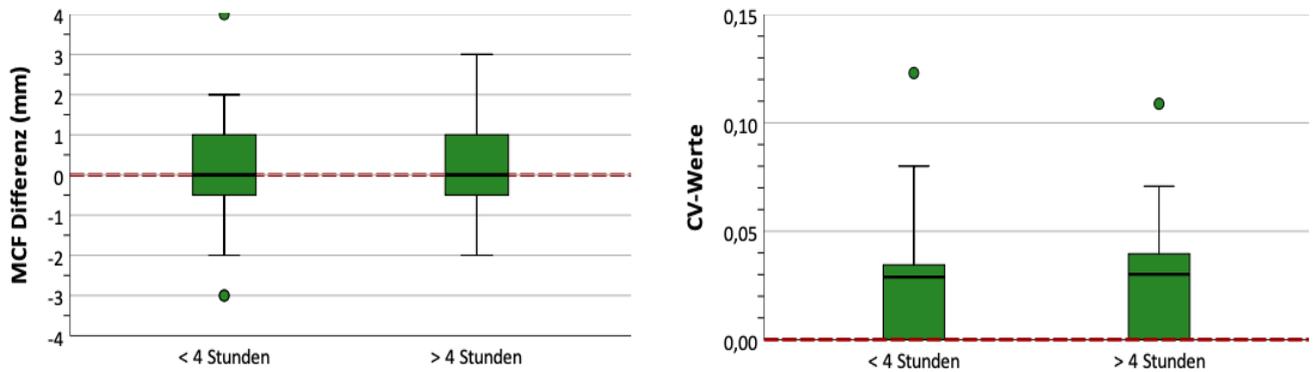
In Abhängigkeit von der Verarbeitungszeit bestanden zwischen den frischen und getauten Plasmaproben hinsichtlich der MCF-Differenzen keine signifikanten Unterschiede im FIBTEM und im FIB-test (siehe *Abbildung 92* und *Abbildung 93*).

Abbildung 92 Differenz und VK der FIBTEM MCF zwischen den Plasmaproben nach Verarbeitungszeit



		< 4 Std.	> 4Std.			< 4 Std.	> 4Std.
MCF	Median	0,00	1,00	VK	Median	0,038	0,038
	IQA	2,7	3,0		IQA	0,06	0,05
	Min/ Max.	-4/ +4	-4/ +8		Min/ Max.	0/ 0,2	0/ 0,4

Abbildung 93 Differenz und VK der FIB-test MCF zwischen den Plasmaproben nach Verarbeitungszeit



		< 4 Std.	> 4Std.			< 4 Std.	> 4Std.
MCF	Median	0,0	0,0	VK	Median	0,03	0,03
	IQA	1,75	2,0		IQA	0,03	0,04
	Min/ Max.	-3 / +4	-2 / +3		Min/ Max.	0 / 0,12	0 / 0,11

Diskussion

Einführung in die Diskussion: Problemstellung und Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die vergleichende Untersuchung der Fibrinogenpolymerisierung mittels funktioneller Fibrinogenassays der viskoelastischen Methoden (repräsentiert durch die maximale Gerinnselfestigkeit: MCF) in der frischen zitrathaltigen Vollblutprobe sowie der frischen und getauten zitrathaltigen Plasmaprobe. Hierbei sollte geprüft werden, ob die in einer Vollblutprobe gemessene MCF aus der zugehörigen getauten Plasmaprobe retrospektiv abgeschätzt werden kann und ob somit eine Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt gegeben ist.

Eine bisher vergleichbare Studie war die Untersuchung von Schoergenhofer et al. (30). Zahlreiche andere Studien zielten auf eine andere Fragestellung ab und bezogen die erhobenen Messungen im Plasma nicht auf die korrespondierende Vollblutprobe. Die Forderung nach weiteren Untersuchungen und einer Standardisierung der viskoelastischen Methoden sind in einer Vielzahl an Publikationen zu finden. Beispielsweise wurden einige dieser Limitationen von Ebinger et al. 2010 in Blood Coagulation and Fibrinolysis thematisiert: „*Frequently, the technical methodology and assays are questioned regarding validation, precision, reproducibility, reference ranges as well as regulatory approval and registration*“ (58). Auch 2016 stand dieses Thema weiterhin zur Diskussion und wurde im Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation von Solomon et al. aufgegriffen (14).

Die zur Beantwortung dieser Frage bislang durchgeführten bzw. veröffentlichten Studien konzentrierten sich zumeist auf die Untersuchung von Messabweichungen (ausgedrückt anhand von Variationskoeffizienten) zwischen und innerhalb einzelner Labore und Untersucher. Zur Anwendung kamen vor allem Plasmaproben, die artifiziell durch Zugabe von Heparin (59) oder durch Verdünnung von Faktoren (60) modifiziert wurden.

Ein besonderer Vorteil der von uns hier durchgeführten Untersuchung ist die Verwendung unverfälschter Proben (ohne in-vitro-Bearbeitung). Durch das heterogene Spenderkollektiv bestand eine Variabilität an Faktorenkonzentrationen, Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen sowie diversen anderen gerinnungsbeeinflussenden Faktoren (Zytokine, pH, Medikamente, etc.). Die Daten spiegelten somit praxisnahe Messungen bzw. Ergebnisse wider.

Die bisherigen Studien lieferten insbesondere zu den Fragestellungen der Reproduzierbarkeit und Validität teils unterschiedliche Ergebnisse mit der abschließenden Forderung nach weiteren Studienbemühungen: „*In order to establish the usefulness of this test a standardized methodology needs to be developed and reproducibility and consistency have to be demonstrated*“ (33). Unabhängig davon waren es aber insbesondere die vielen Studien mit dem Nachweis eines positiven Nutzens der viskoelastischen Verfahren in der klinischen Praxis, die diesen Methoden halfen, an Popularität und indirekt an Validität im klinischen Alltag zu gewinnen. Mit dem Einsatz der VEM sollen sich zum Beispiel gerade im operativen Setting allogene Bluttransfusionen einsparen lassen, Outcomes verbessern und eine höhere Kosteneffektivität erzielen lassen (14). So fanden VEM auch Einzug in aktuelle Leitlinien, wie z.B. die European guideline on management of major bleeding following trauma aus dem Jahr 2017 in der 5. Fassung (11).

Es besteht also weiterhin eine offene Diskussion. Während einige Autoren aufgrund der praxisrelevanten Studienergebnisse zu dem Schluss kommen, dass viskoelastische Methoden bereits als validierte Verfahren zu betrachten sind: “*In conclusion, thromboelastometry can be considered as a validated, precise, and reproducible method that has been approved and registered according to the current legislation, comparable to the standard routine laboratory tests*“ (58), bleiben auf der anderen Seite auch weiterhin Kritiken bestehen, die eine deutliche Untersucherabhängigkeit dieser Point-of-Care-Verfahren postulieren: „*While it is gaining popularity in the clinical arena, the methodology remains at the discretion of the user/manufacturer*“ (33). Eine vollständige Anerkennung, gerade in der wissenschaftlichen Diskussion ist daher scheinbar noch nicht gegeben: „*... cannot be utilized to its full capacity until studies demonstrate the reliability and reproducibility of the assay*“ (33).

Unsere Untersuchung stützt sich nicht auf die in zahlreichen Studien zuvor im Fokus gestandene Reproduzierbarkeit und Kontinuität der Messungen zwischen einzelnen Untersuchern oder Laboratorien (dies wurde jedoch in unserer Arbeit zum Teil mituntersucht). Vielmehr ging es um die bereits erwähnte retrospektive Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse aus einer gelagerten Plasmaprobe. Unserer Ansicht nach würde der positive Nachweis einer retrospektiven Überprüfbarkeit viskoelastischer Messergebnisse, gerade in Bezug auf die vorliegenden Kritiken der Untersucherabhängigkeit, den viskoelastischen Verfahren nochmals Bedeutung zusprechen. Die hier untersuchte Methodik könnte für zukünftige Studien als qualitätssichernde Maßnahme eingesetzt werden.

Intraoperatorvariabilität

Bisherige Studienlage

Die „*TEG-ROTEM Working Group*“ um Chitulur et al. nutzte plättchenreiches Plasma (PRP), normales gepooltes Plasma und ein Faktor VIII vermindertes Plasma für ihre internationale Untersuchung an der insgesamt 9 Laboratorien teilnahmen. Für die MCF im INTEM-Assay des ROTEM® zeigte sich ein Variationskoeffizient von ca. 15%. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass diese ersten Resultate mit einem „interlaboratory CV“ von über 10 % für sie nicht zufriedenstellend waren (33).

Auch Kitchen et al. hatten in ihren Untersuchungen in Großbritannien mit lyophilisierten Plasmen große Schwankungen feststellen können. Für ROTEM®-Parameter wurden Variationskoeffizienten von bis zu 83,6 % berichtet, so dass auch hier die Autoren der Studie zu dem Ergebnis kamen, dass weitere Untersuchungen und Qualitätskontrollen notwendig seien: „... indicate that regular EQA/proficiency testing is needed for these devices“ (61). Es wurden in der erwähnten Studie allerdings nur insgesamt 8 verschiedene Proben von 10 Untersuchern verarbeitet.

In einer Übersichtsarbeit aus Großbritannien um Jennings et al. wird von einer 2006 durchgeführten Studie berichtet. Für die INTEM-MCF im ROTEM® wurde zwischen 10 verschiedenen Laboratorien ein Variationskoeffizient von 8 bis 12 % ermittelt bzw. für die INTEM-CT ein Variationskoeffizient von 13 bis 25 %. Höhere Abweichungen fanden sich vor allem bei den pathologisch veränderten Proben (59).

Lang et al. untersuchten gesunde Probanden, um Referenzwerte für das ROTEM® zu etablieren. Dabei konnten sie ebenfalls eher geringe Variationskoeffizienten für ihre Messungen nachweisen und eine gute Reproduzierbarkeit beschreiben. Für die FIBTEM-MCF wurden Schwankungen von 6 bis 13 % und für die CT von 3 bis 12 % dokumentiert. Darüber hinaus konnten sie für Citratblut eine Probenstabilität von mindestens 6 Stunden nachweisen (47).

Regelmäßige Ringversuche („*External quality controls with External Quality Assessment*“) wurden in Deutschland beispielsweise durch die INSTAND e.V. eingeführt. Kragh et al. berichteten von einer 2009 durchgeführten Pilotstudie, welche lyophilisierte Plasmaproben mit definierten Konzentrationen an Gerinnungsfaktoren verwendeten. Dabei wurden bisher nur die Parameter CT, A20 und Alpha-Winkel im INTEM und EXTEM genauer untersucht. Sie kamen aber zu dem Schluss, dass sich die mittleren Interlabor-Variationskoeffizienten mit unter 20 % im Bereich der plasmatischen Gerinnungsparameter befanden und sich lyophilisierte Plasmaproben für externe Qualitätskontrollen eigneten:

„... mit mittleren Interlabor- Variationskoeffizienten (VKs) von $< 20\%$ bewegen sich die Ergebnisse im Bereich der gerinnungsphysiologischen Plasmamethoden [...] lyophilisierte Plasmaproben in den EQCs bringen eine gute Vergleichbarkeit zu den vom Hersteller vorgesehenen internen Qualitätskontrollen.“ (32)

Unsere Daten

In der durchgeführten 3x3-Matrix zur Abschätzung der Messabweichungen ergab sich für den Parameter MCF im FIB-test (ClotPro®) ein Variationskoeffizient von durchschnittlich 0,12 ($\pm 0,03$) und im FIBTEM (ROTEM®) von 0,11 ($\pm 0,03$). Die Messabweichungen für die MCF-Messung in den funktionellen Fibrinogenassays der Vollblutproben lagen damit innerhalb der publizierten Ergebnisse anderer Studien und waren somit vergleichbar mit den zuvor beschriebenen Variationskoeffizienten. Für die MCF-Messungen in den Plasmaproben zeigten sich aber doch deutlich geringere Variationskoeffizienten. In der frischen Plasmaprobe lag der VK für die MCF-Messung im FIB-test und FIBTEM somit beispielsweise bei durchschnittlich 0,05 bzw. 0,04.

Auch der Parameter CT zeigte in der 3x3-Matrix beider Assays ein mit den zuvor erwähnten Studien vereinbarendes Ergebnis: Der durchschnittliche Variationskoeffizient lag in den Vollblutmessungen bei 0,10 (FIB-test), beziehungsweise 0,14 (FIBTEM). Hier war die Präzision in den frischen Plasmaproben ebenfalls etwas besser ($VK < 0,07$). Unsere Daten zeigten damit ein Ergebnis, das sich der Hoffnung einiger Autoren entgegensetzt: *„We hope that by using whole blood these CV's may show improvement and probably reach acceptable levels.“* (33). Plasmaproben scheinen für vergleichende Untersuchungen geeigneter zu sein als Vollblutproben.

Die Präzision der Globaltests (Fibrinogen/Quick/aPTT) war mit Variationskoeffizienten zwischen 0,01 und 0,04 deutlich höher als die der VEM. Diese SLTs sind jedoch zu einem Plasmastandard referenziert und gegenüber verschiedenen Einflussfaktoren kontrolliert. Die Variationskoeffizienten für die Ergebnisse zwischen verschiedenen Reagenzien der SLTs, z. B. für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss am ACL TOP und am BCS XP, lagen jedoch wieder deutlich höher, im Median bei 9 % (IQA: 11 %).

Für die VEM ist allerdings zu beachten, dass beide Systeme die MCF nur in natürlichen Zahlen, also ohne Dezimalstellen, darstellen und sich die Werte in aller Regel in einem geringen Messbereich befinden (Normwerte beispielsweise zwischen 9 und 25 mm). Somit ergibt sich für die unten beispielhaft aufgeführte Messreihe ein errechneter Variationskoeffizient von bereits 0,09 bzw. 9 %, obwohl nur eine Messung um + 1 mm abweicht:

Messung 1:	6 mm	}	$VK = 0,09 = \frac{\textit{Standardabweichung}}{\textit{Mittelwert}} = \frac{(0,58)}{(6,3)}$
Messung 2:	7 mm		
Messung 3:	6 mm		

Reproduzierbarkeit viskoelastischer Messergebnisse

Bisherige Studienlage

Eine vergleichende Untersuchung viskoelastischer Messungen zwischen Vollblutproben und Plasmaproben wurde 2017 von Schoergenhofer et al. durchgeführt (30). Die Autoren untersuchten hierbei 20 Proben von gesunden Spendern und modifizierten die Proben nachträglich mit Antikoagulantien (Rivaroxaban/Dabigatran) oder Fibrinolytika (Alteplase). Verwendet wurde das ROTEM® mit dem NATEM-, EXTEM- sowie INTEM-Assay und erfasst wurden die Parameter CT, CFT, Alpha-Winkel, MCF, ML, LT und die AUC (Area Under the Curve). Bei ihren Messungen zeigten sich in den Vollblutproben aller Assays deutlich höhere MCF-Werte gegenüber den Plasmaproben: Durchschnittlich lag die MCF in den Vollblutproben im EXTEM bei 64 mm (± 5 mm) und in den frischen wie getauten Plasmaproben bei durchschnittlich ca. 26 mm (30).

Unsere Daten

Sowohl im FIBTEM-Assay des ROTEM® als auch im FIB-test-Assay des ClotPro® zeichneten unsere Daten bezüglich der MCF ein gänzlich anderes Bild: Die von uns in den funktionellen Fibrinogenassays gemessene MCF lag geräteunabhängig, untersucherunabhängig und unabhängig von der Herkunft der Probe in den Plasmaproben immer deutlich über der gemessenen MCF in der Vollblutprobe.

Vereinbarkeit der Ergebnisse

Aufgrund der fehlenden zellulären Komponenten in den Plasmaproben beschrieben die Autoren der oben erwähnten Studie ihre Ergebnisse als „erwartungsgemäß“: *„Expectedly, MCF and AUC were approximately two-fold higher in whole blood than in plasma samples due to a lack of blood cells ($p < 0.001$)“* (30). Wie passen unsere Ergebnisse nun in dieses Bild?

FIBTEM und EXTEM (bzw. FIB-test und EX-test im ClotPro[®]) unterscheiden sich v. a. durch die Zugabe eines Thrombozytenaggregationshemmers (z. B. Cytochalasin D). Es ist also anzunehmen, dass die Thrombozytenzahl und -funktion in den Vollblutproben des FIBTEM/FIB-test keine Auswirkungen auf die Gerinnselfestigkeit (MCF) haben sollte. Dies bestätigte sich zumindest für das ClotPro[®] auch in unseren Daten. Zwischen Thrombozytenzahl und der gemessenen MCF im FIB-test bestand keine signifikante Korrelation ($r = -0.009$; $p = 0,929$). Im FIBTEM hingegen bestand zwar eine schwache, aber dennoch signifikante Korrelation zwischen MCF und der Thrombozytenzahl ($r = 0,258$; $p = 0,01$).

In einer Untersuchung von Schlimp et al. konnte gezeigt werden, dass möglicherweise die Inhaltsstoffe der funktionellen Fibrinogenassays, gegenüber dem EXTEM, einen aktivierenden Effekt auf die Fibrinogenpolymerisation haben könnten (62). In unseren Messungen wäre zu erwarten gewesen, dass diese aktivierenden Inhaltsstoffe alle Proben gleichermaßen beeinflusst hätten, also sowohl die Vollblutproben wie auch die Plasmaproben. Dieser Faktor allein scheint daher ungeeignet, die erhöhten MCF-Werte in Plasmaproben zu erklären.

Faktor XIII (plättchenstabilisierender Faktor) ist ein wichtiger Baustein in der Fibrinogenpolymerisation bzw. in der Quervernetzung und Stabilisierung des Gerinnsels. Mehrere Studien zeigten aber, dass sich die Aktivität des Faktor XIII nicht bzw. nur unzureichend in den viskoelastischen Methoden abbilden lässt (34, 63, 64). Unsere Proben stammten sowohl von gesunden Probanden und von Probanden mit manifesten Störungen der Hämostase nach herzchirurgischem Eingriff. In beiden Gruppen bestand kein Unterschied im Verhalten der MCF zwischen Vollblut- und Plasmaprobe, so dass ein möglicher Einfluss des Faktor XIII auch nicht zur Erklärung herangezogen werden kann.

Ein verbleibender Faktor, welcher in der Lage ist, die Unterschiede der MCF zwischen der Vollblut- und der Plasmaprobe zu erklären, wäre die Erythrozytenzahl bzw. die Hämoglobinkonzentration der untersuchten Vollblutprobe.

Unsere Daten zeigen dahin gehend drei interessante Ergebnisse:

1. Zwischen Hb und MCF bestand eine negative Korrelation
(d. h. je höher der Hb-Wert, desto geringer die gemessene MCF)
2. Zwischen MCF und der relativen Messdifferenz bestand eine negative Korrelation
(d. h. je höher die MCF im Vollblut, desto geringer die relative Abweichung zur Plasmaprobe)
3. Zwischen Hb und Messdifferenz bestand eine positive Korrelation
(d. h. je höher der Hb-Wert, desto höher die Messdifferenz zur Plasmaprobe)

Eine Abhängigkeit viskoelastischer Parameter, besonders der MCF, vom Hämoglobin bzw. Hämatokrit konnte bereits in anderen Untersuchungen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass ein geringerer Hb mit einer höheren gemessenen Gerinnselfestigkeit einherging (65-67). Auf diesen speziellen Umstand und darauf, ob es sich hierbei um eine messtechnische Limitation der VEM oder eine tatsächlich in vivo vorliegende negative Beeinflussung der Fibrinogen-polymerisierung handelt soll später noch einmal ausführlich eingegangen werden (Seite 117).

Dieser Effekt des Hämoglobins wäre in der Lage, die scheinbar gegensätzlichen Ergebnisse unserer Daten mit denen von Schoergenhofer et al. zu vereinen:

Das EXTEM liefert grundsätzlich höhere Gerinnselfestigkeiten im Vergleich zum FIBTEM mit Normwerten um 49 bis 71 mm, während der Referenzbereich beim FIBTEM bei 9 bis 25 mm liegt (47). Durchschnittlich lag die EXTEM-MCF in den Plasmaproben von Schoergenhofer et al. bei etwa 26 mm (30). Dieser Wert entspricht damit ungefähr unseren gemessenen FIBTEM-MCF-Werten in den Plasmaproben, welche durchschnittlich bei $23,6 \pm 7,5$ mm lagen (im ClotPro[®] bei $26,6 \pm 6,2$ mm). Zu beachten sind jedoch das unterschiedliche Spenderkollektiv zwischen unserer Studie und der Untersuchung von Schoergenhofer et al., sowie messtechnische Abweichungen/ Fehler und eine gewisse Beeinflussung durch die Inhaltsstoffe der funktionellen Fibrinogenassays (62), die ursächlich für die geringen Differenzen zwischen EXTEM- und FIBTEM-MCF in den Plasmaproben sein können. Ansonsten sollten sich die beiden Assays in plättchenfreiem Plasma nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Die Gerinnselfestigkeit im EXTEM lässt sich also als eine Funktion der Thrombozyten und Fibrinogenpolymerisierung sehen. Der Abfall der MCF zwischen Vollblut und Plasma im EXTEM wäre durch den Verlust der Thrombozyten zu erklären. Die Wichtigkeit der Thrombozyten konnte beispielsweise unter dem Elektronenmikroskop von Kawasaki et al. nochmals bestätigt werden (55).

Im plättchenarmen Plasma sollte die Polymerisation eigentlich fast nur von der Fibrinogenkonzentration abhängig sein. Der verbleibende Unterschied zwischen FIBTEM im Vollblut und Plasma liegt also in der Anwesenheit der Erythrozyten im Vollblut. Dass nun die in der Vollblutprobe gemessene FIBTEM-MCF nochmals niedriger ausfällt, erklärt sich durch den besonderen Effekt der Erythrozyten und es ergibt sich somit folgender Zusammenhang:

$$EXTEM\ MCF_{VOLLBLUT} > EXTEM\ MCF_{PLASMA} \sim FIBTEM\ MCF_{PLASMA} > FIBTEM\ MCF_{Vollblut}$$

Schlussfolgernd zeigten unsere Daten also, dass eine retrospektive Überprüfung einer in Vollblut gemessenen MCF aus einer gelagerten Plasmaprobe möglich ist. Wir konnten mittels Regressionsanalyse sowohl für das ROTEM® als auch für das ClotPro® eine Formel entwickeln, die in der Lage war, die Varianzen der Messungen sehr gut zu erklären. Die Formeln konnten bisher nur an einem relativ kleinen Probenkollektiv (n = 22) getestet werden. Die nach Rückrechnung vorliegenden Abweichungen zur tatsächlich gemessenen Probe lagen im Bereich der erwarteten Messfehler (VK von ca. 6 bis 13% zwischen dem Messwert in der Vollblutprobe und dem errechneten predicted Value). Die Ergebnisse scheinen also vielversprechend und die Methode könnte als qualitätssichernde Maßnahme (z. B. für zukünftige Studien) in Betracht gezogen werden.

Insbesondere durch die starke Korrelation mit dem Hämoglobinwert und der suffizienten Thrombozytenhemmung war die Regression für das ClotPro® besonders gut möglich gewesen. Dieser Unterschied zwischen ROTEM® und ClotPro® wird später nochmals aufgegriffen ([Seite 121](#)). Vorweggreifend soll erwähnt werden, dass die Vergleichbarkeit beider Verfahren (FIBTEM und FIB-test) durch den unterschiedlichen Ansatz der Thrombozytenhemmung limitiert war und dies einen Grund für die Unterschiede zwischen dem ROTEM®- und dem ClotPro®-System darstellen könnte.

Limitierender Faktor der Regression waren sicherlich die häufig nicht normalverteilten Parameter und das vergleichsweise noch kleine Probenkollektiv unserer Studie. Weitere Untersuchung mit einem größeren Stichprobenumfang und einem noch weiter gefassten Messbereich an Fibrinogenkonzentrationen (insbesondere im unteren Messbereich) wären wünschenswert. Für eine noch exaktere Regressionsanalyse wären zudem normalverteilte Parameter erstrebenswert.

Schoergenhofer et al. berichteten bezüglich der gemessenen CT-Werte im EXTEM-Assay zwar von Differenzen, aber insgesamt vergleichbaren Ergebnissen in allen untersuchten Proben (Vollblut, frische und aufgetaute Plasmaprobe). So wie wir anhand unserer Daten für die FIBTEM-MCF eine Reproduzierbarkeit propagieren können, war dies auch den Autoren um Schoergenhofer et al. für die CT im EXTEM möglich gewesen: „*Activated ROTEM tests such as INTEM or EXTEM are reproducible, and results are comparable between whole blood and corresponding fresh and frozen plasma.*“ (30).

Als Anmerkung soll noch angeführt werden, dass unsere Daten eine sehr große Variabilität der CT im FIBTEM und auch FIB-test aufzeigten und eine Reproduzierbarkeit dieses Parameters aus unseren Daten nicht möglich erschien. Jedoch ist die CT in den funktionellen Fibrinogen-assays auch kein klinisch relevanter Parameter.

Nachweisbarkeit eines Fibrinolyseinhibitors

Eine weitere interessante Beobachtung in der Studie von Schoergenhofer und Kollegen war, dass eine in der Vollblutprobe induzierte Hyperfibrinolyse (durch Zugabe von Alteplase) auch zuverlässig in den Plasmaproben nachgewiesen werden konnte. Unsere Untersuchungen am ClotPro[®] mittels TPA-test zeigten demgegenüber, dass auch die Anwesenheit eines Fibrinolysehemmers wie Tranexamsäure zuverlässig in allen Proben detektiert werden konnte. Alle Proben mit Tranexamsäure zeigten eine zuverlässige Fibrinolysehemmung auch in den getauten Proben. Der Umstand, dass einige Proben im getauten Plasma eine verminderte Lyse gegenüber den Vollblutproben aufwiesen, könnte mitunter an der strikten dichotomen Definition (ML > 94%) oder an unterschiedlichen Laufzeiten der viskoelastischen Messungen gelegen haben.

Hämoglobingehalt und die gemessene Gerinnselfestigkeit

Bisherige Studienlage

Iselin et al. zeigten 2001 einen reziproken Zusammenhang zwischen Hämatokritwert und Gerinnselfestigkeit in ihren in-vitro-Untersuchungen am TEG[®]-Gerät auf. Sie verdünnten Vollblutproben auf einen definierten Hämatokritwert von 10 bis 40 %, ohne dabei jedoch die Gerinnungsfaktoren und Thrombozytenzahlen zu verdünnen. Ihre Ergebnisse zeigten, dass es mit abnehmendem Hämatokrit zu einer verkürzten Gerinnungszeit und einer zunehmenden Gerinnselfestigkeit kam (65). Dies stand zumindest hinsichtlich der MCF auch im Einklang mit unseren Daten.

Roeloffzen et al. konnten am TEG[®] für die Maximale Amplitude (korrespondierender Parameter zur MCF im ROTEM[®]/ClotPro[®]) ebenfalls eine negative Korrelation ($r^2 = 0,197$) mit der Hämoglobinkonzentration aufzeigen (54).

2012 untersuchten Satoru Ogawa und Kollegen ebenfalls den Effekt des Hämatokrits auf die Gerinnselfestigkeit im FIBTEM. Ihre Hypothese war, dass das Fehlen von Erythrozyten im Plasma den Zusammenhang zwischen der FIBTEM-MCF und dem gemessenen Clauss-Fibrinogen beeinflusse. Ihre Experimente umfasste zwei Teilstudien. In einem in-vitro-Versuch wurden 6 Proben von gesunden Spendern verdünnt, zum einen mit physiologischer Kochsalzlösung (Verdünnung von Hämatokrit und Fibrinogen), zum anderen mit autologem Plasma (nur Verdünnung des Hämatokrit). Anschließend wurden die Messungen mit den Werten der unbearbeiteten Proben verglichen. Die Verdünnung mit Kochsalzlösung führte zu einer signifikanten Abnahme der MCF, die Verdünnung mit Plasma zu einer signifikanten Zunahme der MCF gegenüber dem Ausgangswert der unverdünnten Probe (36). Zusätzlich konnten die Autoren in Proben von 50 kardiochirurgischen Patienten eine stärkere Korrelationen zwischen der FIBTEM-MCF und dem Clauss-Fibrinogen in der Patientengruppe mit einem Hämatokrit $< 25 \%$ aufzeigen ($r = 0,88$; $n = 50$), gegenüber Proben mit einem Hämatokrit $> 30 \%$ ($r = 0,67$; $n = 50$): „we explored the difference between FIBTEM-MCF and the Clauss fibrinogen as a function of hematocrit“ (36).

Solomon et al. untersuchten 2013 den Zusammenhang zwischen der FIBTEM-MCF im ROTEM[®] und dem Plasmafibrinogen nach Clauss bzw. dem „Vollblut“-Fibrinogen (ein errechneter Wert, welcher den Hämatokritwert der Probe einbezieht) an 157 herzchirurgischen Patienten. In dieser Studie zeigten sich bei Patienten mit einem Hämatokritwert unter 36% präoperativ signifikant höhere FIBTEM-MCF-Werte und höhere „Vollblut“-Fibrinogenkonzentrationen. Postoperativ seien diese Differenzen zwischen den verschiedenen Hämatokritwerten nicht mehr nachweisbar gewesen. Die Autoren der Studie kamen zu dem Schluss, dass die gemessene MCF im FIBTEM den Effekt des Hämatokritwert auf die Gerinnselfestigkeit gut widerspiegelt, jedoch nicht bei postoperativen Patienten mit Vorliegen einer Hämodilution: „... FIBTEM MCF which incorporates the contribution of haematocrit to whole blood clot firmness. This effect does, however, appear to be negligible in haemodiluted patients“ (66).

Spezia et al. (67) und Roeloffzen et al. (54) führten viskoelastische Untersuchungen an anämischen Patienten durch und präsentierten ebenfalls vergleichbare Ergebnisse:

In der Studie von Roeloffzen et al. untersuchten die Autoren den Einfluss einer Anämie auf die Parameter des TEG[®] an 24 Patienten mit chronischer Anämie vor und nach Gabe von Erythrozytenkonzentraten sowie an 29 Patienten mit einer durch Chemotherapie induzierten Anämie. Auch ihre Ergebnisse demonstrierten den inversen Zusammenhang zwischen MCF und Erythrozyten: „... anemia was associated with a delay in the initiation of the coagulation cascade with a finally formed clot with superior strength and viscoelastic properties. Transfusion of RBCs was associated with impaired clot quality, with even worse effects on the initial fibrin build-up and clot quality by fresh RBCs.“ (54).

Spezia et al. verglichen Proben von 40 anämischen Patienten gegenüber einem gesunden Kollektiv. Sie zeigten dabei ebenfalls eine statistisch signifikante und inverse Korrelation zwischen FIBTEM-MCF und Hämatokritwert auf. Gleichzeitig bestand laut Autoren aber keine erhöhte Thrombinaktivierung in anderen laborchemischen Gerinnungstests, so dass sie diesbezüglich eher von einer methodischen Limitation der VEM ausgingen: „... be related to the method in itself rather than representing a marker of hypercoagulability "in vivo".“ (67).

Kawasaki et al. (55) verfolgten einen anderen Ansatz. Sie untersuchten das sich bildende Gerinnsel zu verschiedenen definierten Zeiten im Verlauf der viskoelastischen Messungen am TEG[®] unter dem Elektronenmikroskop, sowohl im Vollblut als auch in einer plättchenreichen Plasmaprobe von 6 gesunden Spendern. Auch hier war die Maximale Amplitude (MA) des Gerinnsels im Plasma ($57,2 \pm 2,5$ mm) größer als im Vollblut ($53,3 \pm 4,4$ mm).

Einordnung unserer Ergebnisse in die bisherigen Studien

Unsere Daten lassen sich gut mit den Ergebnissen der bisherigen Studien vereinbaren. In der erwähnten Studie von Ogawa et al. wurden keine viskoelastischen Messungen an den hergestellten plättchenarmen Plasmen durchgeführt. Die Plasmaproben wurden ausschließlich für die Bestimmung der Fibrinogenkonzentrationen verwendet. Ungeachtet dessen zeigen die Daten aber eindrucksvoll eine Abhängigkeit der gemessenen MCF vom Hämatokritwert, sowohl in vitro als auch in vivo. Eine direkte Korrelation zwischen dem gemessenen Hämatokritwert und der FIBTEM-MCF sei bei Ogawa et al. wohl nicht nachweisbar gewesen. In der Studie von Solomon et al. fanden sich leider keine Daten zur direkten Korrelation zwischen Hämatokritwert und der FIBTEM-MCF.

Unsere Daten zeigten hingegen eine signifikante Korrelation des Hämatokritwert bzw. der Hämoglobinkonzentration mit der MCF im FIBTEM und im FIB-test.

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede zwischen den beiden Systemen könnte in der unterschiedlichen Effektivität der Thrombozytenhemmung beider Assays begründet liegen. Eine verbleibende Restwirkung von Thrombozyten sollte, bei gleichem Hämatokritwert, zu einer größeren Thrombusstabilität in der Probe und damit zu einer höheren MCF führen. Der Hämatokrit-Effekt käme also weniger stark zur Wirkung. Korrespondierend hierzu zeigten die Ergebnisse anderer Studien beispielsweise auch geringere MCF Werte im FIBTEM PLUS gegenüber dem FIBTEM: „*At all time points, the lowest mean maximum clot firmness (MCF) was observed with FIBTEM PLUS*“ (39).

Ob und inwieweit eine Hämodilution in vivo tatsächlich von Bedeutung ist, scheint also aktuell nicht ganz klar. Während Ogawa et al. stärkere Korrelationen zwischen FIBTEM-MCF und Fibrinogen für postoperativ entnommene Proben ($r = 0,76$) gegenüber den präoperativen Proben ($r = 0,63$) aufzeigen konnten, zeigte sich in der Studie von Solomon et al. nach der Operation, also bei hämodilutierten Patienten, kein relevanter Einfluss des Hämatokrit (66). Unsere Daten zeigten den Effekt des Hämoglobins bzw. Hämatokritwerts auf die MCF für alle Proben unterschiedlicher Herkunft.

Ein Störfaktor für die weitere dahingehende Analyse unserer Daten könnte jedoch die nicht erfasste, aber häufig vorliegende Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern (z. B. Acetylsalicylsäure, Clopidogrel) bei kardiologischen bzw. herzchirurgischen Patienten sein. Denn hierdurch könnte die Effektivität der doppelten Thrombozytenhemmung im FIB-test gegenüber dem FIBTEM in den Hintergrund geraten. Ein ähnliches Ergebnis fanden auch Solomon et al. bei Patienten mit einem Thrombozytenmangel: „... *but there is no meaningful difference between FIBTEM PLUS and FIBTEM in patients with low platelet counts*“ (39).

In unserem Probenkollektiv korrelierte die FIBTEM-MCF bei allen Proben aus der Ambulanz deutlich stärker mit der Thrombozytenzahl ($r = 0,571$; $p = 0,004$; $n = 23$) als bei den Proben nach der extrakorporalen Zirkulation ($r = 0,271$; $p = 0,045$; $n = 39$). Für die FIB-test-MCF zeigte sich interessanterweise zwar eine schwächere, aber dennoch vorhandene signifikante Korrelation bei den Proben aus der Ambulanz ($r = 0,499$; $p = 0,018$). Proben nach der EKZ zeigten keine Korrelation zwischen der MCF im FIB-test und der Thrombozytenzahl ($r = 0,115$; $p = 0,486$). Für zukünftige Studien scheint die Erfassung der Medikation aufgrund der teilweise unzureichenden Thrombozyten-aggregationshemmung der Assays zwingend notwendig für eine korrekte Einordnung der Ergebnisse.

Bedeutung für die Praxis

Eine mögliche und plausible Erklärung für diese Abhängigkeit der MCF vom Hämoglobin wäre beispielsweise, dass das fehlende Volumen der Erythrozyten in den Plasmaproben, bei gleichbleibender Probengröße im Cup, zwangsläufig durch thrombozyten- und fibrinogenhaltiges Plasmavolumen ersetzt bzw. konzentriert wird und es somit zu einer festeren Gerinnselbildung in den Plasmaproben kommt (55). Umgekehrt kommt es also bei gleichbleibendem Probenvolumen im Cup der VEM durch das Hämoglobin bzw. die Erythrozyten zu einer Verdünnung der absoluten Fibrinogenkonzentration in der Vollblutprobe (66). Dieses Modell erklärt suffizient, weshalb die funktionellen Fibrinogenassays, deren Gerinnselhaftigkeit eine Funktion des Fibrinogenspiegels darstellen, in Plasmaproben höhere MCF Werte liefern. Gleichzeitig liefern beispielsweise die SLTs auch keine Hinweise dafür, dass in diesen Fällen tatsächlich eine Hyperkoaguabilität vorliegt (67). In vivo unterstreichen zahlreiche Daten die Bedeutung der Erythrozyten in der Hämostase, z. B. durch den sogenannten Masseneffekt (68, 69). Im Probencup der VEM allerdings spielt dieser Aspekt wohl aber eine untergeordnete Rolle, da die Lateralisierung der Thrombozyten an die Wand des Cups in vitro bei fehlendem subendothelialen Kollagen und vWF keine vergleichbare Aktivierung der Thrombozyten hervorrufen kann wie in vivo.

Zusammenfassend ist also davon auszugehen, dass der Hämatokrit bzw. die Erythrozyten einen praxisrelevanten Einfluss auf die in vitro gemessene Gerinnselhaftigkeit haben, insbesondere in den funktionellen Fibrinogenassays der viskoelastischen Verfahren (TEG[®], ROTEM[®], ClotPro[®]). Aufgrund der aber nachgewiesenen positiven Effekte der Erythrozyten für die Hämostase (69) ist hier aber klar von einer messtechnischen Limitation der in-vitro-Messungen auszugehen.

Es wäre aber zu überlegen, ob eine Hb-Korrektur oder möglicherweise auch Hämatokrit abhängige Cut-Off-Werte in der Praxis sinnvoll wären, um die in den funktionellen Fibrinogenassays gemessene MCF im Hinblick auf eine möglicherweise indizierte Gabe von Fibrinogenkonzentraten oder Thrombozytenkonzentraten besser einordnen zu können.

Vergleichbarkeit beider Messverfahren

Viele bisher durchgeführte Studien untersuchten die Reproduzierbarkeit der TEG[®]-Parameter (70) und der ROTEM[®]-Parameter (45) bzw. auch deren direkte Vergleichbarkeit (71). In unserer Studie konnten wir neben dem ROTEM[®] auch ein relativ neues Gerät, das ClotPro[®], zur Bestimmung der viskoelastischer Parameter verwenden.

Mit Ausnahme einer Übersichtsarbeit über die Funktionsweisen alter und neuer viskoelastischen Methoden (72) konnten wir in einer PubMed-Recherche keine klinischen Studien oder Therapiealgorithmen basierend auf Messungen am ClotPro® finden.

Die sogenannte „interchangeability“ zwischen ROTEM® und TEG® wurde unter anderem von Hagemo et al. an 184 Traumapatienten multizentrisch in 3 Ländern untersucht. Für die korrespondierenden Parameter der Gerinnungszeit (R bzw. CT) ergaben sich dabei schwache Korrelationen mit einem Spearman-Koeffizienten von 0,24. Für die maximale Gerinnselfestigkeit (MA bzw. MCF) konnte hingegen eine stärkere Korrelation mit einem Spearman-Koeffizienten von 0,76 nachgewiesen werden. Im Bland-Altman-Plot zeigten sich aber signifikante Überschreitungen des Limit of Agreement von 10 %, so dass die Autoren zu der Schlussfolgerung kamen, dass beide Methoden und deren Messwerte nicht ohne Limitationen austauschbar waren: *„Development and validation of separate trauma treatment algorithms for TEG® and ROTEM® is required“* (71).

Gerade diese Vergleichbarkeit der korrespondierenden Messergebnisse zwischen den einzelnen Messmethoden ist im Hinblick auf die Vielzahl an derzeit zur Verfügung stehenden Therapiealgorithmen von Interesse und Wichtigkeit.

Unsere Daten zeigten zwischen den beiden Geräten ROTEM® und ClotPro® ähnliche Korrelationen, wie sie auch schon bei Hagemo et al. zu finden waren. Der Parameter CT in den Vollblutproben wies zwischen beiden Geräten nur eine schwache Korrelation auf ($r = 0,394$; $p < 0,001$). Für die MCF bestand eine deutlich stärkere Korrelation ($r = 0,771$; $p < 0,001$).

Insgesamt lagen nur wenige Punkte im Bland-Altman-Plot außerhalb des Limit of Agreements. Limitierend an dieser Darstellung war jedoch der Umstand, dass die Messdifferenzen zwischen beiden Systemen nicht exakt der Normalverteilung folgten und zudem die oberen und unteren Grenzen der Übereinstimmung klinisch nicht praktikabel erschienen (Die 1,96-fache Standardabweichung entsprach Differenzen von bis zu 5 mm). Zwischen den gemessenen MCF-Werten im FIB-test und FIBTEM zeigten sich signifikante Unterschiede, so dass auch zwischen diesen beiden Geräten trotz gleicher Nomenklatur keine einfache Übertragung der Messwerte möglich ist.

Zwar ließen sich mittels Regressionsanalyse keine klinisch praktikablen Umrechnungsfaktoren für die beiden Systeme herleiten, aber sie zeigte eine signifikante Abhängigkeit der Varianzen von der Thrombozytenzahl.

Die gezeigten Unterschiede zwischen den beiden Systemen könnten also durch unterschiedliche Zusatzstoffe der verwendeten Assays (z. B. Heparininaktivierung) oder durch die unterschiedliche Art der Thrombozytenhemmung bedingt sein:

Schlump et al. konnte in plättchenfreien Plasmaproben demonstrieren, dass unterschiedliche funktionelle Fibrinogenassays am ROTEM® wie FIBTEM, FIBTEM-Plus oder das „Functional Fibrinogen Assay of TEG“ (FFTEG) im Vergleich zum EXTEM-Assay unterschiedliche Ergebnisse lieferten und schlussfolgerten daraus, dass auch die Zusatzstoffe der Assays einen Einfluss auf die Fibrinogenpolymerisierung haben: *„we speculate that other unknown industrial stabilizing solvents in the FIBTEM assays are responsible for the increased clot firmness“* (62).

Neben den aktivierenden Zusatzstoffen hat aber auch die Art der Thrombozytenhemmung einen Einfluss auf die gemessene Gerinnselfestigkeit. Auch diese unterscheidet sich zwischen den beiden getesteten Systemen (dies wurde bereits zuvor kurz thematisiert). Während die Thrombozytenfunktion im FIBTEM (ROTEM®) durch Cytochalasin D gehemmt wird, erfolgt dies beim FIB-test (ClotPro®) mittels Cytochalasin D und einem rekombinanten GP2b/3a-Inhibitor. Die Kombination von Cytochalasin D und einem GP2b/3a-Rezeptorantagonist erwies sich gegenüber der einfachen Inaktivierung mittels Cytochalasin D als vorteilhaft (73). In unseren Daten zeigte sich so beispielsweise zwischen der MCF im FIBTEM und FIB-test für Proben mit einer Thrombozytenzahl über 300.000/mL keine Korrelation ($r = 0,493$; $p = 0,32$; $n = 6$) und bei Proben mit einer Thrombozytenzahl von unter 30.000/mL eine signifikante und starke Korrelation ($r = 0,882$, $p = 0,020$; $n = 6$).

Die direkte Vergleichbarkeit von FIBTEM und FIB-test scheint also nicht gegeben und es fand sich auch keine nachvollziehbare systematische Abweichung. Für zukünftige Studien wäre der Vergleich zwischen FIB-test und FIBTEM-Plus als neueres Verfahren möglicherweise sinnvoller. Jedoch beziehen sich die in zahlreichen Algorithmen publizierten MCF-Werte auf die im FIBTEM (und nicht im FIBTEM-Plus) gemessene MCF.

Neben den Unterschieden zwischen zwei verschiedenen Messgeräten besteht aber auch bereits Unstimmigkeit, ob selbst Referenzwerte innerhalb des ROTEM® Systems, beispielsweise vom ROTEM®-Delta auf das ROTEM®-Sigma, übertragbar seien: *„As a result, it cannot be assumed with confidence from this study that published population reference ranges for the ROTEM delta can be used interchangeably for ROTEM sigma test results“* (74).

Diskussion der weiterführenden Ergebnisse

Korrelation der MCF mit dem Plasmafibrinogen nach Clauss

Unsere Daten veranschaulichten einmal mehr eine starke Korrelation der gemessenen MCF im ROTEM® ($r = 0,703$, $p < 0,001$) und ClotPro® ($r = 0,658$, $p < 0,001$) mit der im Plasma gemessenen Fibrinogenkonzentration nach Clauss. Diese Daten entsprechen damit weitgehend den bisher in der Literatur publizierten Daten (75). Solomon et al. zeigten in ihrer Studie an 157 herzchirurgischen Patienten beispielsweise eine vergleichbar starke Korrelation ($r = 0,68$) zwischen Clauss-Fibrinogen und FIBTEM-MCF im ROTEM® (66). Andere publizierte Studien erreichten mitunter eine noch stärkere Korrelation mit Koeffizienten von $r = 0,80$ (36) oder $r^2 = 0,93$ (52). Die Korrelation der in den Plasmaproben gemessenen MCF mit der Fibrinogenkonzentration war stärker ausgeprägt als für die Vollblutproben (ClotPro®: $r = 0,814$; ROTEM®: $r = 0,774$). Auch dieser Befund reiht sich gut in die Ergebnisse bisheriger Studien ein: „... *If platelet-poor plasma is used in viscoelastic assays, their correlation with fibrinogen concentration measurements becomes almost as strong as between other different fibrinogen concentration measurement methods ...*” (66).

Probenstabilität

Das Studiendesign war nicht primär dafür ausgelegt, diese Fragenstellung zu untersuchen, doch zeigten sich einige weitere interessante Ergebnisse bezüglich der Probenstabilität. Bisher besteht bezüglich viskoelastischer Messungen noch kein klarer Konsens über das Zeitintervall, in der eine Vollblutprobe nach Abnahmezeitpunkt spätestens verarbeitet sein muss. Vig et al. zeigten, dass eine Stabilität der Citratproben bis 90 Minuten für die TEG®-Messungen gegeben war (70). Andere Untersuchungen erweiterten diese Grenze auf bis zu 4 Stunden, berichteten aber, dass es mit zunehmender Dauer zu einer Hyperkoaguabilität durch eine verminderte Thrombozytenhemmung komme (26). Camenzind et al. gingen hingegen sogar von einer Stabilität der TEG®-Parameter von bis zu 8 Stunden für Citratproben aus (76). Bezüglich ROTEM®-Parameter wurden Probenstabilitäten von 2 Stunden (45) bis 6 Stunden beschrieben (47). Aktuell gelten häufig 4 Stunden als Grenze für Citratproben in der Gerinnungsdiagnostik (77). Für das ClotPro® und zugehörige Assays konnten keine vergleichbaren Untersuchungen gefunden werden. Unsere Daten legen nahe, dass unter Umständen zumindest den Parameter MCF im FIBTEM und FIB-test betreffend, auch eine deutlich längere Probenstabilität unter Raumtemperatur gegeben sein könnte.

Ausgehend von der Annahme, dass das Patientenkollektiv der Proben mit einer verlängerten Liegedauer annähernd dem Patientenkollektiv der fristgerecht verarbeiteten Proben entspricht (dafür sprechen beispielsweise die nicht signifikanten Unterschiede der plasmatischen Gerinnungsparameter zwischen den beiden Gruppen), zeigten sich trotz unterschiedlicher Verarbeitungszeiten keine signifikanten Unterschiede der gemessenen MCF in beiden Gruppen. Auch die Reproduzierbarkeit der Vollblut-MCF aus der Plasmaprobe war davon nicht betroffen. Die Beurteilung ist allerdings durch das kleine Kollektiv von 23 Proben sowie fehlende Baseline-Messungen unmittelbar nach Probenabnahme mit Einschränkungen verbunden. Auch konnte kein Bezug der verspätet gemessenen MCF-Werte zur tatsächlich vorliegenden klinischen Blutungssituation erhoben werden. Die Ergebnisse könnten aber Grundlage für weitere, in diese Richtung gehende Untersuchungen darstellen.

Untersucherabhängigkeit der viskoelastischen Messungen

Bei genauerer Betrachtung der Clotting-Time (CT) fiel ein weiterer interessanter Befund auf. Obwohl sich wesentliche hämostaseologische Parameter wie Quick und zelluläre Komponenten abhängig von der Probenherkunft und abhängig vom Untersuchenden unterschieden (siehe *Tabelle 45*), zeigten sich weder zwischen den Untersuchenden (Studienarzt und Laborpersonal) noch zwischen der Probenherkunft (Herzklinik und Ambulanz), hinsichtlich der CT im FIBTEM (ROTEM®) statistisch signifikante Unterschiede. Auch in Bezug auf die vom Hersteller angegebenen Normwerte von 38 bis 62 Sekunden zeigte sich zwischen Proben aus Herzklinik und Ambulanz kein signifikanter Unterschied (Chi-Quadrat $p = 0,167$). In der Ambulanzgruppe hatten 61 % der Proben eine verlängerte CT (14 von 23 Proben) und in der Herzklinik 60 % der Proben (46 von 77 Proben). Zwischen den Untersuchenden fand sich in der FIBTEM-CT dementsprechend auch kein Unterschied. Im Median lag die CT bei den durch den Studienarzt untersuchten Proben bei 66 Sekunden (IQA: 16) und bei den durch das Laborpersonal untersuchten Proben bei 65 Sekunden (IQA: 17).

Wendet man den Blick aber auf die FIB-test-CT (ClotPro®), dann zeigte sich, dass die durch den Studienarzt gemessene CT im Median bei 67 Sekunden (IQA: 25) lag und somit im Wilcoxon-Test nicht signifikant von der im FIBTEM gemessenen CT abweicht ($p = 0,458$). Die durch das Laborpersonal gemessene FIB-test-CT hingegen war mit 58 Sekunden (IQR: 16) im Median signifikant kürzer ($p = 0,002$) als die im FIBTEM gemessene CT.

Es stellte sich hier die Frage, warum sich keine signifikanten Unterschiede der CT zwischen den doch so verschiedenen Proben (Herzklinik und Ambulanz) ergaben und warum die durch das Laborpersonal gemessene CT im FIB-test statistisch signifikant niedriger ausfiel als die im FIBTEM gemessene CT.

Dabei ist festzuhalten, dass die CT in funktionellen Fibrinogenassays wie dem FIB-test oder FIBTEM kein klinisch relevanter Parameter ist und auch vom Hersteller des ROTEM® nur die Verwendung des Parameter MCF aus dem FIBTEM-Assay empfohlen wird: „... *only the MCF, which represents the fibrin contribution to the clot, is considered the target value of FIBTEM*“ (78).

Das in den Assays zur Thrombozytenaggregationshemmung verwendete Cytochalasin D soll einen prokoagulatorischen Effekt besitzen. Judd et al. berichteten in ihren Untersuchungen von einer um circa 7 bis 9% verkürzten CT im FIBTEM gegenüber dem EXTEM (79). Durch den prokoagulatorischen Effekt des Cytochalasin D wäre es unter Umständen denkbar, dass dadurch zumindest ein geringer Mangel an Gerinnungsfaktoren bis zu einem gewissen Grad kompensiert werden könnte. Zudem fällt durch die Inhibierung der Thrombozyten ein weiterer wesentlicher Parameter zwischen den beiden Gruppen (Herzklinik und Ambulanz) weg. Eine Erklärung für die Unterschiede der FIB-test-CT (ClotPro®) zwischen den Untersuchenden könnte in präanalytischen Faktoren bzw. in einem unterschiedlichen Pipettierverhalten begründet liegen. Eine Probenaktivierung durch unterschiedliche Pipettierschritte bei Messungen am ROTEM® wurde bereits 2009 in der Dissertation von Darktchiev diskutiert (80).

Die eigentlich im Fokus stehende MCF in den Assays beider Geräte zeigte demgegenüber keinerlei Unterschiede zwischen den Untersuchenden (ROTEM®: $p = 0,961$ und ClotPro®: $p = 0,182$). Es zeigten sich auch starke Korrelationswerte der gemessenen MCF im Vollblut und in den Plasmaproben unabhängig vom Anwender (Spearman-Koeffizient $r = 0,79 - 0,91$).

Zusammenfassung

Viskoelastische Methoden (VEM) bieten gegenüber den routinemäßig durchgeführten Globaltests der Gerinnung (SLTs) wie aPTT und PZ/Quick einige Vorteile. Durch Wegfall einer aufwendigen Präanalytik sowie durch bettseitige Durchführung stehen die Ergebnisse schneller zur Verfügung. Zudem bilden VEM einen weitaus größeren Teil der gerinnungsphysiologischen Abläufe ab und liefern somit mehr Informationen für eine zielgerichtete hämostatische Therapie. Dementsprechend finden VEM zunehmend Anwendung in der klinischen Praxis und werden mit unterschiedlichen Empfehlungsgraden in aktuellen Leitlinien empfohlen. Viskoelastischen Methoden werden aber auch nachgesagt, stark vom Anwender abhängige Methoden zu sein, ohne ausreichende Standardisierung und ohne Möglichkeit der retrospektiven Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Dies liegt vorwiegend auch darin begründet, dass diese Verfahren Vollblut als Testmaterial verwenden. Eine Lagerung des Probenmaterials ist dementsprechend nicht möglich und Qualitätskontrollen damit erschwert. Dies stellte bisher eine Limitation zahlreicher großer Studien dar. Die Möglichkeit Probenmaterial einzufrieren, zu lagern und im Nachgang aus der gelagerten Probe das ursprüngliche Ergebnis der Vollblutprobe rekonstruieren zu können wäre eine Möglichkeit der Qualitätssicherung für zukünftige Studien.

Die vorliegende Arbeit setzte sich zum Ziel mittels VEM und funktioneller Fibrinogenassays speziell die Fibrinogenpolymerisierung in verschiedenen Probenmaterialien (Vollblutprobe, frische Plasmaprobe und getaute Plasmaprobe) zu untersuchen. In unserer Studie sollte untersucht werden, ob sich die in der Vollblutprobe gemessene maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) in den beiden funktionellen Fibrinogenassays von ROTEM® (FIBTEM) und ClotPro® (FIB-test) aus der dazugehörigen, gelagerten und getauten Plasmaprobe retrospektiv nachvollziehen lässt. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob auch die Anwesenheit eines Fibrinolysehemmers wie Tranexamsäure (TXA) mittels TPA-test im ClotPro® retrospektiv aus der gelagerten und getauten Plasmaprobe nachgewiesen werden kann. Gerade im Hinblick auf die zahlreichen, in der letzten Zeit publizierten Therapie-algorithmen zur hämostatischen Therapie mittels ROTEM®, war auch die Vergleichbarkeit beider Verfahren (ROTEM® und ClotPro®) von großem Interesse. Da beide Verfahren die gleiche Terminologie der gemessenen Parameter verwenden sollte geprüft werden, ob die erhobenen Messwerte untereinander austauschbar sind.

Nach Vorliegen des Ethikvotums (Projekt-Nr. 19-686) vom 30.09.2019 erfolgte die Akquirierung der Proben in einem Zeitraum von Dezember 2019 bis Juli 2020. Um einen möglichst weiten Messbereich an Fibrinogenkonzentrationen und damit auch der korrespondierenden Gerinnselfestigkeit (MCF) abdecken zu können erfolgte die Rekrutierung der Proben zum einen von Patienten der hämostaseologischen Ambulanz der Abteilung für Transfusionsmedizin,- Zelltherapeutika und Hämostaseologie (ATMZH) sowie zum anderen von Patienten der Herzkllinik der LMU am Augustinum München. Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Studien wurden die Proben dieser Studie nicht in vitro durch Verdünnung bearbeitet um einen gewünschten Messbereich zu erhalten. Zusätzlich zu den Messungen am ROTEM[®] und ClotPro[®] erfolgte die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration nach der Clauss-Methode und nach der vom Quick abgeleiteten Methode sowie die Messungen der Globalgerinnungstests (PZ/aPTT) und der hämatologischen Parameter (kleines Blutbild). Insgesamt wurden 77 Proben von Patienten der Herzkllinik und 23 Proben von Patienten der ATMZH für die Auswertung eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Proben mit einer Verarbeitungszeit von über 4 Stunden (n = 23). Die Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS Statistics 26.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die in den Plasmaproben gemessenen Gerinnselfestigkeiten (MCF) der funktionellen Fibrinogenassays beider viskoelastischen Methoden deutlich über den gemessenen MCF-Werten in den Vollblutproben lagen. Zwischen den gemessenen Werten in den Vollblutproben und den Plasmaproben bestanden hoch signifikante statistische Unterschiede ($p < 0,001$). Insbesondere zeigte sich eine negative Korrelation der Hämoglobinkonzentration mit der gemessenen MCF sowohl im ClotPro[®] ($r = -0,564$) als auch ROTEM[®] ($r = -0,320$). Zudem zeigte sich im ROTEM[®] noch eine schwache aber statistisch signifikante Korrelation ($r = 0,232$; $p = 0,021$) der im Vollblut gemessenen MCF mit der Thrombozytenzahl. Mittels linearer Regressionsanalyse konnten für beide Verfahren Formeln entwickelt werden, die im untersuchten Probenkollektiv eine gute retrospektive Abschätzung der im Vollblut gemessenen MCF aus der zugehörigen getauten Plasmaprobe erlaubten. Als signifikanter Koeffizient der Regression stellte sich bei beiden Verfahren die Hämoglobinkonzentration dar. Beim ROTEM[®] konnte die Güte der Regression durch Einschluss der Thrombozytenzahl nochmals verbessert werden. Die Anpassungsgüte der Regression lag für das ROTEM[®] bei $R^2 = 0,7$ und für das ClotPro[®] bei $R^2 = 0,9$. Diese beiden Modelle wurden auch auf die zuvor ausgeschlossenen Proben mit einer Liegedauer über 4 Stunden (n = 22) angewandt.

Zwischen der MCF im Vollblut und der errechneten predicted MCF bestanden sowohl für das ROTEM[®] als auch für das ClotPro[®] keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Die resultierenden Variationskoeffizienten zwischen den MCF-Werten in den Vollblutproben und den errechneten predicted MCF-Werten aus den getauten Plasmaproben lagen für das ClotPro[®] im Mittel bei ca. 0,06 und für das ROTEM[®] bei ca. 0,15. Damit lagen diese Abweichungen im Bereich der erwarteten Abweichungen. Die Messpräzision (ausgedrückt anhand von Variationskoeffizienten) unserer Messungen wurde mittels 3x3 Matrix bestimmt und lag für die FIB-test-MCF in den Vollblutproben beispielsweise bei durchschnittlich 0,12 und für die FIBTEM-MCF bei 0,11. Auch im Bland-Altman-Plot zeigte sich eine gute Übereinstimmung der abgeschätzten MCF-Werte. Das Vorhandensein von Tranexamsäure und der damit einhergehenden antifibrinolytischen Aktivität konnte auch in der getauten Plasmaprobe mittels TPA-test im ClotPro[®] zuverlässig detektiert werden. Alle Tranexamsäure enthaltenden Proben zeigten weder in den Vollblutproben noch in den zugehörigen getauten Plasmaproben eine relevante Lyse. Zwischen der im ROTEM[®] und ClotPro[®] gemessenen MCF in den Vollblutproben bestanden statistisch hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$). Eine systematische Abweichung zwischen beiden Systemen ließ sich nicht erkennen. In ca. 67 % der Fälle war die FIB-test-MCF größer als die parallel gemessene FIBTEM-MCF und in den restlichen 33 % der Fälle war die FIBTEM-MCF größer. Zwischen der MCF in beiden Assays bestand eine starke Korrelation von $r = 0,771$ und im Bland-Altman-Plot zeigte sich eine formal hohe Übereinstimmung mit einem Großteil der Messdifferenzen innerhalb eines Limits der 1,96-fachen Standardabweichung. Dies entsprach allerdings einer Messdifferenz von - 9 bis + 6 mm. Die Regressionsanalyse bestätigte die Thrombozytenzahl als einen signifikanten Koeffizienten zur Erklärung der Differenzen zwischen beiden Assays.

Als weitere interessante Beobachtung zeigte sich in der statistischen Untersuchung, dass die MCF auch aus Proben mit einer längeren Liegedauer (deutlich über 4 Stunden) mit plausiblen Werten gemessen werden kann und auch die retrospektive Nachvollziehbarkeit der MCF aus einer Plasmaprobe scheinbar nicht durch eine längere Verarbeitungszeit relevant beeinflusst wird.

Zusammenfassend konnten wir mit unserer Studie also erstmals zeigen, dass eine Vergleichbarkeit der Fibrinogenpolymerisierung in den viskoelastischen Methoden zwischen einer Vollblutprobe und einer getauten Plasmaprobe retrospektiv möglich ist. Somit könnte diese Methode als qualitätssichernde Maßnahme in zukünftigen Studien Anwendung finden.

Ein wichtiger Faktor dabei ist allerdings die Kenntnis der Hämoglobinkonzentration in der Vollblutprobe, denn die Hämoglobinkonzentration korreliert invers und signifikant mit der gemessenen MCF in der Vollblutprobe. Diese Beobachtung stimmt auch überein mit bisherigen Studien. Die beiden Assays zeigten dabei eine unterschiedliche Abhängigkeit der gemessenen MCF von der Hämoglobinkonzentration. Als mögliche Ursache dieser unterschiedlichen Sensibilität ist die unterschiedliche Effektivität der Thrombozytenhemmung in den Assays zu diskutieren. Der in anderen Studien bereits nachgewiesene prokoagulatorische Effekt der Inhaltsstoffe dieser Assays ist als Ursache für die Differenzen ebenfalls in vorstellbar. Bei der Hämoglobinabhängigkeit der gemessenen MCF handelt es sich um eine messtechnische Limitation der in-vitro-Messungen. In vivo demonstrieren zahlreiche Untersuchungen die Bedeutung der Erythrozyten für eine intakte Hämostase. So ist aber beispielsweise die Notwendigkeit von Hämatokrit- bzw. Hämoglobin abhängigen Cut-Off Werten der MCF zu diskutieren und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Aufgrund der unterschiedlichen Thrombozytenhemmung sollte in zukünftigen Studien sicherlich auf die Medikation der Probenspender geachtet werden, da es hierdurch zu verfälschenden Einflüssen kommen kann. Weitere Untersuchungen in einem größeren Kollektiv sind weiterhin notwendig.

Die analogen Parameter MCF in ClotPro[®] und ROTEM[®] waren nicht untereinander austauschbar. Dies wäre von besonderem Interesse für die klinische Praxis da aktuell zahlreiche Therapiealgorithmen für das ROTEM[®] zur Verfügung stehen. Als wesentlichen erklärenden Faktor der Varianz lieferte die Regressionsanalyse die Thrombozytenzahl. Für das ClotPro[®] müssen eigene Algorithmen erstellt und in Studien untersucht werden. Für weitere Untersuchungen wäre der Vergleich zwischen dem neuen FIBTEM-Plus und dem FIB-test von Interesse da diese beiden Assays auf einer dualen Thrombozytenhemmung beruhen. Unsere Daten suggerieren zudem, dass die MCF im FIBTEM und FIB-test auch nach durchaus mehr als vier Stunden noch valide messbar zu sein scheint. Weitere Untersuchungen mit vergleichenden unmittelbaren Baseline-Messungen wären hierfür jedoch notwendig.

Referenzen

1. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med.* 2017;48(4):295-313.
2. Weber CF, Zacharowski K. Perioperative point of care coagulation testing. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(20):369-75.
3. Whiting D, DiNardo JA. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. *Am J Hematol.* 2014;89(2):228-32.
4. Luddington RJ. Thrombelastography/ thromboelastometry. *Clin Lab Haem.* 2005;27:81-90.
5. Curry NS, Davenport R, Pavord S, Mallett SV, Kitchen D, Klein AA, et al. The use of viscoelastic haemostatic assays in the management of major bleeding: A British Society for Haematology Guideline. *Br J Haematol.* 2018;182(6):789-806.
6. Ganter MT, Hofer CK. Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices. *Anesth Analg.* 2008;106(5):1366-75.
7. Hans GA, Besser MW. The place of viscoelastic testing in clinical practice. *Br J Haematol.* 2016;173(1):37-48.
8. Weber CF, Gorlinger K, Meininger D, Herrmann E, Bingold T. Point-of-Care Testing - A Prospective, Randomized Clinical Trial of Efficacy in Coagulopathic Cardiac Surgery Patients. *Anesthesiology.* 2012;117(3):117:531.
9. Task Force on Patient Blood Management for Adult Cardiac Surgery of the European Association for Cardio-Thoracic S, the European Association of Cardiothoracic A, Boer C, Meesters MI, Milojevic M, Benedetto U, et al. 2017 EACTS/EACTA Guidelines on patient blood management for adult cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2018;32(1):88-120.
10. Schöchl H. Transfusion in trauma: thromboelastometry-guided coagulation factor concentrate-based therapy versus standard fresh frozen plasma-based therapy. *Critical Care.* 2011;15.
11. Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, Duranteau J, Filipescu D, Hunt BJ, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition. *Crit Care.* 2019;23(1):98.
12. Mallaiah S, Barclay P, Harrod I, Chevannes C, Bhalla A. Introduction of an algorithm for ROTEM-guided fibrinogen concentrate administration in major obstetric haemorrhage. *Anaesthesia.* 2015;70(2):166-75.
13. Collins P, Abdul-Kadir R, Thachil J, Subcommittees on Women's Health Issues in T, Haemostasis, on Disseminated Intravascular C. Management of coagulopathy associated with postpartum hemorrhage: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2016;14(1):205-10.
14. Solomon C., Asmis LM., Spahn DR. Is viscoelastic coagulation monitoring with ROTEM or TEG validated? *Scand J Clin Lab Invest.* 2016;76(6):503-7.

15. Young G, Sorensen B, Dargaud Y, Negrier C, Brummel-Ziedins K, Key NS. Thrombin generation and whole blood viscoelastic assays in the management of hemophilia: current state of art and future perspectives. *Blood*. 2013;121(11):1944-50.
16. George G, Manatasahit W, Balasubramanian M, Navarro V. Reproducibility of TEG Parameters in Stable Cirrhotics. *Lab Med*. 2018;49(3):226-30.
17. Maegele M, Nardi G, Schochl H. Hemotherapy algorithm for the management of trauma-induced coagulopathy: the German and European perspective. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2017;30(2):257-64.
18. Inaba K, Rizoli S, Veigas PV, Callum J, Davenport R, Hess J, et al. 2014 Consensus conference on viscoelastic test-based transfusion guidelines for early trauma resuscitation: Report of the panel. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015;78(6):1220-9.
19. Schöchl H, Maegele M, Solomon C, Goring K, Voelckel W. Early and individualized goal-directed therapy for trauma-induced coagulopathy. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012;20:15.
20. Baksaas-Aasen K, Gall LS, Stensballe J, Juffermans NP, Curry N, Maegele M, et al. Viscoelastic haemostatic assay augmented protocols for major trauma haemorrhage (ITACTIC): a randomized, controlled trial. *Intensive Care Med*. 2021;47(1):49-59.
21. Rouillet S, Freyburger G, Cruc M, Quinart A, Stecken L, Audy M, et al. Management of bleeding and transfusion during liver transplantation before and after the introduction of a rotational thromboelastometry-based algorithm. *Liver Transpl*. 2015;21(2):169-79.
22. Scala E, Coutaz C, Gomez F, Alberio L, Marcucci C. Comparison of ROTEM Sigma to Standard Laboratory Tests and Development of an Algorithm for the Management of Coagulopathic Bleeding in a Tertiary Center. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2020;34(3):640-9.
23. Goerlinger K, Jambor C, Hanke AA, Dirkmann D, Adamzik M, Hartmann M, et al. Perioperative Coagulation Management and Control of Platelet Transfusion by Point-of-Care Platelet Function Analysis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2007;34(6):396-411.
24. Rigal JC, Boissier E, Lakhal K, Riche VP, Durand-Zaleski I, Rozec B. Cost-effectiveness of point-of-care viscoelastic haemostatic assays in the management of bleeding during cardiac surgery: protocol for a prospective multicentre pragmatic study with stepped-wedge cluster randomised controlled design and 1-year follow-up (the IMOTEC study). *BMJ Open*. 2019;9(11):e029751.
25. Wikkelso A, Wetterslev J, Møller AM, Afshari A. Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016(8):CD007871.
26. Dias JD, Haney EI, Mathew BA, Lopez-Espina CG, Orr AW, Popovsky MA. New-Generation Thromboelastography: Comprehensive Evaluation of Citrated and Heparinized Blood Sample Storage Effect on Clot-Forming Variables. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(4):569-77.

27. Goerlinger K, Kiss G, Dirkmann D, Dusse F, Hanke A. ROTEM-based algorithm for management of acute haemorrhage and coagulation disorders in trauma patients. *European Journal of Anaesthesiology*. 2006;23:84-5.
28. Anderson L, Quasim I, Steven M, Moise SF, Shelley B, Schraag S, et al. Interoperator and intraoperator variability of whole blood coagulation assays: a comparison of thromboelastography and rotational thromboelastometry. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2014;28(6):1550-7.
29. Linskens EA, Devreese KMJ. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(3):292-303.
30. Schoergenhofer C, Buchtele N, Schwameis M, Bartko J, Jilma B, Jilma-Stohlawetz P. The use of frozen plasma samples in thromboelastometry. *Clin Exp Med*. 2017;17(4):489-97.
31. Woodhams B, Girardot O, Blanco M-J, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2001;12(4):229-36.
32. Kragh T, Giebl A, Dick A, Kutsch M, Spannagl M. Thrombelastometrie – interne und externe Qualitätssicherung. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2016;7:Doc01.
33. Chitlur M, Sorensen B, Rivard GE, Young G, Ingerslev J, Othman M, et al. Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group. *Haemophilia*. 2011;17(3):532-7.
34. Shinkman B., Livnat T., Lubetsky A., Tamarin I., Budnik I., Einav Y., et al. The in-vitro effect of fibrinogen, factor XIII and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on clot formation and susceptibility to tissue plasminogen activator-induced fibrinolysis in hemodilution model. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2012;23(5):370-8.
35. Solomon C, Sorensen B, Hochleitner G, Kashuk J, Ranucci M, Schochl H. Comparison of whole blood fibrin-based clot tests in thrombelastography and thromboelastometry. *Anesth Analg*. 2012;114(4):721-30.
36. Ogawa S, Szlam F, Bolliger D, Nishimura T, Chen EP, Tanaka KA. The impact of hematocrit on fibrin clot formation assessed by rotational thromboelastometry. *Anesth Analg*. 2012;115(1):16-21.
37. Lang T, Johannig K, Metzler H, Piepenbrock S, Solomon C, Rahe-Meyer N, et al. The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia. *Anesth Analg*. 2009;108(3):751-8.
38. Winstedt D, Solomon C, Hillarp A, Lundahl T, Schott U. Intraoperative Hydroxyethyl Starch and its Effects on Different Fibrinogen Measurements. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2016;22(7):641-7.
39. Solomon C, Baryshnikova E, Schlimp CJ, Schochl H, Asmis LM, Ranucci M. FIBTEM PLUS provides an improved thromboelastometry test for measurement of fibrin-based clot quality in cardiac surgery patients. *Anesth Analg*. 2013;117(5):1054-62.

40. Erdoes G, Koster A, Meesters MI, Ortmann E, Bolliger D, Baryshnikova E, et al. The role of fibrinogen and fibrinogen concentrate in cardiac surgery: an international consensus statement from the Haemostasis and Transfusion Scientific Subcommittee of the European Association of Cardiothoracic Anaesthesiology. *Anaesthesia*. 2019;74(12):1589-600.
41. Gielen C, Dekkers O, Stijnen T, Schoones J, Brand A, Klautz R, et al. The effects of pre- and postoperative fibrinogen levels on blood loss after cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2014;18(3):292-8.
42. Gielen C, Brand A, van Heerde WL, Stijnen T, Klautz RJM, Eikenboom J. Hemostatic alterations during coronary artery bypass grafting. *Thromb Res*. 2016;140:140-6.
43. Solomon C, Baryshnikova E, Tripodi A, Schlimp CJ, Schochl H, Cadamuro J, et al. Fibrinogen measurement in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: analysis of repeatability and agreement of Clauss method within and between six different laboratories. *Thromb Haemost*. 2014;112(1):109-17.
44. Hochleitner G, Sutor K, Levett C, Leyser H, Schlimp CJ, Solomon C. Revisiting Hartert's 1962 Calculation of the Physical Constants of Thrombelastography. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017;23(3):201-10.
45. Theusinger OM, Nurnberg J, Asmis LM, Seifert B, Spahn DR. Rotation thromboelastometry (ROTEM) stability and reproducibility over time. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;37(3):677-83.
46. Gorlinger K, Perez-Ferrer A, Dirkmann D, Saner F, Maegele M, Calatayud AAP, et al. The role of evidence-based algorithms for rotational thromboelastometry-guided bleeding management. *Korean J Anesthesiol*. 2019;72(4):297-322.
47. Lang T, Bauters A, Braun SL, Pötzsch B. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2005;16(4):301-10.
48. Calatzis A., Spannagl M., Vorweg M. Zielgerichtete Behandlung akuter Hämostasestörungen mit Hilfe der ROTEM-Analyse. Leitfaden ROTEM - Analyse 08/2013. 2003.
49. enicor GmbH. ClotPro® User Manual Rev 001. November 2018.
50. Dynabyte Informationssysteme GmbH. Devices and Methods for Measuring Viscoelastic Changes of a Sample. International Patent WO 2018/137766A1, 2 August 2018.
51. Tirotta CF, Lagueruela RG, Madril D, Salyakina D, Wang W, Taylor T, et al. Correlation Between ROTEM FIBTEM Maximum Clot Firmness and Fibrinogen Levels in Pediatric Cardiac Surgery Patients. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019;25:1-5.
52. Kalina U, Stöhr HA, Heikea B, Knaub S, Siboni S. Rotational thromboelastography for monitoring of fibrinogen concentrate therapy in fibrinogen deficiency. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2008;19(8):777-83.
53. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958-65.

54. Roeloffzen WW, Kluin-Nelemans HC, Bosman L, de Wolf JT. Effects of red blood cells on hemostasis. *Transfusion*. 2010;50(7):1536-44.
55. Kawasaki J, Katori N, Kodaka M, Miyao H, Tanaka KA. Electron microscopic evaluations of clot morphology during thrombelastography. *Anesth Analg*. 2004;99(5):1440-4.
56. Bühl A. *SPSS Einführung in die moderne Datenanalyse ab SPSS 25*: Pearson; 2019.
57. Bland M., Altman D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*. 1986;327(8476):307-10.
58. Ebinger T, Ruland A, Lakner M, Schwaiger M. Validity, regulatory registration and approval of ROTEM thromboelastometry. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010;21(1):106-7.
59. Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Emerging technologies and quality assurance: the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme perspective. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33(3):243-9.
60. Chitlur M, Lusher J. Standardization of thromboelastography: values and challenges. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(7):707-11.
61. Kitchen DP, Kitchen S, Jennings I, Woods T, Walker I. Quality assurance and quality control of thrombelastography and rotational Thromboelastometry: the UK NEQAS for blood coagulation experience. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(7):757-63.
62. Schlimp CJ, Solomon C, Hochleitner G, Zipperle J, Redl H, Schochl H. Thromboelastometric maximum clot firmness in platelet-free plasma is influenced by the assay used. *Anesth Analg*. 2013;117(1):23-9.
63. Grossmann E, Akyol D, Eder L, Hofmann B, Haneya A, Graf BM, et al. Thromboelastometric detection of clotting Factor XIII deficiency in cardiac surgery patients. *Transfus Med*. 2013;23(6):407-15.
64. Chandler P, Gravelle, Soltow, Lewis. Factor XIIIa and clot strength after cardiopulmonary bypass. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2001;12:101-8.
65. Iselin BM, Willmann PF, Seifert B, Casutt M, Bombeli T, Zalunardo MP, et al. Isolated reduction of haematocrit does not compromise in vitro blood coagulation. *Br J Anaesth*. 2001;87(2):246-9.
66. Solomon C, Rahe-Meyer N, Schochl H, Ranucci M, Gorlinger K. Effect of haematocrit on fibrin-based clot firmness in the FIBTEM test. *Blood Transfus*. 2013;11(3):412-8.
67. Spiezia L, Radu C, Marchioro P. et al. Peculiar whole blood rotation thromboelastometry (Rotem) profile in 40 sideropenic anaemia patients. *Thromb Haemost*. 2008;6(100):1106-10.
68. Joist JH, Bauman JE, Sutura SP. Platelet adhesion and aggregation in pulsatile shear flow: effects of red blood cells. *Thrombosis research*. 1998;92:47-52.
69. Weisel JW, Litvinov RI. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2019;17(2):271-82.

70. Vig S, Chitolie A, Bevan DH, Halliday A, Dormandy J. Thromboelastography: a reliable test? *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2001;12(7):555-61.
71. Hagemo JS, Naess PA, Johansson P, Windelov NA, Cohen MJ, Roislien J, et al. Evaluation of TEG((R)) and RoTEM((R)) inter-changeability in trauma patients. *Injury*. 2013;44(5):600-5.
72. Hartmann J, Murphy M, Dias JD. Viscoelastic Hemostatic Assays: Moving from the Laboratory to the Site of Care—A Review of Established and Emerging Technologies. *Diagnostics*. 2020;118(10).
73. Schlimp CJ, Solomon C, Ranucci M, Hochleitner G, Redl H, Schochl H. The effectiveness of different functional fibrinogen polymerization assays in eliminating platelet contribution to clot strength in thromboelastometry. *Anesth Analg*. 2014;118(2):269-76.
74. Field A, Poole T, Bamber JH. ROTEM((R)) sigma reference range validity. *Anaesthesia*. 2019;74(8):1063.
75. Ranucci M, Di Dedda U, Baryshnikova E. Trials and Tribulations of Viscoelastic-Based Determination of Fibrinogen Concentration. *Anesth Analg*. 2020;130(3):644-53.
76. Camenzind V., Bombeli T., Seifert B., Jamnicki M. Citrate Storage Affects Thrombelastograph® Analysis. *Anesthesiology*. 2000;92(5).
77. Pötzsch B., Madlener K. *Hämostaseologie*: Springer-Verlag 2010.
78. Erdoes G, Reid C, Koster A. The Dark Side of FIBTEM: Cytochalasin D. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2020;34(6):1474-5.
79. Judd M, Strauss ER, Hasan S, Abuelkasem E, Li J, Deshpande S, et al. Clotting Time Results Are Not Interchangeable Between EXTEM and FIBTEM on Rotational Thromboelastometry. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2020;34(6):1467-73.
80. Daraktchiev A.T. *Evaluation eines neuen Thrombelastographie-Verfahrens - ROTEM®* [Inaugural-Dissertation]. Marburg: Marburg; 2009.

Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

ADAMOWICZ, Sebastian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Viskoelastische Methoden in der Gerinnungsdiagnostik
- Vergleichende Untersuchungen in Plasma und Vollblut -

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.12.2021
Ort, Datum

Sebastian Adamowicz
Unterschrift

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Zwissler und Prof. Dr. Humpe für die Überlassung des Themas.

Ein großer Dank geht an PD Dr. Patrick Möhnle und Dr. Isabell Pekrul für ihre außerordentlich gute Betreuung und Hilfestellung während jeder einzelnen Projektphase dieser Arbeit. Danke auch für die ständige Erreichbarkeit und die schnellen Korrekturen bzw. Feedbacks.

Ich danke zudem allen medizintechnischen Assistentinnen der hämostaseologischen Ambulanz ganz herzlichst für die nette Aufnahme ins Team, das große Engagement, die Einführung in die Labortätigkeiten und die Durchführung der zahlreichen Messungen trotz der damit einhergehenden zusätzlichen Arbeitsbelastung.

Darüber hinaus danke ich Frau Prof. Dr. Hoster vielmals für die wertvolle Beratung zu statistischen Fragen. Hier im speziellen zum Thema Regressionsanalyse mit SPSS.

Ein großer Dank gilt auch meinen Kollegen und Kolleginnen der Anästhesiologie in der Herzklinik am Augustinum, die mich ebenfalls ständig motivierten und, wo es nur ging, tatkräftig unterstützten. Insbesondere allen Kollegen/innen aus dem OP für die Blutabnahmen und allen Kollegen/innen auf Intensivstation für die Organisation des Probenverkehrs nach meinen Nachtdiensten. Ein besonderer Dank geht auch an Prof. Kilger, der mir, wann immer es der OP-Plan zugelassen hatte, ein paar Stunden FZA gewährte, um diese Dissertation voranzubringen.

Trotz aller zuvor genannten Unterstützung ging die Durchführung einer solchen Arbeit neben einer Vollzeitbeschäftigung an der Uniklinik einher mit zahlreichen Stunden im Labor nach den Nachtdiensten und zahlreichen Stunden am Computer nach den Tagdiensten. Sie ging einher mit viel Stress, angespannten Nerven und viel Verzicht. Deshalb möchte ich zuletzt natürlich auch meiner Familie und insbesondere meiner Ehefrau Theresia Adamowicz danken, die mich durch diese Zeit begleiteten, motivierten, unterstützten und manchmal auch ertragen mussten. Ein Dank geht auch an meine Eltern Isabelle und Michael Adamowicz sowie meinen Bruder Kai Adamowicz für die ständige mentale Unterstützung.

Sebastian Adamowicz, im April 2021