Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT): Bestimmung nun auch im Notfall möglich

Thrombin-Antithrombin III-Complex: Determination now Possible in Emergency Cases

H. D. Bruhn¹, J. Liebsch¹, C. Wagner²

¹ Medizinische Klinik, Universität Kiel, ² Behringwerke AG, Marburg

Zusammenfassung:

Die vorliegenden Daten zeigen, daß mit einer modifizierten, zeitverkürzten Version eines Enzymimmunoassays die Bestimmung von Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT) innerhalb von 20 min durchgeführt werden kann. Die oft therapieentscheidende Diagnose einer Hyperkoagulabilität kann somit auch im Notfall gestellt werden.

Schlüsselwörter:

Thrombin-Antithrombin III (TAT) – Hyperkoagulabilität – Notfallmethode

Summary:

The presented data show, that thrombin-antithrombin III-complex (TAT) determination is now possible within 20 min by a modified time reduced version of an enzyme immunoassay. The diagnosis of hypercoagulability, often decisive for the following therapy, now can be also made in emergency cases.

Keywords:

Thrombin-Antithrombin III (TAT) – hypercoagulability – emergency method

Einleitung

Die Bestimmung des Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT) stellt ein quantitatives Maß der In-vivo-Gerinnungsaktivierung dar (1). Die Aktivierung des Prothrombin zu Thrombin ist die Schlüsselreaktion in der Gerinnungskaskade; die Inaktivierung des Thrombin mittels Komplexbildung mit AT III, dem wichtigsten physiologischen Gerinnungsinhibitor, stellt somit ein indirektes Maß der Thrombinbildung im Blutstrom dar.

Gerinnungsstörungen durch Verbrauchskoagulopathie stellen in der Akutmedizin eine der gefürchtetsten, weil den Patienten letal bedrohenden Komplikationen dar, wobei sowohl Blutungen als auch ein Multiorganversagen infolge der Mikrothrombosierung des Kapillarnetzes Todesursache sein können. In beiden Fällen jedoch resultieren die Komplikationen aus einer gesteigerten Thrombinaktivität, die im Mittelpunkt der als disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) bezeichneten Gerinnungsstörung mit einem erhöhten Umsatz an Thrombozyten, Fibrinogen und Gerinnungsfaktoren sowie Inhibitoren steht.

Mit dem Nachweis einer gesteigerten Thrombinaktivierung wird die Diagnose der DIC wesentlich erleichtert (2, 3), da die Analyse der üblichen Gerinnungsparameter ein völlig unterschiedliches Bild je nach Ausprägungsart der DIC ergeben können. Erstrebenswert ist insbesondere eine möglichst frühzeitige Erfassung der auftretenden Hyperkoagulabilität, um durch eine rechtzeitig einsetzende Therapie die volle Ausildung einer DIC zu verhindern.

Bei der TAT-Bestimmung handelt es sich um einen Enzymimmunoassay im Sandwichprinzip; die übliche Testdauer beträgt ca. 2 h. Um die gerade in der Akutmedizin wertvolle Information über den In-vivo-Aktivitätsgrad des Gerinnungssystems schneller zu erhalten, wurde eine auf 20 min Inkubationszeit insgesamt verkürzte Testversion auf ihre Vergleichbarkeit mit der Standardversion geprüft.

Material und Methoden

TAT wurde bestimmt mittels Enzygnost® TAT (Behringwerke AG, 3550 Marburg). Die Testdurchführung erfolgt entweder gemäß Packungsbeilage (Standardversion) oder gemäß der folgenden Schnellversion:

Je beschichtetes Röhrchen:

100 µl Probenpuffer
200 µl Probe (oder Standard)

10 min bei 37 °C inkubieren

2 × waschen

300 µl Konjugat-Lösung (1 : 20 verd.)

5 min bei 37 °C inkubieren

3 × waschen

300 µl Substrat-Lösung

5 min bei 37 °C inkubieren

300 µl Stopplösung

Für die Schnellversion wurden Einzelbestimmungen, für die Standardversion Doppelbestimmungen durchgeführt. In jeder Meßserie wurde eine Standardreihe zur Auswertung mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels polygonaler Interpolation. Als Probenmaterial wurden ausschließlich Citratplasma proben verwendet (1 Teil Citratlösung + 9 Teile Venenblut).

Ergebnisse

Präzision

Die im Test-Kit enthaltene Kontrolle sowie 3 unterschiedliche Plasmapools wurden in einer Serie mehrfach be-

Abb. 1

Tab. 1: Präzision

	intra-assay			inter-assay		
	$\bar{x}$ (µg/l)	S (µg/l)	VK (%)	$\bar{x}$ (µg/l)	S (µg/l)	VK (%)
Kontrolle (n = 18)	10,2	1,3	12,6	10,3	0,9	8,4
Plasmapool I (n = 10)	5,7	0,9	16,0	5,1	1,0	20,4
Plasmapool II (n = 10)	9,7	1,4	15,5	8,1	0,8	9,5
Plasmapool III (n = 10)	20,3	2,5	12,1	25,6	4,4	17,0

$\bar{x}$ = Mittelwert
s = Standardabweichung
VK = Variationskoeffizient

stimmt (Intra-assay-Präzision) sowie in 10 verschiedenen Serien (Inter-assay Präzision). Tabelle 1 zeigt die erhaltenen Präzisionsdaten. Mit einem mittleren Variationskoeffizienten (VK) von ca. 12–15 % zeigt die auf 20 min verkürzte Testversion eine akzeptable Reproduzierbarkeit.

Kritische Serienlänge

Aufgrund der kurzen Inkubationszeit und damit einer nicht abgeschlossenen Bindungsreaktion ist für längere Sicht in der Schnellversion eine systematische Verschiebung der Ergebnisse vorstellbar. Um die kritische Serienlänge zu bestimmen, wurde ein Probenplasma in Abständen von 10 sec mehrfach in einer Serie eingesetzt.

Die Auftragung der Ergebnisse über die Zeit (Abb. 1) zeigt eine gute Konstanz der Ergebnisse bis zu einer Pipettierdauer von 120 sec; bei einem errechneten Mittelwert von 5,33 µg/l TAT wurde ein VK von 4,5 % erhalten. Später pipettierte Proben zeigten erniedrigte Resultate ($\bar{x}$ für 130–210 sec : 4,86 µg/l TAT). Die gesamte Pipettierdauer der Standards und Proben sollte daher 2 min nicht überschreiten. Diese Zeit ist für das Pipettieren von 6–10 Proben gut praktikabel.

Methodenvergleich

100 Patientenproben aus der täglichen Routine wurden parallel in der Standard- und Schnellversion getestet (43

Abb. 2

Proben TAT < 4,1 µg/l; 40 Proben TAT 4,1–10,0 µg/l; 17 Proben > 10,0 µg/l). Der in Abb. 2 gezeigte Vergleich der mit der Standardversion und der Schnellversion erhaltenen TAT-Werte zeigt eine gute Vergleichbarkeit der beiden Methoden; der Regressionskoeffizient beträgt 0,990, die Regressionsgerade weicht nicht signifikant von der $x = y$ -Linie ab.

Zusammenfassung

Wie die vorgelegten Daten zeigen, ist die Durchführung der TAT-Bestimmung mittels einer zeitverkürzten Testversion des Standard-ELISA innerhalb von 20 min bei zufriedenstellender Präzision durchführbar. Die mittels Standard- und Schnellversion erhaltenen Ergebnisse zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Damit ergibt sich die Möglichkeit der Erfassung des Thrombineinbruchs in die Blutbahn mit Hilfe einer Schnell-Methode, so daß die therapeutisch entscheidende Absicherung der Diagnose Verbrauchskoagulopathie nun auch unter den Bedingungen des Notfall-Labors gewährleistet ist.

Schrifttum:

1. PELZER, H., SCHWARZ, A., HEIMBURGER, N.: Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzymelinked immunosorbent assay. *Thromb Haemostasis* 59, 101–106 (1988).
2. SEITZ, R., EGBRING, R., WAGNER, C., DATI, F.: Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT): Ein Marker für intravasale Gerinnungsaktivierung. *Internist* 31, 69–74 (1990).
3. HOEK, J. A., STURK, A., TEN CATE, J. W., LAMPING, R. J., BERENDS, F., BORM, J. J.: Laboratory and clinical evaluation of an assay of thrombin-antithrombin III complex. *Clin. Chem.* 34, 2058–2062 (1988).

Anschrift der Verfasser:

Dr. Carola Wagner
Behringwerke AG, Klinische Prüfung Diagnostica
Postfach 1140, 3550 Marburg

Prof. Dr. Hans-Dietrich Bruhn
Jürgen Liebsch
1. Medizinische Klinik
Schittenhelm-Straße 12, 2300 Kiel