

Präoperatives Screening der Thrombozytenfunktion mit dem In-vitro-Blutungstest

G. Dietrich und V. Kretschmer
Abt. Transfusionsmedizin und Gerinnungsphysiologie, Univ.-Klinikum Marburg

Präoperativ wird häufig nur plasmatische Gerinnung (Quick, PTT) sowie Thrombozytenzahl untersucht, nicht jedoch die Thrombozytenfunktion. Angeborene Plättchenfunktionsstörungen, wie das v. Willebrand-Syndrom oder erworbene, meist medikamenteninduzierte, fallen so erst intra- oder postoperativ durch Blutungskomplikationen auf. Mit dem In-vitro-Blutungstest (IVBT, Thrombostat® 4000, VDG, Seeon) steht uns jetzt ein einfacher Screening-Test zur Verfügung, der spezifisch und sensitiv Störungen der primären Hämostase erfaßt. Wir untersuchten den Einfluß verschiedener plasmatischer und thrombozytärer Gerinnungsstörungen auf die Meßergebnisse.

Material und Methodik: Nach Optimierung der Methode (2) untersuchten wir mit dem IVBT Blutproben von Patienten mit gesicherter plasmatischer oder thrombozytärer Gerinnungsstörung. Wir bestimmten Blutungszeit (BZ) und Blutungsvolumen (BV).

Ergebnisse und Schlußfolgerungen: Keine Abweichungen von den Normalwerten (BV 220 ± 43 µl; BZ 138 ± 66 sec; n = 37) konnten beobachtet werden bei Mangel an Faktor I (152; 155; n = 1), VIII (265; 172; n = 2), IX (194; 102; n = 1 und XII (166; 70; n = 1), bei therapeutischer Heparinisierung (241; 121; n = 7) oder Marcumartherapie (188; 112; n = 37). Alle vier untersuchten Fälle vom v. Willebrand-Syndrom hatten pathologische BV und BZ. Der Effekt einer Einzeldosis von 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) war fünf bis sieben Tage nachweisbar.

Der IVBT erwies sich als einfach durchführbare, sensitive und spezifische Methode, thrombozytäre Funktionsstörungen zu erfassen. Allerdings ist der Einfluß des Hämatokrits auf die Ergebnisse zu beachten (3). Wir empfehlen den IVBT als Screening-Test im Rahmen der Abklärung von Blutungsneigungen, zur Verlaufs- und Therapiekontrolle. Besonders bei der Vorbereitung von Operationen mit vermehrtem Blutungsrisiko führt die zusätzliche Durchführung des IVBT neben der plasmatischen Gerinnungsanalyse zu höherer Sicherheit.

Schrifttum:

1. KRATZER, M. A. A., BORN, G. V. R.: *Haemostasis* 15, 357-362 (1985).
2. DIETRICH, G., WEBER, D., et al.: Poster dieses Kongresses
3. DIETRICH, G., KRETSCHMER, V.: *Infusionsther.* 17, 212-213 (1990).

HLA-Typisierung bei Nierenempfängern und Spendern nach Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)

G. Holzberger¹, S. Seidl¹, B. O. Boehm², B. Peschke², A. Fürsch², F. A. Scheuermann², W. Schoeppe², M. Opp³ und H. W. Doerr³
¹Institut für Immunhämatologie und Blutspendedienst Hessen
²Zentrum der Inneren Medizin der Universität Frankfurt
³Abteilung für Virologie der Universität Frankfurt

Mit der PCR (Polymerase Chain Reaction) und exonspezifischen synthetischen Primern ist es möglich, das die N-terminale Domäne kodierende 2 Exon des HLA-DRB1-Genlocus nach einem Protokoll von Saiki et al. (*Science* 230, 1350-1355, 1985) zu amplifizieren. Ausgangsmaterial ist die aus Gewebe (Lymphknoten, Milz) oder peripherem Blut (Heparin, EDTA) isolierte genomische DNA. Die pro PCR-Ansatz erforderlichen 1-5 µg DNA werden aus 1-5 x 10⁵ mononucleären Zellen isoliert. Die DNA kann in ca. 2 bis 4 Stunden nach Entfernen der Erythrozyten (Ery-Lysis Puffer) und Proteinverdau (Proteinase K und Kernlysispuffer) sowie Proteinfällung (6M gesättigte NaCl-Lösung oder Phenolextraktion) aus dem Überstand mit 96% eiskaltem Ethanol präzipitiert werden. Die thermostabile Traq-Polymerase ermöglicht es,

Routinetests wurden AT III, Heparin und FM (Erythrocytenagglutinationstest nach Largo, Boehringer Mannheim/Diagnostica Stago: FM-Test) bestimmt. Am Tag vor der Operation sowie am 1., 2., 3., 5., 7. und 9. postoperativen Tag wurden von allen Patienten Blutproben entnommen. Die Diagnose der TVT wurde durch mit dem ¹²⁵J-Fibrinogen-Test parallel dazu vorgenommen. Positive Resultate wurden durch Phlebographie am 7. oder 9. postoperativen Tag überprüft. Bei diesen Patienten ohne TVT wurden nur bei 26% positive FM-Test-Resultate erhalten, während bei 34 der 36 (94%) Patienten mit TVT erhöhte FM-Werte nachgewiesen wurden. Bei diesen Patienten wurde der ¹²⁵J-Fibrinogen-Test erst 3 bis 4 Tage später nach dem FM-Test positiv. Die Ergebnisse zeigen, daß der TM-Test einen frühzeitigen Nachweis des präthrombotischen Zustandes mit einer Sensibilität von 94% und einer Sensitivität von 86% ermöglicht. Der prädiktive Wert des FM-Tests für eine TVT an einem Zeitpunkt von 3 bis 4 Tagen vor der Diagnose mit dem ¹²⁵J-Fibrinogen-Test beträgt 67%. Der FM-Test zeigt bei tiefer Venenthrombose 3 bis 4 Tage vor dem ¹²⁵J-Fibrinogen-Test ein positives Ergebnis und korreliert mit der Heparinaktivität im Plasma. Durch frühzeitigen Nachweis von FM kann sich damit die Möglichkeit ergeben, die drohende Lokalisation des thrombogenetischen Prozesses durch angepaßte Heparindosierung abzuwenden.

Methodische Optimierung des In-vitro-Blutungstests

G. Dietrich, D. Weber und V. Kretschmer
Abt. Transfusionsmedizin und Gerinnungsphysiologie, Univ.-Klinikum Marburg

Der In-vitro-Blutungstest (Thrombostat® 4000, VDS, Seeon) simuliert die primäre Hämostase durch Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an der Apertur einer kollagenbeschichteten Zelluloseazetatmembran. Wir untersuchten methodische Einflußgrößen und variierten sie systematisch, um den IVBT für die Routineanwendung zu optimieren.

Material und Methodik: Aus Zitratblut (1:10) von gesunden Personen wurde zunächst der IVBT, wie bereits zuvor beschrieben (2), durchgeführt, Initial Flow (IF), Blutungsvolumen (BV) und Blutungszeit (BZ) ermittelt. Dabei gingen wir von einem Standardtest aus und variierten nur jeweils einen der folgenden Parameter: a) Zeit zwischen Blutentnahme und Meßbeginn; b) verschiedene Filterchargen; c) Durchmesser von Filterapertur und Kapillare; d) Art des Aggregans; e) Konzentration des Aggregans für Lagerungsstabilität der kollagenbeschichteten Filter; g) Temperatur von Filter, Kapillare und Blut; h) Benetzung der Kapillare.

Ergebnisse und Schlußfolgerungen: a) Der IVBT liefert zwischen 30 und 180 Minuten nach Blutentnahme konstante Werte; b) Die Ergebnisse variieren abhängig von der Filtercharge; c) Eine Filterapertur von 120 µm führt zu niedrigerem BV und kürzerer BZ als 150 µm. Das Entgegengesetzte gilt für den Kapillardurchmesser; d) ADP (5 µmol/l) als Aggregans ergibt die geringsten BV und BZ, gefolgt von Ristocetin (1,5 mg/ml), CaCl₂ (2 mmol/l) und NaCl (0,9%); e) BV und BZ korrelieren reziprok zur Konzentration von ADP oder Ristocetin; f) Filter sind über 14 Tage nach Öffnen der Verpackung stabil; g) Das Meßergebnis wird durch Filter- und Bluttemperatur, nicht jedoch die Kapillartemperatur beeinflusst; h) Trockene Kapillaren ergeben geringere und präzisere BV und BZ.

Folgende optimierte Methode leitet sich daraus ab: Inkubation von trockener Kapillare (Ø 200 µm), 40 µl ADP (4 µmol/l) in Filter mit Apertur 150 µm sowie der Blutprobe (1 ml) über 4 Minuten bei 37°C. Messung mit einem Unterdruck von 40 mbar. Zur Erhöhung der Sensitivität kann CaCl₂ 2 mmol/l statt ADP Verwendung finden.

Schrifttum:

1. KRATZER, M. A. A., BORN, G. V. R.: *Haemostasis* 15, 357-362 (1985).
2. DIETRICH, G., KRETSCHMER, V.: *Infusionsther.* 17, 212-213 (1990).

im Mikroprozessor-gesteuerten Thermocycler mit 3 Temperaturzyklen (Denaturierung 30 sec/97°C, Annealing 30 sec/55°C, Polymerisation 1 min/74°C) nach 30 Zyklen 10⁵- bis 10⁶-fach Kopien der 300 Nucleotide umfassenden DNA-Zielsequenz in 2 bis 3 Stunden herzustellen. Die DNA der Amplifikate wird mittels DOT-Blotting auf eine Membran (Nylon, Nitrozellulose) übertragen und durch UV-Crosslink (25 mJoules) fixiert. Anschließend wird durch die in situ Hybridisierung mit 32P-gamma ATP (10 µCi/µl) markierten 14 Oligonucleotidsonden (Eurotransplant Typing Kit) der mit der serologischen HLA-Spezifität assoziierte Strukturpolymorphismus durch Autoradiographie dargestellt.

Wir haben bei 16 Nierenempfängern und Spendern, bei denen die HLA-Typisierung einen Blank ergab oder wegen schlechter Zellqualität nicht sicher war, mittels Oligonucleotidtyping die HLA-Typisierung durchführen können. Durch Weiterentwicklung der PCR-Methode erscheint es zukünftig möglich, die HLA-Typisierung und die Virusdiagnostik zum Nachweis von HIV, CMV, HBV, HCV simultan in einem PCR-Ansatz durchzuführen, wenn die Primersequenzen so ausgewählt werden, daß sie untereinander nicht hybridisieren.

P 25

Physiological Implications of Measurement of Lymphocyte Subsets and Corticosteroid Receptors in Mononuclear Lymphocytes during Aging

E. Orlandini, I. Karbowiak, V. Zampollo, M. Scali, G. Vittadello und F. Callegari
Laboratorio Analisi and Geriatria Ospedale Civile Piove di Sacco, and Istituto Semeiotica Medica University of Padua

Lymphocyte subsets are affected by corticosteroids (increase of T-suppressor and reduction of CD4/CD8 ratio). It was previously reported that in rat plasma corticosterone is elevated and brain corticosteroid receptors are reduced (1). Aim of the study was to measure lymphocyte subsets, corticosteroid Type I (TIR) and Type II (TIIR) receptors in mononuclear leucocytes (M.N.L.), and plasma cortisol in 20 healthy aged people (60-97 y.o) and in 20 normal controls (21-50 y. o). Lymphocyte subsets were measured by cytofluorimetry (Cytoran Ortho) using monoclonal antibodies from Ortho. Plasma cortisol (F) was measured by enzyme-immunoassay. Corticosteroid Type I and Type II receptors were measured by radioreceptorassay as previously described (2-3).

Results are reported as mean ± SD (*p < 0.05; **p < 0.001).

	CD2	CD3	CD4	CD8	CD16	CD4/CD8	F	TIR	TIIR
Aged	85±6	74±8	47±9	30±11	15±10	1.8±0.9	9.8±3.7	194±78*	1829±577**
Contr	85±5	73±9	46±8	30±7	15±5	1.9±0.7	9.3±4.5	270±98	3340±941

A significant inverse correlation was found between age and CD4 and age and CD4/CD8 ratio in all cases together, but not between cortisol and age.

Conclusions: lymphocyte subsets and plasma cortisol concentration are normal during aging. CD4 and CD4/CD8 ratio which are an index of cortisol action are normal too. The isolated Type I and Type II receptors reduction seems to be a determinant of aging, without implication in the regulation of pituitary-adrenal axis.

References:

1. SAPOLSKY, R., et al.: *Endocrinol. Metab. Clinics*. (1987).
2. ARMANINI, D., et al.: *Am. J. Physiol.* (1985).
3. ARMANINI, D., et al.: *J. Endocrinol. Invest.* (1985).

* Umstellung nach Redaktionsschluß

V 13*

Sensitivity and Specificity of the Capture-R Test in the Screening for Red Cell Antibodies of the IgG Class

R. Lynen, C. Bialek und H. Neumeyer
Abteilung Transfusionsmedizin, Klinikum der Universität, Robert-Koch-Straße 40, D-3400 Göttingen, FRG.

Wie have studied the commercial Capture-R test (CR-T) for its sensitivity and specificity in the screening for red cell antibodies of the IgG class in parallel to the common Liss-Coombs-tube centrifugation test (LC-tubeCT) using the same serum samples from transfusion patients. Up to now the following results can be presented: 1. In a prospective study of the sera from pretransfusion patients for red cell IgG-antibodies (2409 patients) the detection rate with the CR-T (27 IgG-antibodies) was termed to be 100%. In comparison the detection rate with the LC-tubeCT (19 IgG-antibodies) was 70%. 2. With the CR-T the rate of non-reproducible, false positive results (22/2409 = 0,91%) was comparable to the rate of these results with the LC-tubeCT (27/2409 = 1,12%). 3. In the titration of 133 different IgG-antibodies, the CR-T was by 2-6 titer steps more sensitive than the common LC-tubeCT. The only exception was an anti-Fy^b antibody, better demonstrable with the LC-tubeCT. 4. Further 24 IgG-antibodies could be identified only using the CR-T, when the LC-tubeCT failed to identify them. We must conclude that the CR-T is significantly more sensitive than the LC-tubeCT, but with approximately the same rate of false positive results. The CR-T is well suited for the multiple screening of the sera from transfusion patients and from blood donors for red cell antibodies of the IgG class. A use for antibody screening during pregnancy and for the diagnostics of IgG-dependent hemolytic conditions (MHN, AIHA) should also be possible with the CR-T. Unfortunately a modification of this test system for individual screening tests and for crossmatches is not available at present.

V 13*

Sensitivity and Specificity of the Gel-Centrifugation Test in the Screening for Red Cell Antibodies of the IgG Class

R. Lynen, Sonja Sadlowski, G. Simson und H. Neumeyer
Abteilung Transfusionsmedizin, Klinikum der Universität, Robert-Koch-Straße 40, D-3400 Göttingen, FRG

The gel-centrifugation test developed by Lapierre for the study of red cell antibodies is commercially available since about 2 years. We have compared this Liss-Coombs-gel-centrifugation test system (LC-gelCT), and the common Liss-Coombs-tube-centrifugation test (LC-tubeCT) regarding their sensitivity and specificity in the determination of red cell IgG antibodies. Up to now the following results can be presented: 1. The detection rate for red cell alloantibodies of the IgG class was definitely superior with the LC-gelCT. In a prospective screening of the sera of 2975 patients we found 31 IgG-antibodies (100%) with the LC-gelCT, whereas with the LC-tubeCT only 24 IgG-antibodies (77%) were found. 2. During this screening period the rate of non-reproducible, false positive results was considerably lower with the LC-gelCT (11/2975 = 0,37%) than with the LC-tubeCT (60/2975 = 2,02%). 3. Only with 3 out of 98 IgG-antibodies the titerscores (doubling master dilutions in AB-serum) were lower with the LC-gelCT whereas the titers were the same as with the LC-tubeCT. The titers of the remaining 95 antibodies were higher (2-6 Titer steps) with the LC-gelCT as compared to the LC-tubeCT. 4. Further 27 IgG-antibodies could be identified only when using the LC-gelCT, after the LC-tubeCT had failed. We can state that the LC-gelCT shows the better sensitivity and at the same time a considerably lower proportion of false positive results, as compared with the LC-tubeCT. From other results one can expect that the LC-gelCT will be superior also in the antibody screening during pregnancies, in the diagnostics of the mhn, and in the diagnostics of auto-immune hemolytic anemias (AIHA).