

DIN/TR 13284



ICS 11.100.30

Einsprüche bis 2024-06-26

Entwurf**Test der Thrombingenerierung;
Text Deutsch und Englisch**

Thrombin generation assay;
Text in German and English

Test de génération de thrombine;
Texte en allemand et anglais

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-04-26 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nagesutech@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 35 Seiten

DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech)

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Symbole und Abkürzungen	5
5 Test der Thrombingenerierung	6
5.1 Allgemeiner Überblick	6
5.2 Physiologische Grundlage	6
5.3 Grundlage des Verfahrens	6
5.4 Präanalytik	8
5.5 Reagenzien und Materialien	11
5.5.1 Substrat	11
5.5.2 Auslösung	11
5.5.3 Kalibrierung	13
5.5.4 Gerät	13
5.5.5 Verfahren	13
5.6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	14
Literaturhinweise	15

Bilder

Bild 1 — Thrombogramm und daraus abgeleitete TGA-Parameter	7
--	---

Tabellen

Tabelle 1 — Empfohlene präanalytische Überlegungen bei TGA entsprechend der Literatur . . .	9
---	---

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 176-08-04 AA „Hämostaseologie“ des DIN-Normenausschusses Gesundheitstechnologien (NAGesuTech) erarbeitet.

Technische Reports sind nicht Bestandteil des Deutschen Normenwerks.

Erfahrungen mit diesem Technischen Report sind erbeten:

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an nagesutech@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech), 10772 Berlin.

Aktuelle Informationen über diese Norm finden sich auf der Website des DIN (www.din.de) unter der entsprechenden Dokumentennummer.

Einleitung

In-vitro-Diagnostika (IVD) auf dem Gebiet der Blutgerinnung sind dazu vorgesehen, Ärzte bei der Beurteilung des hämostatischen Gleichgewichts, der Identifizierung von Patienten mit Risiko für Blutungen oder Thrombose oder der Überwachung einer gerinnungsfördernden oder gerinnungshemmenden Therapie zu unterstützen. In der Regel werden hierfür halbglobale Tests eingesetzt, die die Prothrombinzeit (PT) und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) sowie spezifische Tests auf einzelne entweder gerinnungsfördernde oder gerinnungshemmene Komponenten umfassen. Diese IVD liefern jedoch kein ganzheitliches Bild des Patientenstatus, der aus der Kombination einander entgegenwirkender gerinnungsfördernder und gerinnungshemmender Faktoren resultiert.

Ein idealer globaler Blutgerinnungstest würde das gesamte komplexe Zusammenspiel gerinnungsfördernder und -hemmender Aktivitäten abbilden, auf diese Weise das hämostatische Gleichgewicht einer Person widerspiegeln und mit einer einzigen Messung genauere und klinisch aussagefähigere Informationen liefern als ein Panel spezifischer Tests.

In diesem Technischen Bericht werden Tests der Thrombingenerierung (en: thrombin generation assays, TGA) als ein solcher Test beschrieben, dabei mehrere angebotene Möglichkeiten der korrekten Durchführung eines TGA zusammengefasst und in einem Überblick präanalytische Elemente, Leistung, Interpretation sowie Anwendungen in der physiologischen Forschung, der Pharmazie und der Patientenversorgung betrachtet.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument bietet technische Informationen über Tests der Thrombingenerierung (TGA).

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term/>
- DKE-IEV: verfügbar unter <https://www.dke.de/DKE-IEV>

4 Symbole und Abkürzungen

In diesem Dokument werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

APC	aktiviertes Protein C
AT	Antithrombin
CTI	Trypsin-Inhibitor aus Mais (en: corn trypsin inhibitor)
ETP	endogenes Thrombinpotential
Faktor Va	aktivierter Faktor V
Faktor VIIa	aktivierter Faktor VII
Faktor VIIIa	aktivierter Faktor VIII
Faktor Xa	aktivierter Faktor X
Faktor XIa	aktivierter Faktor XI
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
IVD	In-vitro-Diagnostikum
PPP	plättchenarmes Plasma
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
PT	Prothrombinzeit
RFU	Einheit der relativen Fluoreszenz (en: relative fluorescence unit)
SSC	Scientific and Standardization Committee
TGA	Test der Thrombingenerierung (en: thrombin generation assay)
TF	Gewebefaktor (en: tissue factor)
TFPI	Gewebefaktor-Pathway-Inhibitor (en: tissue factor pathway inhibitor)
QK	Qualitätskontrolle

5 Test der Thrombingenerierung

5.1 Allgemeiner Überblick

Der Test der Thrombingenerierung (TGA), auch als Analyse der Thrombingenerierung bezeichnet, ist ein globaler Blutgerinnungstest, mit dem der Thrombinspiegel im Zeitverlauf bestimmt wird, der sich aus der gleichzeitigen Aktivität Thrombin bildender und Thrombin abbauender Faktoren ergibt. Daher spiegelt ein TGA das Gleichgewicht zwischen gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Effekten wider.

In solchen Tests fungieren kleine Mengen von Gewebefaktor (TF) zusammen mit Phospholipiden und Calcium als Auslöser der Thrombinbildung in Testplasma. Die Thrombingenerierung wird ausgeglichen durch die physiologische Thrombinhemmung, die zunimmt, sobald Spuren Mengen von Thrombin bei der Reaktion entstehen. Das Ergebnis dieser stimulierenden und entgegenwirkenden Aktivitäten wird mithilfe eines thrombin-spezifischen fluorogenen oder chromogenen Substrats kontinuierlich überwacht. Durch die kontinuierliche Erfassung des sich entwickelnden Signals mit einer speziellen Software lässt sich dann die Thrombinbildungskurve, ausgedrückt als Thrombinaktivität über die Zeit im Vergleich zu einem Thrombinstandard, erstellen – das Thrombogramm.

5.2 Physiologische Grundlage

Thrombin ist das zentrale Enzym der sekundären Hämostase und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines normalen hämostatischen Gleichgewichts. Während der Lebensdauer eines sich bildenden Blutgerinnsels übt Thrombin einander entgegengesetzte gerinnungsfördernde und gerinnungshemmende Wirkungen aus. Die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa durch TF/Faktor VIIa führt zur anfänglichen Bildung von Spuren Mengen von Thrombin in der Initiierungsphase der Blutgerinnung in vivo, die durch den Gewebefaktor-Pathway-Inhibitor (TFPI) schnell herunterreguliert wird. Fehlt die unmittelbare Wirkung von Inhibitoren, kommt es in der Koagulationsphase zu einem Schub der Thrombinbildung, während der Thrombin zudem die Polymerisation und Stabilisation von Fibrin einleiten kann, sodass das entstehende Gerinnsel hämostatisch stabil ist. Thrombin trägt außerdem zur Aktivierung von Faktor V, Faktor VIII, Faktor IX und Thrombozyten bei. Antithrombin, einer der wichtigsten Regulatoren der Blutgerinnung, dringt nicht selbst in das Gerinnsel ein, sondern bildet Komplexe mit aktivierten Gerinnungsfaktoren, die ins Plasma austreten, und neutralisiert sie, während sie andernfalls tödlich wirken würden. Ein Teil des Thrombins bindet jedoch an Thrombomodulin im Endothel von Blutgefäßen, ein Rezeptor, der in der Membran von Endothelzellen verankert ist. Während die gerinnungsfördernde Wirkung von Thrombin aufgehoben wird, erhöht sich seine Affinität für das am Gefäßendothel gebundene Protein C um das mehr als 1 000-Fache. Dies führt dazu, dass aktiviertes Protein C von seinem Rezeptor freigesetzt wird, und dann in das sich bildende Gerinnsel eindringt. Zusammen mit seinem Kofaktor Protein S spaltet Protein C den Faktor Va und den Faktor VIIa und inaktiviert sie, wodurch die Thrombinbildung herunterreguliert wird. Aufgrund ihrer zentralen Stellung gilt die Thrombinbildung als einer der wichtigsten Schritte der Gerinnung [1].

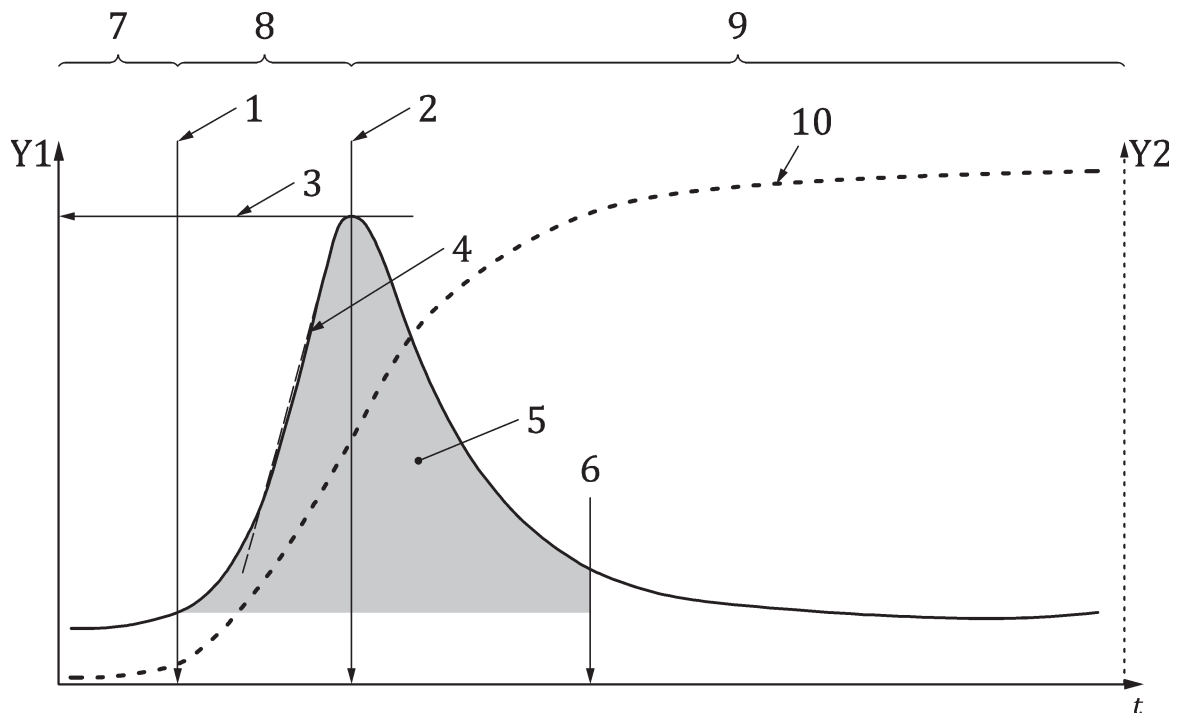
Bei allen Arten von klinisch relevanten Defekten der Gerinnungsfaktoren und bei der Behandlung mit Antikoagulantien ist die Thrombinbildung vermindert. Bei angeborener und erworbener Thrombophilie hingegen ist die Thrombinbildung erhöht [2]. Darüber hinaus wurden TGA als Instrument zur Bewertung der thrombogenen Aktivität von intravenös verabreichten Therapeutika wie Immunglobulinkonzentraten vorgeschlagen [3].

Im Vergleich zu routinemäßig verwendeten Gerinnungstests sind bei TGA die Beiträge von gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Elementen erkennbar, einschließlich der Dualität des Thrombins selbst. TGA-Ergebnisse können daher ein Hinweis auf ein erhöhtes Thrombose- oder Blutungsrisiko sein. Die derzeit angewandten Routine-Screening-Tests unterteilen jedoch die Gerinnung künstlich in getrennte Kompartimente einer theoretischen Gerinnungskaskade, weshalb sich die Interdependenzen der jeweils beteiligten Moleküle und Enzyme nicht vollständig bewerten lassen, während bei TGA die Menge des gebildeten Thrombins gemessen wird.

5.3 Grundlage des Verfahrens

Bei TGA wird die Bildung von Thrombin durch kleine Mengen von TF in Anwesenheit von Phospholipiden und Calcium ausgelöst. Das entstandene Thrombin spaltet ein synthetisches Proteolysesubstrat, wodurch ein

Fluorophor oder ein Chromophor freigesetzt wird. Deren optisches Signal, das proportional zu der Menge des gebildeten Thrombins ist, wird kontinuierlich gemessen. Die Reaktionskinetik (10 in Bild 1) umfasst drei Phasen: Initiierung, Amplifikation/Propagation und Fibrinolyse.



Legende

- t Zeit (min)
- Y1 Thrombin (nM)
- Y2 optisches Signal
- 1 Verzögerungszeit (en: lag time)
- 2 Zeit bis zum Peak (en: time to peak)
- 3 Peakhöhe (en: peak height)
- 4 Geschwindigkeitsindex (en: velocity index)
- 5 Fläche unter der Kurve (ETP) (en: area under the curve)
- 6 Start Nachlaufzeit (en: start tail)
- 7 Initiierungsphase (en: initiation phase)
- 8 Amplifikations-/Propagationsphase (en: amplification/propagation phase)
- 9 Auflösungsphase (en: resolution phase)
- 10 Reaktionskinetik

Bild 1 — Thrombogramm und daraus abgeleitete TGA-Parameter

Die Thrombinbildungskurve besteht aus drei verschiedenen Phasen:

- Als Erstes ermöglicht der Auslöser die Reaktionen, die die physiologische Initiierungsphase der Blutgerinnung widerspiegeln (7 in Bild 1). Die für den Ablauf dieser Phase der TGA erforderliche Zeit entspricht in etwa der Zeit bis zur anfänglichen Fibrinbildung, oder der Gerinnungszeit, bei Routinetests wie PT oder aPTT, für die nur Spuren von Thrombin nötig sind (d. h. $\approx 5\%$ des insgesamt gebildeten Thrombins) und mit denen, ihrer Konzeption entsprechend, keine Ereignisse gemessen oder erkannt werden können, die über die anfängliche Gerinnungsbildung hinausgehen [4].
- Als Zweites erfolgt die Amplifikations-/Propagationsphase (8 in Bild 1), in der die Umwandlung von Prothrombin schneller erfolgt als die Inhibition von Thrombin.

- Als Drittes schließt sich die Fibrinolyse an (9 in Bild 1), in der die Prothrombinumwandlung durch die intensivere Aktivität verschiedener in der Plasmaprobe vorhandener Inhibitoren wie aktiviertes Protein C (aPC), Antithrombin (AT) und Alpha2-Makroglobulin übertroffen wird [5].

Anhand dieses anfänglichen optischen (fluoreszierenden oder chromogenen) Signals, ausgedrückt in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) oder optischer Dichte (OD) über die Zeit, wird die erste Ableitung berechnet, um eine Kurve der anfänglichen Thrombinbildung in RFU/min bzw. OD/min über die Zeit zu erstellen. Das optische Signal kann dann mithilfe einer Kalibrierungskurve weiter auf eine Thrombinmenge zurückgeführt werden, die, aufgetragen in nM über die Zeit, das Thrombogramm ergibt.

Um die Interpretation von TGA nicht auf die Interpretation der Kurven zu beschränken, wurden mehrere Parameter festgelegt, die auf die drei Phasen der Thrombinbildung und Thrombinfunktion zurückgehen und sich zur Darstellung der Ergebnisse von TGA als nützlich erwiesen haben (siehe Bild 1).

Parameter, die anhand der Thrombinbildungskurve analysiert werden können:

- Verzögerungszeit: ausgedrückt in Minuten, beschreibt die Zeit vom Start der Reaktion bis zum Beginn der Thrombinbildung. Sie entspricht dem Zeitpunkt, zu dem in Standard-Gerinnungstests das Fibringerinnsel entsteht (= Gerinnungszeit). Bei einigen Assays kann sie als Thrombin-Anfangszeit definiert werden, die den Zeitpunkt angibt, an dem freies Thrombin nachweisbar ist.
- Zeit bis zum Peak: wird in Minuten ausgedrückt und entspricht der Zeit bis zur Bildung der maximalen Thrombinmenge.
- Start-Nachlaufzeit: wird in Minuten ausgedrückt und entspricht dem Zeitpunkt, an dem die Thrombinbildung abgeschlossen ist und das gesamte gebildete Thrombin gehemmt wurde.
- Peakhöhe: oder Peak-Thrombin, entspricht der maximalen Thrombinbildung. Wenn sie kalibriert ist, wird sie als molare Konzentration von Thrombin ausgedrückt.
- Geschwindigkeitsindex: gibt die Steigung der Thrombinbildung zwischen der Verzögerungszeit und der Zeit bis zum Peak an und entspricht der ersten Ableitung dieses Teils der Kurve.

Das endogene Thrombinpotential (ETP) entspricht der Fläche unter der Kurve.

5.4 Präanalytik

Wie bei anderen Spezialtests im Bereich der Gerinnung ist es für zuverlässige TGA-Ergebnisse entscheidend, die präanalytischen Variablen zu berücksichtigen. Eine umfassende Studie, in der verschiedene Blutentnahmeverfahren bewertet wurden und die zu Empfehlungen zur Präanalytik für TGA führte, veröffentlichten Loeffen et al. im Jahr 2012 [6], gefolgt von einer Mitteilung des Wissenschafts- und Standardisierungsausschusses (SSC) der International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) im Jahr 2017 [7], die 2021 aktualisiert wurde [8].

Tabelle 1 fasst diese Empfehlungen zusammen.

Tabelle 1 — Empfohlene präanalytische Überlegungen bei TGA entsprechend der Literatur

Präanalytische Variablen	Empfehlungen für Thrombinbildungstests nach Loeffen et al. [6]	Vom SSC der ISTH im Jahr 2021 vorgeschlagene präanalytische Bedingungen für Thrombinbildungstests bei Hämophilie [8]
Blutentnahmesystem	— Empfohlen: konventionelle gerade Nadel. — Alternativ: Flügelkanülen oder intravenöse Katheter werden nur dann als zuverlässige Alternative akzeptiert, wenn eine ordnungsgemäße Phlebotomietechnik angewandt wird und die Proben sorgfältig auf Hämolyse überprüft werden.	— Nach Möglichkeit Verwendung einer geraden Nadel. — Entnahme des Bluts direkt in das Blutentnahmeröhrchen. — Von der Blutentnahme über einen Katheter wird abgeraten; wenn jedoch Blut aus einem Katheter entnommen wird, der Heparin zur Verhinderung der Gerinnung enthält, wird empfohlen, den Katheter vor der Blutentnahme zu spülen und die ersten 5 ml zu verwerfen, um das mögliche Vorhandensein von Heparin zu vermeiden. — Blutentnahme ohne oder unter Verwendung nur einer leichten Aderpresse.
Blutentnahmeröhrchen	— Empfohlen: Zugabe von Mais-Trypsin-Inhibitor (CTI) in das Entnahmeröhrchen, um Kontaktaktivierung zu verhindern. — Alternativ: Ohne Zugabe von CTI löst die Monovette®^a die wenigste Kontaktaktivierung aus.	— Verwendung eines Kunststoff-Blutröhrchens, das Natriumcitrat (0,109 M) enthält. — Bei Verwendung von CTI diesen vor der Blutentnahme in das Blutröhrchen geben und die CTI-Konzentration unter 1,6 µM halten.
Verwerfungs-röhrchen	— Für die Messung der Thrombinbildung sind Verwerfungs-röhrchen erforderlich.	— Die ersten Milliliter des Bluts werden verworfen.
Transport der Blutproben ins Laboratorium	— Keine speziellen Empfehlungen.	— Keine speziellen Empfehlungen.
Verarbeitung von Vollblutproben	— Die direkte Plasmapräparation ist einer 6-stündigen Lagerung von Vollblut vorzuziehen.	— Die Zentrifugation sollte innerhalb von 1 h bei Raumtemperatur erfolgen.

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Präanalytische Variablen	Empfehlungen für Thrombinbildungstests nach Loeffen et al. [6]	Vom SSC der ISTH im Jahr 2021 vorgeschlagene präanalytische Bedingungen für Thrombinbildungstests bei Hämophilie [8]
Zentrifugation	— Eine doppelte Zentrifugation ist vorzuziehen: 2 000 g, 5 min, gefolgt von 10 000 g, 10 min.	— Doppelte Zentrifugation oder eine einzige längere Zentrifugation bei hoher Geschwindigkeit (z. B. Zentrifugation in zwei Schritten für 10 min bei $\geq 2\,500\text{ g}$).
Verarbeitung des Plasmas	— Empfohlen: sofortige Analyse nach dem Auftauen des Plasmas. — Alternative: Aufbewahren des Plasmas bei Raumtemperatur.	— Plättchenarmes Plasma (PPP) sollte innerhalb von 4 h oder bei Zugabe von CTI innerhalb von 6 h verwendet werden. — Bei verzögertem TGA das Plasma in flüssigem Stickstoff schnellgefrieren. Wenn Flüssigstickstoff nicht verfügbar ist, kann Trockeneis verwendet werden, oder das Plasma kann direkt bei -80 °C eingefroren werden. — Plasma kann bei -80 °C höchstens 2 Jahre und bei -20 °C höchstens einen Monat lang gelagert werden. Es wird nicht empfohlen, Plasma bei 4 °C zu lagern, da es zu Kälteaktivierung kommen kann. — Gefrorene Proben sollten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut werden. — Die bevorzugte Auftauzeit beträgt 2 min bis höchstens 5 min für eine 1-ml-Probe und muss je nach Probenvolumen erhöht werden, bis kein gefrorenes Plasma mehr sichtbar ist. Proben sollten vor dem Test vollständig aufgetaut sein, um die Ausfällung von Protein zu vermeiden. — Nach dem Auftauen und vor dem Test die Proben vorsichtig mischen und dann bei Raumtemperatur höchsten 4 h aufbewahren.
^a Monovette ist eine Marke von Sarstedt. Diese Informationen dienen der Orientierung des Benutzers dieses Dokuments und stellen keine Empfehlung des DIN für das genannte Produkt dar.		

Kontaktaktivierung kann die TGA-Ergebnisse beeinträchtigen, insbesondere wenn niedrige Gewebefaktor-Konzentrationen (unter $0,5\text{ }\mu\text{M}$) verwendet werden. Um die Kontaktaktivierung, die die TGA-Ergebnisse beeinflussen könnte, zu minimieren, kann ein Inhibitor der Kontaktaktivierung wie Mais-Trypsin-Inhibitor (CTI) verwendet werden, insbesondere wenn niedrige TF-Konzentrationen verwendet werden [5], es sei denn, die Kontaktaktivierung ist – zumindest teilweise – von mechanistischem Interesse. Aufgrund verschiedener Einschränkungen ist die Verwendung von CTI jedoch umstritten:

- a) Citrat – CTI-Röhrchen für den klinischen Gebrauch sind im Handel nicht allgemein erhältlich, so dass die Laboratorien die Röhrchen manuell vorbereiten müssen, was ein potenzielles Fehlerrisiko birgt;

- b) diese Vorbereitung erfordert ein Unterbrechen des Vakuums, was zu einem Fehler beim Blutvolumen führen kann, der sich auf das Verhältnis von Blut zu Antikoagulanzen und damit auf die TGA-Ergebnisse auswirkt;
- c) da CTI recht teuer ist, kann seine Verwendung die Wirtschaftlichkeit von TGA beeinträchtigen;
- d) die Verwendung eines speziellen Röhrchens für einen bestimmten Test kann eine Fehlerquelle für den Test und generell für andere Tests im selben Labor sein.

Bei der Entscheidung für die Verwendung von CTI sollten die oben erwähnten Einschränkungen gegen die analytischen Vorteile abgewogen werden.

Da ein spezielles Verfahren der Blutentnahme für TGA nicht existiert bzw. in einer Routineeinrichtung nicht durchführbar ist, kann ein standardisiertes Verfahren wie CLSI H21-A5 [9] angewendet werden, um die durch zusätzliche präanalytische Schritte verursachte Variabilität zu minimieren. Da diese Leitlinie auch andere Gerinnungsparameter wie den Lupus-Antikoagulanzen-Test abdeckt, wird in [10] empfohlen, die lokal etablierte Probenentnahmemethode auch für TGA anzuwenden, um zusätzliche präanalytische Fehler zu reduzieren.

5.5 Reagenzien und Materialien

5.5.1 Substrat

Die kontinuierliche Messung der Thrombinbildung unter Verwendung eines chromogenen Substrats, Methylmalonyl-methylanyl-arginyl-pNA, wurde erstmals 1993 von Hemker et al. beschrieben [11]. Das Thrombin-spezifische fluorogene Substrat Carboxybenzyl-glycyl-glycyl-arginyl-7-aminomethyl-4-cumarin wurde dann 2003 in dem fluoreszenzbasierten Test „Calibrated Automated Thrombogram“ verwendet [12]. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde dieser Test weiter verbessert, sodass inzwischen kommerzielle automatisierte Thrombingenerierungstests verfügbar sind.

Bei den kommerziell erhältlichen fluorogenen TGA-Tests wird das Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC (ZGGR-AMC) verwendet. Das Molekül AMC (7-Amino-4-methylcumarin) ist ein Fluorophor, der ein Signal erzeugt, wenn er unter Emission von Fluoreszenz (390 nm Anregung/460 nm Emission) freigesetzt wird.

Das Substrat selbst wird immer den Gerinnungsprozess stören. Substratbindung und Substratverbrauch finden im Test gleichzeitig statt, und das resultierende Signal muss die tatsächliche Thrombinbildung widerspiegeln. Die Wahl des geeigneten Substrats ist entscheidend. Eine starke Substratbindung oder ein schneller Substratumsatz würden nicht genügend freies Thrombin für ein normales Funktionieren der Gerinnungsmechanismen übriglassen und werden in der Literatur nicht empfohlen [11,13]. Auch die funktionelle Auswirkung von Thrombininhibitoren, wie z. B. Alpha-2-Makroglobulin, das bei speziellen Patientengruppen, Neugeborenen und Kindern, vermehrt vorkommt, konnte in den TGA-Ergebnissen nicht widerspiegelt werden. Dies ist möglicherweise auf das mathematische Auswertungsmodell zurückzuführen, das bei diesen speziellen Patienten nicht genau genug sein könnte [14]. Es hat sich gezeigt, dass andere Parameter, wie z. B. der Thrombin-Spitzenwert, weniger stark beeinflusst werden [15]. Diese Einschränkung kann jedoch je nach verwendetem System überwunden werden [16]. Darüber hinaus erfordern auf Fluorogenen basierende Assays eine deutlich andere mathematische Behandlung des inneren Filtereffekts (d. h. der Fluoreszenzlöschung). Dies erlaubt eine analytische Darstellung, die sowohl den inneren Filtereffekt als auch den Substratverbrauch berücksichtigt. Schließlich haben Substrate unterschiedliche Nachweisgrenzen, da sie mit unterschiedlicher Geschwindigkeit vom fluorogenen Peptid abgespalten werden, obwohl der Hauptfaktor für die Geschwindigkeit der Thrombinbildung die Konzentration des Gewebefaktors im Auslöser ist [17]. TGA mit fluorogenen Substraten werden Methoden auf der Basis chromogener Substrate gegenüber bevorzugt, insbesondere wenn sie in Kombination mit schwachen Aktivatoren verwendet werden, die typischerweise für die Untersuchung von Hämophilie- und Thrombophilieproben eingesetzt werden [13].

5.5.2 Auslösung

Reagenzien auf TF-Basis mit oder ohne Phospholipide werden am häufigsten verwendet, um die Thrombinbildung auszulösen, aber auch Auslöser des intrinsischen Wegs wie Celite können eingesetzt werden [18]. Die