

**Entwicklung eines Biosensor-Systems  
für ein Patienten-Selbstmanagement der Behandlung  
mit Vitamin K - Antagonisten**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

**Charles Bernard Thürlemann**

aus Waldkirch (SG)

Bern, 2005

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
auf Antrag von

Prof. Dr. phil. nat. André Haeberli als Dissertationsleiter

Prof. Dr. phil. nat. Hans Leuenberger als Fakultätsverantwortlicher

Prof. Dr. med. German A. Marbet als Korreferent

Basel, den 5. Juli 2005

Prof. Dr. Hans-Jakob Wirz, Dekan





*Meinen Eltern in Dankbarkeit*

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation, eingereicht an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, entstand in Bern im Thromboselabor des Departements Klinische Forschung DKF, Universitätsspital (Inselspital), unter der Leitung von Prof. Dr. André Haeberli, Co-Direktor DKF. Ihm möchte ich meinen ersten Dank aussprechen. Er hat sich viel Zeit für anregende Diskussionen und Projektbesprechungen freigehalten; aber auch für spontane Anliegen stand sein Büro stets offen. Ich danke ihm für seinen Rat und Beistand sowie für das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte.

Ich danke Prof. Dr. Hans Leuenberger, Vorsteher des Instituts für Pharmazeutische Technologie, Pharmazentrum, Universität Basel, mir als Fakultätsverantwortlicher Zugang zum Doktoratsstudium in Basel gegeben zu haben und mich in dieser Funktion gegenüber der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel vertreten zu haben.

Auch Prof. Dr. German A. Marbet, Leiter des Hämostaselabors des Kantonsspitals Basel, sei an dieser Stelle gedankt, bereitwillig das Korreferat für die vorliegende Arbeit übernommen zu haben.

Die Dissertation wurde im Rahmen eines gemeinsamen Projektes der Firma Asulab SA, dem zentralen Entwicklungs- und Forschungslabor der Swatch-Group<sup>Ltd</sup>, Marin NE, und dem Thromboselabor der Universität Bern durchgeführt. Dr. Erik J. Frenkel, dem Leiter des Projektes bei Asulab, bin ich zu speziellem Dank verpflichtet. Mit ihm stand ich fortwährend in Kontakt und führte auch manchen Versuch in seinem Labor durch. Nebst konkret Projekt bezogenen Inhalten war ihm ein Anliegen, mir auch allgemein die 'Philosophie' eines privatwirtschaftlich orientierten Betriebes näher zu bringen.

Die aktive Teilnahme von Dr. Rudolf Dinger, Direktor von Asulab, an jeder unserer zahlreichen Sitzungen (Asulab – Universität) hat mir gezeigt, wie ernst das Projekt und insbesondere meine Arbeit seitens Industrie genommen werden. Ich danke auch ihm, mir die Gelegenheit gegeben zu haben, für ein spannendes, praxisorientiertes Projekt einen wesentlichen Beitrag zu leisten.

Danken möchte ich hiermit auch Nathalie Terés und Lise Goniard für die freundliche Aufnahme im Labor bei Asulab, aber auch dafür, mich bei Bedarf mit Teststreifen versorgt zu haben; ich danke auch den vielen anderen Mitarbeitern bei Asulab, die mir bei meinen 'Besuchen' immer das Gefühl gegeben haben, auch dazu zu gehören.

Dr. Christoph Caliezi, Angiologe im Lindenhofspital Bern, danke ich für die Bereitschaft, das Projekt als `ärztlicher Betreuer` zu begleiten, insbesondere für seinen Beistand bei den klinischen Studien.

PD Dr. Walter Wuillemin, Stiftungsratspräsident der Stiftung `Coagulation Care`, danke ich für die Mithilfe bei der Rekrutierung von Studienteilnehmern

Dank gebührt ebenfalls:

- der Förderagentur für Innovation (KTI), welche meine Arbeit im Rahmen eines MedTech-Projekt finanziell unterstützte

- der Firma Asulab für die finanziellen Beiträge an Labormaterial und Kongressteilnahmen sowie für die Übernahme diverser Spesen

- der Hämostase-Gruppe des Hämatologischen Zentrallabors des Inselspitals für das Zuverfügungstellen von Plasmaproben und für so manche spontane Referenzmessung

- den vielen freiwilligen Patienten und Probanden für ihre Teilnahme an einer der klinischen Studien

- Dr. Anita Moresi. Sie hat mit ihrer, der meinigen zeitlich vorgelagerten Dissertation die eigentliche Basis für das Projekt geschaffen. Ich hoffe, ich konnte ihr `Vermächtnis` gut anlegen.

- dem Team des Thromboselabors, namentlich Trinh Cung-Pham, Manfred Heller, Evelyn Schlappritzi, Verena Schröder, Daniel Stalder, Monika Stutz, Coretta van Leer, Jakob Zbären. Dass ich mich in ihrem Umfeld wohl gefühlt habe, war ein wesentlicher Beitrag zur Freude an meiner Arbeit.

Schliesslich möchte ich meiner Familie und meinem Freundeskreis für deren Interesse, Verständnis und vielfältigen Beistand meinen herzlichen Dank aussprechen, insbesondere meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und ohne deren Unterstützung ich heute diese Arbeit nicht würde vorlegen können.

Charles Thürlemann

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abkürzungen	X
Ziel der Arbeit	1
Vorwort	2
<b><u>Kapitel I: Theoretischer Hintergrund</u></b>	<b>3</b>
<b>1. Biosensoren</b>	<b>3</b>
1.1. Allgemeines zu Biosensoren	3
1.1.1. Definition	3
1.1.2. Messprinzip	3
1.1.3. Anwendungen	4
1.1.4. Anforderungen und Defizite	5
1.1.5. Zukunft / Trends	6
1.2. Elektrochemische Biosensoren	7
1.2.1. Definition	7
1.2.2. Arten und Anwendungen	7
1.2.3. Amperometrisches Messprinzip	10
<b>2. Hämostase</b>	<b>13</b>
2.1. Überblick	13
2.2. Thrombozytenaggregation (Primäre Hämostase)	14
2.3. Plasmatische Gerinnung (Sekundäre Hämostase)	15
2.3.1. Kaskadentheorie	16
2.3.2. Revidierte Theorie der Blutgerinnung	17
2.3.3. Regulation der plasmatischen Gerinnung	19
2.4. Fibrinolyse	20
2.5. Tissue Factor	21
2.6. Thrombin	22
2.7. Enzymkinetik	23
2.7.1. Enzymkinetik allgemein	23
2.7.2. Serin Proteasen	23
2.7.3. Gerinnungskomplexe	24
2.8. Vitamin K	25

<b>3. Medikamentöse Antikoagulation</b>	<b>27</b>
3.1. Antithrombotika	27
3.2. Orale Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten	28
3.2.1. Indikation	28
3.2.2. Vitamin K-Antagonisten	29
3.2.3. Überwachung der Behandlung	30
<b>4. Monitoring der Medikation mit Vitamin K-Antagonisten</b>	<b>32</b>
4.1. Thromboplastinzeit	32
4.1.1. Geschichte	32
4.1.2. Klinische Bedeutung	32
4.1.3. Testbedingungen	33
4.1.4. Thromboplastinreagens	33
4.1.5. Messprinzipien	34
4.1.6. Masseinheiten für den Quick-Test	36
4.2. Die Masseinheit `INR`	37
4.2.1. Definition der INR	37
4.2.2. International Sensitivity Index (ISI)	38
4.2.3. Therapeutischer Bereich, Zielwert	40
4.2.4. Bleibende Probleme bei der Standardisierung der Thromboplastinzeit mittels INR	42
4.3. Selbstmessung der Thromboplastinzeit	46
4.3.1. Geschichte	46
4.3.2. Voraussetzung	47
4.3.3. Studien	48
4.3.4. Kalibrierung von Point-of-Care-Methoden	50
4.3.5. Validierung von Point-of-Care-Geräten	51
4.3.6. Qualitätskontrolle	52
4.3.7. Existierende Messsysteme	54
<b>5. Biosensor-System zur INR-Bestimmung mittels Amperometrie</b>	<b>55</b>
<b><u>Kapitel II: Entwicklung des Biosensor-Systems</u></b>	<b>60</b>
<b>1. Selektion verschiedener Reaktionsgemische</b>	<b>60</b>
1.1. Einleitung	60
1.2. Versuch einer reinen Kontaktaktivierung	61
1.3. Prüfung verschiedener Thromboplastinreagenzien	66
<b>2. Standardisierung des Herstellungsverfahrens</b>	<b>80</b>
2.1. Einleitung	80
2.2. Standardisierung der Herstellung des Reaktionsgemisches	80
2.3. Einfluss des Trocknungsvorganges	82
2.4. Standardherstellung der Teststreifen	89

<b>3. Einfluss von Umgebungsbedingungen auf die Messung</b>	<b>90</b>
3.1. Einleitung	90
3.2. Einfluss der Messtemperatur	90
3.3. Einfluss der Luftfeuchtigkeit	93
<b>4. Kalibrierung des Biosensor-Systems; Ableitung der Einheit `INR`</b>	<b>98</b>
4.1. Einleitung	98
4.1.1. Ziel	98
4.1.2. Problematik	98
4.2. Zusammenhang zwischen Messzeit, Messtemperatur und INR-Wert	99
4.3. Kalibrierung neuer Teststreifenchargen	110
4.4. Algorithmus zur Bestimmung des INR-Wertes von Plasmaproben	113
4.5. Messungen mit Vollblut	116
4.5.1. Einfluss des Hämatokritwertes	116
4.5.2. Zusammenhang von Plasma und Kapillarblut	119
4.5.3. Algorithmus zur Bestimmung des INR-Wertes von Kapillarblut	123
4.6. Richtigkeit der Methode	125
<b>5. Evaluation erster Biosensor-Prototypen</b>	<b>133</b>
<b>6. Anwendung durch das Zielpublikum</b>	
– eine klinische Studie zur Validierung des Biosensor-Systems	<b>142</b>
<b><u>Kapitel III: Diskussion und Schlussbemerkung</u></b>	<b>164</b>
1. Diskussion der Entwicklungsarbeiten	164
2. Diskussion des entwickelten Systems	167
3. Schlussbemerkung	169
Referenzen	170
Curriculum vitae	180

## Zusammenfassung

Zur Prävention thromboembolischer Ereignisse stehen heute weltweit rund sechs Millionen Personen unter langzeitiger, oft lebenslanger Medikation mit so genannten oralen Antikoagulanzen, Arzneimittel aus der Wirkstoffgruppe der `Vitamin K – Antagonisten`. Pharmakokinetische Umstände machen eine regelmässige Überwachung dieser Behandlung notwendig. Die Kontrolle basiert auf der Bestimmung der `Thromboplastinzeit`, umgangssprachlich als `Quick-Test` bezeichnet. Gegenstand der vorliegenden Arbeit - Bestandteil eines gemeinsamen Projektes von Universität und Industrie- war die Entwicklung eines neuartigen, auf einem elektrochemischen Messverfahren basierenden Biosensor-Systems, mit welchem sich die Medikation mit oralen Antikoagulanzen durch den Patienten selbständig überwachen liesse. Die Entwicklung basierte auf einem Verfahren, in welchem die plasmatische Gerinnung auf spezifischen Teststreifen `in-vitro` aktiviert, und die Bildung des zentralen Gerinnungsenzyms `Thrombin` chronoamperometrisch erfasst wird, d.h. mittels Aufzeichnung der Intensität eines von der gebildeten Thrombinmenge abhängigen Stromflusses in der Zeit. Das Reaktionsgemisch besteht im wesentlichen aus einem Thromboplastinreagenz zur Gerinnungsaktivierung und einem amperogenen Substrat für Thrombin.

In einem ersten Teil wurden mit verschiedenen Thromboplastinreagenzien zahlreiche Reaktionsgemische hergestellt und auf ihre Eignung getestet. Mehrere `Teststreifenrezepturen` kamen zur Weiterverwendung in Frage. Man wählte jene Formulierung aus, die die Anforderungen des zu entwickelnden Testverfahrens am besten zu erfüllen schien. Bei Optimierungsversuchen konnte dem Trocknungsvorgang ein wesentlicher Einfluss auf das aufgezeichnete Signal zugeschrieben werden und aus diesen Erkenntnissen eine Standardherstellungsprozedur für Teststreifen definiert werden.

Eine Testserie konzentrierte sich auf die Einflüsse während des Messvorganges. Das Zielpublikum sollte das System bei verschiedenen Umgebungsbedingungen nutzen können. Im Unterschied zu den herkömmlichen Methoden der `Quick-Wert-Bestimmung` würde die Reaktion im Biosensor-System nämlich nicht thermostatisiert ablaufen. Die chronoamperometrischen Kurvenverläufe während der Messungen erwiesen sich in nicht zu vernachlässigendem Ausmass von der Umgebungstemperatur und der Luftfeuchtigkeit abhängig. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit

mit Verdunstungsreaktionen zusammenhängt und zu einem wesentlichen Teil den grossen Temperatureffekt erklärt. Eine Adaptation der Streifenarchitektur durch 'Überdachung' des Reaktionsfeldes, mit Konsequenzen für die Blutropfenzuführung (von nun an seitlicher Bluteinzug), konnte dieses Problem signifikant mindern.

Als nächstes wurde nach einem Verfahren gesucht, die aus verschiedenen Blutproben resultierenden chronoamperometrischen Messkurven mit dem jeweiligen INR-Wert (International Normalized Ratio – Einheit, welche die Intensität der oralen Antikoagulation beschreibt) in Verbindung zu setzen. Dies wurde durch die Tatsache erschwert, dass der Kurvenverlauf nicht nur von der Intensität der Antikoagulation, sondern eben auch durch die Umgebungstemperatur beeinflusst wurde. Mit zu diesem Zweck bei verschiedenen Temperaturen in einem 'Klimaschrank' durchgeführten Messungen von INR-Kalibrationslösungen wurde eine Tabelle erstellt, die den Zusammenhang zwischen Messtemperatur, Messzeit und INR-Wert aufzeigen konnte. Eine Analyse dieser Tabelle liess Gesetzmässigkeiten zwischen INR-Werten, Messtemperaturen und Messzeiten erkennen, woraus schliesslich ein Algorithmus abgeleitet werden konnte, dessen Grundgerüst sich auf Messungen einer definierten Standardstreifencharge bei 22.5°C bezieht, und worauf sich Messungen, die bei anderen Temperaturen durchgeführt wurden, korrigieren lassen.

Ferner wurde eine Methode definiert, mit welcher sich Teststreifenchargen auf einfache Weise mittels Kalibrationslösungen über eine Eichgerade kalibrieren liessen; eine Methode, die ohne das herkömmliche komplexe Verfahren gemäss Weltgesundheitsorganisation (WHO) auskommt. Der Algorithmus wurde durch einen entsprechenden 'Chargenkalibrationsfaktor' erweitert, der den INR-Wert hinsichtlich Chargenvariabilität korrigiert. Der Vergleich von mittels Algorithmus abgeleiteten INR-Werten mit denjenigen, welche nach herkömmlicher Methode berechnet wurden, zeigte, dass das gewählte Kalibrationsverfahren grundsätzlich tauglich ist.

Mittels einer klinischen Testreihe mit 38 oral antikoagulierten Patienten und 12 nicht antikoagulierten Probanden, in welcher Plasma- und Kapillarblutproben gemessen wurden, konnte eine Korrelation von Vollblut und Plasma –zu Beginn der Arbeiten postuliert– nachgewiesen und entsprechend im Algorithmus integriert werden. Die Entwicklungsschritte basierten bis zu diesem Zeitpunkt auf Messungen mit Plasma und wurden mittels eines Labor-Potentiostaten durchgeführt. Dieselbe klinische Testreihe diente der generellen Überprüfung

von Messverfahren, von Standardherstellungsprozedur der Teststreifen und von mathematischer Ableitung des Resultates. Aufgrund des positiven Ergebnisses konnten erste Biosensor-Prototypen entsprechend gefertigt und anschliessend in einer Fortsetzung der klinischen Testreihe mit weiteren 42 Patienten und 5 Probanden validiert werden. Die Resultate entsprachen in etwa denjenigen des ersten Teils der Testreihe. Es konnte bestätigt werden, dass die Biosensor-Prototypen gemäss den Anforderungen zusammengestellt und programmiert worden waren.

Als letztes wurde eine Feldstudie durchgeführt, in welcher 33 Patienten in Eigenanwendung zu Hause insgesamt 347 Vergleichsmessungen mittels Biosensor-Prototypen und einem Referenzsystem (CoaguChek<sup>®</sup>S, Roche Diagnostics) durchführten. Bei den Studienteilnehmern handelte es sich um langfristig oral antikoagulierte Patienten, die Erfahrung im Selbstmanagement der oralen Antikoagulation hatten. Die klinische Studie diente einerseits als Datenvergleich mit dem Referenzsystem, andererseits aber auch der Evaluation der Benutzerfreundlichkeit des Biosensor-Testsystems. Die Handhabung des Biosensor-Systems wurde insgesamt für `leicht` befunden; gewisse Probleme bereitete das Auftragen des Blutropfens. Die mittlere Differenz zwischen den INR-Werten der beiden Messmethoden betrug  $0.063 \text{ INR} \pm 0.64$  über alle Vergleichsmessungen ( $n = 347$ ) und  $0.078 \text{ INR} \pm 0.40$  unter alleinigem Einbezug der Patientenmittelwerte ( $n = 33$ ). Die mittlere Differenz zwischen den INR-Werten der beiden Messmethoden darf als sehr gering bezeichnet werden. Diverse Studien, in welchen das CoaguChek<sup>®</sup>S-System mit anderen Messmethoden verglichen wurde, zeigen höhere Differenzen auf. Betreffend der hohen Streuung der Werte konnten Ursachen eruiert werden, die durch technische Adaptationen beseitigt oder zumindest vermindert werden können sollten, darunter eine inhomogene Verpackung der Teststreifen sowie die erwähnten Schwierigkeiten beim Bluteinzug.

Es ist gelungen, die entscheidenden Einflüsse auf die Gerinnungsreaktion in-vitro zu kontrollieren und somit aus dem chronoamperometrischen Messverfahren ein Biosensor-System soweit zu entwickeln, dass dieses `richtige` Resultate liefert und bei Anwendung durch den Patienten den Anforderungen eines ersten Feldversuchs standhalten konnte. Hinsichtlich `Präzision` ist noch Potential für eine Optimierung vorhanden.

## Abkürzungen

$\alpha_2$ -AP	$\alpha_2$ -Antiplasmin
$\alpha_2$ M	$\alpha_2$ -Makroglobulin
aPTT	aktivierte Partielle Thromboplastinzeit
AT	Antithrombin
CSCQ	Centre Suisse de Contrôle de Qualité
Hk	Hämatokritwert
INR	International Normalized Ratio
ISI	International Sensitivity Index
MNPT	Mittlere normale Thromboplastinzeit
NCP	Normalcitratplasma
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PIVKA	Protein Induced by Vitamin K Absence
PL	Phospholipide
PSM	Patientenselbstmanagement
PSM-OAK	Patientenselbstmanagement der oralen Antikoagulation
POC	Point-of-care
PT	Prothrombin time
QUALAB	Schweizerische Kommission für Qualitätssicherung im medizinischen Labor
Rel. LF	relative Luftfeuchtigkeit
TF	Tissue Factor, Gewebefaktor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
t-PA	Gewebeplasminogenaktivator
TPZ	Thromboplastinzeit
$t_{300}$	Zeit in Sekunden von Messbeginn bis zum Erreichen von 300nA
vWF	von Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
$x_{Lot}$	Chargenkorrekturfaktor
$x_{Hk}$	Hämatokritkorrekturfaktor

## **Ziel der Arbeit**

Zur Prävention thromboembolischer Ereignisse stehen heute weltweit rund sechs Millionen Personen unter langzeitiger, oft lebenslanger Medikation mit sogenannten oralen Antikoagulanzen. Pharmakokinetische Umstände machen eine regelmässige Kontrolle dieser Behandlung notwendig. Jahrzehntlang hatten sich die betroffenen Patienten zu diesem Zweck in der Regel einmal im Monat zum Hausarzt oder ins Spital für eine Blutentnahme zu begeben. Seit einigen Jahren sind Geräte vorhanden, mit welchen betroffene Patienten ihre medikamentöse Therapie selbständig kontrollieren können. Ziel der vorliegenden Arbeit - Bestandteil eines gemeinsamen Projektes von Universität und Industrie- war die Entwicklung eines neuartigen Biosensor-Systems, mit welchem sich die Medikation mit oralen Antikoagulanzen von Patienten selbständig überwachen liesse.

## Vorwort

In einem ersten Kapitel der vorliegenden Arbeit wird auf den theoretischen Hintergrund der tangierten Gebiete näher eingegangen. Einerseits werden verschiedene Aspekte von `Biosensoren` erläutert, andererseits das medizinische Gebiet der `Hämostase`, insbesondere der Bereich der oralen Antikoagulation behandelt. Im zweiten Kapitel wird die Entwicklung des Biosensor-Systems aufgezeigt. Auf kaum einen Bereich der Entwicklung konnte unabhängig eingegangen werden. Manchmal wurde an mehreren Entwicklungsschritten gleichzeitig gearbeitet. Oft waren Arbeiten von Fortschritten in anderen Bereichen abhängig. Gelegentlich führten spätere Erkenntnisse dazu, eine frühere Thematik erneut aufzugreifen und neue Wege einzuschlagen. Solche Parallel- und Wiederholungsarbeiten sind in der Niederschrift nicht als solche ersichtlich. Zum einfacheren Verständnis ist das Kapitel nicht strikte `chronologisch`, sondern thematisch geordnet, aber dennoch `logisch` aufbauend gestaltet. Das letzte Kapitel fasst die Arbeiten und gewonnenen Erkenntnisse im Rahmen einer abschliessenden Diskussion zusammen.

Manchmal wäre eine grundlegendere Untersuchung einzelner Themen und Resultate durchaus möglich gewesen. Gewisse Aspekte und Erkenntnisse hätten eine weitere Betrachtung auch verdient. Vorliegende Arbeit richtete sich jedoch danach, ein marktfähiges Produkt zu entwickeln. Nebst der wissenschaftlichen und medizinisch-technischen Innovation wollten auch andere Gesichtspunkte berücksichtigt werden. So sollten die Erkenntnisse nebst `im Labor machbar` auch in grösserer Produktion möglich, wirtschaftlich sinnvoll, den Rechtsgrundlagen entsprechend und nicht zuletzt auch anwenderfreundlich sein.

Die Arbeiten wurden im Thromboselabor des Departements Klinische Forschung der Universität Bern, in Kliniken des Inselspitals Bern und bei der Firma ASULAB SA in Marin, dem zentralen Forschungslabor der SwatchGroup<sup>LTD</sup>, durchgeführt. Die Verantwortlichen beim Industriepartner ASULAB SA haben die universitäre Forschungsfreiheit stets in den Vordergrund gestellt und meine Arbeiten nie in eine Richtung gedrängt, in welcher nicht auch meine Interessen lagen.

Charles Thürlemann

## **Kapitel I: Theoretischer Hintergrund**

---

### **1. Biosensoren**

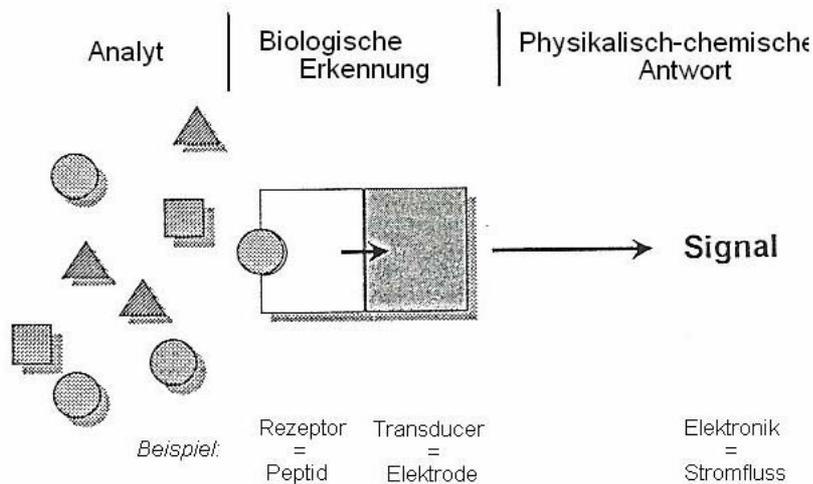
#### **1.1. Allgemeines zu Biosensoren**

##### **1.1.1. Definition**

Ein chemischer Sensor ist eine Vorrichtung, welche chemische Information -sei es die Konzentration einer einzelnen spezifischen Komponente in einer Probe oder sei es ein Gemisch- in ein analytisch nützliches Signal umzuwandeln vermag. Chemische Sensoren bestehen aus zwei in Serie geschaltete Grundkomponenten: eine chemische (molekulare) Erkennungskomponente (Rezeptor) und ein physikalisch-chemischer Umwandler (Transducer). Biosensoren sind chemische Fühlssysteme, bei welchen die Erkennungskomponente auf einem biochemischen Mechanismus beruht [1] [2]. Biosensoren verbinden die Selektivität von biologischen Prozessen mit modernen analytischen Detektionsmöglichkeiten.

##### **1.1.2. Messprinzip**

Anders ausgedrückt versteht man unter `Biosensor` ein Messsystem, bei welchem Material biologischer Herkunft mit einem physikalischen Signalwandler räumlich und funktionell gekoppelt ist [3]. Die Konfiguration hervorhebend handelt es sich um einen chemischen Messfühler bestehend aus einer biologischen Erkennungskomponenten, einem Transducer, der die biologische Erkennungsreaktion in ein messbares elektronisches Signal umwandeln kann, und einem Detektor. In Abbildung 1 ist dieses allgemeine Funktionsprinzip schematisch dargestellt.



**Abb. 1:** Allgemeines Funktionsprinzip eines Biosensors

Das biologische Element vermag Vorhandensein, Aktivität oder Konzentration eines spezifischen Analyten in Lösung zu erkennen. Der Erkennungsschritt kann entweder ein Bindungsprozess sein (Liganden basierende Biosensoren; dabei handelt es sich bei der Erkennungskomponente z.B. um Antikörper, DNA Segmente oder Zellrezeptoren) oder eine biokatalytische Reaktion (Enzym-basierende Biosensoren). Die Interaktion von Erkennungskomponenten und Analysensubstanz resultiert in einer messbaren Änderung einer der Lösungseigenschaften, wie z.B. der Bildung eines Produkts. Der Transducer wandelt diese Eigenschaftsänderung in ein quantifizierbares Signal um. Diese Umwandlung kann verschiedener Methodik sein, elektrochemisch, optisch oder Detektion einer Massen- (piezoelektrisch) oder Wärmeänderung (kalorimetrisch) [4].

### 1.1.3. Anwendungen

Biosensoren eignen sich für Einsatzbereiche, in denen eine bestimmte chemische Verbindung selektiv in einem komplexen Gemisch bestimmt werden muss. Biosensoren finden Anwendung in einer ständig wachsenden Anzahl von Bereichen. Der erste Biosensor wurde 1962 von Clark und Lyons entwickelt [5]. Er diente zur Bestimmung von Glucose im Urin. Durch Fortschritte in Biochemie und Mikroelektronik sind seither viele weitere Biosensoren zu unterschiedlichen Zwecken entwickelt worden. Die diversen, heute noch gängigen Anwendungsbereiche sind in folgender Liste aufgeführt [6]:

- Klinische Analytik und Medizintechnik
- Analytik von Pharmazeutika und Toxikologika
- Bioprozesskontrolle
- Lebensmittelanalytik
- Umweltanalytik
- Landwirtschaft und Gartenbau
- Mikrobiologie
- Bergbau
- Militärische Anwendungen

#### **1.1.4. Anforderungen und Defizite**

Im Laufe der Entwicklung eines Biosensors von der Idee zum marktreifen Produkt muss zahlreichen Anforderungen an das System Rechnung getragen werden. In der ersten Stufe, der Entwicklung des Sensorkonzeptes, gilt es zunächst, die grundlegenden Anforderungen an Stabilität, Erhalt der biologischen Aktivität, Sensitivität, Ansprechzeit, Selektivität und Reproduzierbarkeit durch Wahl der Biokomponenten, eines geeigneten Immobilisierungsverfahrens, sowie einer entsprechenden Sensorarchitektur zu erfüllen. Desweiteren müssen Langzeitstabilität, Selektivität, linearer Messbereich, Ansprechzeit, Reproduzierbarkeit, Fehlergrenzen und Chargenkalibrierung beachtet werden. Oft kommen noch spezielle anwendungsbezogene Anforderungen wie Biokompatibilität, hohe Selektivität in komplexen Matrices wie Umweltproben oder Vollblut und Konstanz über bestimmte Temperaturbereiche hinzu. Eines der Hauptdefizite von Biosensoren ist derzeit die mangelnde Langzeitstabilität, die zwar durch die Art der Immobilisierung teilweise verbessert werden kann, aber häufig durch die relativ geringe Stabilität der biologischen Komponente limitiert ist.

### **1.1.5. Zukunft / Trends**

Allgemein geht der Trend weiter in Richtung 'kleiner und einfacher'. Durch die überflüssig werdende Probenaufbereitung kann mittels Biosensoren öfters am Ort der Probenentnahme die Analytik durchgeführt werden. In der Medizintechnik heisst dies vermehrt Überwachung von Biomarkern (z.B. Herz-Markern) und schnellere Resultate z.B. im Operationssaal oder direkt beim Patienten, sei dies am Spitalbett, in der Arztpraxis oder Apotheke (z.B. Drogenscreening, Detektion von Infektionen) [Point-of-care (POC) / Bedside-monitoring / Near-patient testing]. Und was vom medizinischen Laien bei der Blutzuckerbestimmung schon seit mehreren Jahren praktiziert wird, soll auch bei anderen Indikationen Anwendung finden: eine Selbstkontrolle oder ein Selbstmanagement der Therapie im Umfeld des Patienten zu Hause oder auf Reisen.

Die Forschungsschwerpunkte auf dem Gebiet der Biosensorik liegen zur Zeit in der Molekularen Diagnostik. Primär wird eine Verbesserung der Sensitivität von DNA-Biosensoren angestrebt, mit dem Ziel, ohne die Notwendigkeit einer Amplifikation einzelne Moleküle in einer Probe detektieren zu können. In Zukunft soll solche DNA-Analyse wie auch weitere diagnostische Tests mittels 'Lab on a Chip' - Technologie erfolgen. Darunter werden Analyse-Systeme verstanden, welche auf kleinstem Raum (Chip) die Probenaufbereitung, chemische Analyse, wie auch die Fähigkeit zur Signalführung enthalten [4]. Vorläufig noch Wunschtraum ist, solche Chips auch zu implantieren. Im Körper sollen sie physiologische Vorgänge überwachen, Krankheiten früh erkennen und bei Bedarf selbständig die richtige Medikation freisetzen. Bis zur Realisation eines solchen Szenario dürfte noch sehr viel Zeit vergehen, vorher sind noch einige Probleme zu lösen. Dazu gehört die Langzeit-Biokompatibilität. Nebst Abstossungsreaktionen oder einfach Wirkungsverlust nach Attacke des Immunsystems fallen darunter auch Proteinanlagerung auf dem Biosensor, was nebst einer Sensitivitätsänderung auch ein erhöhtes Infektionsrisiko birgt. Entsprechende Versuche wurden schon in Zusammenhang mit implantierbaren Glucose-Messsystemen durchgeführt [7].

## 1.2. Elektrochemische Biosensoren

### 1.2.1. Definition

Ein elektrochemischer 'Biosensor' ist eine in sich abgeschlossene Vorrichtung, welche durch Kopplung einer biologischen Erkennungskomponente (biochemischer Rezeptor) mit einem elektrochemischen Umwandler eine spezifische quantitative oder semi-quantitative analytische Information liefern kann [3].

### 1.2.2. Arten und Anwendungen

Nebst einfacher Bedienung sind hohe Sensitivität und Selektivität, sowie die Funktionsfähigkeit in trüben Medien die wesentlichen Vorteile von elektrochemischen Biosensoren. In Abbildung 2 sind die wichtigsten elektrochemischen Analysemethoden schematisch aufgeführt.

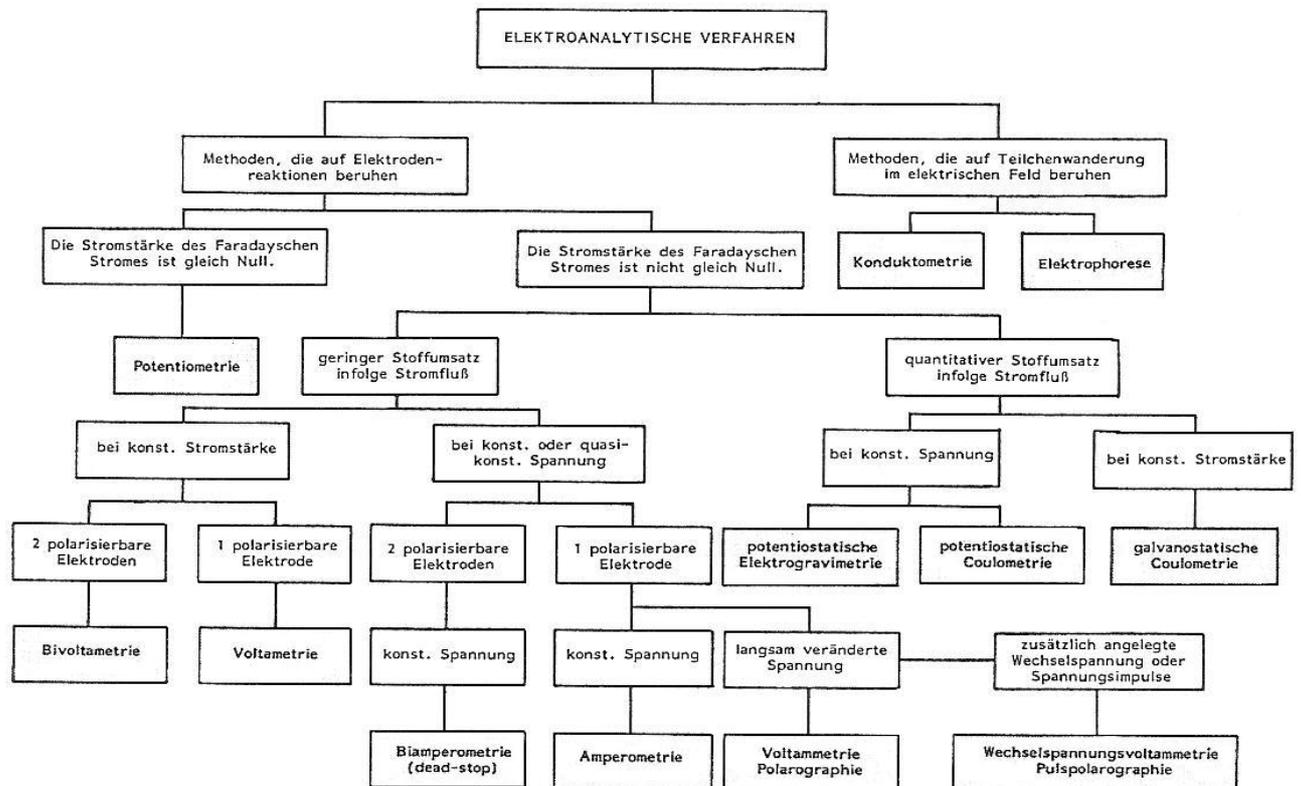


Abb. 2: Systematik der wichtigsten elektrochemischen Analysemethoden [8]

In elektrochemischen Biosensoren finden vorwiegend Amperometrie, Potentiometrie, Konduktometrie und von der Oberflächenladung abhängige Messverfahren wie z.B. die Coulometrie Anwendung [3]. Potentiometrie wird die Messung einer elektrischen Potentialdifferenz zwischen zwei Elektroden genannt, wenn der Zellstrom null beträgt [4]. Bei der Konduktometrie wird die elektrische Leitfähigkeit von Elektrolytlösungen zur Bestimmung ihres Elektrolytgehaltes (Absolutmessung) oder bei Titrations zur Erkennung des Endproduktes herangezogen [9]. Als Coulometrie wird eine elektrochemische Technik verstanden, bei welcher die Menge an Ladungsteilchen (Coulombs), welche zwischen zwei Elektroden passieren, gemessen wird. Dieser Betrag ist direkt proportional zur Oxidation oder Reduktion einer elektroaktiven Substanz an einer der Elektroden [4]. Beim amperometrischen Messverfahren wird bei konstanter Zellspannung die relative Änderungen der Stromstärke detektiert. Weitere Erläuterungen zu Amperometrie sind unter 1.2.3. aufgeführt.

Da Biosensoren in der Regel schnell, sensitiv und einfach zu handhaben sind, bieten sie sich z.B. für ein Pre-Screening von Probenreihen an, von denen dann nur die relevanten Proben mit den genaueren, aber wesentlich aufwendigeren und kosten intensiveren instrumentellen Methoden untersucht werden müssten. Hierdurch kann sowohl der Zeitaufwand bei der Probenahme, -vorbereitung und -messung, als auch der Preis pro Analyse gesenkt werden. Ein weiterer Vorteil von Biosensoren liegt in der Möglichkeit zur Miniaturisierung. Der Einbau von Biosensoren in Mikrosysteme ist besonders interessant im Hinblick auf klinische Anwendungen wie implantierbare Biosensoren und verspricht weiterhin eine Kostensenkung durch geringe Reagenzien- und Probenvolumina und eine Arbeitserleichterung durch einfach zu bedienende, portable Messgeräte. Ausserdem bietet sich die Möglichkeit zur Simultanmessung mehrerer Substanzen mit Hilfe von Sensorarrays an, deren einzelne Sensoroberflächen individuell mit unterschiedlichen biologischen Komponenten modifiziert werden können.

Hauptanwendungsgebiete für elektrochemische Biosensoren sind derzeit die klinische Analytik, die Lebensmittel- und Prozesskontrolle und die Umweltanalytik. Der Einsatz von Biosensoren in der Lebensmittelindustrie [10-12] beinhaltet sowohl die Prozesskontrolle, als auch die Qualitätsprüfung verschiedener Lebensmittel. Zur Qualitätskontrolle gehört die Detektion von Kontaminationen (Pestizide, Hormone, Bakterien etc.) oder Zusatzstoffen (Zucker, Geschmacksstoffe, Antioxidantien etc.), ebenso wie die Konzentrationsbestimmung natürlicher Inhaltsstoffe. Ziel der industriellen Prozesskontrolle ist die möglichst effiziente

Führung diverser Prozesse wie z.B. Fermentationen. Mittels on-line oder in-line Analyse (in Echtzeit) werden bisher hauptsächlich physikalische und chemische Parameter (Temperatur, pH-Wert,  $pO_2$ ,  $pCO_2$  etc.) kontrolliert, während die Messung von Substrat- und Produktkonzentrationen mit Hilfe von Biosensoren meist off-line (nach Probenahme aus dem Reaktor) erfolgt. Problematisch für den Einsatz von Biosensoren direkt im Reaktor ist die pH- und Temperaturabhängigkeit der Enzyme, die zum einen zu Messwertschwankungen während des Prozesses führen kann und zum anderen keine Hitzesterilisation erlaubt. Weitere Nachteile, die auftreten können, sind ein zu geringer linearer Messbereich des Enzymsensors und die Sauerstoffabhängigkeit mancher Enzyme. Eine vielversprechende Methode zur on-line Analyse mit Biosensoren ist daher die sogenannte Fliessinjektionsanalyse (FIA), die eine Änderung unerwünschter Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Inhibitoren) vor dem Eintritt der Probe in die Durchfluss-Messzelle erlaubt und an beliebige Detektoren gekoppelt werden kann [13,14].

Auch in der Umweltanalytik nehmen Biosensoren einen immer grösseren Bereich neben den herkömmlichen instrumentellen Methoden ein. Aufgrund der hohen Selektivität der biologischen Erkennungskomponente können Analyte auch in den komplexen Matrices umweltrelevanter Proben selektiv bestimmt werden. Die Einsatzmöglichkeit von Biosensoren in der Umweltanalytik reicht von der Bestimmung von Phenolen [15,16], Phosphaten [17], Dimethylformamid (DMF) [18], Cyanid [19,20], Nitrat und Methan [21] bis zum Nachweis unterschiedlicher Pestizide [20,22,23], wie z.B. Organophosphor-Verbindungen [22,24]. Dabei werden am häufigsten Enzymelektroden [15-18,23], aber auch Immunosensoren [25,26] und Sensoren auf der Basis intakter Zellen [27] und pflanzlicher Gewebeschnitte [16] eingesetzt.

Die klinische Analytik bzw. Medizintechnik ist bisher das bedeutendste Einsatzgebiet von Biosensoren [28-32]. Wichtige Ziele sind dabei der Aufbau einer sogenannten „bed-side“ Analytik, die die ständige Überwachung von Intensivpatienten direkt am Krankenbett erlaubt und das zeitaufwendige und teure Einschicken von Proben zu Zentrallabors ersetzt, die on-line Kontrolle wichtiger metabolischer Werte eines Patienten während einer Operation, sowie die Verbesserung der Patientenselbstkontrolle. Viele medizinisch interessante Substanzen können mit Hilfe elektrochemischer Biosensoren detektiert werden, so z.B. Harnstoff [23-34], Cholesterin [35-37], Lactat [38-41], die Neurotransmitter Dopamin und Glutamat [42] oder auch Pharmaka und illegale Drogen [31,43], wie Phenothiazine [44], Theophyllin [45],

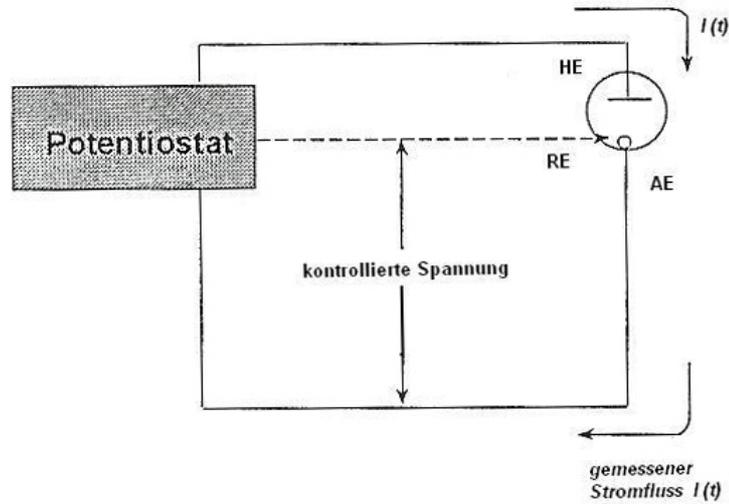
Penicillin [46,47], Diacetylmorphin (Heroin) und Morphin [48]. Den grössten Anteil der klinischen Anwendungen machen jedoch Glucosesensoren [49-52] aus, die vorwiegend in Blutzuckermessgeräten für Diabetiker Einsatz finden.

### 1.2.3. Amperometrisches Messprinzip

Amperometrie ist das elektrochemische Verfahren, welches am meisten in den kommerziell erhältlichen Biosensoren für die klinische Analytik Anwendung findet. Weitaus am häufigsten finden amperometrische Biosensoren zur Bestimmung von Glucose Anwendung [4]. Die Substitution der dabei meist verwendeten Glucoseoxidase durch andere Redox-Enzyme erlaubt die Anwendung von amperometrischen Biosensoren zur Detektion anderer Substrate, welche ebenfalls von klinischem Interesse sind [4], so Lactat [53], Cholesterin [54], Pyruvat [55], Analin [55], Glutamat und Glutamin [56] sowie Creatinin [57].

Gewisse chemische Verbindungen werden bei einem bestimmten Potential an Metall-Elektroden oxidiert oder reduziert. Diese Verbindungen werden als elektroaktive Substanzen bezeichnet. Amperometrische Bestimmung basiert auf der Messung eines aufgrund an einer elektroaktiven Komponente ablaufenden Oxidations- oder Reduktionsreaktion resultierenden elektrischen Stromes an einer Arbeitselektrode. Auf die Arbeitselektrode wird mittels eines Potentiostaten ein konstantes Potential ausgeübt. Das applizierte Potential führt zu Oxidations- oder Reduktionsreaktionen [58]. Als Arbeitselektrode dienen Pt-, Pd-, Au- oder C-Elektroden, welche in Bezug auf eine Referenzelektrode (üblicherweise Ag/AgCl) gesetzt werden. Bei tiefen Stromstärken ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  A) kann letztere auch als Hilfselektrode eingesetzt werden [3]. Bei positivem Potential läuft an der Arbeitselektrode eine Oxidationsreaktion ab. Die Elektrode wird dann als Anode bezeichnet. Gemäss Faradayschem Gesetz, welches besagt, dass die bei der Elektrolyse abgeschiedene Stoffmenge zur elektrischen Ladung, welche durch die elektrolytische Lösung geflossen ist, proportional ist, ist der gemessene Zellstrom (Diffusionsstrom) somit ein quantitatives Mass für den gesuchten Analyten [4].

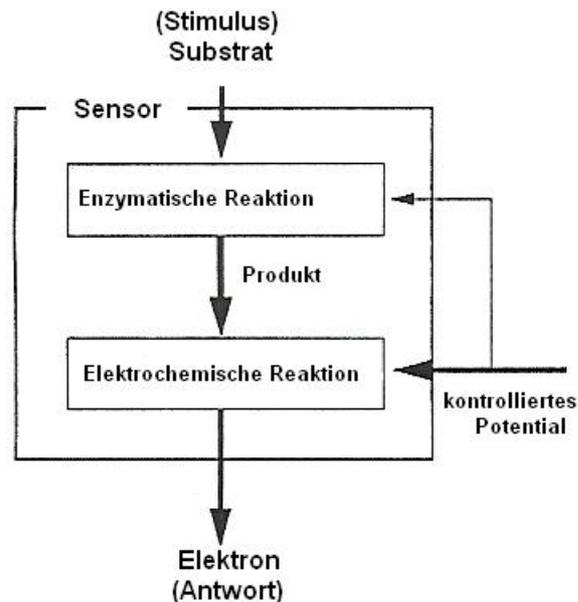
Abbildung 3 zeigt das Messprinzip bei amperometrischen Verfahren.



**Abb. 3:** Messprinzip bei amperometrischen Verfahren

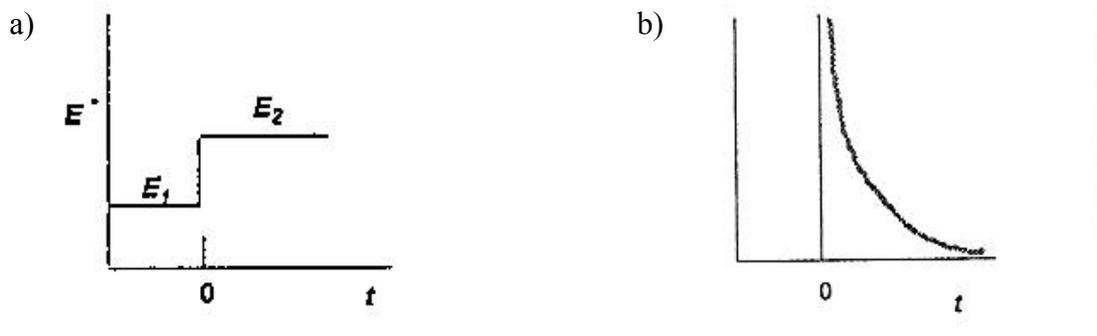
AE: Arbeitselektrode; HE: Hilfselektrode; RE: Referenzelektrode

Die meisten amperometrischen Biosensoren verwenden Enzyme als Erkennungskomponente. In Abbildung 4 ist das allgemeine Schema eines amperometrischen, enzymbasierten Biosensors aufgezeichnet.



**Abb. 4:** Schematisches Diagramm eines amperometrischen, enzymbasierten Biosensors

Als Chronoamperometrie bezeichnet man jenes Prinzip, bei welchem unter amperometrischer Versuchsanordnung, d.h. bei konstanter Potential-Differenz zwischen Arbeits- und Referenzelektrode, die Stromstärke als Funktion der Zeit aufgezeichnet wird. Chronoamperometrie findet daher vor allem bei kinetischen Messungen Anwendung. Abbildung 5 verdeutlicht den Effekt bei Spannungswechsel: Bei Anlegen einer höheren Spannung kann bei einigen organischen Stoffklassen eine elektrochemische Oxidation an Edelmetall- oder Carbonelektroden erfolgen. Ab einer Spannung von etwa 700mV reagiert auch  $O_2$ . Um diese Spannung herum und höher wird es schwierig, andere Signale von  $O_2$  zu unterscheiden.



**Abb. 5:** a) Wechsel von Potential  $E_1$  zu Potential  $E_2$ ; b) resultierender Verlauf der Stromstärke gegen die Zeit

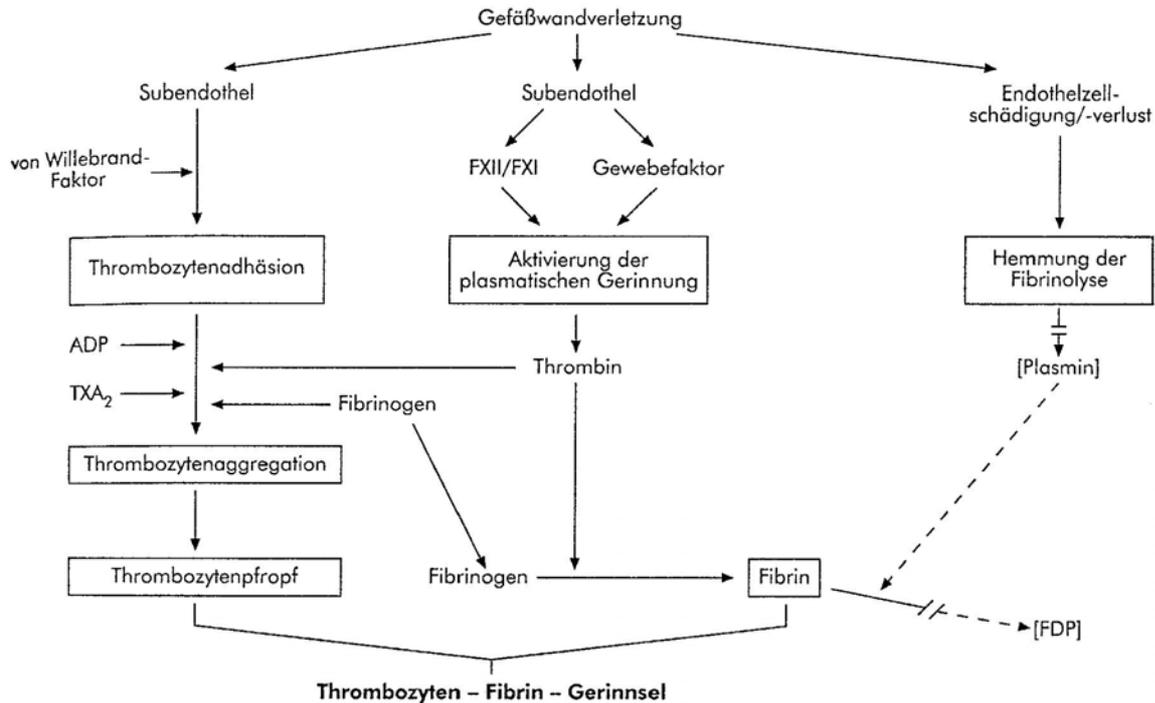
## 2. Hämostase

### 2.1. Überblick

Hämostase ist eines von verschiedenen Abwehrsystemen des Körpers, welche für ein normales Leben unabdingbar sind. Sie bezeichnet das Zusammenspiel von Blutzellen, Gefäßsystem, Plasmaproteinen und diversen niedrig molekularen Substanzen. Ist die Hämostase ausgewogen, bedeutet dies, dass weder Blutung noch Thrombose auftreten. Dieses Gerinnungssystem bekämpft Störungen im Blutfluss, verhindert Blutverlust und sorgt für die Wiederinstandsetzung des verletzten Gefäßsystems. Hauptsächlich beteiligt an den Mechanismen der Hämostase sind: [59]

- Gefäßwand (insbesondere Endothelium und Subendothelium)
- Thrombozyten und andere Blutzellen
- Plasmatische Gerinnungsfaktoren und deren Inhibitoren
- Weitere Plasmaproteine wie von Willebrand Faktor
- Faktoren des fibrinolytischen Systems und deren Inhibitoren
- Calcium-Ionen
- Organische niedrig molekulare Substanzen, darunter Phospholipide, Prostaglandine
- Zytokine, Hormone

Traditionell wird der Blutstillungsprozess in drei Phasen aufgeteilt: Zur primären Hämostase zählt man die Vasokonstriktion, die Plättchenadhäsion und die Plättchenaggregation. Als sekundäre Hämostase wird die von den plasmatischen Gerinnungsfaktoren bewirkte Fibrinbildung bezeichnet. In der Fibrinolyse werden die Fibrinstränge wieder aufgelöst. Diese drei Vorgänge laufen zeitlich nahezu parallel ab und greifen physiologisch ineinander (Abbildung 6).



**Abb. 6:** Zusammenspiel von Thrombozyten, plasmatischem Gerinnungssystem und Fibrinolyse-System bei der Entstehung eines Thrombozyten-Fibrin-Gerinnsels nach Gefäßwandverletzung [60].

ADP = Adenosindiphosphat,  $\text{TXA}_2$  = Thromboxan  $\text{A}_2$ , FDP = Fibrinolytische Degradationsprodukte

## 2.2. Thrombozytenaggregation (Primäre Hämostase)

Bei der primären Hämostase sind das Gefäßsystem einschliesslich der Endothelzellen sowie die Thrombozyten beteiligt. Die erste Plättchenreaktion auf eine Gefäßverletzung ist deren Adhäsion an Kollagen und andere Komponenten der subendothelialen extrazellulären Matrix. Gleichzeitig tritt oberhalb und unterhalb der Gefäßläsion an allen Gefässen, die glatte Muskelzellen besitzen, ein Gefässspasmus über 5-10 Sekunden auf. In dieser Zeit ist der Blutzufluss in dem Bereich der Läsion gedrosselt. Da aber die Mehrzahl der Gefässe aus Kapillaren besteht, die keine glatten Muskelzellen besitzen, spielt die Vasokonstriktion bei der Hämostase eine relativ geringe Rolle. Die Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliale Strukturen über Adhäsivproteine, wie z.B. den von Willebrand-Faktor (vWF), leitet eine Stimulierung der Zellen ein, die als Thrombozytenaktivierung bezeichnet wird. Der von Willebrand-Faktor wird in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert und liegt im zirkulierenden Blut als Komplex mit Faktor VIII vor [60]. Darüber hinaus sind Agonisten

bekannt, die eine Aktivierung einleiten. Für folgende Agonisten sind Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten nachgewiesen worden: Adrenalin, ADP, Thrombin, Plättchen aktivierender Faktor (PAF), Kollagen und Thromboxan [61,62]. Nach Adhäsion an das Subendothel sezernieren Thrombozyten Inhaltstoffe, z.B. ADP, die eine Aggregation von weiteren Thrombozyten an die primär adhärierenden Zellen induzieren. Demnach versteht man unter Thrombozytenaggregation die Aneinanderlagerung von Thrombozyten an Thrombozyten im Gegensatz zu Thrombozytenadhäsion, womit das Anhaften von Thrombozyten an Gefässwandstrukturen definiert wird. Sowohl Vollblutgerinnsel als auch ein Gerinnsel, das aus Thrombozyten-reichem Plasma hergestellt worden ist, zieht sich unter Auspressen von Serum zusammen [60]. Viele für Thrombozyten typische Reaktionen, wie Aggregation, Sekretion und Retraktion, sind von Signaltransduktionen abhängig [63-65]. Agonisten der Signaltransduktion, die zu einer Thrombozytenaktivierung führen, sind ADP, Thrombin, Adrenalin, Thromboxan A<sub>2</sub>, PAF sowie Kollagen und andere Komponenten der extrazellulären Matrix [60].

### **2.3. Plasmatische Gerinnung (Sekundäre Hämostase)**

Subendotheliale Strukturen leiten eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung ein. Hieran sind die Kontaktfaktoren sowie der Gewebefaktor (Tissue factor TF) beteiligt. Der Gewebefaktor ist ein Bestandteil der subendothelialen extrazellulären Matrix, wird aber auch von Endothelzellen nach Stimulierung derselben sezerniert [60]. Über eine Kaskade von plasmatischen Gerinnungsfaktoren (Plasmafaktoren) entsteht schliesslich in einem letzten Schritt aus dem löslichen Plasmaprotein Fibrinogen ein unlösliches Fibringerinnsel. Die Plasmafaktoren sind Glykoproteine, welche verschiedene Halbwertszeiten aufweisen und in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen. In Tabelle 1 sind die plasmatischen Gerinnungsfaktoren aufgeführt.

**Tab. 1:** Faktoren des plasmatischen Gerinnungssystems, ihre Halbwertszeit und Plasmakonzentration [66]

Symbol	Name (teils veraltet)	Plasmahalbwertszeit (h)	Plasmakonz. (nM)
F I	Fibrinogen	64-96	8800
F II	Prothrombin	48	1400
F V	Proaccelerin	12	20
F VII	Proconvertin	4-6	10
F VIII	Antihämophil – Globulin A	15-20	0.7
F IX	Antihämophil B, Christmas-Faktor	24	90
F X	Stuart-Prower-Faktor	32	170
F XI	Plasmathromboplastin- Vorläufer	60-80	30
F XII	Hagemann Faktor	50-70	400
F XIII	Fibrinstabilisierender F.	40-50	50
TF	Gewebefaktor		-
PK	Präkallikrein		400
HMWK	High Molecular Weight Kininogen		700

Die aktivierten Formen der Faktoren II (Prothrombin), VII, IX, X, XI und XII sind Serinproteasen. Sie liegen im Blut als Proenzyme vor und werden im Verlauf eines Gerinnungsprozesses in ihre aktive Form (bezeichnet als Faktoren IIa [Thrombin], VIIa, IXa, Xa, XIa bzw. XIIa) überführt. Die aktivierten Faktoren V und VIII sind keine Enzyme, jedoch als Kofaktoren entscheidend an der Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems beteiligt. Thrombin darf als zentrales Gerinnungsenzym bezeichnet werden [61].

### 2.3.1. Kaskadentheorie

Nach einem bis vor einigen Jahren als Stand des Wissens vertretenen und heute noch zum einfacheren Verständnis gebrauchten Prinzip wird die plasmatische Blutgerinnung in einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg unterteilt. Letzterer wurde als physiologisch wichtigster Weg bezeichnet: Die Aktivierung der Blutgerinnung durch den Faktor VIIa erfolgt zusammen mit dem Gewebefaktor als Kofaktor (siehe Abschnitt 2.5.). Der Gewebefaktor

bildet zusammen mit Phospholipiden das Gewebethromboplastin [60]. Das bei einer Gewebeläsion frei werdende Gewebethromboplastin aktiviert Faktor VII, dieser aktiviert Faktor X und dieser wiederum Faktor II (Prothrombin) zu Thrombin durch proteolytische Spaltung (Kaskadentheorie). Als zweites Prinzip für den normalen, das heisst zeitgerechten Ablauf der Gerinnung gilt folgendes: Die Aktivierungsreaktion von Faktor II ist auf die Anwesenheit von Membranoberflächen (Phospholipide) angewiesen. Durch Adsorption an eine Membran wird Faktor II zu einem wesentlich leichter zugängigen Substrat für Faktor Xa. Nur Membrane, die negativ geladene Phospholipide (PL) enthalten, dienen diesem Zweck. Durch Faktor V, der kein proteolytisches Enzym ist, sondern als Cofaktor fungiert, wird die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin 1000fach beschleunigt.

Der intrinsische Weg, welcher möglicherweise ein Laboratoriumsartefakt ist, wird nur durch negativ geladene Fremdoberflächen angestossen wie z.B. durch Glas, Kaolin, Sulfatide und andere Materialien, die Faktor XII adsorbieren und aktivieren. FXIIa aktiviert Präkallikrein zu Kallikrein mit Hilfe von hochmolekularem Kininogen (HMWK). Das gebildete Kallikrein aktiviert Faktor XII, und diese gegenseitige Aktivierung setzt sich so lange fort, bis das Substrat lokal erschöpft ist. Faktor XIIa aktiviert FXI, der den Faktor IX aktivieren kann, der dann letztlich über FX zur Aktivierung von Prothrombin führt.

Beide Reaktionswege resultieren in der Aktivierung von Faktor X zu Xa. Das extrinsische und das intrinsische System sind über die sogenannte Jasso-Schleife verbunden, in der Faktor VII-Gewebethromboplastin Faktor IX aktiviert [67]. Die Kaskadentheorie stützt sich auf die prokoagulatorisch wirksamen Plasmaproteine, ohne Einbezug der im Gerinnungsablauf involvierten Zellen, deren Oberfläche für die verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen essentiell sind [68].

### **2.3.2. Revidierte Theorie der Blutgerinnung**

Nach einer `revidierten Theorie der Blutgerinnung` [69] vollzieht sich der Ablauf der Gerinnungskaskade nicht in der lange Zeit angenommenen und oben geschilderten Form, in welcher ein `intrinsisches` und ein `extrinsisches` System unterschieden werden. Klinische Beobachtungen hatten gezeigt, dass die Kaskadentheorie die Hämostase nur unvollkommen reflektiert. Personen mit einem Mangel an Faktor XII, Präkallikrein und HMWK wiesen keine



diesen exprimiert wird, freigesetzt. Der 'Tissue factor' gerät so in Kontakt mit dem im Plasma zirkulierenden Faktor VII. Nach Aktivierung des Faktors VII durch TF bildet sich der Komplex  $[VIIa \cdot TF \cdot Ca^{++}]$ , der in der Lage ist, kleine Mengen der Faktoren X und IX zu Xa bzw. IXa zu aktivieren. Der Komplex  $[VIIa \cdot TF \cdot Ca^{++}]$  ist nur kurzzeitig wirksam, da mit der Bildung von Xa die Wirkung eines Inhibitors, des TFPI, manifest wird. TFPI hemmt den Faktor Xa durch Bindung an dessen aktives Zentrum. Der so entstandene Inhibitor-Komplex Xa-TFPI hemmt seinerseits in einem Rückkopplungs-Mechanismus den  $[VIIa \cdot TF \cdot Ca^{++}]$ -Komplex und verhindert die weitere Bildung von Xa und IXa. In der Initialphase, die hiermit ihren Abschluss findet, konnten sich somit nur geringe Mengen von Xa und IXa sowie über Xa Spuren von Thrombin bilden. Die fassbare Fibrinbildung (Blutclot) ereignet sich bereits zu Beginn der Dauerphase, wenn erst 5-10 nM Thrombin gebildet wurden. Der grösste Teil Thrombin (mehr als 95 %) wird entsprechend erst in der Dauerphase gebildet [70].

Die Dauerphase wird durch den Faktor IXa nach Komplexbildung mit Faktor VIIIa, Phospholipiden, Thrombozyten und  $Ca^{++}$ -Ionen eingeleitet. Die Aufrechterhaltung und Verstärkung der Gerinnung in dieser zweiten Phase ist von den in der Initialphase entstandenen kleinen Mengen Xa abhängig. Diese hatten die Bildung kleiner Thrombinmengen hervorgerufen, die in einem Rückkopplungsmechanismus eine Thrombozytenaggregation, die Freisetzung von Substanzen aus Thrombozyten und Endothelzellen und eine Aktivierung der Akzeleratoren Faktor VIII und Faktor V bewirken. Zusammen mit dem in der Initialphase gebildeten Faktor IXa kommt es dadurch zur Entstehung grosser Mengen Xa und über den Prothrombinasekomplex  $[Xa \cdot Va \cdot PL \cdot Ca^{++}]$  (siehe Abschnitt 2.7.3.) zur verstärkten Thrombinbildung, was letztendlich über die Aktivierung von FXIII und anschliessender Quervernetzung des Fibrins die Ausbildung des Fibringerinnsels zur Folge hat. Die Rolle des Faktors XI ist noch nicht völlig klar. Eine Aktivierung durch Thrombin wurde nachgewiesen, wodurch in kritischen Situationen eine vermehrte Nachlieferung von IXa durch Wirksamwerden des aktivierten Faktors XI möglich ist [71].

### **2.3.3. Regulation der plasmatischen Gerinnung**

An der Regulation der plasmatischen Gerinnung sind mehrere plasmatische Inhibitoren sowie diverse Mechanismen, darunter insbesondere die negativen Rückkopplungsmechanismen

beteiligt. Wichtigster Inhibitor des plasmatischen Gerinnungssystems ist das Antithrombin (AT), früher als Antithrombin III bezeichnet, das relativ langsam alle Serinproteasen, vorzugsweise die Enzyme Faktor IXa, Faktor Xa und Thrombin inhibiert. Die Aktivierung des `extrinsischen` Weges der plasmatischen Gerinnung wird durch TFPI herunterreguliert. TFPI wird von Endothelzellen synthetisiert. TFPI hemmt Faktor Xa direkt und bildet mit dem Faktor VIIa/TF einen Komplex. Etwa 10% des im Blut zirkulierenden TFPI ist in den Thrombozyten gespeichert und wird aus diesen nach Stimulierung mit Thrombin freigesetzt. TFPI ist der Hauptregulator der Initialphase, während Antithrombin zur Abschwächung von Thrombinaktivität und Thrombingenerierung dient [70]. Wichtigster negativer Rückkopplungsmechanismus des plasmatischen Gerinnungssystems ist das Protein C-System, an dem Protein C, Protein S und Thrombomodulin beteiligt sind [60]. Ebenfalls wirkt die Konkurrenz von FVII mit FVIIa um den Gewebefaktor als negative Rückkopplungsreaktion [70].

## 2.4. Fibrinolyse

Die Fibrinolyse stellt einen lebensnotwendigen Mechanismus des Organismus dar und hat im Hämostasesystem zwei wichtige Funktionen: Sie baut einerseits Fibringerinnsel wieder ab, nachdem diese ihre Funktionen in der Blutstillung erfüllt haben, und sie limitiert eine Gerinnselbildung [60]. Die Fibrinolyse erfolgt durch das proteolytische Enzym Plasmin, das die polymerisierten Fibrinfäden spaltet. Die Spaltung erfolgt an ganz spezifischen Stellen des Fibrinmoleküls, die aber nicht identisch sind mit denen der Polymerisationsstellen. Diese Abbauprodukte, deren prominentestes das D-Dimer ist, unterscheiden sich daher von den Abbauprodukten des Fibrinogens, und sie können vor allem immunologisch von Fibrinogen differenziert werden. D-Dimere sind Plasmamarker, um die Fibrinolyse von der Fibrinogenolyse zu unterscheiden. Plasmin entsteht aus Plasminogen durch die Aktivatoren Gewebeplasminogenaktivator (t-PA ) oder Urokinase. Als dominierender Plasmininhibitor wirkt  $\alpha_2$ -Antiplasmin ( $\alpha_2$ -AP) [73]; als `Reserveinhibitor` inaktiviert auch  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ M) –wenn auch relativ langsam- verschiedene Komponenten des Fibrinolysesystems. Desweiteren existieren noch verschiedene Plasminogenaktivator-Inhibitoren, von denen der Typ 1, PAI-1, der wichtigste ist. Er hemmt sowohl t-PA als auch Urokinase [67].

## 2.5. Tissue Factor

Molekularbiologische und klinische Erkenntnisse belegen die Wechselwirkung von Tissue factor (TF, Gewebefaktor) und Faktor VII als wichtigster Auslöser der Gerinnung in vivo [74]. Der grösste Anteil an FVII zirkuliert im Plasma als Zymogen, 1% der gesamten FVII-Menge liegt jedoch im Plasma bereits in seiner aktivierten Form (FVIIa) vor [75]. Sobald aber FVII am TF gebunden ist, wird es via Proteolyse rasch in seine aktive Form überführt [76]. TF dient als Protein Kofaktor für Faktor VIIa, eine Plasma Serinprotease. Während der Gerinnungsfaktor VII somit als lösliches Plasmaprotein im Blut zirkuliert –wie auch die weiteren Faktoren der `Gerinnungskaskade`-, handelt es sich beim Gewebefaktor um ein membrangebundenes Protein, welches vorwiegend auf Zelloberflächen ausserhalb des Gefässsystems vorkommt [77]. Der TF ist ein glykosyliertes Protein, bestehend aus einer einzigen Polypeptidkette mit rund 260 Aminosäuren und einem Molekulargewicht um 45`000 Da [78] [72]. Lange Zeit glaubte man, dass der `Tissue Factor` ausschliesslich in extravaskulären Gewebe von Makrophagen, Monocyten und Fibroblasten exprimiert würde. Es wurde schliesslich aber auch in der Adventitia von Blutgefässen und Organkapseln, in den Endothelzellen wie auch in der Epithelschicht von Haut und Schleimhaut nachgewiesen. Ebenfalls konnte im Kreislauf zirkulierender TF detektiert werden, nachgewiesen sowohl in Vollblut wie auch im Serum [79] [80]. TF findet sich auch in zirkulierenden Mikropartikeln, welche aus Membranfragmenten gebildet wurden, die aus eukariotischen Zellen stammen [81]. Es handelt sich um Fragmente von Thrombozyten [82] oder Leukozyten [83]. Während es auf die Art der Membranbindung nicht ankommt, so schien lange Zeit aber die Tatsache einer Membranbindung des TF für eine ausgeprägte proteolytische Aktivität von FVIIa unerlässlich [84]. Versuche haben nun aber gezeigt, dass auch im Plasma zirkulierender TF unter gewissen, noch nicht geklärten Bedingungen, durchaus aktiviert werden kann [85] [80]. Vor einer Gefässverletzung ist TF jedoch nicht in der Lage, mit den Plasmaproteinen zu interagieren und dadurch lokal eine Thrombose zu initiieren. Der Anteil an zirkulierendem TF dürfte für die Ausbreitung eines Thrombus notwendig sein [86]. Nebst seiner hauptsächlichen Rolle in der Blutgerinnung konnten für den TF im Komplex mit FVII noch Funktionen als Signalrezeptor [87] –aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit der Familie der Zytokine-, als Übermittlungssubstanz bei septischen Zuständen [77] wie auch als `Mitspieler` im Umfeld von Tumormetastasen [88] nachgewiesen werden.

Tissue Factor wird seit Jahrzehnten im Thromboplastin-Reagenz (siehe 4.1.4.) für den Quick-Test (siehe 4.1.) verwendet, sei es in Form von lipidhaltigen Gewebeextrakten, sei es als rekombinant hergestellter Tissue Factor mit einer definierten Menge eines gerinnungsaktiven Phospholipids.

## 2.6. Thrombin

Thrombin (Faktor IIa) ist eine trypsinähnliche Serinprotease mit einem Molekulargewicht von rund 30'000 Da. Es entsteht durch Abspaltung aus dem Proenzym Prothrombin (Faktor II), welches als inaktive Form des Thrombins im Plasma zirkuliert [89]. Thrombin gilt als zentrales Enzym in der Hämostase. Es weist sowohl enzymatische wie hormonähnliche Eigenschaften auf, kann gerinnungsfördernd und gerinnungshemmend wirken. Durch die enzymatische Spaltung von Fibrinogen nimmt Thrombin eine Schlüsselstelle im Gerinnungsprozess ein. Das entstehende Fibrin wird nach der spontanen Polymerisation mittels FXIIIa –aktiviert durch Thrombin- quervernetzt. Über positive Rückkopplung sorgt Thrombin durch eine Aktivierung der Gerinnungsfaktoren FV und FVIII für eine weitere Thrombinproduktion. In Anwesenheit von negativ geladenen Oberflächen aktiviert Thrombin auch FXI. Durch enzymatische Spaltungen an sogenannten Thrombinrezeptoren aktiviert Thrombin die Thrombozyten und löst damit mehrere Prozesse aus, die die Gerinnungsprozesse an die Plättchenmembran und an das verletzte Endothel fixieren. Zudem erfüllt Thrombin aber auch einige gerinnungshemmende Funktionen. Durch Bindung an Thrombomodulin, einem Zelloberflächenprotein, aktiviert Thrombin Protein C, welches wiederum die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa inaktivieren kann [90].

Thrombin kommt in freier Form im Blut kaum vor, sondern wird einerseits im Blut an seine Inhibitoren –insbesondere Antithrombin- gebunden, zum anderen an Fibrin bzw. Thrombomodulin an den Endotheloberflächen, wo es Protein C zu Protein Ca aktiviert [89]. Im Unterschied zu Fibrinogen ist Thrombin lebenswichtig. Hypofibrinogämie führt nicht zwingend zu Blutungen und ist mit dem Leben vereinbar [70]. Von den physiologischen Inhibitoren des Thrombins ist Antithrombin der wichtigste. Desweiteren sind der Protein C<sub>a</sub>-Inhibitor (wirksam nur bei Bindung von Thrombin an Thrombomodulin) zu nennen, sowie das multifunktionale  $\alpha_2$ -Makroglobulin [89].

## **2.7. Enzymkinetik**

### **2.7.1. Enzymkinetik allgemein**

Enzyme dienen als Katalysatoren von biochemischen Prozessen. Ohne Enzyme würden die betreffenden Reaktionen viel langsamer ablaufen, viel zu langsam für die Geschwindigkeit des Metabolismus. Enzyme werden auch nach deren Spezifität charakterisiert. Diese beschreibt, wie restriktiv ein Enzym in der Wahl eines Substrates ist [91]. Selektivität hingegen ist eine Eigenschaft des Substrates. Sie ist ein Mass für die Stärke, mit welcher ein Substrat zu verschiedenen Enzymen gebunden wird. Ein selektives Substrat ist gewiss spezifisch, was umgekehrt aber nicht bedeutet, dass alle spezifischen Substrate auch selektiv sein müssen. Substratspezifität ist eine kinetische Eigenschaft. So bedeutet eine höhere Spezifität eine grössere Reaktionsrate verglichen mit einem Referenzsubstrat oder einer Referenzreaktion bei denselben Bedingungen [92]. So sind enzymkatalysierte Reaktionen abhängig von äusseren Bedingungen wie Reaktionstemperatur, pH-Wert und Ionenstärke im Reaktionsmilieu [93].

### **2.7.2. Serin Proteasen**

Proteolytische Enzyme, sogenannte Proteasen, spielen in den Prozessen der Blutgerinnung eine wesentliche Rolle, insbesondere die Serin-Proteasen, die so bezeichnet werden, weil sie einen gemeinsamen katalytischen Mechanismus besitzen, dessen Kennzeichen der Besitz eines besonders reaktiven Ser-Restes ist. Die plasmatischen Gerinnungsfaktoren sind unter anderem die natürlichen Substrate der Serinproteasen. Die Serinproteasen bei Säugetieren werden vorwiegend als inaktive Proenzyme synthetisiert. Diese 'Zymogene' bestehen aus einer Peptidkette. Spaltungen durch andere Proteasen an einer oder mehreren spezifischen Stellen führen zur Aktivierung. Ein Temperaturanstieg um 10°C kann zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms um bis zu 100% führen. Bei höheren Temperaturen, zum Teil schon ab 40°C, beobachtet man einen gegenteiligen Effekt: Nach einem anfänglichen Anstieg mit zunehmender Temperatur nimmt die Reaktionsrate bei weiter steigender Temperatur plötzlich ab, bedingt durch Denaturierung des Enzyms [93].

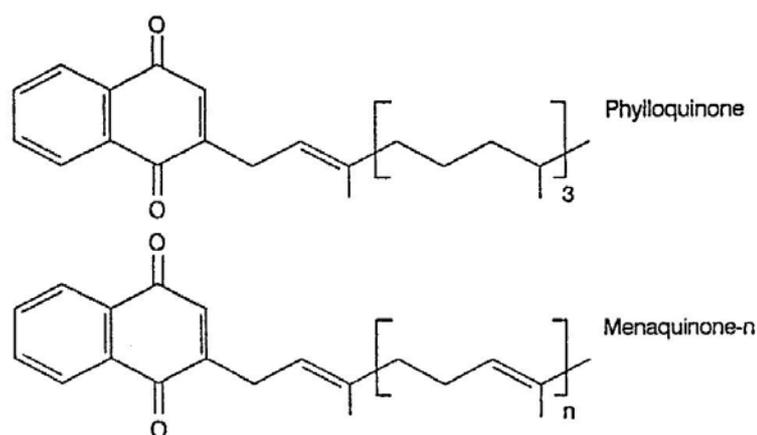
### 2.7.3. Gerinnungskomplexe

Nebst der hohen Spezifität für ihre Proteinsubstrate und deren Protein-Cofaktoren, sowie der Beteiligung von Protein-Cofaktoren überhaupt, ist die Zuhilfenahme von sogenannten Gerinnungskomplexen, situiert auf Membranoberflächen, ein herausragendes Merkmal der plasmatischen Gerinnungsproteine [94].

Für sich selbst ist die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren ein extrem langsamer Prozess. FVIIa ist eine sehr schwache Serinprotease für sich alleine betrachtet. Wenn er aber – eingebettet in Lipidvesikel- an den Gewebefaktor bindet, so steigt seine Enzymaktivität um das Millionenfache an [76]. Ebenso kann zwar Prothrombin durch Faktor Xa in freier Lösung aktiviert werden, aber mit einer 100'000fachen geringeren Reaktionsgeschwindigkeit. Der Komplex von Faktor Xa, Faktor Va, Calcium und Phospholipiden (Prothrombinase-Komplex) führt jedoch zur normalen, d.h. maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Aus dieser Gegenüberstellung ist ein wichtiges Prinzip der Gerinnungskinetik ablesbar: Die Aktivierungsreaktionen sind auf Membranoberflächen, insbesondere auf negativ geladene Phospholipide, angewiesen. So wird z.B. –wie bereits im Abschnitt 2.3. erwähnt- der Faktor II durch die Adsorption an eine Membran zu einem wesentlich leichter zugänglichen Substrat für Faktor Xa mit einer Reaktionsbeschleunigung um den Faktor 100. Dies bedeutet aus Sicht der Enzymkinetik, dass bei normaler Prothrombinkonzentration das aktivierende Enzym (Faktor Xa) durch das Substrat (Faktor II) gesättigt werden kann und damit maximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt. Faktor Va lässt den Umsatz durch einen Faktor annähernd 1000 ansteigen, d.h. die Zahl der Thrombinmoleküle, die durch das Enzym (Faktor IIa) – ebenfalls bei vorhandener Substratsättigung – produziert werden, wird annähernd 1000fach multipliziert [67]. Der vorgelagerte Tenasekomplex  $[IXa \cdot VIIa \cdot PL \cdot Ca^{++}]$  und der Komplex  $[VIIa \cdot TF \cdot Ca^{++}]$  aktivieren den Faktor X. Faktor X nimmt die zentrale Stelle bei der Verbindung zwischen endogenem und exogenem System ein [71]. So ist auch Faktor VIIa eine schwache Serinprotease, die allein kaum wirksam ist. Sie entfaltet ihre eigentliche Wirkung erst durch Komplexbildung mit dem 'Tissue factor', ihre optimale Wirkung, wenn der TF in die gerinnungsaktiven Phospholipide der Zellmembranen des Verletzungsbereichs eingebunden ist [95]. Jeder membrangebundene, Vitamin K-abhängige (siehe Abschnitt 2.8.) Enzymkomplex ist  $10^4 - 10^6$  mal aktiver gegenüber ihren makromolekularen Substraten als die entsprechende Protease alleine in Lösung [88]. Andere Literaturstellen geben sogar eine Vervielfachung der Aktivität um den Faktor  $10^6 - 10^9$  an [96].

## 2.8. Vitamin K

Im Verlaufe einer Versuchsreihe im Jahre 1935 entwickelten Hühner, welche unter lipidfreier Diät gehalten wurden, Blutungen [97]. Die fettlösliche Substanz, welcher man nachweisen konnte, die Blutungen zu verhindern, wurde später Vitamin K genannt. Als sie später aus dem Luzernen-Gewächs und aus verfaultem Fisch isoliert werden konnte, zeigte sich, dass sie in zwei Formen natürlich vorkommt (siehe Abbildung 8): Phylloquinon (Vitamin K<sub>1</sub>) wird in Pflanzen synthetisiert und stellt in der industrialisierten Welt die Hauptquelle dieses essentiellen Vitamins dar. Desweiteren kommt Menaquinon (Vitamin K<sub>2</sub>) vor, welches im menschlichen Darm durch Bakterien synthetisiert wird. Die Höhe des Beitrags dieser Variante am Vitamin K – Bedarf ist aber umstritten [96].



**Abb. 8:** Chemische Struktur von Phylloquinon (Vitamin K<sub>1</sub>) und Menaquinon (Vitamin K<sub>2</sub>) [96]

Die Faktoren II, VII, IX und X sowie die Proteine C und S werden Vitamin-K-abhängig von den Hepatozyten synthetisiert. In Anwesenheit von Vitamin K erfolgt eine postribosomale Carboxylierung von Glutaminsäure-(Glu)- zu  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure-(Gla)-Resten [60]. Vitamin K ist in einen sich mehrfach regenerierenden Zyklus eingebunden (Abbildung 9). Die aktive Form des Vitamin K als Kofaktor der Carboxylase ist die Hydroquinonform (KH<sub>2</sub>). Für die Reaktion der  $\gamma$ -Carboxylierung werden O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> benötigt, Letzteres für die Carboxylierung der Glutaminsäurereste. Aus Vitamin KH<sub>2</sub> entsteht durch den gleichzeitigen Oxydationsprozess Vitamin K-Epoxid (KO). In zwei weiteren Reduktionsschritten entsteht

zunächst aus Vitamin KO das Vitamin K, und daraus dann erneut Vitamin KH<sub>2</sub>. Der letztere Schritt wird ausserdem durch eine NADPH-abhängige Reduktase bewirkt [98].

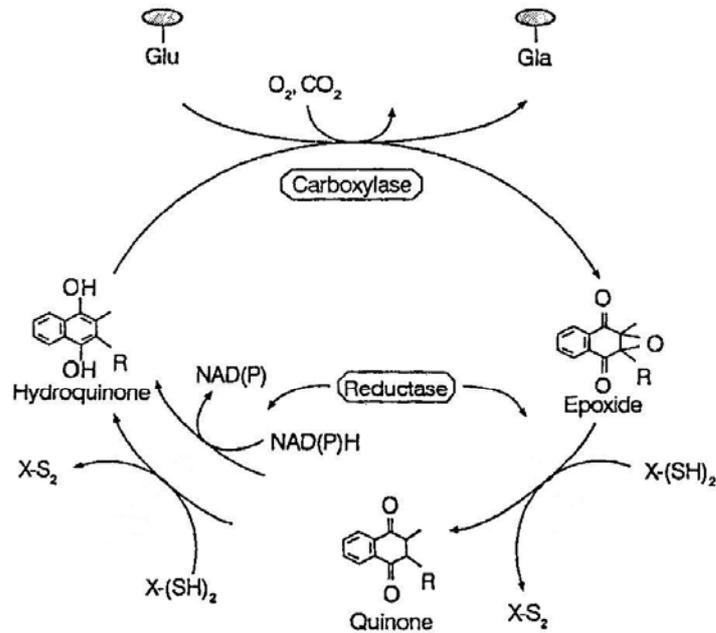


Abb. 9: Vitamin K – Zyklus [96]

## 3. Medikamentöse Antikoagulation

### 3.1. Antithrombotika

Das Ziel eines ungestörten Blutflusses bei gleichzeitiger Bereitschaft zur Hämostase wird unter physiologischen Bedingungen durch das ausgewogene Gleichgewicht von pro- und antikoagulatorischen Mechanismen der Gefässwand, der Thrombozyten sowie des Gerinnungs- und Fibrinolyseystems gewährleistet (hämostatisches Gleichgewicht). Dieses komplexe Gleichgewicht kann durch endogene biologische Mechanismen der Gerinnungshemmung oder durch verschiedene Wirkstoffe in die eine oder andere Richtung verschoben werden. Substanzen, die hemmend in die Gerinnung eingreifen, werden als Antithrombotika bezeichnet. Antithrombotika reduzieren entweder die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten oder die plasmatische Gerinnungsfähigkeit des Blutes und verschieben so das hämostatische Gleichgewicht prinzipiell in Richtung einer verstärkten Blutungsneigung. Demgemäss kann man die Antithrombotika entsprechend ihrem primären Angriffspunkt in zwei Klassen einteilen (Abbildung 10): Die Thrombozytenaggregationshemmer unterdrücken die Aggregation der Thrombozyten in der Primärhämostase. Die Antikoagulanzen hemmen die Fibrinbildung in der Sekundärhämostase.

Die Antikoagulanzen können nach ihrem Wirkmechanismus in zwei Untergruppen eingeteilt werden, nämlich in direkte Antikoagulanzen mit unmittelbarer Hemmung eines Gerinnungsfaktors und indirekte Antikoagulanzen, die ihre hemmende Wirkung über Kofaktoren oder eine Synthesehemmung verschiedener Gerinnungsfaktoren entfalten. Weitere spezifische Unterscheidungen werden nach dem Zielsubstrat, z.B. FX oder Thrombin, getroffen. Zu den indirekten Antikoagulanzen werden insbesondere die seit vielen Jahren eingesetzten Substanzen Heparin und Heparinderivate sowie die oralen Antikoagulanzen vom Typ der Vitamin K-Antagonisten gezählt [99].

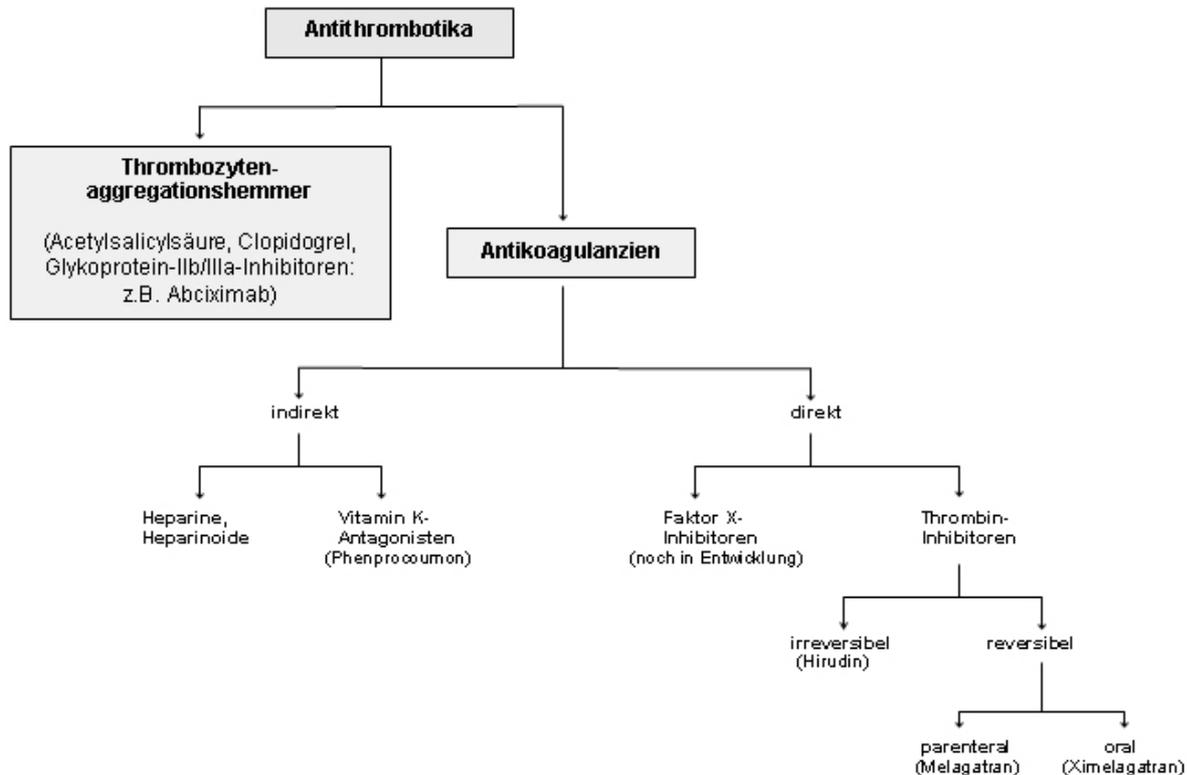


Abb. 10: Einteilung der Antithrombotika, mit Beispielen

## 3.2. Orale Antikoagulation mit Vitamin K - Antagonisten

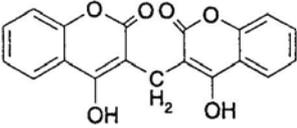
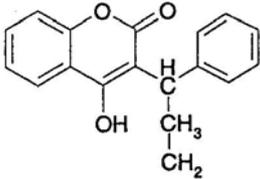
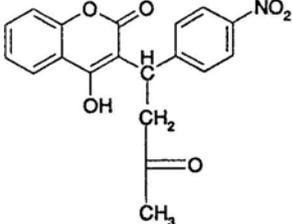
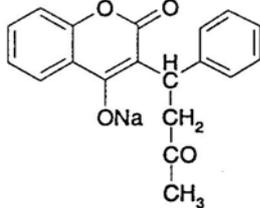
### 3.2.1. Indikation

Vitamin K – Antagonisten werden eingesetzt zur primären oder sekundären Thromboembolieprophylaxe. Indikationen können somit u.a. sein: Rezidivverhütung tiefer Venenthrombosen, Zustand nach Herzinfarkt, Vorhofflimmern, Klappenersatz. Als oral einzunehmende Medikamente können sie im Bedarfsfall über viele Jahre eingenommen werden. Eine Langzeiteinnahme von Antikoagulanzen ist insbesondere wichtig bei der Behandlung von thrombotischen Komplikationen, welche aufgrund eines Vorhofflimmerns aufgetreten sind, bei der Prävention von Herzinfarkten und für die Sekundärprophylaxe von venösen Thrombosen. Zudem kann eine länger dauernde Antikoagulation bei der Therapie von Atherosklerose und Restenose angezeigt sein [100]. Die Dosierung der Vitamin K-Antagonisten richtet sich nach der Indikation.

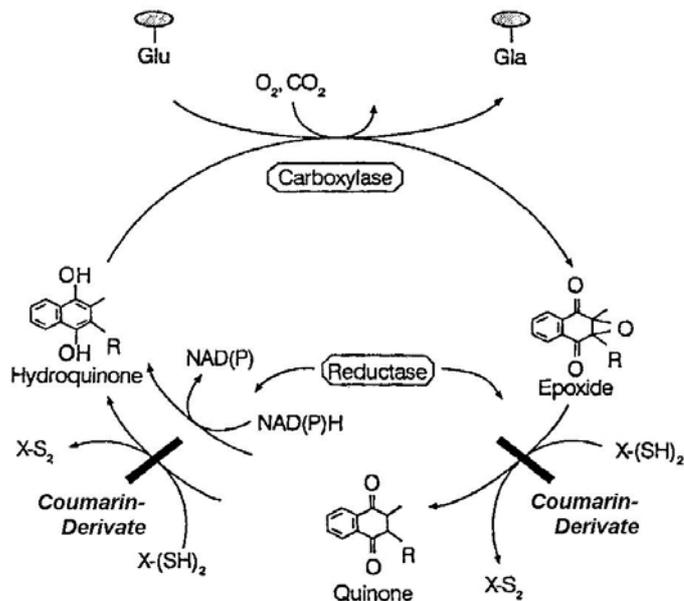
### 3.2.2. Vitamin K - Antagonisten

Die wesentliche Wirkstoffgruppe der Vitamin K – Antagonisten sind die Coumarine, deren Entdeckung (1921) auf die Beobachtung von Blutungen bei Rindern zurückgeht, denen verdorbener Süßklee verfüttert worden war [101]. 1941 wurde Dicoumarol, ein 4-Hydroxycoumarin, als für die Blutungen verantwortliche Substanz ermittelt [102] und 1959 synthetisiert und erstmals klinisch eingesetzt [103]. Therapeutische Bedeutung haben die Hydroxycoumarin-Derivate Phenprocoumon, Acenocoumarol und Warfarin erlangt (Tabelle 2).

**Tab. 2:** Vitamin K – Antagonisten und ihre pharmakologischen Eigenschaften [104]

Dicoumarol	Phenprocoumon	Acenocoumarol	Warfarin
			
Markenbezeichnung	Marcoumar <sup>®</sup>	Sintrom <sup>®</sup>	Coumadin <sup>®</sup>
Vertrieb	Roche Pharma (CH)	Novartis Pharma (CH)	Bristol-Myers Squibb (USA)
Halbwertszeit	90-140 h	3-6 h	30-40 h
Beginn der Wirkung nach Therapiebeginn	48-96 h	24 h	36-72 h
Ende der Wirkung nach Therapiestopp	7-14 d	2 d	3-5 d

Die Coumarinderivate unterbinden im Vitamin K- Zyklus durch Hemmung der Vitamin K-abhängigen Reduktasen die  $\gamma$ -Carboxylierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X bei deren Synthese in den Hepatozyten (Abbildung 11). Das führt zu einem Verlust der Calciumbindungsfähigkeit dieser Faktoren und damit zur Ausbildung von funktionell inaktiven Faktoren (genannt PIVKA-Faktoren [*Protein Induced by Vitamin K Absence*]).



**Abb. 11:** Hemmung der Vitamin K-abhängigen Reduktasen durch Coumarinderivate [98]

In Abhängigkeit von der Halbwertszeit der aktiven Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, sie beträgt zwischen 6h beim Faktor VII und 70h beim Faktor II, sinkt die Gerinnungsfähigkeit des Plasmas im Sinne eines antikoagulatorischen Effekts ab. Eine ausreichende und stabile Antikoagulation wird auf diese Weise im allgemeinen erst nach 3-4 Tagen erreicht. Der Gerinnungsinhibitor Protein C, ebenfalls ein Vitamin K-abhängiges Protein, fällt wie auch der Faktor VII aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von 6 h rasch ab, während Faktor II und Faktor X (50h) langsamer abfallen. Auf diese Weise kann in den ersten Tagen der oralen Antikoagulationstherapie ein Zustand erhöhter Gerinnbarkeit des Blutes entstehen [60].

### 3.2.3. Überwachung der Behandlung

Die Empfindlichkeit auf Vitamin K-Antagonisten ist individuell verschieden und kann sich im Verlauf der Behandlung ändern. Insbesondere fehlt eine einfache Dosis-Wirkungsbeziehung. Faktoren wie Infektionen, Vitamin K-Aufnahme, Alkoholgenuss und zahlreiche medikamentöse und ernährungsbedingte Interaktionen üben einen kleineren oder grösseren Einfluss aus [105] [106]. Da zudem die therapeutische Breite recht eng ist, ist es

unerlässlich, die Blutgerinnung fortlaufend zu kontrollieren und die Dosierung entsprechend anzupassen. Eine zu geringe Dosierung birgt das Risiko einer Thrombose, eine Überdosierung hingegen steigert die Blutungsgefahr. Die Überwachung der Behandlung mit Vitamin K – Antagonisten erfolgt durch Aktivitätsmessung des Prothrombinkomplexes mittels Bestimmung der Thromboplastinzeit oder durch einen adäquaten Test (siehe Abschnitt 4.1.5.). Die erste Bestimmung erfolgt vor Behandlungsbeginn, die weiteren Kontrollen finden ab dem 3.-4. Tag statt. Bei ausreichender Erfahrung mit der Erhaltungsdosis kann man sich später auf grössere Intervalle beschränken, sofern der Zustand des Patienten oder die Gabe von Medikamenten, welche die Wirkung oder die Ausscheidung der Vitamin K-Antagonisten beeinflussen, dies erlauben. Für den therapeutischen Bereich (4.2.3.) gelten die diesbezüglichen Angaben der Bestimmungsmethode beziehungsweise des dazu eingesetzten Thromboplastinreagens [107].

## **4. Monitoring der Medikation mit Vitamin K - Antagonisten**

### **4.1. Thromboplastinzeit**

#### **4.1.1. Geschichte**

Die Entwicklung von auf Plasmagerinnseln basierenden In-vitro-Tests, in welchen die Beobachtung von Fibrinsträngen jeweils den Endpunkt darstellt, spielte in der Erforschung der Blutgerinnungsabläufe schon immer eine wichtige Rolle. Solche Tests wurden beigezogen zur Erläuterung der bereits bekannten Gerinnungskomponenten sowie zum Nachweis der Reaktionen und Beziehungen zwischen den einzelnen Reaktanden in der Blutgerinnung [70]. So konnte 1905 die Verknüpfung zwischen der Zugabe einer Gewebskomponente ins Plasma und der Bildung eines Blutgerinnsels schematisch erklärt werden [108]. Quantitativ wurde diese Reaktion von Armand Quick untersucht, wobei er schliesslich 1935 den sogenannten 'Prothrombinzeit-Test' entwickelte [109], wobei er zu mit Oxalat ungerinnbar gemachtem Plasma einen Überschuss an Thromboplastinreagens (siehe Abschnitt 4.1.4.) und Calcium hinzufügte. Die Zeit bis zur sichtbaren Bildung eines Gerinnsels wurde in direkten Zusammenhang mit der Prothrombinkonzentration im Blut gebracht [110]. Ursprünglich wurde der Test zum Nachweis einer Gerinnungsstörung bei Hühnern verwendet, später erst adaptiert für die Kontrolle der Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten [111]. Heute ist bekannt, dass Quick's Test noch von einer Anzahl anderer Gerinnungsfaktoren beeinflusst wird, namentlich den Faktoren V, VII und X. Dennoch bezeichnet man ihn noch heute international als 'Prothrombin time' (PT) bezeichnet. Als Synonym werden 'Thromboplastinzeit' (TPZ) oder umgangssprachlich 'Quick-Test' verwendet. Nach Schätzungen wurden im Jahre 2000 weltweit rund 800 Millionen 'Quick-Tests' durchgeführt [112].

#### **4.1.2. Klinische Bedeutung**

Der Quick-Test wird primär eingesetzt, um die orale Antikoagulanzen-therapie mit Vitamin K-Antagonisten zu überwachen. Ausserdem wird er verwendet zur Erfassung eines Vitamin K-Mangels und manchmal auch zur Beurteilung der Leberfunktion. Ferner dient er als globaler Test zur allgemeinen Beurteilung des Hämostasepotenzials, z.B. perioperativ oder

bei Krankheitsverläufen – zumeist in der Intensivmedizin. Gelegentlich ist er der erste Hinweis, dass eine angeborene Verminderung eines der plasmatischen Gerinnungsfaktoren vorliegt. Die Gerinnungszeit dieses meistgebrauchten Tests wird primär von der jeweiligen Aktivität der Vitamin K-abhängigen Faktoren II, VII und X des Prothrombinkomplexes bestimmt. Er ist jedoch ein sogenannter globaler Test, da er den Gerinnungsablauf des gesamten `extrinsischen Systems` erfasst und somit auch die Aktivität des Faktor V, die Einflüsse von Inhibitoren (wie z.B. Heparin) sowie einen ausgeprägten Mangel des Substrats Fibrinogen [113].

Damit der Test nur auf Aktivitätsänderungen der Vitamin K –abhängigen Faktoren reagiere, entwickelte Owren 1959 ein abgeändertes Verfahren, wobei er das Thromboplastinreagens mit Faktor V und Fibrinogen ergänzte [114].

#### **4.1.3. Testbedingungen**

Im Quick-Test und seinen Varianten wird durch Zugabe eines Thromboplastin-Reagenz (siehe Abschnitt 4.1.4) und Calciumionen zum Plasma über das `extrinsische System` aus Prothrombin das Enzym Thrombin abgespalten, das seinerseits Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Es wird die Zeit vom Augenblick der Zugabe von Gewebethromboplastin und Calciumionen bis zur fassbaren Fibrinbildung gemessen [119].

#### **4.1.4. Thromboplastin-Reagens**

Die Thromboplastin-Reagenzien haben eine zentrale Bedeutung für den Quick-Test und die Testergebnisse. Sie enthalten Gewebethromboplastine, die aus einem Proteinanteil (Tissue factor) und einem Lipidanteil (gerinnungsaktive Phospholipide) bestehen. Tissue factor und Phospholipide sind notwendig zur Aktivierung des Faktors X durch den Faktor VII [105]. Sie werden entweder als Gewebeextrakte aus unterschiedlichen Organen (z.B. Hirn, Plazenta, Lunge) verschiedener Spezies (z.B. Kaninchen, Mensch, Rind) gewonnen oder rekombinant hergestellt. Die Thromboplastine sind von unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber der Aktivität der Faktoren II, VII und X [113]. Verglichen mit dem klassischen Extraktionsverfahren können die rekombinanten Thromboplastine in reproduzierbarer

Qualität hergestellt werden [115]; auch sie variieren aber miteinander verglichen in ihrer Empfindlichkeit [116]. In Tabelle 3 ist eine Auswahl von Thromboplastinreagenzien aufgeführt.

**Tab. 3:** Auswahl von Thromboplastinreagenzien

Markenname	Hersteller oder Vertrieb	Quelle des Gewebefaktors
Hepato Quick <sup>®</sup>	Roche Diagnostics, D	Kaninchenhirn
Innovin <sup>®</sup>	Dade Behring, D	Rekombinant aus E.coli
Neoplastin Plus <sup>®</sup>	Roche Diagnostics, D	Kaninchenhirn
Thromborel R <sup>®</sup>	Dade Behring, D	Rekombinant aus E.coli
Thromborel S <sup>®</sup>	Dade Behring, D	Human-Plazenta
Manchester Reagent <sup>®</sup>	Helena BioSciences, UK	Kaninchenhirn

#### 4.1.5. Messprinzipien

Der Quick-Test kann im Citratplasma mit verschiedenen Messprinzipien durchgeführt und mit verschiedenen Gerätschaften (Einzelbestimmung manuell, Halbautomaten, Vollautomaten) gemessen werden. Unter bestimmten Bedingungen kann auch Citratvollblut oder direkt Nativblut als Probe eingesetzt werden [113].

Anschliessend sind Beispiele von verschiedenen ursprünglichen und derzeit gängigen Messprinzipien aufgeführt:

- Manuell-mechanische Methode
  - Häkchenmethode: Ein Platinhaken wird in regelmässigen Abständen durch den Gerinnungsansatz (z.B. im Reagenzglas) hindurchgeführt. Der Gerinnungsendpunkt ist als der Zeitpunkt definiert, zu dem ein Gerinnsel am Häkchen hängt [117].
  - Kippmethode: Der Endpunkt wird durch eine Clotbildung nach wiederholtem Neigen der Probe bezeichnet [117].

- Kugelkoagulometer-Methode

Im Gerinnungsansatz befindet sich eine Metallkugel, welche während des Messvorganges in Bewegung gebracht wird (durch Bewegung des Teströhrchens oder aufgrund eines magnetischen Feldes). Beim Einsetzen der Gerinnung verlangsamt sich oder stoppt die Kugelbewegung, was von einem magnetischen Sensor registriert wird [117].

- Optische Methode

Während der Gerinnung einer Plasmaprobe kommt es zur Veränderung der Lichtdurchlässigkeit des Gerinnungsansatzes; diese zeigt die Fibrinbildung an. Die Trübungsbildung kann auch automatisiert erfasst werden [117].

- Chromogene Methode

Analog zu allen anderen Methoden wird bei der chromogenen Methode die Reaktion durch Zugabe eines Thromboplastin-Reagenzes gestartet. Dieses enthält neben Calcium aber zusätzlich auch ein Thrombin-spezifisches chromogenes Substrat. Aufgrund der höheren Affinität des chromogenen Substrates zu Thrombin im Vergleich zu Fibrinogen wird, sobald erste Spuren von Thrombin erzeugt sind, das chromogene Substrat gespalten und eine Abgangsgruppe (Farbstoff) freigesetzt, was zu einer Änderung der optischen Dichte führt. Das Erreichen einer zuvor definierten Wellenlänge wird photometrisch detektiert [118] [119].

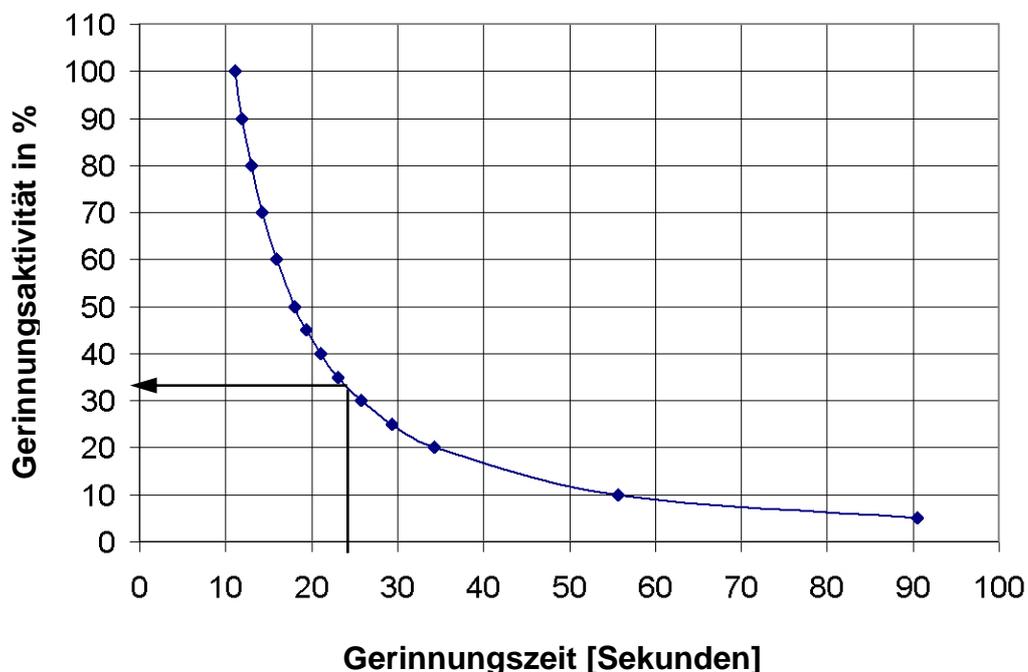
- Point-of-Care-Methoden bei der Selbstkontrolle der oralen Antikoagulanzen-therapie:

Hierzu stehen verschiedene Geräte und Reagenzien zur Testung von Kapillarblut zur Verfügung. Beispiele werden unter 4.3.7. aufgeführt.

#### 4.1.6. Masseinheiten für den Quick-Test

Für den Quick-Test stehen unterschiedliche Masseinheiten zur Verfügung [113]:

- Die 'Thromboplastinzeit' -wörtlich genommen- gibt die gemessenen Sekunden an.
- Der sogenannte 'Quick-Wert' wird in Prozent Gerinnungsaktivität (%) angegeben. Ein Quick-Wert von 100 % bezieht sich auf die Gerinnungszeit in einem Plasmapool von mindestens 40 sogenannten gerinnungsgesunden Normal Spendern nach Zugabe entsprechender Mengen Calcium und desselben Thromboplastinreagens bei Verwendung desselben Messprinzips (Gerätschaft und Methode). Mit zunehmender Verdünnung des Normalplasmas mit physiologischer Kochsalzlösung verlängert sich die Gerinnungszeit des Quicktests. Die Bezugskurve erhält man durch Zuordnung der jeweils gemessenen Gerinnungszeit zu der entsprechenden Plasmaverdünnung. Mit Hilfe dieser Kurve wird der Prozentwert des Quick-Tests aus der gemessenen Gerinnungszeit ermittelt. In Abbildung 12 ist eine solche Bezugskurve dargestellt.



**Abb. 12:** Eichkurve zur Bestimmung des 'Quick-Wertes' in Prozent Gerinnungsaktivität:

Beispiel: Ermittlung eines Quick-Wertes von 34% aus der gemessenen Gerinnungszeit von 23.6 Sekunden

- Bei der Prothrombinzeitratio oder kurz `Ratio` handelt es sich um den Quotienten aus Gerinnungszeit des Patientenplasmas / Gerinnungszeit Normalplasma

Wesentlicher Nachteil von `Thromboplastinzeit`, `Ratio` und insbesondere der häufig verwendeten `Quick-Prozente` ist die Nichtvergleichbarkeit der Messergebnisse zwischen den einzelnen Laboratorien. Dies liegt in der individuellen Empfindlichkeit der verschiedenen Thromboplastinreagenzien für die einzelnen plasmatischen Faktoren des Gerinnungssystems begründet. Schon der Einsatz von unterschiedlichen Thromboplastinchargen, aber auch der Gebrauch von verschiedenen Geräten und Messmethoden führt zu individuellen Bezugskurven. Bei der Angabe der `Ratio` entfällt die Erstellung einer Bezugskurve. Die Methode bietet eine bessere Vergleichbarkeit der Werte an, da nicht absolute Messwerte sondern ein Quotient angegeben wird. Dennoch bleibt auch die Angabe der Thromboplastinzeit als Ratio vom verwendeten Testthromboplastin abhängig.

Um die Zuverlässigkeit der oralen Antikoagulanzenüberwachung zu verbessern und insbesondere eine Vergleichbarkeit der –mit verschiedenen Thromboplastinen ermittelten– Messwerte zu ermöglichen, führte die Weltgesundheitsorganisation WHO 1983 eine neue Masseinheit ein [120]:

- International Normalized Ratio `INR`; sie ist eine modifizierte `Ratio`, die sich auf ein Referenzthromboplastin bezieht. Die `INR` erlaubt die derzeit grösstmögliche Vergleichbarkeit der Messwerte. Im Abschnitt 4.2. wird die Einheit `INR` eingehend besprochen.

## **4.2. Die Masseinheit `INR`**

### **4.2.1. Definition der INR**

Zur Vereinheitlichung der Erfassung der Gerinnungsaktivitäten bei oral antikoagulierten Patienten wurde vom International Committee for Standardization in Haematology (ICSH) und der International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) die International Normalized Ratio (INR) empfohlen und 1983 von der WHO als neue Masseinheit eingeführt.

Unter INR wird die Prothrombinratio verstanden, die erhalten wird, wenn das verwendete Thromboplastin auf die ursprüngliche Thromboplastin-Referenzpräparation der WHO (IRP 67/40) abgeglichen wurde [120]. Die INR wird mittels folgender Gleichung berechnet:

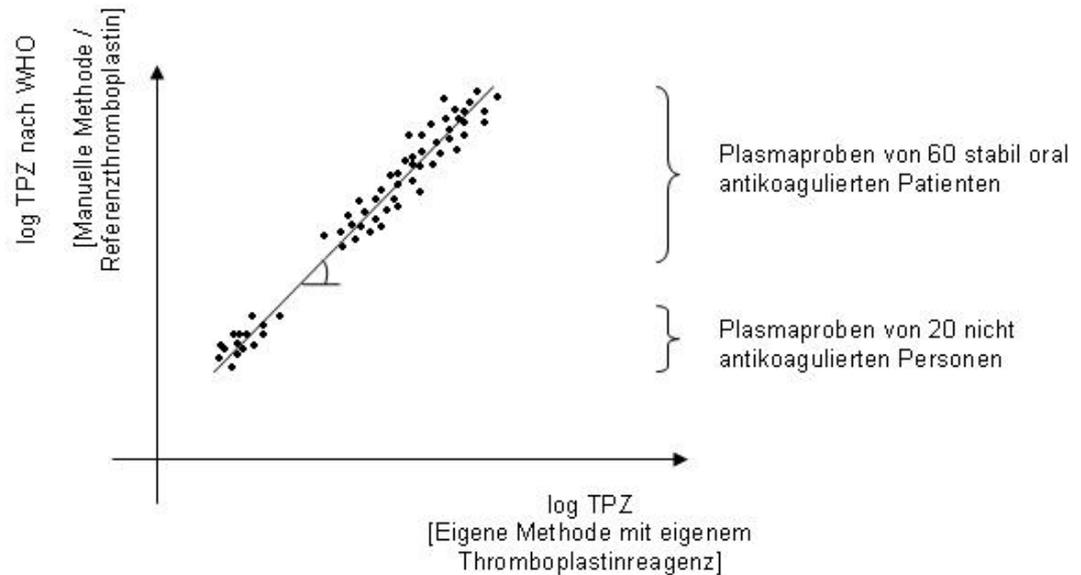
$$\text{INR} = \left[ \frac{\text{Thromboplastinzeit Patient in Sekunden}}{\text{mittlere normale Thromboplastinzeit in Sekunden}} \right]^{\text{ISI}}$$

Im Exponenten steht der International Sensitivity Index (ISI), der ein Mass für die Ansprechempfindlichkeit auf das verwendete Thromboplastin darstellt (siehe Abschnitt 4.2.2.). Die mittlere normale Thromboplastinzeit (MNPT) ist das geometrische Mittel der Thromboplastinzeit von 20 gesunden Erwachsenen beider Geschlechter, bestimmt mit demselben Testsystem unter denselben Bedingungen wie beim Einsatz von Patientenproben [121].

#### 4.2.2. International Sensitivity Index (ISI)

Da sich die Thromboplastine, insbesondere auch die kommerziell angebotenen, in der Empfindlichkeit von der WHO-Referenzpräparation unterscheiden, muss der Hersteller für jede Thromboplastincharge einen Empfindlichkeitsfaktor, den sogenannten International Sensitivity Index (ISI-Wert), ermitteln. Dieser drückt die Abweichung von der WHO-Präparation aus. Je näher der Wert bei 1.0 liegt, desto mehr gleicht das Thromboplastin der WHO-Referenzpräparation, desto höher ist seine Präzision [122] [123]. Um den ISI-Wert eines Thromboplastins bestimmen zu können, müssen nach dem WHO-System 20 normale frische Plasmen und 60 Plasmen von antikoagulierten Patienten unter stabiler Langzeittherapie (mindestens seit sechs Wochen antikoaguliert) mit beiden Thromboplastinen ermittelt werden, wobei als Referenzthromboplastin ein solches derselben Spezies (z.B. human, Kaninchen, Rind) wie das zu testende Routinethromboplastin verwendet werden soll. INR-Werte >4.5 und <1.5 für Patientenplasmen werden ausgeschlossen. Der Test ist mit der manuellen Methode durchzuführen. Der ISI ist die Steigung der Kurve der Thromboplastinzeiten in Sekunden, die in einem doppelt logarithmischen System mit

Berechnung durch das statistische Verfahren der orthogonalen Regression erhalten wird. Dabei sollte das Referenzthromboplastin auf der y-Achse und das zu untersuchende Thromboplastin auf der x-Achse aufgetragen werden (Abbildung 12). Wird der bekannte ISI-Wert des verwendeten Referenzthromboplastins mit dem Wert der Steigung der Geraden multipliziert, erhält man den ISI-Wert des zu untersuchenden Thromboplastins [111].



$$ISI\text{-Wert}_{\text{eigen}} = ISI\text{-Wert}_{\text{Referenzthromboplastin}} \times \text{Steigung der Regressionsgeraden}$$

TPZ = Thromboplastinzeit (in Sekunden)

ISI = International Sensitivity Index

**Abb. 13:** Bestimmung des ISI-Wertes nach Anforderungen der Weltgesundheitsorganisation WHO

### 4.2.3. Therapeutischer Bereich, Zielwert

In Abhängigkeit von der Indikation sind unterschiedliche INR-Zielwerte anzustreben. Im Folgenden ist eine Auswahl aufgeführt [124]:

Lungenembolie	INR 2.5
Kardiomyopathie	INR 2.5
Proximale tiefe Venenthrombose	INR 2.5
Nach Absetzen der oralen Antikoagulation erneute Thromboembolie	INR 2.5
Vorhofflimmern	INR 2.5
Herzklappenersatz, biologisch	INR 2.5
Herzklappenersatz, mechanisch	INR 3.5
Unter oraler Antikoagulation erneute venöse Thromboembolie	INR 3.5
Antiphospholipidsyndrom	INR 3.5

Die Indikationen sind im individuellen Fall spezifischer. Aufgrund differenzierterer Diagnose und unter Berücksichtigung von Familienanamnese, etwaiger weiterer Indikation oder allfälliger früherer Ereignisse sind auch andere INR-Zielwerte möglich. Während rund 15 Jahren nach der Einführung des INR-Wertes wurde versucht, den INR-Wert der Patienten innerhalb eines Bereiches (meist eine INR-Einheit, z.B. 2.0 – 3.0) zu halten. Vermehrt werden nun konkrete INR-Zielwerte angestrebt. Ausführliche Untersuchungen haben gezeigt, dass jederzeit nur rund 50% der INR-Werte einer Patientenpopulation, welche Vitamin K-Antagonisten einnimmt, innerhalb des definierten Bereiches liegen, bzw. innerhalb  $\pm 0.5$  Einheiten neben dem Zielwert). 80% der Patienten sind innerhalb von 0.75 Einheiten neben dem Zielwert [125]. Die Tatsache, dass ein derart hoher Prozentsatz der INR-Werte ausserhalb des therapeutischen Intervalls liegen, könnte auf die Kombination von grossen relativen Standardabweichungen und den Gebrauch von INR-Bereichen statt INR-Zielwerten zurückzuführen sein. Das therapeutische Intervall sollte mehr als Ziel für eine optimale Behandlung denn als Bereich gesehen werden, bei welchem jede Grenzüberschreitung eine Dosisanpassung zur Folge hat. Andernfalls würde ein ständiger 'Pingpong-Effekt' die Therapie massgeblich beeinflussen. Bei einem Zielwert von INR 2.5 und einem angenommenen Variationskoeffizienten von 10.1% ist es nicht möglich 100% der INR-Werte innerhalb des INR-Bereiches zwischen 2.0 und 3.0 zu haben, selbst wenn sich der Patient während der ganzen Messreihe im 'hämostatischen Gleichgewicht' befindet [126]. Diese

Erkenntnisse führten zur Empfehlung, dass es angebrachter sei, einen Zielwert zu definieren, und die Medikation nebst der Beachtung individueller Faktoren wie früherer Ereignisse insbesondere nach der INR-Abweichung zu richten, aber stets unter Berücksichtigung der längerfristigen INR-Stabilität. So gelte ein INR-Wert innerhalb von  $\pm 0.5$  Einheiten neben dem Zielwert normalerweise als zufriedenstellend, Abweichungen von zwischen 0.5 und 0.75 Einheiten, bzw. mehr als 0.75 Einheiten müssten im längerfristigen Zusammenhang gesehen werden. Dabei gelte die oben erwähnte Feststellung als Richtlinie, nämlich dass 50% der INR-Werte innerhalb von 0.5 Einheiten und 80% innerhalb 0.75 Einheiten vom Zielwert entfernt liegen sollen [124].

Auch wenn das 'Anpeilen' von Zielwerten nach den überarbeiteten britischen Richtlinien [124] als vorzuziehende Variante der medikamentösen Einstellung angesehen wird, so ist dennoch die Angabe von INR-Bereichen (z.B. INR 2.0 bis 3.0) immer noch weit verbreitet. Der in diesen Richtlinien höchste Zielwert beträgt INR 3.5. Sollten INR-Werte zwischen 4 und 6 bestimmt werden, so werden eine Dosisreduktion der Medikation oder ein Unterbruch der Therapie empfohlen, bei INR  $>6$  immer ein vorübergehender Stopp der Medikamenteneinnahme. Bei Blutungen oder Blutungsgefahr infolge schwerer 'Hypoprothrombinämie' (das heisst Mangel an den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X), unter anderem bedingt durch Überdosierung von Antikoagulantien vom Wirkungstyp des Dicoumarols, wird Vitamin K (Phytomenadion) als Antidot verabreicht. Weiter soll hier nicht näher auf die medizinischen Aspekte wie Dauer der jeweiligen Therapien eingegangen werden, noch auf die Diskussion, ob bei gewissen Indikationen eine tiefere der höheren Intensität der oralen Antikoagulation vorzuziehen sei.

Während bei einem INR-Wert von 2 das relative Risiko einer grösseren Blutung pro Behandlungsjahr bei 1:250 liegt und bei INR 3.5 1:50, so steigt es darauf exponentiell an (1:10 bei INR 4.7, 1:2.5 bei INR 6, 1: 0.5 bei INR 7.5 und 1:0.02 bei INR 10) [127]. Dies zeigt, dass eine Antikoagulation über INR 4.5 aufgrund des zu hohen Risikos einer Blutung, nicht sinnvoll ist. Nachweislich steigt aber auch das thrombotische Risiko bei INR-Werten kleiner als 2 [128].

#### **4.2.4. Bleibende Probleme bei der Standardisierung der Thromboplastinzeit mittels INR**

Was als erstes von Qualitätskontrollstudien festgestellt wurde, wurde später von zahlreichen Studien bestätigt: Auch das INR-System liefert nicht vollumfänglich vergleichbare Resultate. Bei Messungen von Aliquots derselben Plasmaprobe betrug der Variationskoeffizient der durchschnittlichen INR-Resultate in Multizenterstudien bis zu gut 20 % [129-132]. In Einzelfällen wurden aber auch schon Unterschiede in den mittleren INR-Werten von bis zu 40% festgestellt [139]. Bei einem Variationskoeffizienten von rund 10% hat das Vertrauensintervall eines INR-Wertes von 3.0 bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% also bereits das selbe Ausmass wie der übliche therapeutische Bereich [134]. Die geltenden Richtlinien der WHO bezeichnen Abweichungen ab 10% vom `wahren` INR-Wert als klinisch relevant [135].

Trotz der Verbesserungen, die durch die Einführung der INR erzielt wurden, weist dieses Modell nachweislich einige Unzulänglichkeiten auf [112], auch solche die direkt mit der WHO-Definition zusammenhängen. So wird definitionsgemäss angenommen, die Regressionslinie gehe durch den Punkt (1.1). Nach dem Ersatz des Ur-Thromboplastinreagenzes wurde festgestellt, dass dem nicht zwingend so sei. Der Grund für die Abweichung liegt beim sogenannten PIVKA-Hemmer, einem Enzym, das zwar keine klinische Relevanz hat, aber dennoch die Gerinnungszeiten von oral antikoagulierten Patienten beeinflusst, je nach Testsystem stärker oder weniger. Auf die Gerinnungszeiten von Gerinnungsgesunden hat er keinen Einfluss [136]. Da die Regressionsgerade zur Bestimmung des ISI-Wertes aus einem Anteil von rund einem Drittel Normalplasmen basiert, liegen Abweichungen von INR-Werten bereits zu einem nicht zu unterschätzenden Ausmass bereits in der unbefriedigenden ISI-Ermittlung begründet, welche den Achsenabschnitt vernachlässigt und sich nur auf eine teilweise falsche Steigung stützt [137]. Die Bestimmung des ISI-Wertes basiert somit auf einer vereinfachten Kalibrierung, während aber eine korrekte Umrechnung von Gerinnungszeiten in Gerinnungsverhältnisse viel komplexer ist. So müssten die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Thromboplastine gegenüber dem PIVKA-Hemmer berücksichtigt werden. Es werden in der Literatur entsprechende Methoden vorgeschlagen, die aber aufgrund ihrer Komplexität in der Praxis kaum durchführbar sind [138].

Das INR-System birgt auch weitere Probleme, die nicht direkt auf die oben geschilderte Definitionsproblematik an sich zurückzuführen sind:

- So führte auch die Kalibrierung von neuen Referenzchargen zu Ungenauigkeiten: 1977 bezeichnete die WHO eine Charge eines standardisierten Thromboplastin Reagenzes aus menschlichem Gehirn als die erste internationale Referenzcharge für Thromboplastin [139]. Diese Ur-Referenzcharge wurde später durch Referenzthromboplastine der zweiten und dritten Generation ersetzt. Jedes Mal wenn ein neues Referenzthromboplastin gegen seinen unmittelbaren Vorgänger kalibriert wird, steigt der Fehler im ISI-Wert gemäss Literatur um 5% pro Generation [140]. So haben auch zwei unabhängige Studien gezeigt, dass ein systematischer Unterschied zwischen den INR-Werten besteht, die mit zwei verschiedenen Referenzthromboplastinen der zweiten Generation bestimmt wurden. Im Durchschnitt wichen die INR-Werte um 6% voneinander ab [134].
- INR-Werte, welche aus der selben Patientenprobe aber durch den Gebrauch verschiedener Thromboplastinreagenzien erhalten werden, weichen signifikant voneinander ab. Dies kann selbst dann der Fall sein, wenn beide Thromboplastinreagenzien dieselbe Faktorsensitivität, d.h. gleichen ISI-Wert, aufweisen [141]. In einer Studie unterschieden sich die mittels vier verschiedenen Thromboplastinreagenzien ermittelten INR-Werte derselben Plasmaprobe um durchschnittlich rund 0.4 INR-Einheiten (im Bereich um INR 2.5) [142]. Die Thromboplastinzeit reagiert auf drei der vier Vitamin K-abhängigen Faktoren, nämlich FII, FVII und FX, wobei aber -in Abhängigkeit des verwendeten Thromboplastins- unterschiedlich empfindlich. [143] [144]. In Studien konnte dieser Effekt aber auch Unterschieden in den Patientenproben zugeschrieben werden [142], so den verschiedenen Konzentrationen an Faktor V und Fibrinogen, aber auch den unterschiedlichen Empfindlichkeiten dieser Komponenten gegenüber verschiedener Thromboplastinreagenzien [145]. Um diesen Effekt wenigstens teilweise abschwächen zu können, ist es angebracht, bei der ISI-Bestimmung gegen ein 'artverwandtes Referenzthromboplastin' zu eichen, d.h. zum Beispiel bei Verwenden eines Thromboplastinreagenz humanen Ursprungs, auch ein solches als Referenz zu gebrauchen [146] [116].

- Auch wenn die Hersteller von Thromboplastinreagenzien bei jeder Charge den ISI-Wert für verschiedene Geräte angeben, so kann es vorteilhaft sein, den ISI-Wert jeweils mit dem effektiven Messgerät unter den eigenen Laborbedingungen selber zu bestimmen, was von diversen Studien belegt wird [152] [122].

Zu den bereits erwähnten Unzulänglichkeiten der INR-Standardisierung, den analytischen sowie statistischen Ungenauigkeiten kommen schliesslich noch die präanalytischen Fehlermöglichkeiten hinzu. So ist ein zuverlässiger INR-Wert schliesslich auch abhängig von einer korrekten Blutentnahme, wie auch von adäquaten Lagerungs-, Transport- und Zentrifugationsbedingungen der Blutprobe [147].

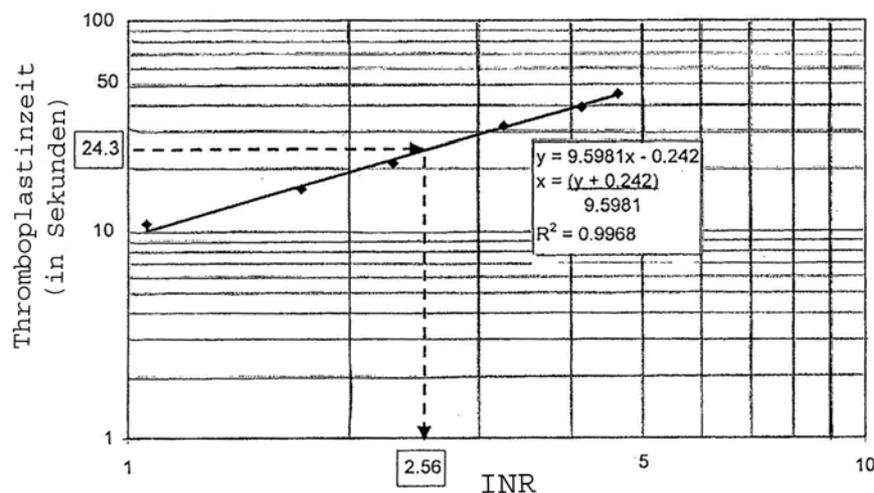
Die Unsicherheit im INR-Wert ist also das Resultat von analytischen Fehlern und Ungereimtheiten zwischen der definitionsgemässen Berechnung der INR und Gerinnungsfaktoren in der Patientenprobe [134].

Abgesehen von den besprochenen Fehlerquellen im INR/ISI-System, ist es für die Laboratorien zudem praktisch nicht möglich, für jede Charge Thromboplastin eine korrekte ISI-Bestimmung nach WHO-Anforderungen durchzuführen. Zur limitierten Verfügbarkeit des korrekten Referenzpräparates kommt der Aufwand, frische Plasmen von stabil antikoagulierten Patienten und gesunden Erwachsenen für jede Eichkurve zu beschaffen, und die Tests zudem in kurzem Zeitraum manuell durchzuführen, was alles in allem nicht zumutbar ist [111]. Die Empfehlung, die Genauigkeit des INR-Wertes mit einer Multizenterstudie [121] jeweils zu erhöhen, ist für den täglichen Laboratoriumsbetrieb illusorisch.

Um die ISI-Bestimmung in der Praxis zu vereinfachen, wurden zertifizierte lyophilisierte Standardplasmen entwickelt. Diese erlauben, auf weniger komplizierte Weise, den ISI-Wert basierend auf der WHO-Bestimmung zu ermitteln [111].

Eine alternative Idee, den INR mittels INR-Kalibratoren direkt über eine einfache Eichkurve zu ermitteln [130,138,148-150] (siehe Abbildung 14), bekommt in letzter Zeit zunehmend Aufschwung. Diese `direkte INR-Bestimmung` weist eindeutige Verbesserungen auf, insbesondere scheint sie eine valable Möglichkeit zu sein, nebst einfacherer Testprozedur sowohl die Genauigkeit der INR-Werte desselben Probenmaterials im Vergleich

verschiedener Laboratorien zu verbessern [151,152] wie auch die Präzision zu erhöhen [152,153]. Die Methode kommt ohne vorgängige Bestimmung der MNPT und des ISI-Wertes aus; diese können aber im doppeltlogarithmischen System abgeleitet werden (x-Achse: log `INR-Werte der Kalibrationsplasmen`; y-Achse: log `Gerinnungszeiten in Sekunden`). Dem laborspezifischen ISI-Wert liegt die Geradengleichung  $[\log(\text{sec}) = \frac{1}{\text{ISI}} * \log(\text{INR}) + \log(\text{MNPT})]$  zu Grunde. Ein –zumindest theoretisches- Problem besteht aber darin, dass die MNPT und der ISI-Wert eigentlich definitionsgemäss Bestandteil der INR sind. Desweiteren scheint auch bei dieser Methode das Resultat zuverlässiger zu sein, wenn man INR-Kalibratoren verwendet, die gegen ein artgleiches Referenzthromboplastin geeicht wurden wie das verwendete Thromboplastinreagenz [154]. Weitere Untersuchungen über die Zuverlässigkeit der `direkten INR-Bestimmungen` sind zur Zeit im Gange. Insbesondere ist abzuklären, ob eine doppeltlogarithmische Darstellung der Eichgerade notwendig ist, oder ob eine lineare Ableitung der INR-Werte ebenso zuverlässig ist. Es gibt Studien, die eine doppeltlogarithmische Variante begründen [147,155] und solche, die für eine einfach-lineare Darstellung sprechen [156]. Auf jeden Fall sind die Hersteller von solchen INR-Kalibratoren gefordert, genaue und reproduzierbare INR-Kalibratoren zu entwickeln [111]. Zur Zeit ist der Gebrauch von INR-Kalibratoren für die `direkte INR-Bestimmung` immer noch in einer `Experimentalphase` und ist noch nicht Bestandteil der geltenden Richtlinien der WHO.



**Abb. 14:** Beispiel für eine `direkte INR-Bestimmung` mittels INR-Kalibratoren über eine Eichkurve. Die Thromboplastinzeiten (y-Achse) werden an Ort für jeden INR-Kalibrator bestimmt und gegen den entsprechenden INR-Wert (x-Achse; bestimmt vom Hersteller mittels Eichung gemäss WHO gegen ein offizielles Referenzthromboplastin) aufgetragen. Die Skalierung der Achsen ist doppeltlogarithmisch dargestellt. Im Beispiel weist eine Plasmaprobe eine Thromboplastinzeit von 24.3 Sekunden auf. Dieser Wert führt über die Eichgerade direkt zum entsprechenden INR-Wert (2.56). [157]

## 4.3. Selbstmessung der Thromboplastinzeit

### 4.3.1. Geschichte

In der Regel wird der Quick-Test durch den Hausarzt oder in gewissen Ländern in einer Klinik durchgeführt. Der Arzt legt dann entsprechend dem INR-Wert die Medikamentendosis fest. Die Idee und das Konzept der Patientenselbstkontrolle wurden 1986 in Deutschland entwickelt. Es begann mit einer jungen Patientin, die nach einer Herzklappen-Operation dauerhaft orale Antikoagulantien einnehmen musste und daher beschloss, ihre Blutgerinnungswerte selbst zu bestimmen. Diesem Konzept schlossen sich bald weitere Betroffene an, die sich in ihrem Arbeitsleben durch die regelmässigen Sprechstundenbesuche sehr beeinträchtigt fühlten. In Deutschland wurde 1994 das CoaguChek<sup>®</sup>-Messgerät von der Firma Boehringer Mannheim<sup>©</sup> (heute Roche Diagnostics<sup>©</sup>) eingeführt. Zur CoaguChek<sup>®</sup>-Serie gehören heute die weltweit meistverbreiteten Geräte zur Selbstbestimmung der Gerinnungswerte. Seit der Einführung der Selbstmessung in der Schweiz 1998, wurden auch hierzulande gute Erfahrungen mit dieser Therapiekontrolle gemacht [158]. Mittlerweile ist international anerkannt, dass Patienten, die ihre Blutgerinnung selbst kontrollieren, neben einer verbesserten Lebensqualität auch die Qualität und den Erfolg ihrer Therapie steigern. Heute führen weltweit etwa 130'000 Personen ein Selbstmanagement ihrer Therapie mit oralen Antikoagulantien durch, wovon der grösste Anteil, rund 110'000 Personen, in Deutschland lebt. Man schätzt, dass sich rund 50-60% der langfristig oral antikoagulierten Patienten für das Patienten-Selbst-Management (PSM) qualifizieren [159]. Das Modell des PSM erfordert aber noch vielerorts eine Verlagerung von Blickwinkel und Finanzierungsmittel, insbesondere durch die Krankenkassen. Ein erfolgreiches PSM erfordert eine Ausrüstung, welche sich mancher Patient nicht bereit ist, anzuschaffen, insbesondere wenn die Kosten für Gerät und Teststreifen von der Krankenkasse nicht übernommen werden [160].

Mit der laufenden Erweiterung der klinischen Indikationen für den Einsatz von Vitamin K-Antagonisten steigt auch die Nachfrage nach langfristigem qualitativ hochstehendem Management dieser Therapie. Und dieser Herausforderung muss sich nicht nur der Fortschritt in der medikamentösen Behandlung stellen, sondern auch die Form der Betreuung. PSM hat sich als eine solche Verbesserung für die Langzeit-Therapie mit oralen Antikoagulantien

erwiesen [161]. Denn die Frage ist heutzutage nicht, ob Patienten mit chronischen Einschränkungen mit ihrer Krankheit zurechtkommen, sondern wie sie es tun [162].

#### **4.3.2. Voraussetzung**

Voraussetzung für ein PSM ist nebst der Indikation für eine orale Langzeit-Antikoagulation ein interessierter und motivierter Patient, der über ausreichende manuelle Geschicklichkeit und Sehkraft sowie über die Fähigkeit verfügt, Verständnis für die Zusammenhänge der therapeutischen Antikoagulation zu erwerben. Entscheidend ist die Bereitschaft zur Übernahme von Verantwortung. Da sich jeweils sämtliche Reagenzien auf dem Teststreifen bzw. der Testkassette befinden und direkt Kapillarblut aufgetragen wird, entfällt eine Probenaufbereitung. Der Messvorgang wird durch das Auftragen der Blutprobe ausgelöst und das Ergebnis wird automatisch angezeigt. Auch ein speziell technisches Verständnis ist somit nicht notwendig. Das Erlernen des Patienten-Selbstmanagements ist prinzipiell an kein Lebensalter gebunden. Sollten Patienten nicht bzw. nicht mehr in der Lage sein, das PSM durchzuführen, so kann dies auch von Angehörigen übernommen werden [163]. Man unterscheidet die Patientenselbstkontrolle (PSK) vom Patientenselbstmanagement (PSM). Bei der Patientenselbstkontrolle führt der Patient die Bestimmung des INR-Wertes durch, während der behandelnde bzw. spezialisierte Arzt die Dosis des Antikoagulans festlegt. Im Patienten-Selbstmanagement wird der Patient aktiv in die Therapie eingebunden. Hier übernimmt er nach entsprechender Schulung sowohl die Überwachung der Intensität der gerinnungshemmenden Behandlung als auch die Dosisanpassung des Antikoagulans je nach Messwert. Es gibt auch Mischmodelle, in welchen der Patient seine Messwerte per Telefon einer zentralen Stelle übermittelt [164] oder gleich zu Hause in ein Computerprogramm eingibt, welches ihn in der Dosisfindung unterstützt. Unabdingbar für die Selbstmessung ist aber eine standardisierte und strukturierte patientengerechte Schulung mit theoretischen und praktischen Inhalten zur oralen Antikoagulation. Hierzu steht ein evaluiertes Schulungsprogramm zur Verfügung [165] [163]. Trotz Schulung und PSM verbleibt der Patient weiter in der Betreuung des Arztes.

### 4.3.3. Studien

Klinische Studien an kleinen Patientengruppen in den USA und in Kanada wiesen bereits Ende der 80er Jahre darauf hin, dass mit dem PSM eine gute Einstellung der oralen Antikoagulation erreicht werden konnte [166,167]. Die gesteigerte Lebensqualität konnte ebenfalls belegt werden [165,168]. Heute ist erwiesen, dass das PSM in Bezug auf Überwachung der Therapie und Aufrechterhaltung eines gewünschten Zustandes der besten Spezialklinik ebenbürtig ist [112].

Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Zeit, in der sich die INR-Werte innerhalb des therapeutischen Bereiches bewegen, und dem Verhindern von Komplikationen – dem eigentlichen Ziel der Behandlung. Verschiedene prospektive randomisierte Studien belegen den höheren Prozentsatz an INR-Werten innerhalb eines definierten Zielbereiches verglichen mit der konventionellen Therapieüberwachung durch den Hausarzt oder die Klinik (Tabelle 4). Dies ist auf die höhere Messfrequenz zurückzuführen. Durchschnittlich konsultieren oral antikoagulierte Patienten monatlich einmal den Hausarzt oder eine Klinik zwecks Bestimmung des INR-Wertes. Studien zeigten, dass aber bei einer einmal wöchentlichen Testfrequenz eine längere 'Verweildauer' im therapeutischen Bereich besser erreicht werden kann. Diese Frequenz ist praktisch nur mit der Patientenselbstkontrolle zu erreichen. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass die wöchentliche Messung der Gerinnungszeit durch den Patienten zu Hause verglichen mit der konventionell geführten Gruppe die Komplikationsrate sowohl bei Blutungen (4.5% /Jahr vs. 10.9% / Jahr) als auch bei thromboembolischen Ereignissen (0.9 % / Jahr vs. 3.6% / Jahr) deutlich senkt [169]. Eine neuere Studie spricht dem PSM eine Senkung des Risikos für eine schwere Blutung oder für eine schwere Thromboembolie um 70% zu [170]. Die Senkung der Komplikationsrate durch das Gerinnungsselbstmanagement bewirkt eine Reduktion der Ausgaben im Gesundheitswesen. In einer Studie von 1999 wurden die durchschnittlichen Kosten für die herkömmliche Therapieüberwachung auf 2062 Deutsche Mark (290 DM direkte Kosten und 1772 DM Kosten für die Komplikationsbehandlung) beziffert, das Selbstmanagement pro Patient und Jahr schlug mit 1343 DM (619 DM und 724 DM) zu Buche, was einer Einsparung von rund 700 DM entspricht [171]. Kosten, die z.B. durch Langzeitbehinderung, häusliche Krankenpflege, Arbeitsausfall oder Verlust der Erwerbsfähigkeit verursacht werden, sind darin noch nicht einmal berücksichtigt. Diese dürften den grösseren Kostenfaktor ausmachen.

Die Krankenkassen und die weiteren involvierten Versicherungen sollten sich dessen bewusst sein.

**Tab. 4:** Vergleich des Prozentsatzes an Messergebnissen innerhalb eines definierten Zielbereiches nach Art der Therapieüberwachung. Eine Auflistung verschiedener Studien.

Referenz	Anzahl Patienten	INR innerhalb Zielbereich		p
		Selbstmanagement	konventionelle Überwachung beim Hausarzt	
Watzke [172]	113	84%	74%	nd
Cromheecke [168]	50	55%	49%	0.06
Beyth [173]	325	56%	32%	<0.001
Körtke [174]	1155	78%	61%	<0.001
Fitzmaurice [175]	56	66%	72%	ns
Völler [176]	202	68%	59%	0.0061
Menéndez [170]	737	59%	56% *	ns

\*spezialisierte `Antikoagulationsklinik`

Die Vorteile der Patientenselbstkontrolle und des Patienten-Selbstmanagements sind vielfältig und lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen:

- deutlich höhere Anzahl der INR-Werte im therapeutischen Bereich und somit eine stabilere Einstellung bzw. geringere Schwankungen der INR-Werte
- Reduzierung von Thromboembolien und Blutungskomplikationen
- Reduzierung von Anzahl und Dauer der Klinikaufenthalte
- Unabhängigkeit von länder- und herstellerepezifischen Reagenzien
- grössere Sicherheit bei veränderten Lebensbedingungen
- Zunahme der Lebensqualität
- Kosten-Nutzen-Effektivität

Der Selbsttest wird immer auf demselben Gerät durchgeführt. Ergebnisse können daher nicht durch unterschiedliche Methoden oder Reagenzien verfälscht werden. Ausserdem kann das Ergebnis mit früheren Werten verglichen werden. Veränderungen werden sofort erkannt, und Therapieanpassungen können unverzüglich vorgenommen werden.

#### 4.3.4. Kalibrierung von Point-of-Care-Methoden

Kriterien für die Kalibrierung existieren vorerst nur für konventionelle Laborsysteme zur Bestimmung der Thromboplastinzeit. Für 'Point-of-Care-Geräte' (POC) zur Bestimmung der Thromboplastinzeit aus Vollblut wurden noch keine spezifischen Richtlinien erarbeitet. Die Kalibrierungsmethode ist den Herstellern überlassen. In einigen Punkten lassen sich die Empfehlungen, welche sich ursprünglich auf Messungen mit Plasma bezogen, einfach auch auf POC-Methoden anwenden. Der relative Variationskoeffizient der Steigung der Regressionsgeraden von zertifizierten INR-Werten und der zu prüfenden Methode ermittelten INR-Werten beschreibt die Präzision der Steigung der Kalibrationsgeraden. Für eine ausreichende Präzision der Kalibrierung soll gemäss WHO dieser relative Variationskoeffizient  $<3.0\%$  betragen [177]. Er wird berechnet aus Variationskoeffizient der Steigung dividiert die Standardabweichung multipliziert mit 100 [146]. Die Präzision der Werte lässt sich auch bei POC-Geräten erhöhen, wenn gegen ein 'artverwandtes' Referenzthromboplastin kalibriert wurde [178].

Das wesentliche Problem in der Kalibrierung von POC-Geräten zur Bestimmung von INR-Werten besteht darin, dass sich der ISI-Wert nach Definition auf Messungen mit Plasma bezieht, POC-Geräte aber direkt Vollblut als Probe einsetzen. Es wurden verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen, wie POC-Geräte dennoch bestmöglich kalibriert werden könnten. Eine davon basiert auf der herkömmlichen orthogonalen Regressions nach WHO zur Bestimmung des ISI-Wertes (ebenfalls mit Proben von 60 stabil antikoagulierten Patienten und 20 Gerinnungsgesunden), wobei aber parallel Messungen mit Vollblut (gemessen mit POC-Gerät) und mit Plasma aus jeweils derselben Probe (bestimmt mittels manueller Methode nach WHO) durchgeführt und die Thromboplastinzeiten gegeneinander aufgetragen werden [146]. Dieses Kalibrationsverfahren ist aber immer noch recht komplex und aufgrund der Erfordernis von frischen Vollblutproben ziemlich aufwendig und ebenfalls in der Praxis kaum anwendbar. Bei gewissen POC-Geräten scheint es möglich zu sein, den ISI-Wert zu benutzen, der mittels der herkömmlichen Methode ausschliesslich aus Messungen mit Plasma bestimmt wurde. Dieses Verfahren führt aber nicht bei allen getesteten Geräten zu zuverlässigen Resultaten, weil sich bei denen die so bestimmten ISI-Werte signifikant von den ISI-Werten nach herkömmlicher Methode unterscheiden [179]. Es wurde ein Verfahren entwickelt, mittels welchem man einen entsprechenden Korrekturfaktor bestimmen kann.

Diese Möglichkeit der Korrektur gründet auf der Korrelation von Vollbut und Plasma derselben Probe im doppeltlogarithmischen System [180].

Studien belegen, dass sich die Genauigkeit (Differenz zum `wahren INR-Wert`) signifikant verbessern lässt, wenn der ISI-Wert mittels einer Multizenteranalyse bestimmt wird. In einem Beispiel liess sich die Abweichung zwischen dem mittleren, von einem POC-Gerät ermittelten INR-Wert und dem `wahren INR-Wert` so von 19% auf 9.5%, in einem weiteren Fall von 6.8% auf 0.3% senken [181]. Die Durchführung einer Multizenteranalyse für eine jede ISI-Wert-Bestimmung ist natürlich nicht realistisch.

Die ermittelten Kalibrationsparameter werden meistens in den Teststreifen kodiert oder in einem chargenspezifischen Chip, der unabhängig von den Teststreifen ins Gerät eingeführt wird, entsprechend programmiert. Insbesondere im Hinblick auf Studien zur Validierung von Kalibrationsverfahren wird es als Nachteil angesehen, wenn die Parameter (meist ISI und MNPT) vom Benutzer nicht verändert werden können [146].

#### **4.3.5. Validierung von Point-of-Care- Geräten**

Zur Validierung der mit POC-Geräten kreierte Resultate werden –im Vergleich zu einer Referenzmethode- meist eine lineare Regression und eine Analyse mittels gepaartem t-Test durchgeführt. Idealerweise müssten auch hier jegliche neue POC-Geräte gegen den `Gold-Standard` der WHO, die INR-Bestimmung mittels manueller Kipptechnik unter Verwendung eines internationalen Referenzthromboplastins, verglichen werden. Die einzige Studie [132], die POC-generierte Resultate mit den `wahren Werten` verglich, die gemäss WHO ermittelt wurden, zeigt eine mittlere Abweichung der durchschnittlichen INR-Werte (mittlere Unterschiede in zehn Zentren) von 15.2%. Der durchschnittliche `wahre INR-Wert` betrug 2.52, der durchschnittliche mittels eines POC-Typs ermittelte INR-Wert war 2.91. Ein anderes POC-Gerät wies eine durchschnittliche Differenz vom `wahren INR-Wert` von 7.1% (INR 2.59 vs 2.40) auf. Beide Geräte sind auf dem Markt. Der Unterschied zwischen den Durchschnittswerten der beiden POC-Geräte betrug 21.3% (INR 2.91 vs 2.40) [132].

Ein Vergleich mit der Referenzmethode nach WHO ist nicht immer möglich, eine Validierung mittels Multizenterstudie erst recht nicht. Und so werden Präzision und Genauigkeit neuer Geräte bzw. Methoden meist mit einem eigenen Standardverfahren verglichen [182].

POC-Methoden sind aber zu vielen Faktoren unterworfen, als dass man eine bessere INR-Korrelation als bei herkömmlichen Labormethoden erwarten dürfte. So ist schon die Präzision geringer, es fehlen Kalibratorsubstanzen für Vollblut und es bestehen Ungenauigkeiten in der Bestimmung des ISI. Bis ein standardisiertes Kalibrationsverfahren für POC-Geräte erarbeitet ist, werden signifikante systematische Abweichungen der Resultate, ausgedrückt in INR, nicht zu vermeiden sein [172]. In einer Studie wurden die zufälligen, nicht beeinflussbaren Fehler von den systematischen Fehlern unterschieden und `quantifiziert`. Vor allem beim Vergleich zweier Methoden, die einander ähnlich sind, d.h. z.B. beide automatisch und unter Verwendung von reinem Thromboplastin gleichem Ursprungs, ist die Ursache für die zufälligen Fehler zum grössten Teil Patienten-abhängig. D.h. die einzelnen Patientenproben reagieren nicht bei beiden Messsystemen gleich und können demnach gar nicht dasselbe Resultat angeben, auch nicht bei adäquater Kalibrierung. Es wurde an einem praktischen Beispiel statistisch berechnet, dass wenn einige Patienten auf demselben POC-Gerät mit Vollblut alle einen korrekten INR 3.0 messen würden –systematische Fehler also ausgeschlossen-, dann würden Plasmaproben derselben Patienten gemessen -ebenfalls ohne systematische Fehler- mit einer herkömmlichen Labormethode Werte zwischen INR 2.4 und 3.6 ergeben (95% Vertrauensintervall), d.h. Differenzen bis zu 20%; bereits ohne Einbezug der `üblichen` systematischen Fehler nehmen die Abweichungen klinisch relevante Ausmasse an. Es wird die Erarbeitung eines neuen Standardisierungsverfahren für POC-Geräte empfohlen, welches sich direkt auf Messungen mit Vollblut bezieht. Solange ein solches nicht bestünde, müsse man die patienten-spezifischen Abweichungen bei der Festlegung der INR-Zielbereiche (die sich auf herkömmliche Plasmabestimmungen der INR-Werte beziehen) berücksichtigen [183].

#### **4.3.6. Qualitätskontrolle**

In Empfehlungen der `British Society of Haematology` werden im Bereich der Therapie des Patientenselbstmanagements der oralen Antikoagulation (PSM-OAK) verschiedene Arten der Qualitätskontrolle unterschieden [184]. Einerseits sollten betreffende Patienten weiter von einem Hausarzt oder einer Klinik betreut werden, wo sie auch mindestens alle sechs Monate für eine Therapiebesprechung vorsprechen sollten. Was die Qualitätskontrolle der Geräte anbelangt, so werden drei weitere Arten der Qualitätssicherung genannt:

- Eine elektronische Qualitätskontrolle des Gerätes sollte möglichst vor jedem Einsatz durchgeführt werden; dies geschieht - meist automatisch beim Anschalten- um falsche Ergebnisse aufgrund Fehler in der Elektronik und in der Stromversorgung auszuschliessen.
- Regelmässige `externe Qualitätskontrolle`, so z.B. halbjährliche parallele Messungen mit einem Vergleichsgerät beim Hausarzt oder in einer Klinik. Beim Vergleichsgerät muss es sich um eines handeln, dessen Genauigkeit und Richtigkeit seinerseits den Anforderungen externer Ringversuche entspricht. Variieren die Resultate von Home-Care-Gerät und Vergleichsmethode nicht mehr als 0.5 INR-Einheiten wird dies als ausreichend beurteilt.
- Als `interne Qualitätskontrolle` werden Messungen mit sogenannten Kontrollösungen bezeichnet. Diese Messungen bezwecken die Kontrolle des Messverfahrens als Ganzes, insbesondere die Qualität der Teststreifen. Sie sollen einmal monatlich und mit jedem ersten Teststreifen einer neuen Streifencharge durchgeführt werden. Eine Studie mit zwei Testgeräten hat aufgezeigt, dass beim Qualitätstest eine Messung mit nur einer Kontrollösung eigentlich ungenügend ist. Je nach Gerät wären für eine aussagekräftige Überprüfung der Zuverlässigkeit der INR-Resultate Messungen mit drei bzw. fünf verschiedenen Kontrollösungen notwendig. Kein Resultat darf dabei mehr als 15% vom deklarierten INR-Wert abweichen. Obschon gemäss WHO eine Abweichung von 10% klinisch relevant ist, werden hier –aufgrund der bekannten geringeren Präzision von POC-Systemen-  $\pm 15\%$  toleriert [185].

### 4.3.7. Existierende Messsysteme

In Tabelle 5 sind ein paar der zur Zeit im Handel erhältlichen Systeme für das PSM-OAK und eine Auswahl deren Merkmale aufgeführt.

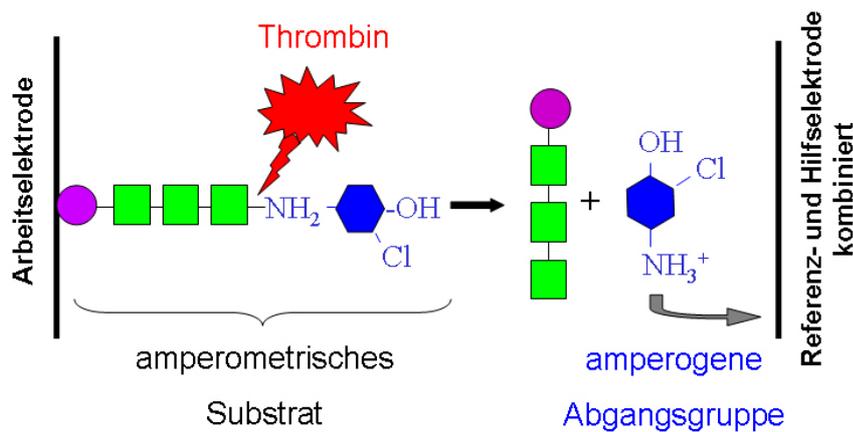
**Tab. 5:** Einige im Handel erhältlichen Systeme für das PSM-OAK und eine Auswahl deren Merkmale

	<b>CoaguChek S<sup>®</sup></b>	<b>INRatio<sup>®</sup></b>	<b>ProTime<sup>®</sup></b>	<b>Harmony<sup>®</sup></b>
<b>Firma</b>	Roche Diagnostics	HemoSense	International Technidyne Corporation	LifeScan / Johnson&Johnson
<b>Prinzip der Endpunktbestimmung</b>	Magneto-optische Reflexionsphotometrie; eingebettete Eisenoxidpartikel	Elektrochemische Detektion; Impedanzänderung	Photometrische Detektion; Bewegungsstopp in Kapillarkanal	Photometrisch; Änderung der Lichttransmission bei Bewegungsstopp in Kapillarkanal
<b>Thromboplastin</b>	Kaninchenhirn	Rekombinant human	Rekombinant human	
<b>Probenmaterial</b>	Kapillarblut oder venöses Vollblut	Kapillarblut	Kapillarblut oder Venöses Vollblut	Kapillarblut
<b>Erforderliche Blutmenge</b>	mind. 10µl	15µl	30µl	20µl
<b>Kalibrierung</b>	Chargenspezifischer Codechip	Streifencharge manuell einzugeben		Streifencharge manuell einzugeben
<b>Qualitätskontrolle</b>	Kontrolllösungen	Auf Teststreifen integriert	In Testcuvette integriert	In Gerät integriert
<b>Ausmasse</b>	17.3cm x 12.5cm x 4.5cm	16cm x 7.5cm x 5cm	22cm x 11cm x 6.1cm	20cm x 8.4cm x 5.6cm
<b>Gewicht</b>	454g	300g	800g	366g
<b>Speicherkapazität</b>	60 Messwerte	60 Messwerte	30 Messwerte	75 Messwerte
<b>Gerätepreis</b>	Ca. SFr 1700.-	Ca. 1000 US\$	Ca. 1600 US\$	
<b>Preis pro Teststreifen</b>	Ca. SFr 5.-	Ca. SFr 5.-	Ca. SFr 6.50.-	
<b>ISI-Wert</b>	1.8	1.2	1.0	1.0 – 1.5
<b>Zeit bis zur Ergebnisanzeige</b>	1 min	2-3 min	5-6 min	1.5 min
<b>INR-Bereich</b>	0.8 – 8.0	0.7 – 7.5	0.8 – 9.9	0.8 – 8.0

## 5. Biosensor-System zur INR-Bestimmung mittels Amperometrie

Vorliegende Arbeit basiert auf den Ergebnissen der Dissertationsschrift von Anita Moresi, 'Development of an Amperogenic Biosensor for Thrombin' [186]. Darin wurden die Grundlagen für eine amperometrische Erfassung der Thrombinbildung in-vitro geschaffen. Kernpunkte waren die Auswahl eines amperometrischen Substrates für Thrombin – zusammengesetzt aus Schutzgruppe, Oligopeptid und amperometrischer Abgangsgruppe- wie auch die Zusammensetzung eines geeigneten Reaktionsgemisches zur In-vitro-Aktivierung der Blutgerinnung.

Mit 'Tos-Gly-Pro-Arg-4-Amino-2-chlorophenol AcOH', im Folgenden als 'Pefa 007-56' bezeichnet, konnte ein den Anforderungen entsprechendes Substrat gefunden werden. Es wird von Thrombin selektiv gespalten, und deren amperogene Abgangsgruppe '4-Amino-2-chlorophenol' erfüllt bei einem Potential von 300 mV die geforderten Kriterien wie gute Löslichkeit in wässrigen Systemen, hohes zyklisches Signal bei tiefem Potential und lineare Abhängigkeit der Stromstärke von der Konzentration. Thromborel<sup>®</sup> R (ein rekombinantes Thromboplastin von DadeBehring<sup>®</sup>, Marburg D), und der Zusatz von Phosphatidylserin ergänzen im Wesentlichen das Reaktionsgemisch. Das entwickelte elektrochemische System zur Bestimmung der Thromboplastinzeit als Ganzes [187] und das Substrat im Speziellen [188] sind Gegenstand von Patenten. Das Prinzip der enzymatischen Spaltung des Substrates durch Thrombin mit der Bildung der amperogenen Abgangsgruppe ist in Abbildung 15 schematisch aufgeführt.



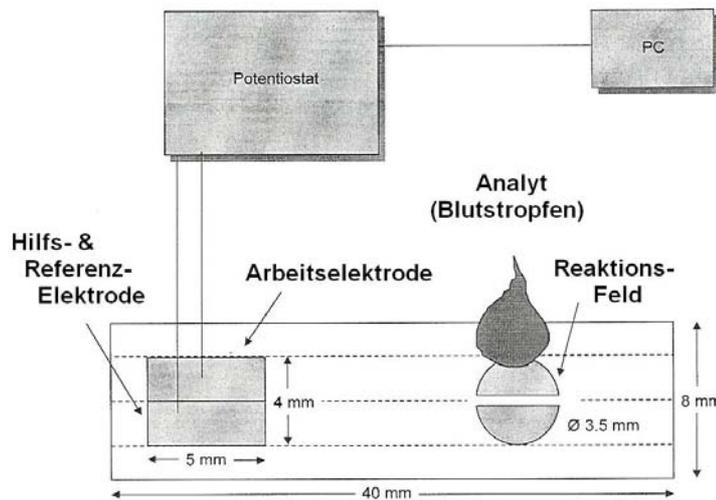
**Abb. 15:** Enzymatische Spaltung von `Tos-Gly-Pro-Arg-4-Amino-2-chlorphenol` (Schutzgruppe `Tosyl` violett, Oligopeptid `Tos-Gly-Pro-Arg` grün) durch Thrombin (rot) mit Bildung der amperogenen Abgangsgruppe (blau)

Im Folgenden ist das Reaktionsgemisch nach A. Moresi und seine Zubereitung aufgeführt:

1. Das gefriergetrocknete Thromborel R<sup>®</sup> wird nach Anleitung des Herstellers rekonstituiert. Diese Lösung wird 1:1 mit Aqua bidest. verdünnt.
2. Eine `Lösung` von Phosphatidylserin (5.0 µMol/ml) wird in HEPES-Puffer (0.25% Natriumdeoxycholat enthaltend) durch fünfminütige Behandlung im Ultraschallbad gebildet. Darauf wird mit HEPES-Puffer bis zu einer totalen Phosphatidylserinkonzentration von 0.83 mg/ml verdünnt. Die Thromborel R<sup>®</sup>-Verdünnung gemäss 1) wird im Verhältnis 24:1 zur `Phosphatidylserin-Lösung` gegeben; die Lösung wird `Thromboplastinlösung` genannt.
3. Das Substrat `Pefa 007-56` (0.5 mM) wird mittels fünfminütiger Behandlung im Ultraschallbad in der Thromboplastinlösung gelöst. Diese Lösung wird `Reaktionsgemisch` genannt.
4. Auf jeden Teststreifen bzw. jedes Reaktionsfeld werden 10µl Reaktionsgemisch gefügt und während 2 h bei 30°C luftgetrocknet. Die Teststreifen sind trocken und lichtgeschützt zu lagern.

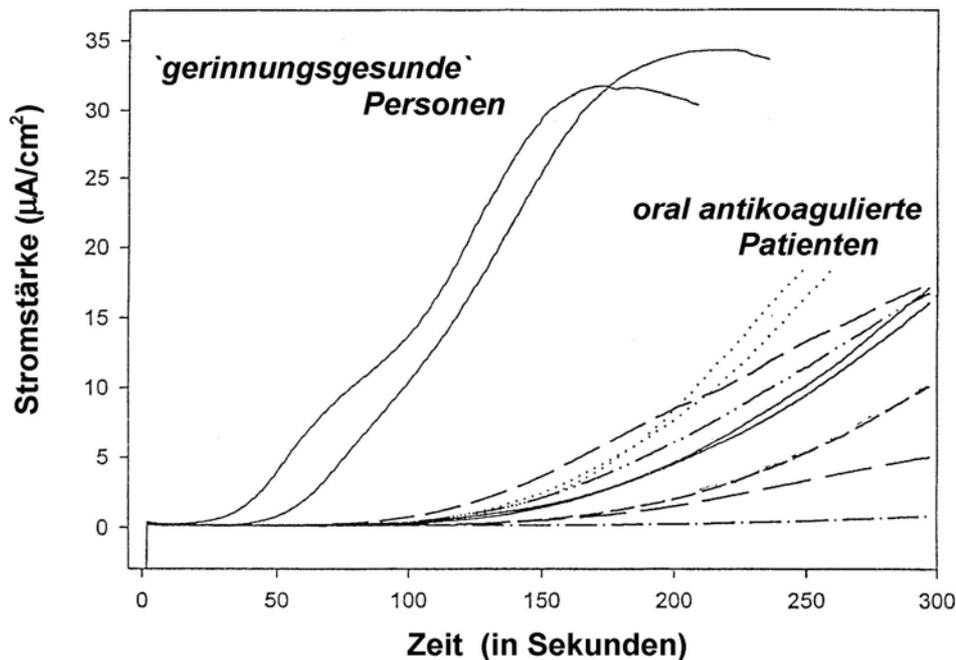
Beim Auftragen von 10µl Probe (citriertes Plasma oder Kapillarblut) auf das Reaktionsfeld des Teststreifens wird die chronoamperometrische Aufzeichnung gestartet (Potential 1: 0mV,

Potential 2: 300mV; Potentiostat/Galvanostat PGP201, Radiometer Copenhagen). Die Oberfläche der Arbeitselektrode (Platin) wird mit  $0.035 \text{ cm}^2$  bezeichnet. Eine Software (VoltaMaster 1, Version X9606-2.50 n°905V250N067) konvertiert die detektierten effektiven Stromstärken in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Konvertierungsfaktor 28.57). Abbildung 16 zeigt schematisch einen Teststreifen und die Anordnung bei einer chronoamperometrischen Messung.



**Abb. 16:** Teststreifen und Anordnung bei chronoamperometrischer Messung [187]

Erste Messungen mit Plasmaproben oral antikoagulierter Patienten zeigten, dass die Steigung im linearen Bereich der chronoamperometrischen Messungen mit den Aktivitätsprozenten linear ( $r = 0.84$ ) und mit den entsprechenden INR-Werten negativ exponentiell ( $r = 0.82$ ) korrelieren. A. Moresi zeigte schliesslich, dass mit dem entwickelten amperogenen Biosensorverfahren die Thrombinbildung selektiv gemessen werden könne, diese mit der Intensität der oralen Antikoagulation im Plasma auch korreliere, und dass Messungen mittels Kapillarblut antikoagulierter Patienten innerhalb eines vernünftigen Zeitrahmens prinzipiell möglich seien. Abbildung 17 zeigt das Beispiel einer Aufzeichnung des chronoamperometrischen Verlaufes, welcher bei gerinnungsgesunden Personen bzw. bei oral antikoagulierten Patienten indirekt die Bildung von Thrombin wiedergibt (jeweils aus Kapillarblut in Reaktion mit Reaktionsgemisch nach A. Moresi).



**Abb. 17:** Chronoamperometrischer Kurvenverlauf (Kapillarblut; Reaktionsgemisch A. Moresi)

Spätere Untersuchungen zeigten, dass die Messzeit bis zum Erreichen von 300 nA (im Folgenden  $t_{300}$  genannt) einen besseren Messparameter darstellt. Dieser 'Endpunkt' ist einfacher und schneller zu bestimmen als die Steigung und korreliert mindestens ebenso gut mit den entsprechenden INR-Werten.

In vorgängigen Arbeiten wurde also ein System entwickelt, mit welchem die Blutgerinnung mittels vorgetrocknetem Reaktionsgemisch auf Teststreifen 'in-vitro' aktiviert und das gebildete Enzym Thrombin chronoamperometrisch erfasst werden kann. Es wurde gezeigt, dass unter definierten Bedingungen (Elektrodenfläche, Spannung, Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, Probenmenge) die Zeit zwischen Beginn der Reaktion und Erreichen einer Stromstärke von 300 nA ( $t_{300}$ ) mit der Intensität der oralen Antikoagulation korreliert und somit als Messprinzip für den 'Quick-Test' verwendet werden kann.

Ziel vorliegender Arbeit war, die bestehenden Grundlagen in Zusammenarbeit mit dem Industriepartner, welcher auch für die technische Umsetzung besorgt war, zu einem im Patientenselbstmanagement der Therapie mit oralen Antikoagulantien brauchbaren Biosensor

weiterzuentwickeln und die Funktionsfähigkeit unter anderem in einer abschliessenden klinischen Studie zu belegen.

Um technisch umsetzbar zu sein, die behördlich vorgeschriebene Zulassungspflicht erfüllen zu können, die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten, aber auch den Gesetzen des freien Marktes gerecht zu werden, muss ein solches Biosensor-System bestimmten Anforderungen genügen. So muss die chemische Reaktion auf den Teststreifen auch mit Kapillarblut reproduzierbar sein, das Messgerät die richtigen Werte in der üblichen Masseinheit anzeigen und das Biosensor-System als Ganzes nicht zuletzt auch vom Patienten einfach und sicher zu bedienen sein. Die Präzision der Messungen und die Chargenvariabilität hängen von einer reproduzierbaren Herstellung und einer bekannten Lagerungsstabilität des Reaktionsgemisches ab. Die richtige Interpretation der chemischen Reaktion ist Folge eines adäquaten Algorithmus, aber auch einer korrekten Eichung jeder Streifencharge. Der Benutzerfreundlichkeit und –sicherheit schliesslich muss von den Lagerungsstabilität der Teststreifen über die Einfachheit jeder Manipulation bis zur Verständlichkeit der Gebrauchsanleitung Rechnung getragen werden.

## **Kapitel II: Entwicklung des Biosensor-Systems**

---

Im Unterschied zu den in Kapitel I, Abschnitt 5 geschilderten und in Abbildung 16 dargestellten Teststreifen, wurden die weiteren Entwicklungsschritte auf Teststreifen mit leicht modifizierter Geometrie vorgenommen: Reaktionsfeld rechteckig (3.0mm x 4.4mm; Fläche der Arbeitselektrode 0.054 cm<sup>2</sup> ; Konvertierung der effektiven Stromstärken in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  mittels Faktor 18.51), kein `Steg` mehr zwischen Arbeits- (Palladium) und Hilfs/Referenzelektrode (Ag/AgCl). Die Messungen fanden alle unter 300mV Spannung statt. Als Beginn der Messung galt der Moment des Probenauftragens.

### **1. Selektion verschiedener Reaktionsgemische**

#### **1.1. Einleitung**

Thromborel R<sup>®</sup>, von A. Moresi schliesslich als Thromboplastinreagenz verwendet, sollte infolge einer Produktebereinigung nach Firmenfusion von der Firma Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, ausser Handel genommen werden. So stand die Suche nach einem neuen Aktivierungsreagenz an, und somit die Entwicklung und Erprobung eines neuen Reaktionsgemisches.

Um zuverlässige Resultate zu erhalten, sollten die Vergleichsmessungen möglichst bei jeweils denselben Umgebungsbedingungen durchgeführt werden. Wo dies nicht möglich war, wurden die Messtemperatur- und Luftfeuchtigkeitsunterschiede bei den Interpretationen der Messresultate berücksichtigt.

## 1.2. Versuch einer reinen Kontaktaktivierung

### Absicht

Die notwendig gewordene Neuentwicklung eines Reaktionsgemisches gab Anlass zu einem neuen Versuchsansatz: Man wollte die Gelegenheit nutzen und versuchen, die Aktivierung der Blutgerinnung auf den Teststreifen ausschliesslich auf `intrinsischem Weg` zu erreichen, d.h. über eine `Kontaktaktivierung` mittels gerinnungsaktiven, negativ geladenen Oberflächen, analog der aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) [189]. Vorteile versprach man sich mit potentiell lagerungsstabileren Teststreifen, befände sich ja kein, in dieser Hinsicht problematisches Protein im Reaktionsgemisch.

Ob sich entsprechende Formulierungen schliesslich trotz andersartiger Aktivierung dennoch als Reagenz für einen `Quicktest` eignen würden, sollte erst Inhalt anschliessender Studien sein.

### Material

- Potentielle Aktivatorssubstanzen:

Aerosil 200	Degussa AG, Frankfurt
Aerosil R 812	Degussa AG, Frankfurt; 1437
Aerosil R 972	Degussa AG, Frankfurt; 1443
Bentonit	Fluka AG Buchs CH, 11957
Ellagsäure	Fluka AG Buchs CH, 45140
Glasfibrillen $\varnothing$ 1.7 $\mu\text{m}$ , Art. 711061	SEKISUI, Fine chemical company, Osaka, Japan
Glasfibrillen $\varnothing$ 4.5 $\mu\text{m}$ , Art 705141	SEKISUI, Fine chemical Company, Osaka, Japan
Glaspulver; Partikelgrösse nicht definiert;	
Pasteur-Pipette pulverisiert	Pasteur-Pipetten Fortuna, 3.526
Glassplitter Pasteur-Pipette; Partikelgrösse nicht definiert	Pasteur-Pipetten Fortuna, 3.526

## Imprägnierte Kügelchen aus Sarstedt Monovetten

zur Serumbestimmung	S-Monovette Z, 0.1063
Kaolin Ph. Eur.	Fluka AG Buchs CH, 60609
Kieselgur G	Merck, 8129
Li Chroprep Si 60 (SiO <sub>2</sub> ) ø 15-25µm	Merck, 9336

- Weitere Substanzen und Materialien:

HEPES-Puffer, 50mM, KCl 100 mM, pH 7.4	Fluka AG Buchs CH, 54461
L-α-Phosphatidylserin	Sigma, P-7769
Polypropylenröhrchen 5 ml	
Polystyrolröhrchen 5ml	
Reagenzglas	
IKA-Schüttler MTS 2	Labortechnik Janke&Kunkel
Drehrad `Eigenbau`	

## Methoden

Für eine Vorselektion von potentiellen Substanzen sollte eine erste Testreihe zuerst in grösserem Massstab erfolgen. Hierfür wurden jeweils 1ml frisch entnommenes venöses Vollblut uncitriert in mit jeweils 10mg Aktivatorsubstanz versetzte Polypropylenröhrchen (5ml) gegeben. Ein Drehrad erlaubte, bis zu 16 radial angeordnete Röhrchen gleichzeitig, regelmässig und reproduzierbar umzuschütteln: Radius (Radmitte-Röhrchenboden) 12 cm, Neigungswinkel Drehrad zu Horizontalen 50°, Drehgeschwindigkeit (6 Umdrehungen pro Minute). In einer weiteren Versuchsanordnung wurden die Polypropylenröhrchen vertikal im Reagenzglashalter auf einem `Schütteltisch` (`Schüttler`) fixiert. Die Versuche wurden hier bei konstanten Schüttelbewegungen (700/min) durchgeführt. Es wurde jeweils die Zeit gemessen von der Blutzugabe an bis zur sichtbaren Gerinnung der Probe. Als Referenz diente ein Polypropylenröhrchen ohne Aktivatorsubstanz. Mit den erfolgversprechendsten Aktivatorsubstanzen wurde die Versuchsanordnung mit frischem Citratplasma als Probe wiederholt, wobei zusammen mit 500 µl Probe zusätzlich 500 µl CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (25mM) in HEPES-Puffer zur Citratkompensation beigegeben wurden. Die `Kontaktaktivierung` sollte

möglichst auch mit Plasmaproben möglich sein, da dies die weiteren Arbeiten wegen der einfacheren Probengewinnung und –Lagerung vereinfachen würde. Beim Versuch im grösseren Massstab ging es nicht um die Absolutzeiten; wichtiger waren die relativen Zeitdifferenzen, insbesondere der Vergleich zur Probe ohne Aktivatorsubstanz. Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur statt.

Mit den erfolgversprechendsten Substanzen sollten anschliessend Versuche auf den Teststreifen unternommen werden, dabei sollten dieselben Konzentrationen zum Einsatz kommen. Die Aktivatorsuspensionen wurden kurz vor dem Aufpipettieren auf das Reaktionsfeld des Teststreifens zur Pulverdispergierung kurz ins Ultraschallbad gehalten und anschliessend vortexiert. Die Detektion erfolgte wie unter Kapitel I, Abschnitt 5 geschildert.

## Resultate

Tabelle 6 zeigt die Resultate der Versuchsreihe mit Vollblut.

**Tab. 6:** `Reine Kontaktaktivierung`: Resultate der Versuchsreihe mit Vollblut, geordnet nach zunehmender Gerinnungszeit

Aktivatorsubstanz	Zeit bis Gerinnung von Vollblut (in Minuten)	
	auf `Drehrad`	auf `Schüttler`
Reagenzglas ohne Aktivatorsubstanz	2	2
Ellagsäure	3 ¼	2
Kaolin	2 ½	3
Kieselgur G	3 ½	2
10 imprägnierte Kügelchen aus Sarstedt-Monovetten zur Serumgewinnung	4	2
Glasfibern ø 1.7 µm	3	3
Bentonit	4	3 ¾
Glasfibern ø 4.5 µm	5	3
Glaspulver	6	2
Aerosil 200	7	3
Glassplitter Pasteurpipette	8	3
Li Chroprep Si 60	9	5
Polystyrolröhrchen ohne Aktivatorsubstanz	13	12
Aerosil R 812	14	11
Aerosil R 972	21	9
Polypropylenröhrchen ohne Aktivatorsubstanz	22	10

Der Zusatz aller Aktivatorsubstanzen führte zu einer schnelleren Gerinnung verglichen mit der Reaktion ohne Aktivatorzusatz. Insbesondere Ellagsäure, Kieselgur G, Kaolin, Bentonit, beide Glasfibersorten sowie das pulverisierte Glas brachten das Blut in ähnlichem Zeitrahmen zur Gerinnung wie die zur Serumgewinnung üblichen imprägnierten Kügelchen aus Sarstedt-Monovetten. Ellagsäure wurde für weitere Versuche nicht mehr berücksichtigt, da sie als licht- und luftempfindliche Substanz für eine Anwendung auf Teststreifen nicht in

Frage kommen dürfte, insbesondere da andere Substanzen ebenso gute Resultate lieferten. In Tabelle 7 sind die Resultate der Messungen mit Plasma aufgeführt.

**Tab. 7:** 'Reine Kontaktaktivierung': Resultate der Versuchsreihe mit Citratplasma (Mischverhältnis 1:1 mit  $\text{CaCl}_2$  25mM in HEPES-Puffer), geordnet nach zunehmender Gerinnungszeit

<b>Aktivatorssubstanz</b>	<b>Zeit bis Gerinnung von Plasma auf Drehrad (in Minuten)</b>
Kaolin	5 ½
Glasfibrn $\varnothing$ 1.7 $\mu\text{m}$	7
Glasfibrn $\varnothing$ 4.5 $\mu\text{m}$	7
Bentonit	9
Kieselgur G	9
Glaspulver	11
Polypropylenröhrchen ohne Aktivatorssubstanz (nur Calciumzusatz zur Citratkompensation)	30

Alle Substanzen führten im Vergleich zur Referenz (Röhrchen ohne Aktivatorssubstanz) zu einer deutlich schnelleren Gerinnung. Alle sechs Substanzen wurden für die Versuche auf den Teststreifen weiterverwendet:

Bei keiner Streifensorte konnte eine deutliche Aktivierung (bzw. Substratspaltung) detektiert werden (Messungen mit Plasma). Ein langsames Ansteigen der Stromkurve mit der Zeit war zwar zu erkennen, doch die erreichten wenigen  $\mu\text{A}$  (ca. 0.6  $\mu\text{A}$  nach 15 min) genügten den Ansprüchen bei weitem nicht. Versuche mit Vollblut statt Plasma führten zwar zu etwas höheren Werten (ca. 2  $\mu\text{A}$  nach 15 min); diese waren aber immer noch vernachlässigbar klein (einzelne Versuche nicht aufgeführt).

## Folgerung

Manche Aktivatorssubstanzen erwiesen sich im makroskopischen Verfahren als gerinnungsaktivierend sowohl im Plasma wie auch im Vollblut. Immobilisiert auf Teststreifen konnte aber mit keiner der potentiell möglichen Substanzen eine zufrieden stellende Thrombinbildung beobachtet werden. Auch nicht ein Zusatz von Phosphatidylserin in

bekannter Konzentration (Kapitel I, Abschnitt 5) –wie bei der eigentlichen aPTT-Bestimmung üblich [189]- konnte das Problem lösen, ebenso wenig eine stetige Vibration des Reaktionsgemisches während der Messung (Resultate nicht gezeigt). Die Zugabe einer Thrombinlösung (50U/ml) anstelle einer Blutprobe erzeugte jeweils deutliche Stromkurven. Dies widerlegte die Vermutung, dass eine zu hohe Aktivatorkonzentration die Elektroden abdichtete.

Die durchgeführten Testreihen schliessen die Möglichkeit einer reinen 'intrinsischen' Gerinnungsaktivierung noch nicht aus. So könnten andere Konzentrationen und Zusammensetzungen an Aktivatorsubstanzen und Phospholipide einen Effekt auch auf den Teststreifen zeigen. Da die Aktivatorsubstanzen mit Ausnahme der Ellagsäure nicht gelöst vorliegen, ist im Unterschied zur Bestimmung der 'Thromboplastinzeit' hier möglicherweise wesentlich, dass eine gewisse Inkubationszeit und / oder die Einhaltung einer bestimmten Temperatur eingehalten wird [189]. Das Biosensor-System lässt aber eine solche Präanalytik nicht zu, ebensowenig ein richtiges Schütteln oder Rühren während des Messvorganges. Dass auch dies relevant für die Auslösung der Gerinnung unter den interessierenden Bedingungen sein könnte, zeigte die schnellere Gerinnung unter stärkerem Schütteln mittels 'Schüttler' im Vergleich zur einfacheren Durchmischung beim Versuch mittels 'Drehrad'.

Aus genannten Gründen sollte sich die weitere Suche nach einem Reaktionsgemisch auf eine herkömmliche Aktivierung mittels Thromboplastinreagenz konzentrieren.

### **1.3. Prüfung verschiedener Thromboplastinreagenzien**

#### **Absicht**

Es sollte ein neues Reaktionsgemisch zur 'trockenchemischen' Aktivierung der Blutgerinnung in-vitro entwickelt werden. So war insbesondere das Thromborel R<sup>®</sup> durch ein neues kommerzielles Thromboplastinreagenz zu ersetzen. Als Grundlage und Vergleich sollte das Reaktionsgemisch mit Thromborel R<sup>®</sup> gemäss Kapitel I, Abschnitt 5 dienen.

## Material

Hepato Quick <sup>®</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim D
Innovin <sup>®</sup>	Dade Behring, Marburg D
Manchester Reagent <sup>®</sup>	Helena Biosciences, Sunderland UK
Neoplastin Plus <sup>®</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim D
Thromborel R <sup>®</sup>	Dade Behring, Marburg D
Thromborel S <sup>®</sup>	Dade Behring, Marburg D
Aerosil 200	Degussa AG, Frankfurt
Bentonit	Fluka AG Buchs CH, 11957
Bentonit für wässrige Systeme (Bentonit WS)	Fluka AG Buchs CH, 11959
Bentonit SF	Serva Heidelberg D, 14515
Glasfibern $\varnothing$ 1.7 $\mu$ m, Art. 711061	SEKISUI, Fine chemical company, Osaka, Japan
Kaolin Ph. Eur.	Fluka AG Buchs CH, 60609
Kieselgur G	Merck, 8129
Na-Deoxycholat	Fluka AG Buchs CH, 30970
HEPES-Puffer, 50mM, KCl 100 mM, pH 7.4	Fluka AG Buchs CH, 54461
L- $\alpha$ -Phosphatidylserin	Sigma, P-7769

## Methode

### 1. Reaktionsgemisch mit Thromborel R<sup>®</sup> als Vergleich

In Tabelle 8 sind die Komponenten des Reaktionsgemisches mit Thromborel R<sup>®</sup> (Reaktionsgemisch gemäss A. Moresi) aufgeführt, welche in der folgenden Versuchsreihe (Absatz 2) ersetzt oder deren Konzentration geändert wird. Die Herstellung der Streifen folgt dem im Kapitel I Abschnitt 5 geschilderten Prozedere, inklusiv der übrigen Komponenten wie Na-Deoxycholat und HEPES-Puffer.

**Tab.8:** Auswahl von Komponenten in 1ml Reaktionsgemisch mit Thromborel R<sup>®</sup>

<b>Thromborel R<sup>®</sup> - Stammlösung</b>	<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	<b>Phosphatidylserin</b>	<b>Substrat Pefa 007-56</b>
480µl	480µl	40µl	0.33 mg

## 2. Selektion verschiedener Thromboplastinreagenzien

Es wurden im Austausch zu Thromborel R<sup>®</sup> die Thromboplastinreagenzien Hepato Quick<sup>®</sup>, Innovin<sup>®</sup>, Neoplastin Plus<sup>®</sup>, Thromborel S<sup>®</sup> und Manchester Reagent<sup>®</sup> getestet. Durch Konzentrationsänderungen der jeweiligen Thromboplastinstammlösung, der Phospholipide, durch unterschiedliche Zugaben von CaCl<sub>2</sub>, wie auch von 'Oberflächenaktivatoren' (siehe Abschnitt 2.2.), wurden systematisch unterschiedliche Streifen hergestellt, bis sich die Streifenrezeptur hinsichtlich dieser Komponenten nicht mehr verbessern liess. Schliesslich wurde durch Änderung der Substratkonzentration geprüft, ob dieses in optimaler Konzentration vorlag.

Aufgrund der grossen Anzahl von Versuchen mit der dazu noch grösseren Anzahl von notwendigen Blutproben (jeweils Mehrfachmessungen) war es nicht möglich Kapillarblut oder frisches, uncitriertes Vollblut einzusetzen. Die Streifen wurden deshalb vorerst alle auf Messungen mit Normalcitratplasma (NCP) optimiert. Als Oberflächenaktivatoren wurden Kaolin, Kieselgur G, Bentonit, Bentonit für wässrige Systeme, Bentonit-SF, Aerosil 200 und Glasfibern 1.7µm in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Für die Optimierung des Reaktionsgemisches wurde primär Wert auf eine kurze Zeit bis Erreichen von 5.56 µA/cm<sup>2</sup> (300 nA) gelegt. Zusätzlich wurden aber auch Reproduzierbarkeit, Maximalstromstärke (mind. 25 µA/cm<sup>2</sup>), Steigung der Kurve (möglichst gross) und Grundstrom (sollte möglichst reproduzierbar bleiben und nicht zu hoch sein) in die Entscheidungen miteinbezogen. Die Messungen wurden möglichst bei der gleichen Temperatur durchgeführt; allfällige Abweichungen wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Als Vergleich diente die Strom-Zeit-Kurve, welche mit dem 'Reaktionsgemisch Thromborel R<sup>®</sup>' aufgezeichnet wurde. Pro Thromboplastinreagenz wurden durch die Kombination von verschiedenen Inhaltsstoffen in unterschiedlicher Konzentration zwischen zehn und 50 verschiedene Reaktionsgemische getestet, insgesamt 204. Bei dieser Versuchsreihe wurde NCP als Probe (jeweils 10 µl)

eingesetzt. Es wurden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt. Die getesteten Reaktionsgemische werden nicht im Detail aufgeführt.

### **3. Messungen mit Kapillarblut**

Die Formulierungen, welche mit Plasmaproben für am besten befunden wurden, wurden anschliessend auch mit Kapillarblut gemessen, würde doch schliesslich dieses als Probe im fertig entwickelten Biosensor-System zum Einsatz kommen.

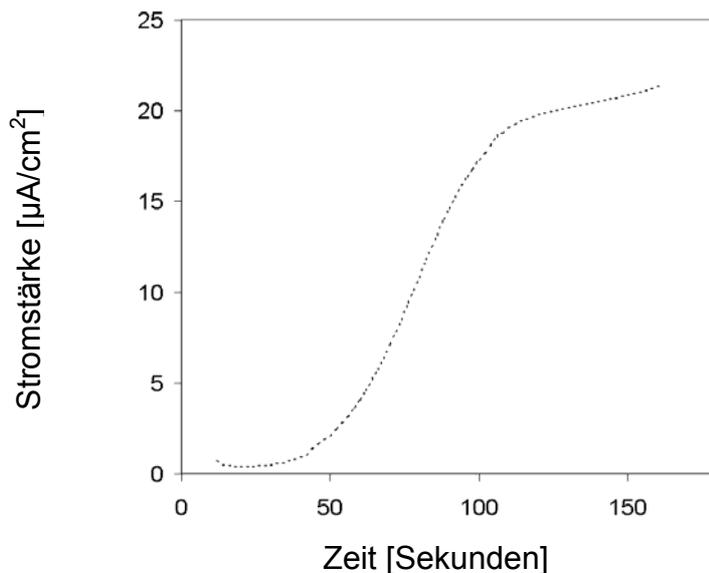
### **4. Optimierung des Reaktionsgemisches**

Es wurde geprüft, ob der Einsatz von Deoxycholat-Natrium und HEPES-Puffer - wie sie in der Formulierung mit Thromborel<sup>®</sup>R definiert sind- auch in den unter Absatz 3 verwendeten Reaktionsgemischen berechtigt ist. Hierfür wurden Reaktionsgemische mit und ohne diese Komponenten hergestellt und Messungen mit NCP als Probe durchgeführt.

## Resultate

### 1. Reaktionsgemisch mit Thromborel R<sup>®</sup> als Vergleich

Abbildung 18 zeigt den Kurvenverlauf von Messungen von NCP mittels herkömmlichen Teststreifen mit Thromborel R<sup>®</sup>.



**Abb. 18:** Messung von Plasma (NCP) mittels herkömmlichen Teststreifen mit Thromborel<sup>®</sup>R

### 2. Selektion verschiedener Thromboplastinreagenzien

#### *Hepato Quick<sup>®</sup>*

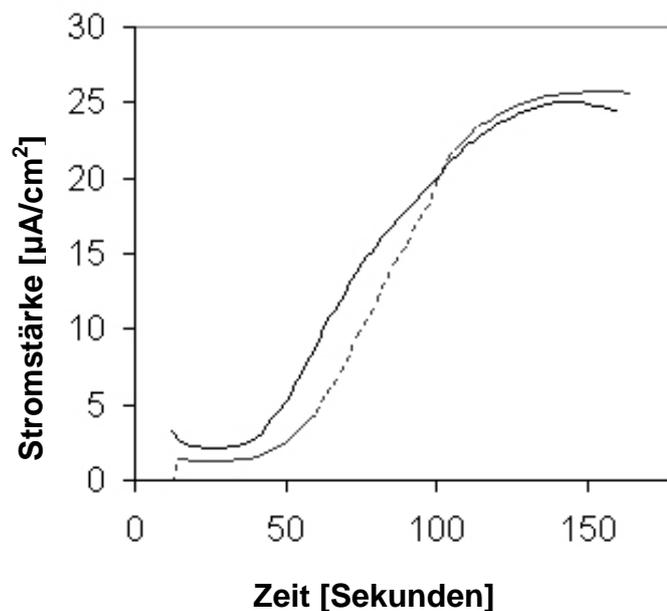
Tabelle 9 gibt die beste Formulierung für ein Reaktionsgemisch mit Hepato Quick<sup>®</sup>, Tabelle 10 zusätzlich mit Oberflächenaktivator wieder, die Abbildung 19 die entsprechenden Kurvenverläufe.

**Tab. 9:** Bestes Reaktionsgemisch mit Hepato Quick<sup>®</sup> ohne Oberflächenaktivator

<b>Hepato Quick<sup>®</sup> - Stammlösung</b>	<b>CaCl<sub>2</sub> (10mM)</b>	<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	<b>Substrat Pefa 007-56</b>
180µl	480µl	340µl	0.40 mg/ml

**Tab. 10:** Bestes Reaktionsgemisch mit Hepato Quick® und Oberflächenaktivator

Hepato Quick® - Stammlösung	CaCl <sub>2</sub> (10mM)	Aerosil 200- Suspension (3.5mg/ml)	Substrat Pefa 007-56
180µl	650µl	170µl	0.33 mg/ml



**Abb. 19:** Messungen von Plasma (NCP) mittels Hepato Quick®, mit (— / bei 24.5°C) und ohne (---- / bei 25.8°C) Oberflächenaktivator; herkömmliche Formulierung nach Kapitel I Abschnitt 5, adaptiert gemäss Tab. 9 bzw. Tab. 10

In allen Fällen war die Zugabe von Calciumchlorid notwendig, ansonsten war die Neutralisierung des Citrates bei den Messungen mit citriertem Plasma unvollständig. Die Streifenversion mit dem Zusatz von Aerosil 200 als Oberflächenaktivator führt zur schnellsten Substratspaltung. Geeigneter dürften hier aber dennoch Streifen mit einem Reaktionsgemisch ohne Oberflächenaktivator sein. Im Unterschied zu diesen zeigen Streifen mit Aerosil 200 einen relativ hohen Grundstrom und zeigen sowohl innerhalb derselben wie zwischen verschiedenen Chargen eine grössere Variabilität auf (entsprechende Kurven nicht aufgeführt).

Innovin<sup>®</sup>

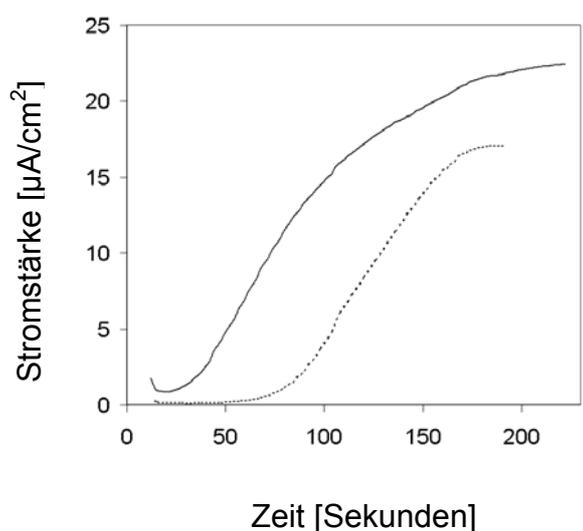
Tabelle 11 gibt die beste Formulierung für ein Reaktionsgemisch mit Innovin<sup>®</sup>, Tabelle 12 zusätzlich mit Oberflächenaktivator wieder, die Abbildung 20 die entsprechenden Kurvenverläufe.

**Tab. 11:** Bestes Reaktionsgemisch mit Innovin<sup>®</sup> ohne Oberflächenaktivator

<b>Innovin<sup>®</sup> - Stammlösung</b>	<b>Phosphatidylserin</b>	<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	<b>Substrat Pefa 007-56</b>
480µl	40µl	480µl	0.40mg/ml

**Tab. 12:** Bestes Reaktionsgemisch mit Innovin<sup>®</sup> und Oberflächenaktivator

<b>Innovin<sup>®</sup> - Stammlösung</b>	<b>Phosphatidylserin</b>	<b>Bentonit für wässrige Systeme- Suspension (1.75mg/ml)</b>	<b>Substrat Pefa 007-56</b>
480µl	40µl	480µl	0.33mg/ml



**Abb. 20:** Messungen von Plasma (NCP) mittels Innovin<sup>®</sup>, mit (— / bei 23.8°C) und ohne (--- / bei 24.0°C) Oberflächenaktivator; herkömmliche Formulierung nach Kapitel I Abschnitt 5, adaptiert gemäss Tab. 11 bzw. Tab. 12

Streifen mit 'Bentonit für wässrige Systeme' führen zu einer deutlich schnelleren Thrombinbildung als jene Streifen ohne Oberflächenaktivator. Innovin kristallisiert beim Eintrocknen aus, was wahrscheinlich der Grund für die ungenügende Reproduzierbarkeit beider Streifentypen ist (entsprechende Kurven nicht aufgeführt).

### *Manchester Reagent<sup>®</sup>*

Es konnte kein Reaktionsgemisch mit Manchester Reagent<sup>®</sup> gefunden werden, dass zu einer ausreichenden Thrombinbildung geführt hätte. Die höchste erreichte Stromstärke betrug  $9.6\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (nach rund 200 Sekunden, bei  $23.8^\circ\text{C}$ ).

### *Neoplastin Plus<sup>®</sup>*

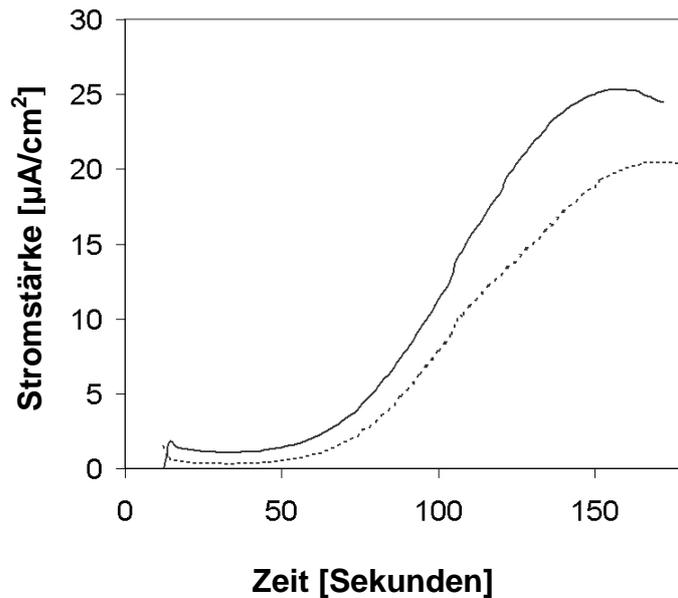
Tabelle 13 gibt die beste Formulierung für ein Reaktionsgemisch mit Neoplastin Plus<sup>®</sup>, Tabelle 14 zusätzlich mit Oberflächenaktivator wieder, die Abbildung 21 die entsprechenden Kurvenverläufe.

**Tab. 13:** Bestes Reaktionsgemisch mit Neoplastin Plus<sup>®</sup> ohne Oberflächenaktivator

<b>Neoplastin Plus<sup>®</sup></b> Rekonstituiert mit CaCl <sub>2</sub> (10mM)	<b>Phosphatidylserin</b>	<b>CaCl<sub>2</sub></b> (10mM)	<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	<b>Substrat Pefa 007-56</b>
120µl	40µl	360µl	480µl	0.40mg/ ml

**Tab. 14:** Bestes Reaktionsgemisch mit Neoplastin Plus<sup>®</sup> und Oberflächenaktivator

<b>Neoplastin Plus<sup>®</sup></b> Rekonstituiert mit CaCl <sub>2</sub> (10mM)	<b>Phosphatidylserin</b>	<b>CaCl<sub>2</sub></b> (10mM)	<b>Bentonit-Suspension</b> (0.9mg /ml H <sub>2</sub> O)	<b>Substrat Pefa 007-56</b>
120µl	40µl	360µl	480µl	0.33mg/ml



**Abb. 21:** Messungen von Plasma (NCP) mittels Neoplastin Plus<sup>®</sup>, mit (— / bei 23.8°C) und ohne (---- / bei 23.6°C) Oberflächenaktivator; herkömmliche Formulierung nach Kapitel I Abschnitt 5, adaptiert gemäss Tab. 13 bzw. Tab. 14

Das Reaktionsgemisch führt schneller zu einer Thrombinbildung, wenn das lyophilisierte Neoplastin Plus<sup>®</sup> nicht mit der vom Hersteller mitgelieferten CaCl<sub>2</sub>-Pufferlösung, die noch Konservierungsstoffe enthält, sondern mit einer selber hergestellten Calciumchloridlösung aufgelöst wird. Die Streifen mit Bentonit führen nicht zu einer wesentlich schnelleren Thrombinbildung verglichen mit Streifen ohne Oberflächenaktivator. Letztere weisen einen grösseren Grundstrom auf. Die Reproduzierbarkeit ist in beiden Fällen recht gut.

### Thromborel S<sup>®</sup>

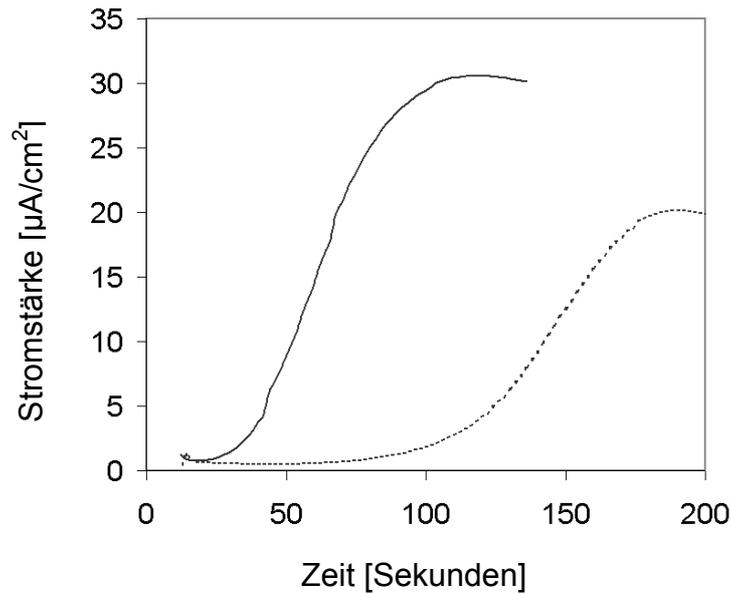
Tabelle 15 gibt die beste Formulierung für ein Reaktionsgemisch mit Thromborel S<sup>®</sup>, Tabelle 16 zusätzlich mit Oberflächenaktivator wieder, die Abbildung 22 die entsprechenden Kurvenverläufe.

**Tab. 15:** Bestes Reaktionsgemisch mit Thromborel S<sup>®</sup> ohne Oberflächenaktivator

<b>Thromborel S<sup>®</sup> - Stammlösung</b>	<b>Phosphatidylserin</b>	<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	<b>Substrat Pefa 007-56</b>
360µl	40µl	600µl	0.40mg/ml

**Tab. 16:** Bestes Reaktionsgemisch mit Thromborel S<sup>®</sup> und Oberflächenaktivator

<b>Thromborel S<sup>®</sup> - Stammlösung</b>	<b>Phosphatidylserin</b>	<b>Bentonit SF- Suspension (1.8mg/ml H<sub>2</sub>O)</b>	<b>Substrat Pefa 007-56</b>
325µl	40µl	635µl	0.33mg/ml

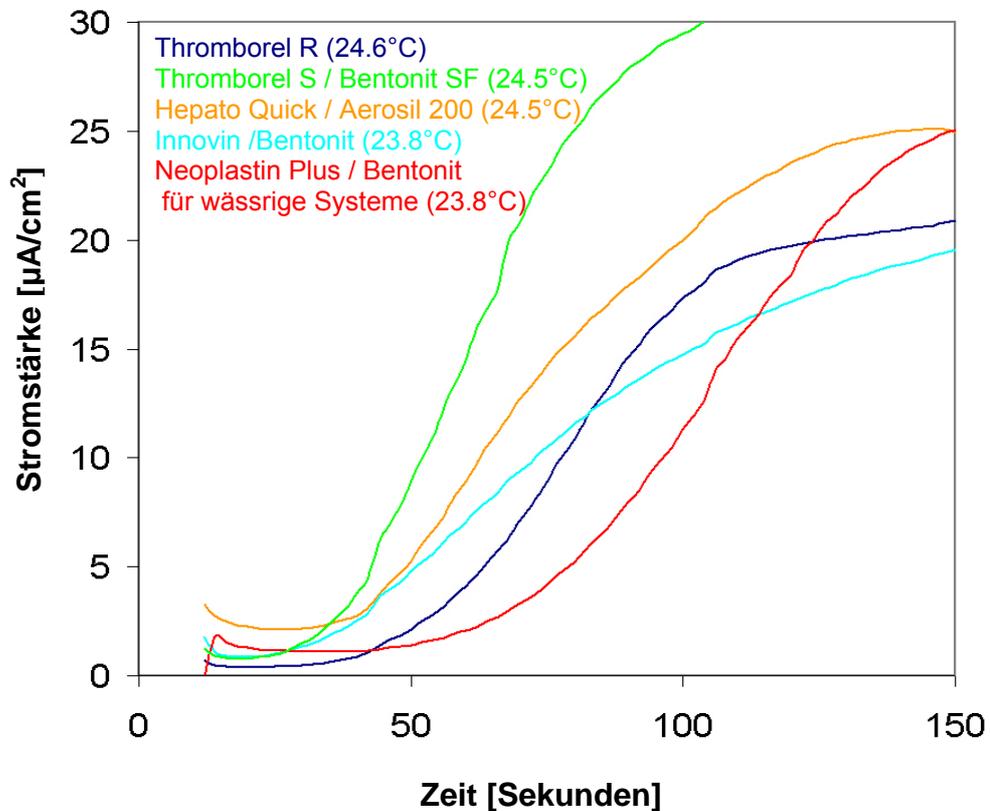


**Abb. 22:** Messungen von Plasma (NCP) mittels Thromborel S<sup>®</sup>, mit (— / bei 24.5°C) und ohne (---- / bei 24.6°C) Oberflächenaktivator; herkömmliche Formulierung nach Kapitel I Abschnitt 5, adaptiert gemäss Tab. 15 bzw. Tab. 16

Die Zugabe von Bentonit SF führt zu einer deutlichen Reaktionsbeschleunigung. Beide Reaktionsgemische nach Tabelle 15 und Tabelle 16 führen zu reproduzierbaren Messungen.

Die Erhöhung der Substratkonzentration von 0.33mg auf 0.40mg führt überall zu höheren Maximalstromstärken, wobei `Lag-Zeit` und Steigung gleich bleiben (Kurven nicht gezeigt); die höhere Maximalstromstärke wie sie in den Abbildungen 20, 21 und 22 bei Reaktionsgemischen von Innovin<sup>®</sup>, Neoplastin Plus<sup>®</sup> bzw. Thromborel S<sup>®</sup> in Kombination mit einem Oberflächeaktivator jeweils ersichtlich ist, kann also zumindest teilweise der höheren Substratkonzentration zugeschrieben werden, nicht aber die beschleunigte Reaktionszeit der Messungen.

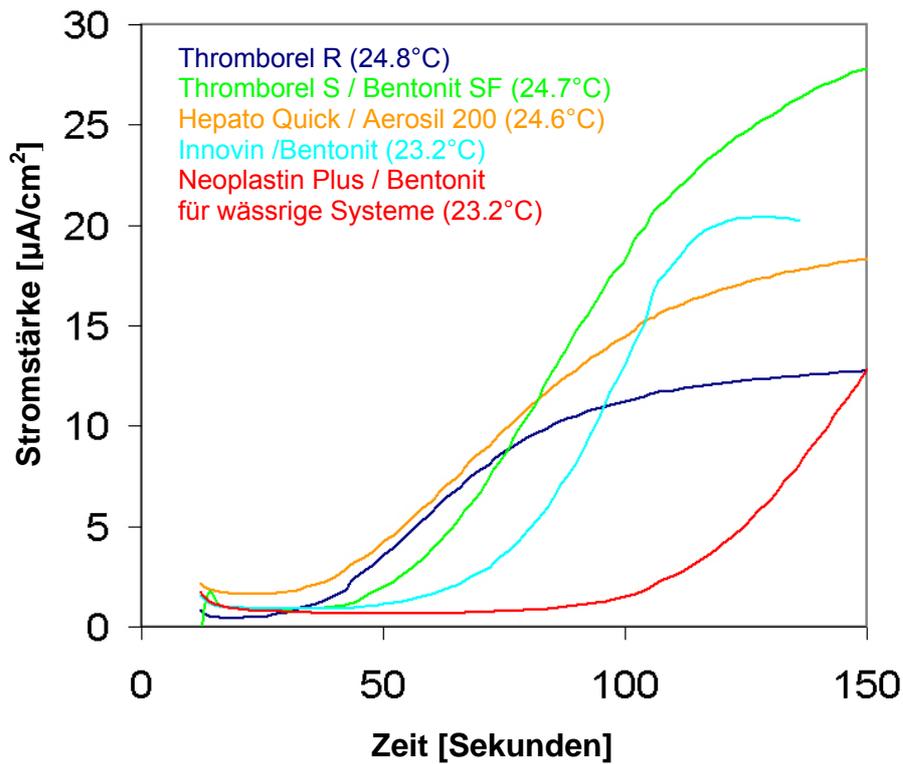
In Abbildung 23 sind die Thrombinbildungsverläufe, welche durch den Einsatz der verschiedenen Thromboplastinreagenzien mit NCP erhalten wurden, zusammenfassend im direkten Vergleich dargestellt.



**Abb. 23:** Messungen von Plasma (NCP): Direkter Vergleich der Reaktionsgemische bestehend aus den verschiedenen Thromboplastinreagenzien; alle Reaktionsgemische mit 'Oberflächenaktivatoren' gemäss Tabellen 9, 11,13,15.

### 3. Messungen mit Kapillarblut

Bei denselben Streifenrezepturen, welche mit Plasma zu den in Abbildung 23 gezeigten Kurven führen, wurde schliesslich Kapillarblut als Probe eingesetzt. In Abbildung 24 sind die entsprechenden Kurvenverläufe dargestellt.



**Abb. 24:** Messungen von Kapillarblut: Direkter Vergleich der Reaktionsgemische bestehend aus den verschiedenen Thromboplastinreagenzien; alle Reaktionsgemische mit 'Oberflächenaktivatoren' gemäss Tabellen 9, 11,13,15.

#### 4. Optimierung des Reaktionsgemisches

Es konnte kein Unterschied zwischen Messkurven von Reaktionsgemischen mit und ohne Natriumdeoxycholat und / oder HEPES-Puffer festgestellt werden (Kurven nicht aufgeführt).

#### Folgerung

Mit Hepato Quick<sup>®</sup>, Innovin<sup>®</sup>, Neoplastin Plus<sup>®</sup> und Thromborel S<sup>®</sup> konnten Reaktionsgemische definiert werden, die mit Plasma als Probe zu einer ausreichenden Substratspaltung führten. Die favorisierte Zusammensetzung, *die aus patentrechtlichen Gründen hier nicht explizit erwähnt wird*, führt bei Messungen von Plasma zu sehr kurzen, bei Messungen von Kapillarblut zu immer noch akzeptablen  $t_{300}$ -Werten. Sowohl Steigung

wie auch Maximalstromstärke sind hier bei beiden Probenarten höher als sie mit den anderen Reaktionsgemischen erreicht werden. Dies erlaubt Messungen von Blutproben stärker antikoagulierter Patienten. Eine zunehmende Antikoagulation führt nämlich ausser zu grösseren  $t_{300}$ -Werten auch zu geringer werdenden Steigungen und kleineren Stromstärkemaxima. Reaktionsgemische, welche bereits bei nicht antikoaguliertem Kapillarblut zu sehr langen Messzeiten führen, sind in Bezug auf einen Einsatz des Biosensor-Systems im `Hausgebrauch`, insbesondere im Vergleich zu den bereits existierenden Systemen, nicht tolerierbar.

Wenn auch nicht alleine dazu fähig (siehe Abschnitt 2.2.), kann jedoch der Zusatz von `Oberflächenaktivatoren` offensichtlich zu einer Unterstützung der Gerinnungsaktivierung führen. Nicht alle eingesetzten Substanzen sind gleich wirksam. Abhängig davon, in Kombination mit welchem Thromboplastinreagenz sie eingesetzt werden, zeigen sie keinen, einen leichten oder auch deutlichen Effekt. Woran dies im Einzelfalle liegt, wurde nicht untersucht. Faktoren wie Oberflächenstruktur, Ladungsverteilung und elementare Zusammensetzung der `Oberflächenaktivatoren`, aber auch Phospholipidanteil und -zusammensetzung aber auch weitere nicht speziell deklarierte Komponenten in den kommerziellen Thromboplastinreagenzien dürften ihren Einfluss haben. Wie sich die Beimischung von `Oberflächenaktivatoren` auf die Korrelation der INR-Werte mit den Kurvenverläufen auswirkt, musste Gegenstand weiterer Tests sein. Mit standardisierten Plasmalösungen konnte gezeigt werden, dass höhere INR-Werte zu zeitlich verzögerten Kurvenverläufen führten (Resultate nicht gezeigt). Versuche mit frischem Vollblut oder Kapillarblut oral antikoagulierter Patienten können aus ethischen und rechtlichen Gründen nur im Rahmen einer von den zuständigen Behörden zugelassenen klinischen Studie erfolgen.

Bei der Auswahl der Reaktionsgemische spielte deren Lagerstabilität noch keine Rolle. Vorerst wurde Wert auf eine möglichst schnelle, ausreichend starke und gut reproduzierbare Substratspaltung gelegt. Eine Berücksichtigung der Stabilität wäre im Rahmen dieses systematischen Selektionsverfahrens gar nicht möglich gewesen. Wohl besteht die Möglichkeit von standardisierten `Stresstests`, in welchen die Teststreifen für eine definierte Zeit bestimmten Temperaturen oder Temperaturschwankungen ausgesetzt werden, wobei die anschliessenden Messungen Aufschluss über die `Widerstandskraft` der Reaktionsgemische geben. Der Aufwand solcher Tests ist aber relativ gross, und die Resultate lassen höchstens relative Stabilitätsvergleiche der verschiedenen Teststreifen zu. Aussagen über die effektive

Lagerstabilität sind eigentlich nur im 'Echtzeit-Versuch' möglich. Entsprechende Tests sollten darum erst mit ausgewählten Teststreifen durchgeführt werden. Das Weglassen von HEPES-Puffer dürfte auf die Langzeitstabilität keinen Einfluss haben. Das Reaktionsgemisch liegt doch während der Lagerung in getrockneter Form vor, wo keine pH-Pufferkapazität mehr bestehen dürfte.



## Resultate

Die Resultate zeigten eine Beschleunigung der Reaktion (abnehmendes  $t_{300}$ ) und höhere Maximalstromstärken je länger die 'Substratlösung' im US-Bad stehen gelassen oder geschwenkt wurde. Eine Kombination von Stehen lassen und anschliessendem Schwenken zeigte bei der Messung die besten Kurvenverläufe. Die notwendige Dauer der Ultraschallbehandlung zur Auflösung des Substrates ist abhängig von der Ansatzgrösse der 'Substratlösung', d.h. von der zu lösenden Substratmenge. (Die Versuche sind nicht im einzelnen aufgeführt).

## Folgerung

Die notwendige Dauer der Ultraschallbehandlung zur Auflösung des Substrates ist abhängig von der Ansatzgrösse der 'Substratlösung', d.h. von der zu lösenden Substratmenge. Es lassen sich keine fixen Werte für die Dauer der Ultraschallbehandlung festlegen, denn zusätzlich kommt noch der Einfluss des Behältnisses hinzu. Je nach Material und Form ändert die Adhäsion des ungelösten Substrates bzw. die Ansammlung am Gefässboden, was wiederum verschiedene Behandlungszeiten im Ultraschallbad notwendig macht. Ein zu frühes Schwenken des Gefässes ist zu vermeiden, da dabei das Risiko besteht, dass ungelöstes Substrat am Gefässrand über der Lösung adhäriert und nicht gelöst wird. Deshalb empfiehlt sich eine Kombination von anfänglichem Stehen lassen und anschliessendem Schwenken der Lösung im Ultraschallbad. Eine sicherheitshalber längere Behandlung im Ultraschallbad kann in Erwägung gezogen werden. Dabei soll aber darauf geachtet werden, dass sich das Bad nicht erwärmt. Um dem vorzubeugen, soll das Ultraschallbad mittels Eis kühl gehalten werden. Aus genannten Gründen lassen sich kein standardisiertes Prozedere, höchstens Richtlinien formulieren. Wichtig ist, dass man sich der Einflüsse bewusst ist, und bei diesem Herstellungsschritt -in Abhängigkeit von zu lösender Substratmenge und von Behältnisart und -form, aber auch Schallfrequenz bei der Ultraschallbehandlung- sorgfältig auf eine vollständige Auflösung des Substrates achtet. Geringere Substratkonzentrationen im Reaktionsgemisch können aus enzymkinetischen Gründen zu niedrigeren Maximalstromstärken und höheren  $t_{300}$ -Werten führen, was die Reproduzierbarkeit von verschiedenen Streifenchargen verschlechtert.



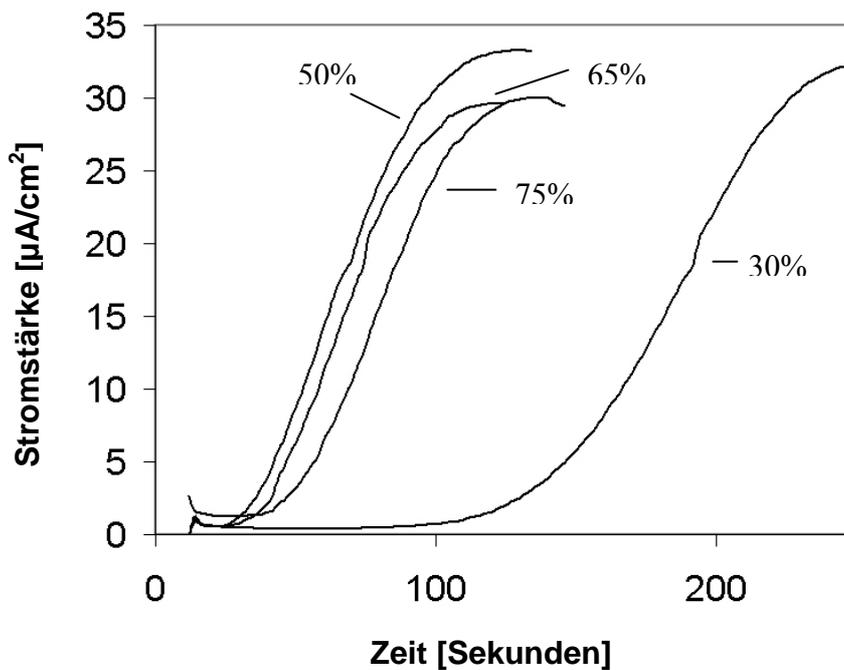
verschiedenen Gruppen für 18 Stunden unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt wurden: 18 Stunden bei 22.5°C, 55°C, 70°C oder 80°C (jeweils eingeschweisst unter Stickstoffatmosphäre in gasdichten Aluminiumsäckchen). Sämtliche Teststreifen wurden anschliessend chronoamperometrisch bei 22.5°C und 50% rel. LF mit NCP gemessen.

Desweiteren wurden auch Versuche mit ändernden Trocknungsbedingungen durchgeführt: Nach einer ersten zweistündigen Trocknungsphase bei 22.5°C und 65% rel. LF weitere Trocknung bei 30% rel LF (22.5°C) für vier Tage.

Schliesslich wurden auch Versuche bei unterschiedlichen Bedingungen einer Kurzzeitlagerung nach der Trocknungsphase unternommen. Nach viertägiger Trocknung bei 22.5°C und 55 % rel. LF wurde dieselbe Streifencharge aufgeteilt und für weitere 10 Tage vier unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt: weiter bei 55% rel. LF, bei 11% rel. LF, in einer Plastikdose mit Deckel (versetzt mit Trocknungsmittel) (rel. LF in der Dose nicht bekannt), sowie eingeschweisst in einem aluminiumbeschichteten Säckchen unter Stickstoffatmosphäre (rel. LF nicht bekannt) (je 22.5°C).

## Resultate

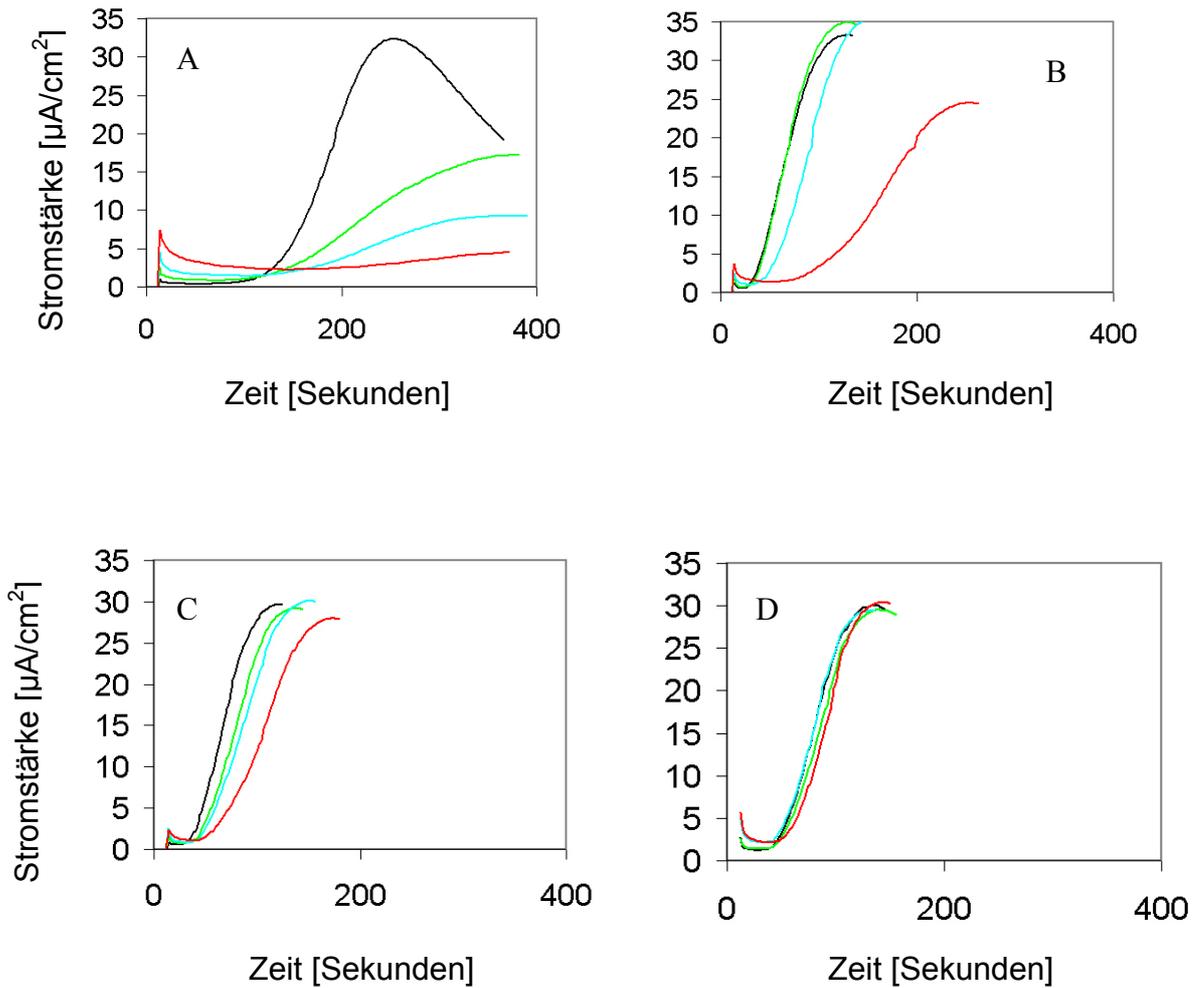
In Abbildung 25 wird der Einfluss der rel. LF beim Trocknungsvorgang auf die Thrombinbildung ersichtlich.



**Abb. 25:** Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit beim Trocknungsvorgang auf die Thrombinbildung. Trocknung vier Tage lang bei 22.5°C und 30%, 50%, 65% bzw. 75% rel. LF. Messungen bei 22.5°C mit NCP. Aufgeführt jeweils eine reproduzierbare Messung.

Das Reaktionsgemisch darf nicht unter zu trockenen Bedingungen getrocknet werden, da ansonsten die Reaktion stark verzögert abläuft. Trocknungsvorgänge über 50% relat. LF führen aber nicht mehr zu schnelleren Reaktionszeiten. Allzu hohe Feuchtigkeiten während des Trocknungsprozesses lassen den Grundstrom der Messung ansteigen.

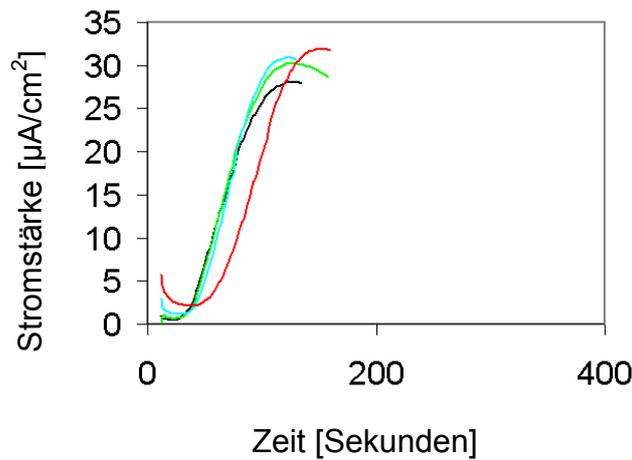
In Abbildung 26 wird der Einfluss der rel. LF beim Trocknungsvorgang auf die Stabilität des Reaktionsgemisches ersichtlich.



**Abb. 26:** Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit beim Trocknungsvorgang auf die Stabilität des Reaktionsgemisches. Teststreifen nach Auftragen des Reaktionsgemisches getrocknet vier Tage lang bei 22.5°C und 30% rel. LF (A), 50% rel. LF (B), 65% rel. LF (C) bzw. 75% rel. LF (D). Messungen bei 22.5°C mit NCP nach Aussetzen der Streifen während 18 Stunden bei 22.5°C, 55°C, 70°C oder 80°C. Aufgeführt jeweils eine reproduzierbare Messung.

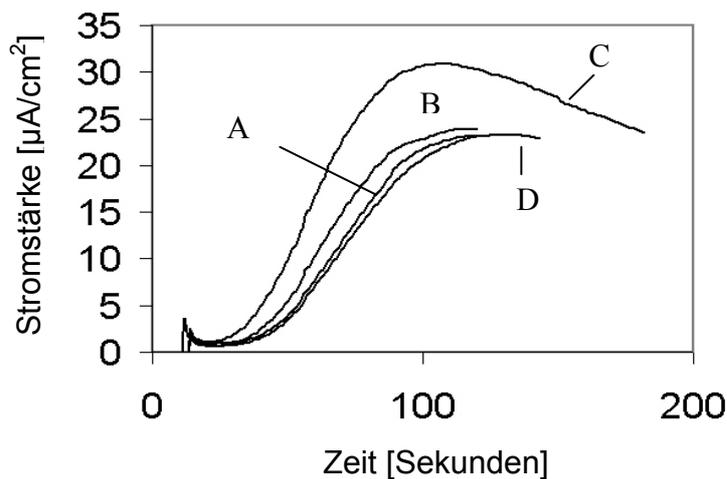
Je feuchter die Atmosphäre beim Trocknungsvorgang, desto stabiler bleibt das Reaktionsgemisch.

In Abbildung 27 wird der Einfluss der rel. LF während der ersten zwei Stunden des Trocknungsvorganges ersichtlich.



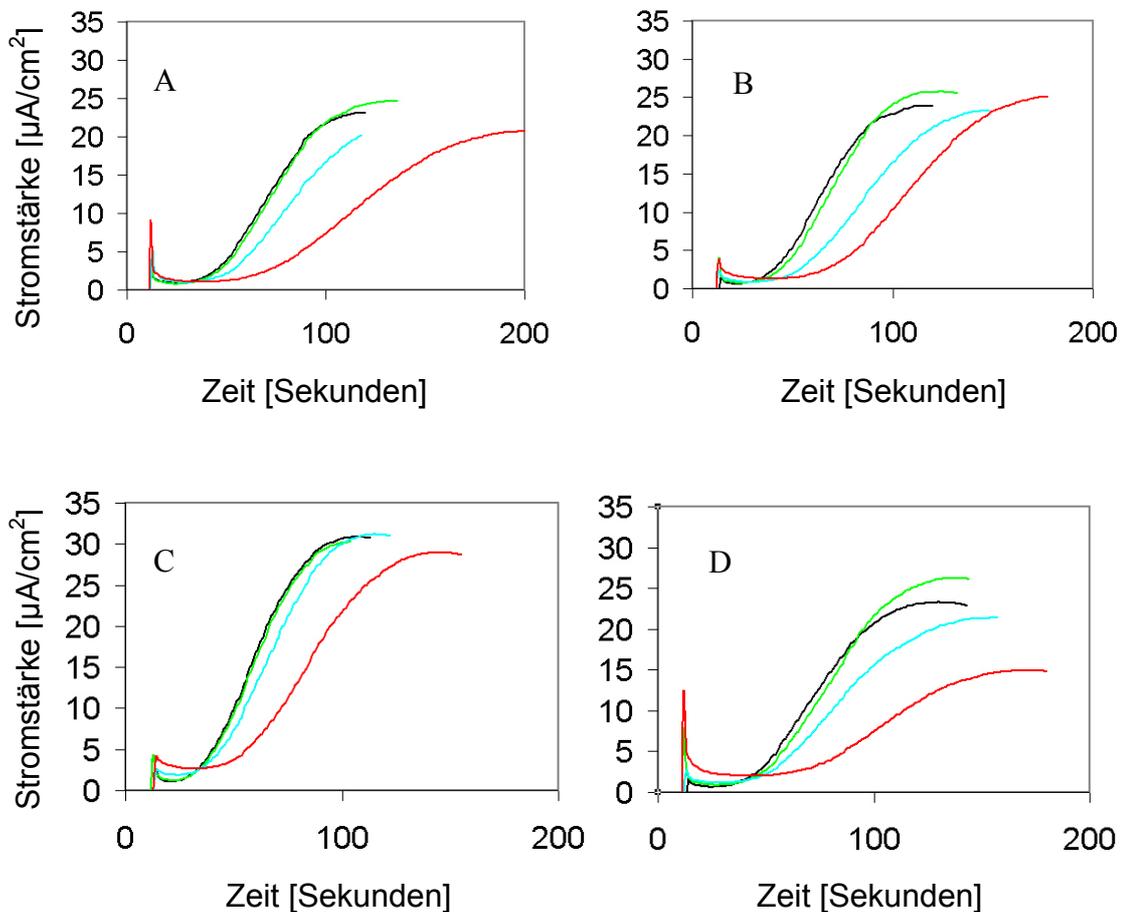
**Abb. 27:** Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit beim Trocknungsvorgang auf die Stabilität des Reaktionsgemisches. Teststreifen nach Auftragen des Reaktionsgemisches getrocknet während zwei Stunden bei 65% rel LF (22.5°C) und anschliessend vier Tagen bei 30% rel. LF (22.5°C). Messungen bei 22.5°C mit NCP nach Aussetzen der Streifen während 18 Stunden bei 22.5°C, 55°C, 70°C oder 80°C. Aufgeführt jeweils eine reproduzierbare Messung.

In Abbildung 28 wird der Einfluss längerer Trocknungsbedingungen auf die Thrombinbildung ersichtlich.



**Abb. 28:** Einfluss längerer Trocknungsbedingungen auf die Thrombinbildung. Teststreifen nach Auftragen des Reaktionsgemisches getrocknet vier Tage lang bei 55% relat. LF (22.5°C) und anschliessend 10 Tage bei weiteren 55% rel LF (A), bei 11 % rel. LF (B), in einem Plastikröhrchen mit 'Trockendeckel' (C) bzw. eingeschweisst in einem aluminiumbeschichteten Säckchen unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre (D). Messungen bei 22.5°C mit NCP. Aufgeführt jeweils eine reproduzierbare Messung.

In Abbildung 29 ist der Einfluss von weiteren Trocknungsbedingungen nach der ersten Trocknungsphase auf die Stabilität ersichtlich.



**Abb. 29:** Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit beim Trocknungsvorgang auf die Stabilität des Reaktionsgemisches. Teststreifen nach Auftragen des Reaktionsgemisches getrocknet vier Tage lang bei 55% relat. LF (22.5°C) und anschliessend 10 Tage bei weiteren 55% rel LF (A), bei 11 % rel. LF (B), in einem Plastikröhrchen mit 'Trockendeckel' (C) bzw. eingeschweisst in einem aluminiumbeschichteten Säckchen unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre (D). Messungen bei 22.5°C mit NCP nach Aussetzen der Streifen während 18 Stunden bei 22.5°C, 55°C, 70°C oder 80°C. Aufgeführt jeweils eine reproduzierbare Messung.

## Folgerung

Die Versuche zeigen, dass die Bedingungen beim Trocknungsvorgang einen wesentlichen Einfluss auf 'Reaktionszeit' und Stabilität der Streifen haben. Schon der Unterschied, ob die Streifen während vier Tagen bei 30% oder 50% rel. Luftfeuchtigkeit getrocknet werden, ist erheblich. Sowohl 'Reaktionszeit' wie auch die Stabilität verbessern sich bei Trocknung unter

‘feuchteren’ Bedingungen. Am besten erwies sich eine Trocknung bei 75% rel. LF (bei 22.5°C). Nachher ist eine trockenere Lagerung erlaubt. Wie trocken dies sein darf, und wie lange eine bestimmte Trockenheit eingehalten werden kann, muss Gegenstand weiterer Tests sein.

Es hat sich gezeigt, dass bei einer Trocknung bei 40°C die ‘Reaktionszeit’ verglichen mit Trocknung bei 22.5°C unverändert bleibt, hingegen die Stabilität leicht nachlässt. 40°C können für die industrielle Realisierung des Trocknungsvorganges zu gewissen Problemen führen (hier nicht weiter erläutert). Um diese zu verhindern, aber dennoch bei allfällig höheren Raumtemperaturen in der Produktionsstätte auch eine Kühlung des Systems zu vermeiden, wird ein Kompromiss zwischen Temperaturoptimum und Optimum der relativen Luftfeuchtigkeit definiert (*aus patentrechtlichen Gründen hier nicht explizit erwähnt*).

Sofern man nach 10 Tagen überhaupt eine Aussage machen darf, scheint die Plastikdose sowohl die ‘Reaktionszeit’ als auch die Stabilität am besten zu bewahren. Es sieht so aus, als ob die Langzeitlagerung unter sehr trockenen Bedingungen erfolgen muss. Die Stabilitätsabnahme von Streifen, welche in einer Atmosphäre von trockenem Stickstoff weitergelagert wurden, wird erklärt mit einer möglicherweise durch die Streifen neu angefeuchteten Umgebung: Die zuerst während vier Tagen bei 55% rel. LF gelagerten Streifen hatten dabei vermutlich ausreichend viel Feuchtigkeit aufgenommen (Reaktionsgemisch und Plastikkomponenten), um diese bei der anschliessenden Weiterlagerung unter trockeneren Bedingungen wieder abzugeben, was genügte, die Stabilität zu beeinträchtigen. Bei der Lagerung in den Plastikröhrchen wurde dieser Effekt wahrscheinlich durch das Trocknungsmittel im Deckel verhindert. Es zeichnet sich ab, dass die Stabilität am besten ist, wenn auf eine erste, kürzere Trocknungsphase bei eher höherer rel. LF eine Langzeitlagerung unter trockenen Bedingungen folgen muss. Bei der Verpackung ins Primärpackmittel muss geachtet werden, dass die Streifen die aufgenommene Feuchtigkeit vorher abgeben konnten.

Auch die Frage, ob eine kühle Lagerung -was in einem geschlossenen System aber auch eine höhere rel. LF bedeutet- eine bessere Lagerstabilität nach sich zieht, kann nur nach entsprechenden Langzeittests beantwortet werden. In solchen, einige Monate dauernden Versuchsreihen wurde eine deutlich bessere Stabilität bei Kühlung (ca. 5°C) nachgewiesen (Resultate nicht aufgeführt). Die Stabilität dürfte stark auch von der Art des

Primärpackmittels (aluminiumbeschichtet, Plastikröhrchen, etc.) und der Atmosphäre darin (Sauerstoffanteil, inertes Gas, Zusatz von Trocknungsmittel wie Silikagel, etc.) abhängig sein. Entsprechende Versuchsreihen stehen noch an.

Anhand einer Aussetzung von Proteinen / Enzymen bei Temperaturen von bis zu 80°C Rückschlüsse auf die Protein-Stabilität bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank zu schliessen, ist für eine Angabe von absoluten Lagerungszeiten nicht möglich. Manche Enzyme halten auch kurzfristig keine 50°C aus. Mangels einer alternativen einfachen Testmethode bediente man sich aber dennoch dieses Verfahrens. Man kann davon ausgehen, dass es für relative Stabilitätsvergleiche dennoch zweckmässig ist: je höhere Temperaturen ein Reaktionsgemisch ohne Stabilitätseinbusse aushält, desto länger dürfte auch seine Stabilität bei Raumtemperatur (bzw. im Kühlschrank) sein. Um Aussagen betreffend effektiver Lagerungsstabilität zu machen, sind Echtzeittests aber unumgänglich.

## **2.4. Standardherstellung der Teststreifen**

Aus den bislang gewonnenen Erkenntnissen bezüglich Thromboplastinersatz und Methodenstandardisierung wurde ein Prozedere für die Standardherstellung von Teststreifen definiert.

*Dieses Prozedere, gemäss welchem alle Teststreifen im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, kann aus patentrechtlichen Gründen hier nicht explizit aufgeführt werden.*

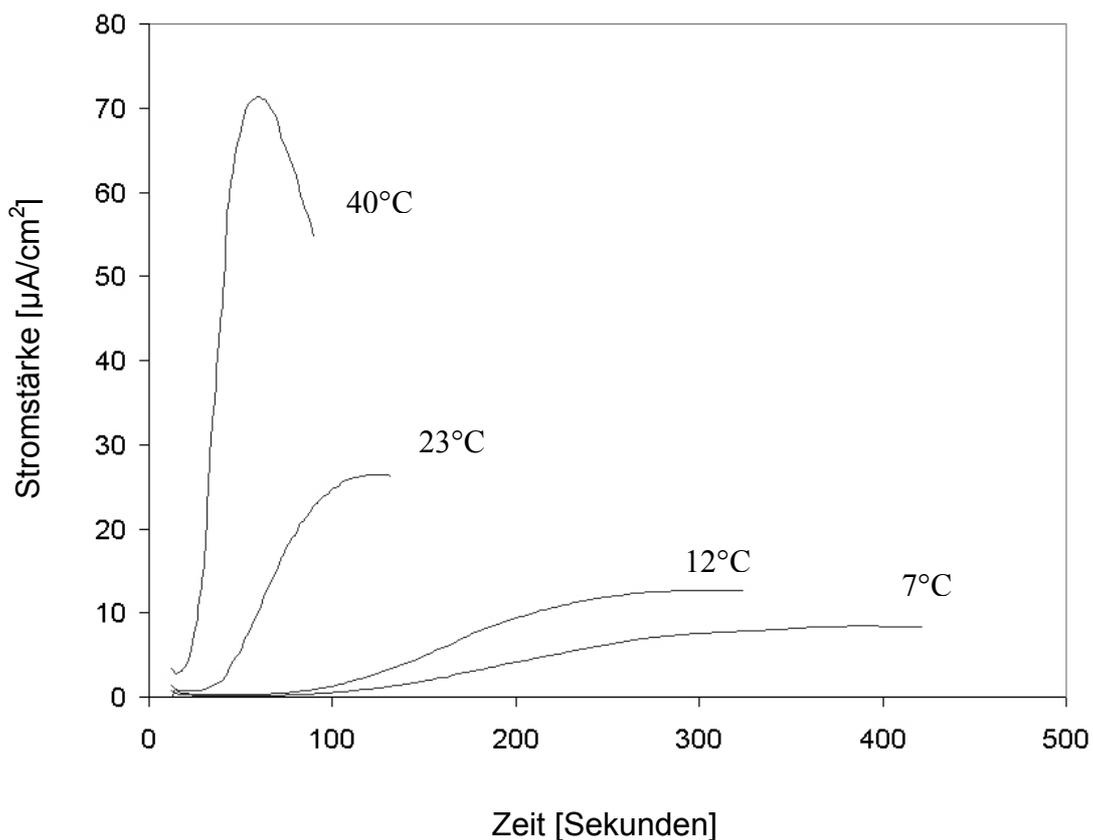


## Methoden

Im Klimaschrank wurden Messungen bei definierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit ausgeführt. Es wurden mit Teststreifen derselben Charge mit NCP Messungen bei rund 7°C, 12°C, 23°C und 40°C (bei jeweils 55% rel. LF) durchgeführt und deren chronoamperometrischer Kurvenverlauf aufgezeichnet.

## Resultate

Die Aufzeichnungen der Messungen bei verschiedenen Messtemperaturen und gleich bleibender Luftfeuchtigkeit (55% relat. LF) sind in Abbildung 30 aufgeführt.



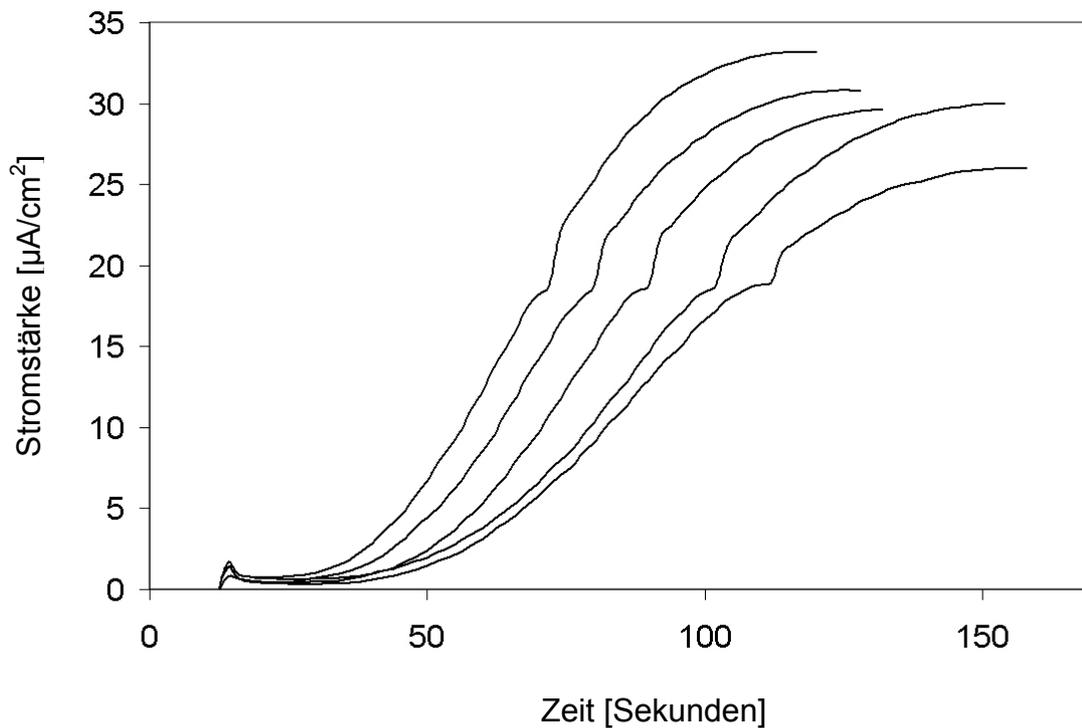
**Abb. 30:** Aufzeichnung der Messungen bei verschiedenen Messtemperaturen aber gleich bleibender Luftfeuchtigkeit (55% relat. LF)

## Folgerung

Die Reaktion, welche durch den Kontakt von Blutprobe mit Reaktionsgemisch ausgelöst wird und zur Bestimmung der Intensität der oralen Antikoagulation beigezogen werden soll, erwies sich derart stark temperaturabhängig, dass man die jeweilige Umgebungstemperatur während der Messung berücksichtigen muss. Die aufgeführten Kurven wurden durch Messung von Normalplasma erhalten. Wie sich Temperaturunterschiede bei Blutproben antikoagulierter Personen auswirken, soll später getestet werden. Da die Messresultate aber offensichtlich entscheidend von der Messtemperatur abhängig sind, muss gewährleistet werden können, dass entweder sämtliche Messungen thermostatisiert ausgeführt werden, oder aber dass ein Algorithmus definiert wird, der die Messtemperatur miteinbezieht. Thermostatisierte Messungen (meist bei 37°C) erfordern eine zusätzliche Heizvorrichtung. Das Biosensor-System, welches Gegenstand der Entwicklung ist, soll aber –um entsprechend auch die Vorteile eines amperometrischen Messverfahrens ausschöpfen zu können- möglichst klein sein. Auch müsste –entgegen der ursprünglichen Absicht- die Reaktionszone auf den Teststreifen während der Messung geschützt im Innern des Messgerätes liegen. Zudem würde der Stromverbrauch, welcher beim amperometrischen Prinzip im Vergleich zu anderen Messverfahren sehr niedrig gehalten werden kann, bei Einsatz eines Thermostaten enorm ansteigen. Aus diesen Gründen ist die Variante der Berücksichtigung der Messtemperatur vorzuziehen: Ein im Messgerät integrierter Temperaturfühler soll jeweils die Messtemperatur detektieren, welche rechnerisch in die Resultatermittlung miteinbezogen wird. Durch das amperometrische Messverfahren ist es möglich, die Blutprobe auch während der Messung ausserhalb des Gerätes zu belassen. Inwiefern die Platzierung des Temperaturfühlers im Biosensor-System einen Einfluss auf die Bestimmung der `Aussentemperatur` hat, sollte Gegenstand späterer Untersuchungen sein.

Es stellte sich zudem die Frage, wie gross der Einfluss der Temperatur der Blutprobe auf die Messung sei. Kapillarblut hat eine Temperatur zwischen 32°C und 37°C. Wie lange bräuchten 10µl Kapillarblut (32°C) beim sofortigen Auftragen auf einen Teststreifen bis zur Annahme dessen Temperatur von 20°C? Computersimulationen seitens Industriepartner zeigten, dass ein Tropfen Wasser von 37°C innerhalb weniger als einer Sekunde auf eine Umgebungstemperatur von 20°C abkühlt (Resultate nicht gezeigt). Bei Vollblut als Probe dürfte dies nicht relevant mehr sein und somit kein Grund zur weiteren Besorgnis.





**Abb. 31:** Aufzeichnung der Messungen von NCP bei gleich bleibender Temperatur (22.5°C) aber unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit (von links nach rechts: 85%, 70%, 55%, 35% und 25% rel. LF)

Die Abhängigkeit der Messungen von der Luftfeuchtigkeit ist deutlich ersichtlich. Es ist ein klarer Zusammenhang zwischen abnehmender relativer Luftfeuchtigkeit und Verlangsamung der Reaktion auszumachen. Diese 'Fächerung' der Kurvenverläufe war auch bei den Versuchen bei anderen Messtemperaturen erkennbar (Messkurven nicht gezeigt).

## Folgerung

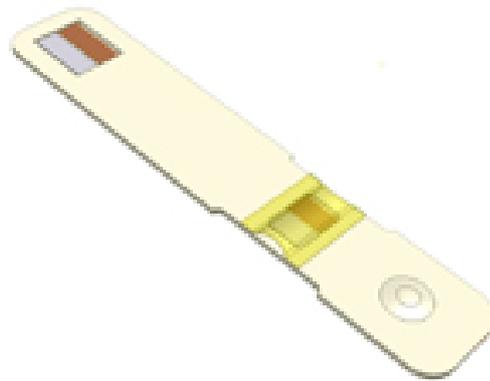
Die Luftfeuchtigkeit scheint –wie auch schon für die Messtemperatur nachgewiesen– ebenfalls einen wesentlichen Einfluss auf die Messung zu haben. Es stellt sich die Frage, wie der beobachtete Effekt zu erklären ist. Dass sich die molekulare Konformation der Bestandteile im Reaktionsgemisch mit wechselnder Umgebungsfeuchte ändert, was schliesslich auch die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst, scheint unwahrscheinlich, weil bei Auftragen eines Blutropfens sogleich wieder eine hundertprozentige Luftfeuchtigkeit herrscht. Eher wahrscheinlich dürfte die Hypothese der unterschiedlichen Verdunstung sein:

Je trockener das Klima, desto schneller verdunstet die Probe. In feuchteungesättigter Luft führt die Verdunstung an Flüssigkeitsoberflächen zu einer Temperaturabsenkung bis in die Nähe der sogenannten Kühlgrenztemperatur. Die für die Verdunstung notwendige Wärme wird der Flüssigkeit entnommen. Die Flüssigkeitstemperatur fällt unter die Lufttemperatur ab. Danach wird die Wärme immer stärker der Luft entnommen, bis am Ende eine konstante Flüssigkeitstemperatur, die Kühlgrenztemperatur erreicht wird, bei der der ganze Wärmestrom zur Verdunstung aus der Luft stammt. Die Kühlgrenztemperatur ist abhängig von der Lufttemperatur, der relativen Feuchte und der Oberfläche. Bei einer Lufttemperatur von 22.5°C und einer relat. Feuchte von 25% beträgt die Kühlgrenztemperatur einer freischwebenden Flüssigkeitskugel 11.7°C, d.h. die Flüssigkeit kühlt um bis zu 10.8°C ab [190]. Je höher die Lufttemperatur desto grösser diese Abkühlung (verglichen bei gleicher relat. Feuchte). Bei gleicher Lufttemperatur nimmt die Abkühlung mit abnehmender relativer Feuchte zu. Dies ist sehr theoretisch und in der Praxis spielen noch weitere Parameter wie z.B. der Luftzug und die Abstrahlung von nahen Oberflächen eine Rolle. Die in Abbildung 31 ersichtliche Reaktionsverzögerung von Messungen bei 25% relat. LF verglichen mit Messungen bei 85% relat. LF entspricht gemäss Versuche einer Temperaturabnahme von rund 5°C (Versuche analog 3.2; Versuche nicht aufgeführt). Diese Beobachtungen stimmen mit der Theorie ziemlich genau überein: Bei 22.5°C und 25% relat. LF kühlt eine `freischwebende` Flüssigkeitskugel um bis zu 10.8°C ab, bei 22.5°C und 85% relat. LF um bis zu 1.8°C, was eine Differenz von 9°C ausmacht [190]. Angenommen ein aufgesetzter Tropfen (z.B. auf Teststreifen) habe die Oberfläche einer Halbkugel, beträgt die theoretische Temperaturabnahme noch 4.5°C. Es ist somit theoretisch wie praktisch erwiesen, dass sich die Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit wohl zum grössten Teil mit dem bereits bekannten Temperatureffekt erklären lässt.

#### *Anpassung der `Streifenarchitektur`:*

Im Unterschied zum Einbezug der Raumtemperatur lässt sich die relative Luftfeuchtigkeit technisch nicht `so einfach` von einer im Biosensor-System integrierten Sonde detektieren. Je grösser die Flüssigkeitsoberfläche desto ausgeprägter der Effekt. Durch Abschirmung der flüssigen Probe müsste sich dieser eindämmen lassen. Ein Kapillarsystem, bei welchem das Reaktionsfeld bedeckt und die Probe von der Seite einzuführen ist, sollte eine Lösung für das Problem darstellen. Entsprechende Versuche (nicht gezeigt) haben dies bestätigt. Diverse

Versuche (nicht aufgezeigt) führten schliesslich zu einer Ergänzung der Teststreifen mit einer über dem Reaktionsfeld umgekehrt fixierten, durchsichtigen Wanne. Diese liegt im Rechten Winkel zur Streifenlängsachse. `Architektur` und Material der neuen Teststreifenversion sind derart abgestimmt, dass der physikalische Kapillareffekt zum Zuge kommt, d.h. dass ein Tropfen Kapillarblut (ca. 10 $\mu$ l) bei Anbringen an eine der beiden Kanalöffnungen (rechts oder links) `automatisch` eingezogen wirkt, den Kanal füllt und somit die Messung startet. In Abbildung 32 ist ein Teststreifen mit Kapillarkanal dargestellt.



**Abb. 32:** Teststreifen mit Kapillarkanal

Bei dieser `Streifenarchitektur` kann die Blutprobe wählbar von rechts oder von links angebracht werden. Insbesondere dürfte von Nutzen sein (im Vergleich zu einem Probenauftragen senkrecht auf das Reaktionsfeld), dass beim Auftragen des Bluttröpfens direkt `ab Finger` im wahrsten Sinne des Wortes die `Übersicht` besser behalten werden kann. Für wie anwenderfreundlich eine solche Manipulation vom Endbenutzer angesehen wird, sollte in einer späteren Studie evaluiert werden. Unbestrittener Vorteil eines solchen Kapillarsystems ist der Schutz vor mechanischer Abnutzung des Reaktionsgemisches (z.B. durch Reibung während der Lagerung oder durch Berühren bei Manipulation des Streifens).

Der Kapillarkanal dürfte seinen Zweck hinsichtlich der `Abschirmung` vor trockener Luft nur zufriedenstellend erfüllen, wenn nicht mehr Blut `aufgetragen` wird als der Kapillarkanal an Volumen fasst (7 $\mu$ l). Eine weitere Versuchsreihe, die hier nicht im einzelnen aufgeführt ist, sollte klären, welche Auswirkungen ein etwaiges Überpipettieren der Blutprobe hat. Daneben

wurde der Einfluss von zusätzlichem Durchzug getestet, standardisiert simuliert mittels Taschenventilator. Wenn 7  $\mu$ l aufgetragen werden, besteht kein Unterschied zwischen Messungen ohne und bei Durchzug. Die beiden seitlichen Öffnungen des Kapillarkanals sind also ausreichend klein, als dass bei 'korrekter' Blutmenge der Durchzug einen Einfluss ausüben könnte. Bei überlaufendem Blut hingegen verlängert sich die Reaktionsdauer bei Durchzug in Abhängigkeit der überpipettierten Blutmenge bzw. dessen Oberfläche. Durch Luftzug wird die Verdunstungsfeuchte unmittelbar über der Probenoberfläche abgeführt, worauf sich die Luftfeuchtigkeit erniedrigt, was wiederum gemäss oben beschriebenem Effekt zu einer Temperaturabnahme der Blutprobe führt.

Sämtliche weitere Versuche sollten mit diesem Streifentyp durchgeführt werden, wobei jeweils darauf geachtet werden sollte, dass beim Aufziehen von Proben mittels Pipette, der Kanal nicht überfüllt würde. Beim Aufziehen des Kapillarblutes direkt 'ab Finger' ist ein Übertreten des Blutes auf der gegenüberliegenden Seite gar nicht möglich, da der physikalische Kapillareffekt die Probe nur bis zum Kanalende einzieht. Dafür besteht die 'Gefahr' eines Überquellens oder Verschmierens des Bluttropfens. Dementsprechend sollte darauf geachtet werden, dass nach 'Füllen' des Kapillarkanals 'überflüssiges' Blut sauber vom Streifen weggestreift wird.

## **4. Kalibrierung des Biosensor-Systems**

### **-Ableitung der Einheit `INR`**

#### **4.1. Einleitung**

##### **4.1.1. Ziel**

Als nächstes musste ein Weg gefunden werden, die aus verschiedenen Blutproben resultierenden chronoamperometrischen Messkurven mit dem jeweiligen INR-Wert in Verbindung zu setzen. Eine Herleitung der INR gemäss Definition und Verfahren nach WHO ist in der Praxis kaum durchführbar und wollte möglichst umgangen werden. Könnte eine direkte Korrelation von Messzeit ( $t_{300}$ ) und INR nachgewiesen werden, wäre dies die einfachste Art der INR-Bestimmung. Das amperometrische Verfahren erlaubt Messungen sowohl von Vollblut- wie auch von Plasmaproben. Dies sollte genutzt werden, das Biosensor-System gegen besser definiertes Plasma (verglichen mit Vollblut) zu eichen. Anschliessend sollte nach einer Plasma/Kapillarblut-Abhängigkeit gesucht werden, aus welcher ein Algorithmus resultierte, mit welchem sich aus der Plasmaeichung eine INR-Berechnung gültig für Kapillarblut ableiten liesse.

##### **4.1.2. Problematik**

Bevor zwecks Korrelationsanalyse ein direkter Vergleich der chronoamperometrischen Kurvenverläufe möglich ist, muss aber noch folgenden Problemen beigegeben werden:

- Berücksichtigung der Messtemperatur
- Definition von Kalibrations-Lösungen:

Bei den im Handel erhältlichen Kalibrations-Sets zur Erstellung von Eichgeraden für auf Plasma basierte Systeme werden die entsprechenden INR-Werte für eine Auswahl von Gerät/Thromboplastin-Kombinationen angegeben. Würde es sich bei den Kalibrationslösungen um Poolplasmen von oral antikoagulierten Patienten handeln,

könnte eine Kalibrationslösung mit einem einzigen INR-Wert definiert sein. Bei den Kalibrations-Sets handelt es sich aber nicht um lyophilisiertes reines Plasma, sondern um Plasma mit Zusätzen oder um künstliche Lösungen, für welche definierte INR-Wert nur bei bestimmten Geräte/Thromboplastin-Kombination gelten. Eine neue Geräte/Thromboplastin-Kombination darstellend figuriert das Biosensor-System nicht unter den definierten Systemen. Um die für das Biosensor-System geltenden INR-Werte der Kalibrationslösungen bestimmen zu können, sollte das Biosensor-System zuerst gegen ein Referenz-System geeicht werden. Zu diesem Zweck sollte eine Testreihe mit oral antikoagulierten Patienten durchgeführt werden. Kapillarblut und Plasmaproben aller Patienten sollten mit dem chronoamperometrischen Messverfahren gemessen werden, zur INR-Referenzangabe die Plasmaproben zusätzlich mit einer Referenzmethode.

## **4.2. Zusammenhang zwischen Messzeit, Messtemperatur und INR-Wert**

### **Absicht**

Wie bereits nachgewiesen wurde, ist der INR-Wert beim Biosensor-System nicht –wie bei thermostatisierten Systemen- im Wesentlichen nur von der Messzeit, sondern auch von der Messtemperatur abhängig. Durch Änderung der Streifenarchitektur mit einem Kapillarkanal konnte der Effekt der Luftfeuchte praktisch neutralisiert werden. Es sollte nun die genaue Abhängigkeit des INR-Wertes von Messzeit  $t_{300}$  und Messtemperatur untersucht und darausfolgend eine Methode zur INR-Bestimmung von Plasmaproben abgeleitet werden.

### **Material**

Streifen gemäss Standardherstellung 2.4, mit Kapillarkanal

PT Calibration Plasma Kit A-D, OQLZ 11, Dade Behring Marburg

Potentiostat

Radiometer Copenhagen PGP 201; 450-016

‘Klimaschrank’

Heraeus Vötsch GmbH, Anlagen zur Umweltsimulation,  
Typ VLK 07/90; 32788; D-7460 Balingen

## **Methode**

### **A) Temperaturtests**

Es wurden die  $t_{300}$ -Werte von vier Kalibrationsplasmen (INR  $\sim 1.0$ ,  $\sim 2.0$ ,  $\sim 3.5$  und  $\sim 5.0$ ) im Klimaschrank bei diversen Temperaturen (von  $15^{\circ}\text{C}$  bis  $30^{\circ}\text{C}$  im Abstand von je zwischen  $1.5^{\circ}\text{C}$  und  $2.5^{\circ}\text{C}$ ) bestimmt. Die relat. LF wurde stets zwischen 50-60% gehalten. Pro Probe und Temperatur wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt, wobei zur weiteren Auswertung der Durchschnitt aus Medianwert und Mittelwert verwendet wurde. Aus den graphischen Darstellungen der Ergebnisse sollten zwischen  $t_{300}$  und INR wie auch zwischen der Messtemperatur T und  $t_{300}$  Korrelationen nachgewiesen werden.

### **B) Testreihe mit Plasma oral antikoagulierter Patienten**

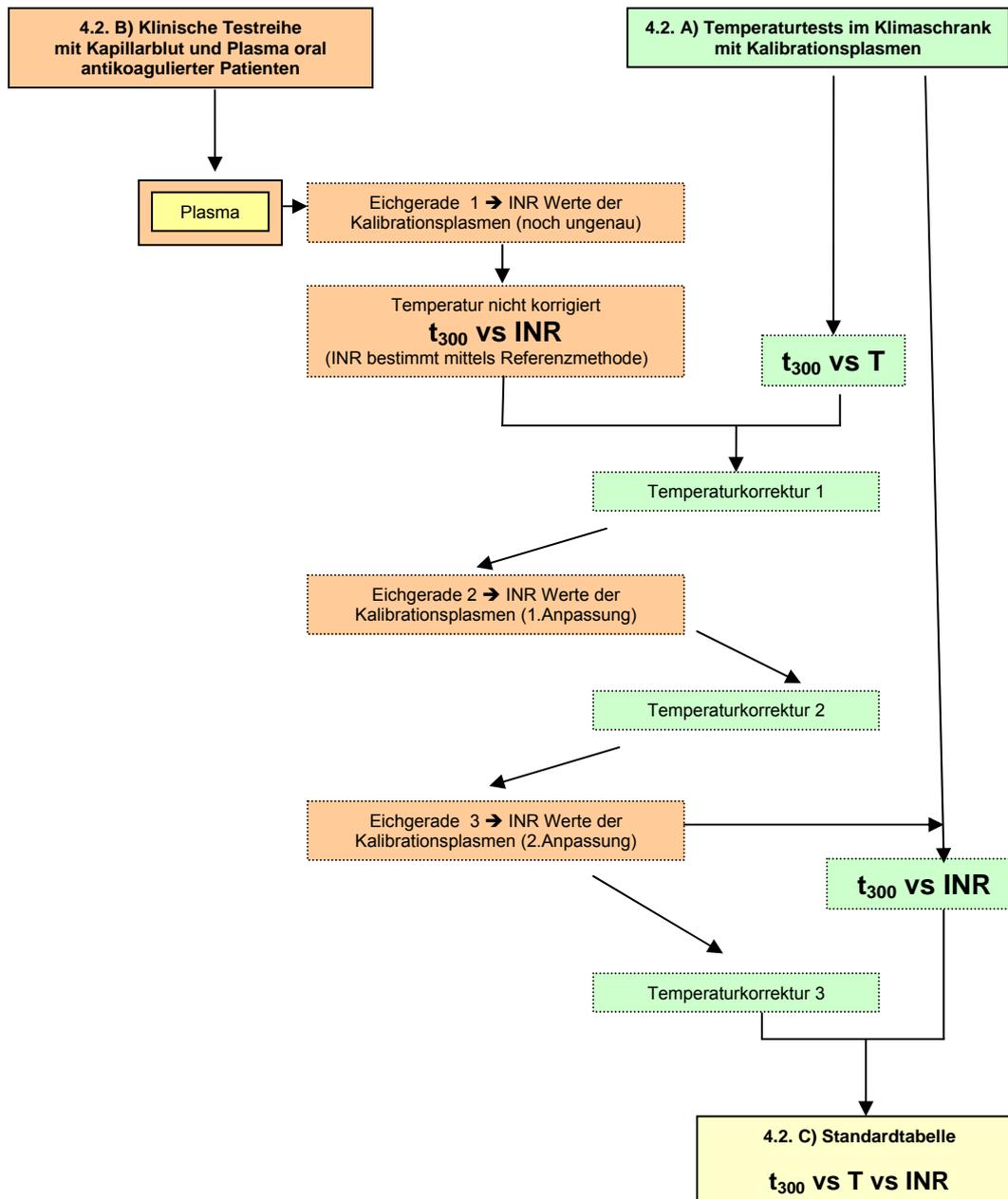
Zur Bestimmung der für das Biosensor-System geltenden INR-Werte der Kalibrationsplasmen wurde eine Testreihe mit oral antikoagulierten Patienten durchgeführt. Diese Testreihe -ausgeführt mit derselben Streifencharge wie bei den Temperaturtests eingesetzt- diente in einem ersten Schritt dazu, die Messzeiten  $t_{300}$  von Plasmaproben gegen die entsprechenden, mit einem Referenzsystem erhaltenen INR-Werte zu eichen, woraus schliesslich die für das Biosensor-System geltenden INR-Werte der Kalibrationsplasmen abgeleitet werden konnten.

Insgesamt wurden 50 Personen (38 oral antikoagulierte Patienten, rekrutiert in der Angiologischen Poliklinik des Inselspitals, Bern, und 12 nicht antikoagulierte Probanden) eingeschlossen. Die Messungen wurden mittels Potentiostaten ausgeführt und von der Software `Voltmaster` aufgezeichnet. Es wurden jeweils Doppel- oder Dreifachmessungen durchgeführt. Als Referenzsystem diente die Routine-INR-Bestimmung im Hämatologischen Zentrallabor (HZL) des Inselspitals Bern mittels System BCS (Dade Behring, Düringen) und Innovin<sup>®</sup> als Thromboplastinreagenz. Zusätzlich wurden im HZL der Fibrinogengehalt und der Hämatokritwert der Blutprobe bestimmt, sowie zwecks Ausschluss von Heparin auch die Thrombinzeit. Die Testreihe sollte später auch dazu dienen, eine Abhängigkeit zwischen Plasmaproben und Kapillarblut herzuleiten (siehe Abschnitt 4.5.2.) Deswegen wurde bei den Teilnehmern der Testreihe nebst venöses Plasma jeweils auch Kapillarblut gewonnen und die

Reaktion aufgezeichnet. Die Testreihe diente schliesslich, um erste Prototypen zu programmieren, mit welchen das Biosensor-System (Gerät und Algorithmus) anschliessend erstmals mit Kapillarblutproben oral antikoagulierter Patienten validiert werden konnte (siehe Abschnitt 5.). Die Durchführung der Testreihe wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

Bei Ausführung der Testreihe, die sich über mehrere Wochen hinzog, war es nicht möglich, sämtliche Messungen bei derselben Temperatur durchzuführen. Die einzelnen Messwerte mussten dementsprechend auf eine einheitliche Temperatur (22.5°C) korrigiert werden. So war die besagte Testreihe mit oral antikoagulierten Patienten einerseits für die Auswertung der Temperaturtests notwendig, die Testreihe mit Patienten ihrerseits aber zur Temperaturkorrektur der Messwerte wiederum von den Resultaten der Temperaturtests abhängig. Um dieses Problem zu lösen, wurden die INR-Werte der Kalibrationsplasmen zuerst über die `nicht temperaturkorrigierte Eichgerade  $t_{300}$  vs INR-Wert gemessen mit Referenzsystem` bestimmt und bei den Temperaturtests ( $t_{300}$  vs INR) eingesetzt. Daraus wurde ein erster Temperaturkorrekturterm (Korrektur auf 22.5°C) abgeleitet. Mit diesem wurden die vorhin noch unkorrigierten Messzeiten der Testreihe auf 22.5°C korrigiert [ $t_{300\text{ kor}}$ ], was nun eine temperaturkorrigierte Eichgerade ergab, woraus genauere INR-Werte für die Kalibrationsplasmen abgeleitet werden konnten. Diese ihrerseits wurden nun eingesetzt zur Bestimmung eines genaueren Temperaturkorrekturterms, welcher vorhin aufgrund unkorrekter INR-Werte ebenfalls auf einer Annahme beruhte. Dies wiederum führte – eingesetzt zur Temperaturkorrektur der Messwerte der Patiententestreihe- zu einer dritten Korrelation von  $t_{300}$ -Werten und Referenz-INR, mit welcher der INR-Wert der Kalibrationsplasmen erneut korrigiert werden konnte. Ein solcher `Korrekturzyklus` wurde – bis keine signifikante Veränderung der INR-Werte resultierte- noch zweimal durchgeführt.

In Abbildung 33 ist die Herleitung des Zusammenhangs von Messzeit, Messtemperatur und INR-Wert bei Plasmaproben schematisch dargestellt.



**Abb. 33:** Schematische Darstellung der Herleitung des Zusammenhangs von Messzeit, Messtemperatur und INR-Wert bei Plasmaproben

### C) Standardtabelle für Patientenplasmen

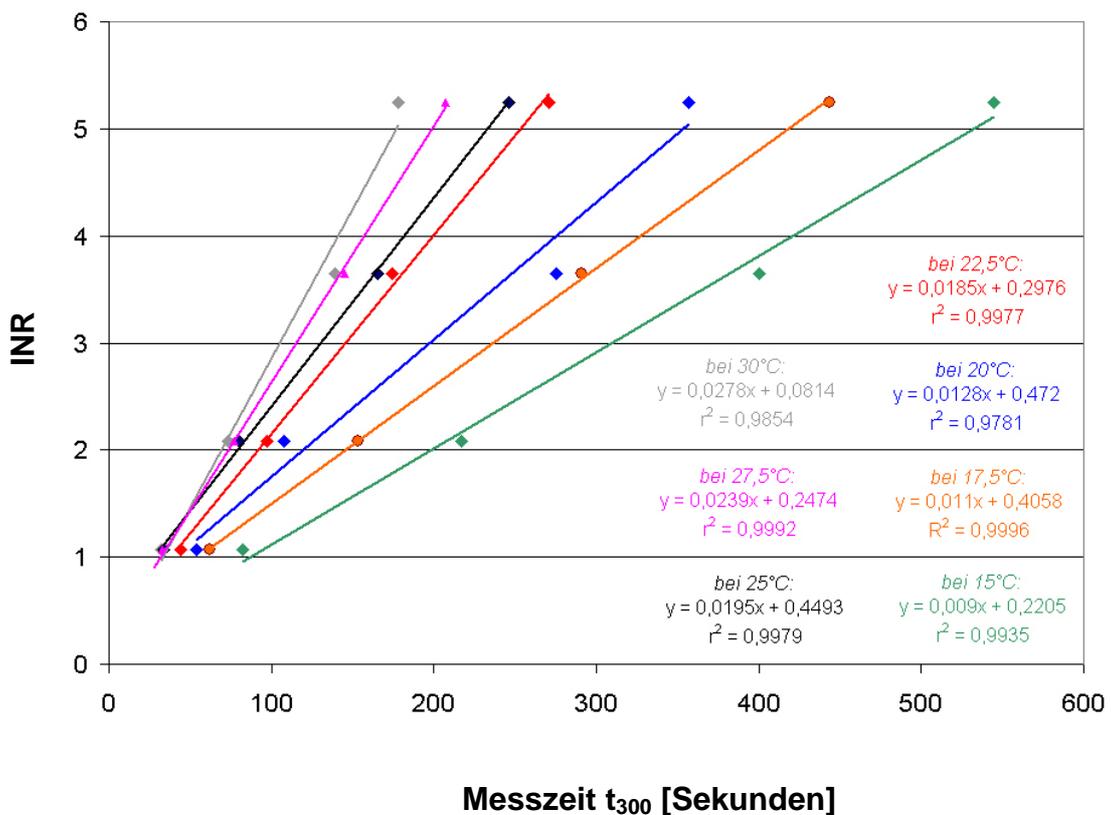
Mit einer weiteren Analyse der aus der Testreihe mit Patientenplasmen (4.2.B) und den Temperaturtests mit Kalibrationsplasmen (4.2.A) resultierenden Messpunkte sollten weitere Gesetzmässigkeiten im Bezug auf Abhängigkeiten zwischen Messzeit, Temperatur und INR-Wert abgeleitet werden. Die unter schwierigen Bedingungen im Klimaschrank kreierte

Messpunkte der Temperaturtests wie auch die INR-Werte der Kalibrationsplasmen sollten dadurch mathematisch korrigiert werden. Mit den neuen Fixpunkten sollte eine Tabelle zur Herleitung des INR-Wertes von Plasmaproben aus Messzeit  $t_{300}$  und Messtemperatur erstellt werden.

## Resultate

### A) Temperaturtests & B) Testreihe mit Plasmen oral antikoagulierter Patienten

Abbildung 34 zeigt die aus der Temperaturtestreihe resultierenden Messpunkte. Bei der Skala auf der y-Achse handelt es sich um die aus den Temperaturtests und der Testreihe mit Patientenplasmen für die Kalibrationsplasmen schliesslich abgeleiteten INR-Werte (INR 1.07, 2.08, 3.65 und 5.25).



**Abb. 34:** Messzeit  $t_{300}$  vs INR in Abhängigkeit der Messtemperatur; Resultat aus Temperaturtest und Testreihe mit Patientenplasmen

Gemäss Abbildung 34 kann eine lineare Abhängigkeit zwischen Messzeit  $t_{300}$  und INR-Wert angenommen werden. Die lineare Regressionsgerade

$$\text{INR} = a * t_{300} + b$$

-geltend für eine definierte Standardtemperatur- wird als Grundgerüst für einen Algorithmus zur INR-Bestimmung definiert. Es muss nun ein Term zur Temperaturkorrektur der Messzeiten auf eine solche Standardtemperatur gefunden werden. Abbildung 35 zeigt die Testresultate als Messtemperatur T versus Messzeit  $t_{300}$  in Abhängigkeit des INR-Wertes.

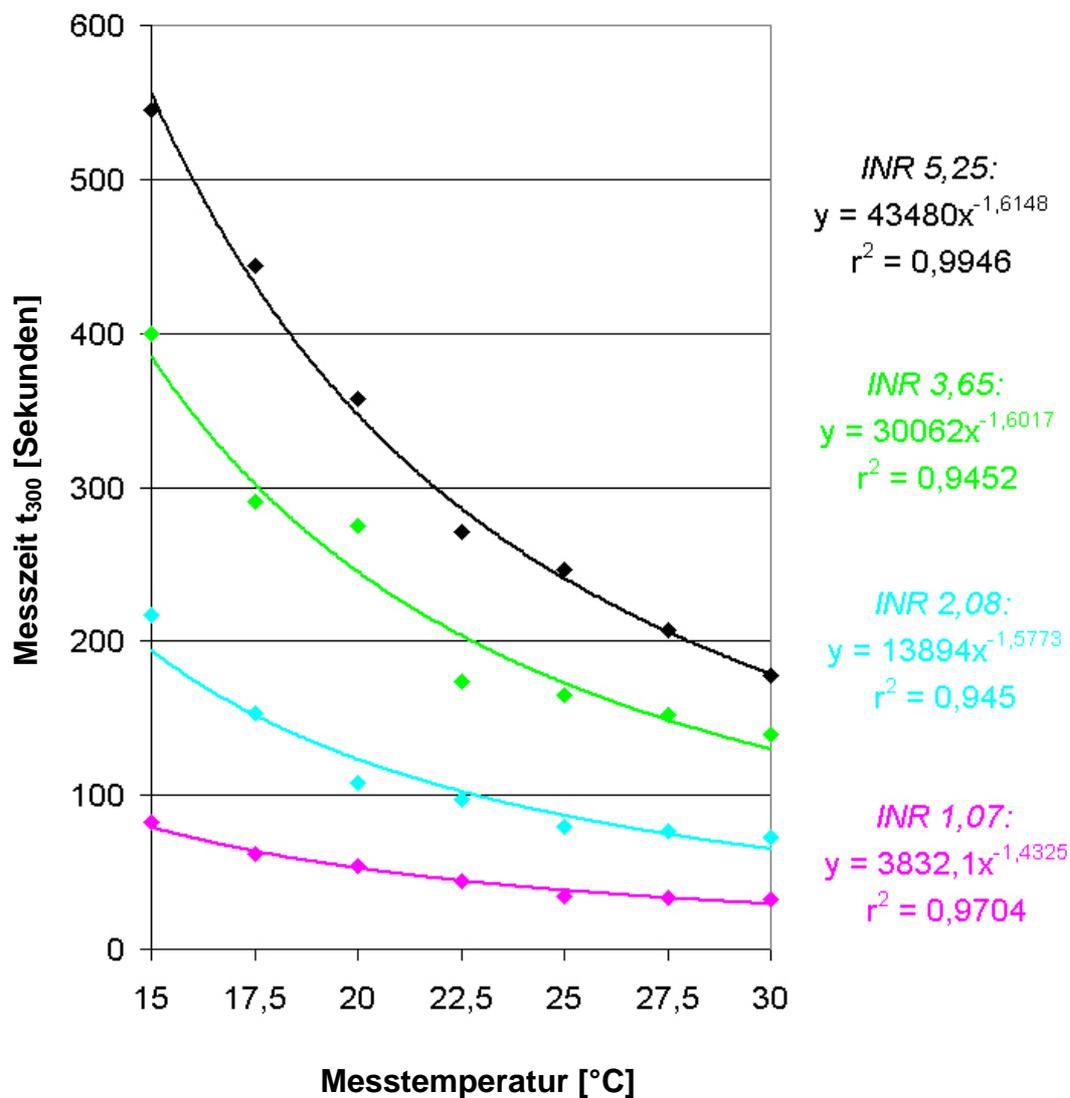
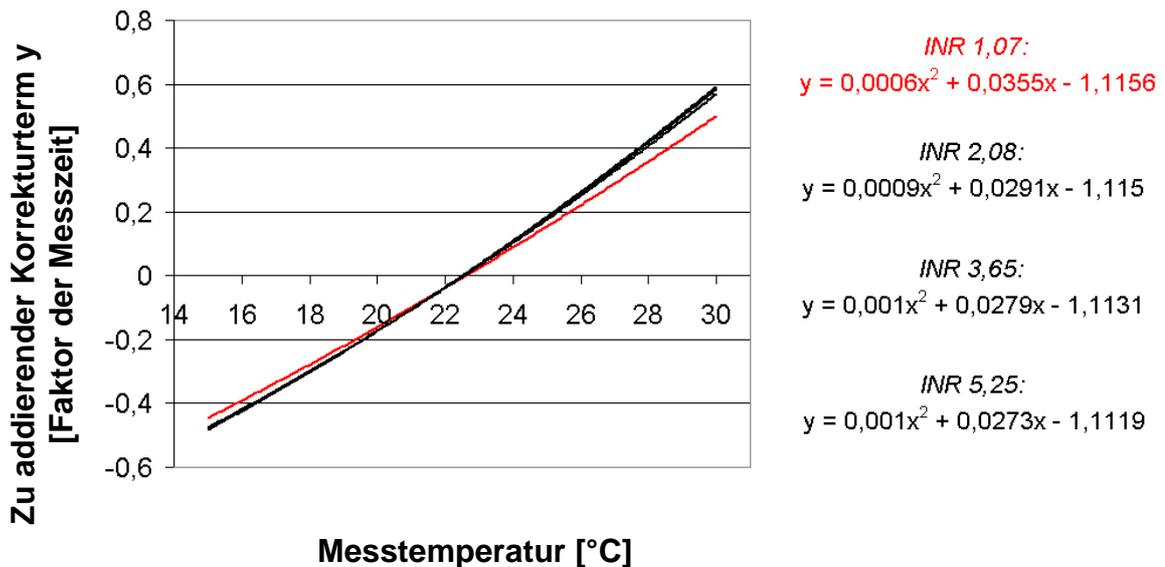


Abb. 35: Messtemperatur vs Messzeit  $t_{300}$  in Abhängigkeit des INR-Wertes

Bei jeder Plasmaprobe liess sich die Korrelation von Messzeit in Abhängigkeit der Messtemperatur am ehesten mit einer Potentialfunktion beschreiben (Versuche hierzu nicht aufgeführt). Bei jeder dieser INR-abhängigen Potentialkurven (in Abbildung 35 aufgeführten) wurde für jede Temperatur die prozentuale Abweichung der Messzeit zur Messzeit bei 22.5°C berechnet. In Abbildung 36 ist dies graphisch dargestellt.

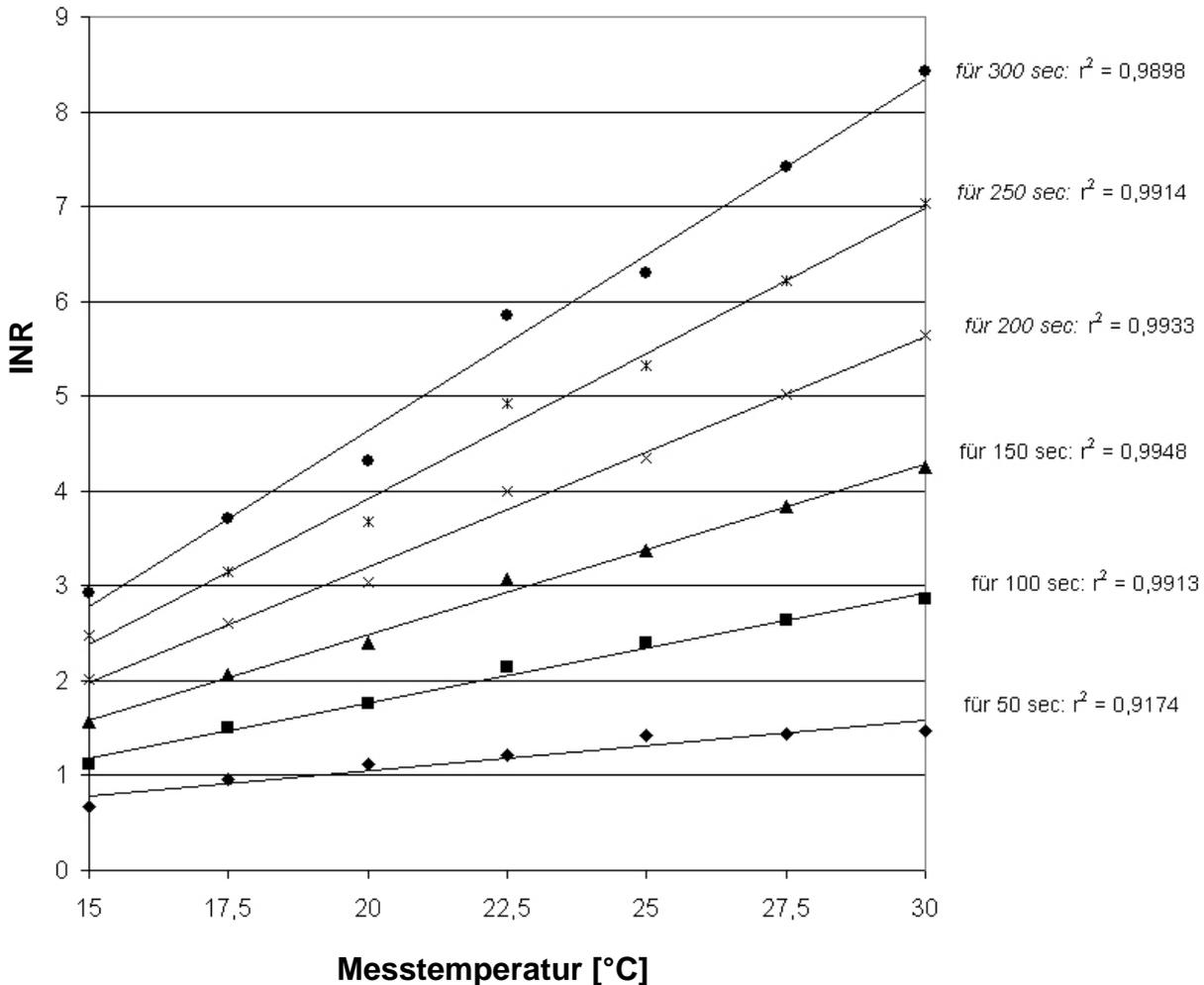


**Abb. 36:** INR-abhängige Funktionen zur prozentualen Temperaturkorrektur der Messzeit auf eine theoretische Messzeit bei 22.5°C. Die x-Achse stellt die Messtemperatur T in °C dar. Auf der Ordinate ist der entsprechende `zur Messzeit  $t_{300}$  zu addierende Prozentsatz von  $t_{300}$ ` abzulesen. Beispiel: Um die Messzeit auf 22.5°C zu korrigieren müssen bei einer Messung bei 28°C zur Messzeit  $t_{300}$  noch 40.5% der Messzeit  $t_{300}$  (Korrekturterm  $0.405 \cdot t_{300}$ ) hinzu addiert werden (gilt für INR 2.08)

Die prozentuale Abweichung der Messzeit von der theoretischen Messzeit bei 22.5°C lässt sich am genauesten durch Polynomfunktionen 2. Ordnung definieren (Versuche hierzu nicht gezeigt). Die verschiedenen INR-abhängigen Polynome 2. Ordnung sind bei Temperaturen zwischen 15°C und 30°C praktisch deckungsgleich mit Ausnahme derjenigen Korrekturkurve von INR 1.07. Bei der klinischen Testreihe (B) wurden bei den Patientenplasmen die Messzeiten mittels der für INR 2.08 geltenden Temperaturkorrekturkurve auf theoretische Messzeiten bei 22.5°C korrigiert, die Messzeiten der nicht antikoagulierten Probanden mittels der für INR 1.07 geltenden Temperaturkurve. Die Ergebnisse der klinischen Testreihe werden im Abschnitt 4.6.1. genauer erläutert.

### C) Standardtabelle für Patientenplasmen

Durch graphische Darstellung der Messtemperatur vs INR-Wert bei jeweils gleicher Messzeit (50, 100, 150, 200, 250 und 300 Sekunden) (gemäss Gleichung der linearen Regressionsgeraden in Abbildung 34) wurde ersichtlich, dass hier ebenfalls eine lineare Abhängigkeit bestehen dürfte (Abbildung 37).



**Abb. 37:** Messtemperatur und INR-Wert korrelieren bei gleicher Messzeit linear

Mit der angenommenen Gesetzmässigkeit, dass sowohl die Messzeit mit dem entsprechenden INR-Wert (bei gleich bleibender Temperatur) wie auch die Messtemperatur mit dem entsprechend erhaltenen INR-Wert (bei gleich bleibender Messzeit) linear korrelieren, konnten die in den Temperaturtests erhaltenen und in den Abbildungen 34 und 35 aufgeführten Messpunkte weiter adaptiert und schliesslich auch für höhere Messtemperaturen

extrapoliert werden (Berechnungsschritte nicht aufgeführt). Die INR-Werte der vier verwendeten Kalibrationslösungen waren dadurch noch einmal zu korrigieren, um schliesslich mit INR 1.02, 1.95, 3.41 bzw. 4.89 bezeichnet zu werden. Ebenso liess sich damit eine Tabelle formulieren, die jeder Kombination von Messzeit und Messtemperatur den entsprechenden INR-Wert zuordnet. Diese Tabelle bezieht sich auf die eben verwendete Streifencharge und wird entsprechend als Standardtabelle bezeichnet. Jeder durch Messzeit  $t_{300}$  und Messtemperatur definierte Tabellenpunkt (INR-Wert) lässt sich durch lineare Interpolation der Tabellenfixpunkte genau definieren. In Abbildung 38 und Abbildung 39 sind die entsprechenden Kurven durch die adaptierten Messpunkte graphisch wiedergegeben.

*Aus patentrechtlichen Gründen können die genauen Werte der Standardtabelle und der Lineargleichungen nicht explizit angegeben werden.*

Zwischen Messtemperaturen von 15°C und 37°C (bei einer Messgenauigkeit von 0.1°C) und einem INR-Bereich von 1 bis 5 (bei einer Messfrequenz von einer Sekunde) sind rund 50'000 Messpunkte definiert, wobei etwa 50% davon auf Messungen zwischen 15°C und 20°C anfallen. Der Bereich, in welchem sich der grösste Anteil der Patienten `bewegt` (Zielbereich INR 2.0 bis 3.5; Messungen zwischen 20°C und 27.5°C) macht gar nur 10% der so definierten Tabelle aus.

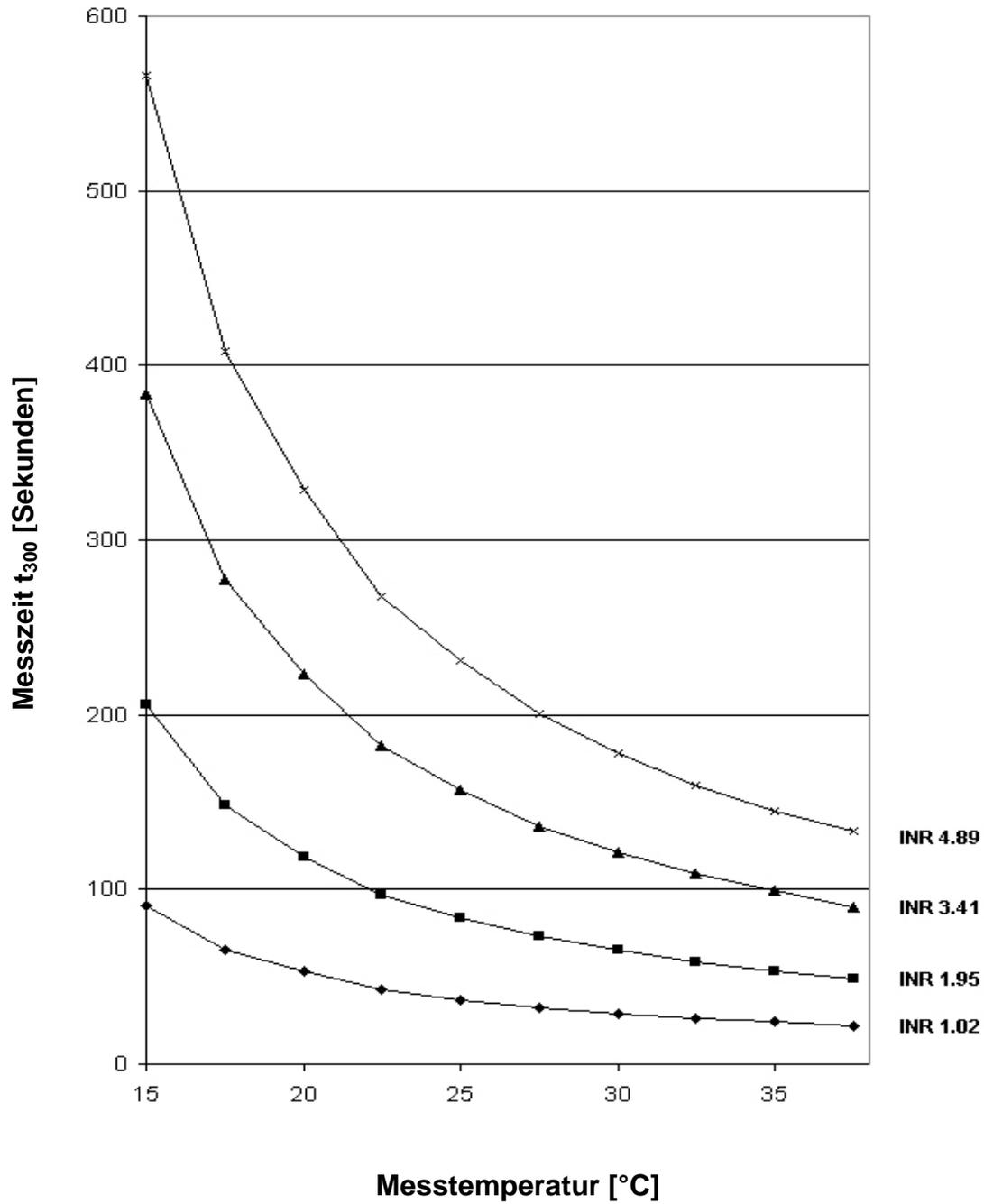
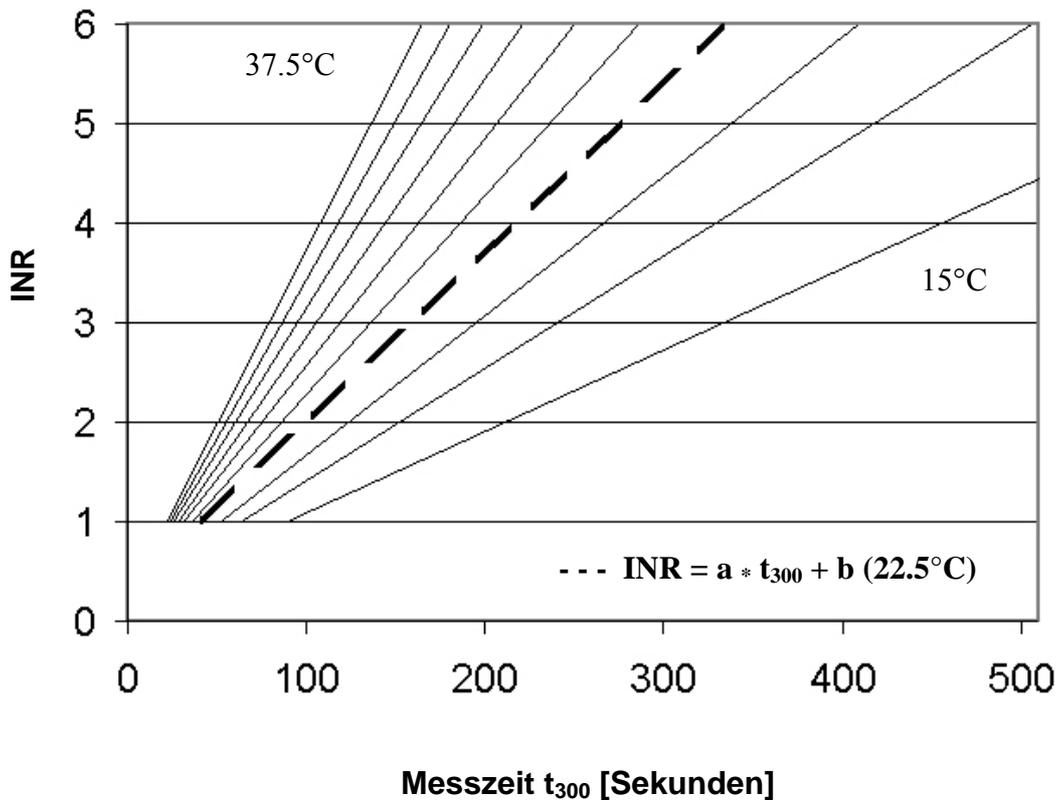


Abb. 38: Adaptierte Messpunkte für Plasmaproben; Messtemperatur vs Messzeit



**Abb. 39:** Adaptierte Korrelationen für Plasmaproben; Messzeit vs INR-Wert;  
Kurven von ganz links (für 37.5°C) nach ganz rechts (für 15.0°C) im 2.5°C-Abstand

## Folgerung

Infolge Fehlens methodenunabhängiger Kalibrationsplasmen musste das zu entwickelnde System indirekt über eine Testreihe mit antikoagulierten Patienten gegen ein Referenzsystem geeicht werden. Gleichzeitig war die Temperaturabhängigkeit zu bestimmen. Das eine war vom anderen abhängig. Die resultierenden INR-Werte für die Kalibrationsplasmen waren demnach nicht als unumstösslich anzusehen, umso mehr es schwierig war, bei den Temperaturtests die Testbedingungen, insbesondere eine stabile Temperatureinstellung, unter Kontrolle zu halten. Unabhängig davon konnte aber gezeigt werden, dass es prinzipiell durchführbar sein sollte, den INR-Wert direkt mittels einer Eichgeraden abzuleiten, wenn definierte Kalibrationsplasmen zur Verfügung stehen. Die Tauglichkeit sowohl der  $t_{300}$  als Endpunkt der Messung konnte –vorerst zumindest für Plasmaproben- belegt werden.

Die graphischen Darstellungen machen deutlich, wie sehr die Messzeit (und damit der INR-Wert) von der Messtemperatur abhängt. 4 ½ Minuten dauert die Messung einer Plasmaprobe von INR 2.5 bei 15°C, bei 22.5°C gut 2 Minuten, bei 30°C noch 1 ½ Minuten. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass zusätzlich zur eigentlichen INR definierenden Variablen zusätzlich die Temperatur als `zweite Dimension` einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis hat und entsprechend einer genauen Detektion bedarf.

Für Vollblut wird aus enzymkinetischen Überlegungen dieselbe Temperaturabhängigkeit angenommen. Wie Kapillarblutproben im Vergleich zu Plasma in Bezug auf die INR-Abhängigkeit reagieren wird in Abschnitt 4.5. diskutiert. Vorerst soll aber versucht werden, auch für die Kalibration von Streifenchargen eine Plasma basierte Methode zu schaffen.

### **4.3. Kalibrierung neuer Teststreifenchargen**

#### **Absicht**

Ein wesentlicher Vorteil des Biosensor-Systems gegenüber manch anderen Systemen zur Patientenselbstkontrolle der oralen Antikoagulation ist die Möglichkeit, auch Messungen mit Plasma durchzuführen. Was für den Patienten direkt nicht relevant ist, darf im Hinblick auf eine Eichung von Teststreifenchargen nicht unterschätzt werden, vorbehalten einer reproduzierbaren Korrelation zwischen Vollblut und Plasma. Es sollte nun ein Verfahren definiert werden, neue Streifenchargen in einen Bezug zur Standardtabelle (Abschnitt 4.2.C) zu bringen und so zu kalibrieren.

#### **Material**

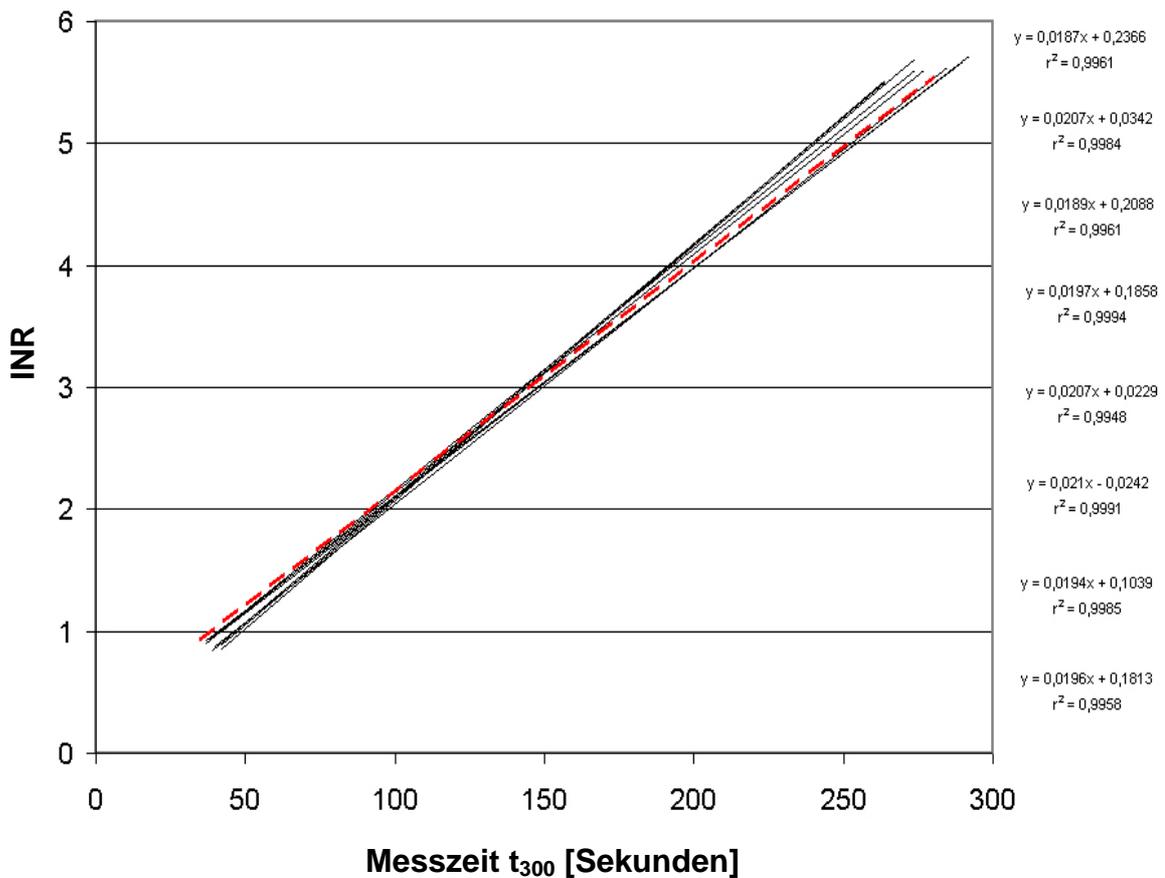
Kalibrationsplasma-Set `PT-Multi Calibrator 1-6` REF OPAT 03 Dade Behring, Marburg

## Methoden

Es wurden acht Streifenchargen (gemäss 2.4.) hergestellt, jede an unterschiedlichen Tagen. Mittels eines einzigen Kalibrationsplasma-Set wurde bei 24°C von jeder eine Eichgerade ( $t_{300}$  vs INR-Kalibrationsplasma) erstellt (Fünfpunkt-Eichung bei INR 0.94, 1.57, 2.76, 4.89 und 5.56) und mit der entsprechenden Geraden (bei 24°C) aus der Standardtabelle verglichen. Jeder Eichpunkt wurde durch den Durchschnitt aus fünf Messungen bezeichnet.

## Resultate

In Abbildung 40 sind die Eichgeraden der acht Streifenchargen sowie die bei 24°C entsprechende Gerade aus der Standardtabelle aufgeführt.



**Abb. 40:** Eichgeraden acht verschiedener Chargen und die entsprechende Gerade aus der Standardtabelle (gestrichelte rote Linie) bei 24°C

Verschiedene Berechnungen haben gezeigt, dass die einzelnen Chargen genügend genau durch einen einzigen Faktor ( $x_{Lot}$ ) definiert werden können, wobei sich kalibrationsbedingte Abweichungen im klinisch tolerierbaren Bereich bewegen. Ein Vergleich der Messzeiten der Eichgeraden (von zu kalibrierender Charge und Referenzcharge [gemäss Standardtabelle]) bei einem INR von 2.5 zeigt im klinisch am meisten angestrebten Zielbereich (INR 2 bis 3) die geringsten kalibrationsbedingten Abweichungen; zugleich ist der bei einer solchen 'Einpunktkalibrierung' in Kauf zu nehmende Verlust an Genauigkeit in den anderen INR-Bereichen noch vernachlässigbar klein (Daten hier nicht aufgeführt). Dieser Kalibrationsfaktor ist demnach definiert als Quotient aus  $t_{300}$  bei INR 2.5 der Standardgeraden und  $t_{300}$  bei INR 2.5 der Eichgeraden der zu kalibrierenden Charge ab (jeweils bei derselben Temperatur abgelesen). Im Beispiel der acht aufgeführten Streifenchargen variieren die so bestimmten Chargenkalibrationsfaktoren ( $x_{Lot}$ ) zwischen 0.96 und 1.00.

## **Folgerung**

Abbildung 40 zeigt, dass die Streifenproduktion gemäss 2.4. als reproduzierbar bezeichnet werden kann. Der Vergleich der bei einer beliebigen Temperatur erstellten Eichgeraden ( $t_{300}$  vs INR) mit der entsprechenden Geraden in der 'Plasmastandardtabelle' bei INR 2.5 ergibt einen Faktor, der die Charge genügend genau definiert. Eigentlich korrigiert dieser Faktor nur die Steigung und berücksichtigt keinerlei Achsenabschnitt. Die Variabilität im y-Achsenabschnitt zeigte sich aber vernachlässigbar klein, um klinisch relevante Abweichungen in den Resultaten weder bei INR-Werten im tiefen noch im hohen Bereich zur Folge zu haben. Bei Anwendung dieses Kalibrierungsverfahrens sollten die kalibrierungsbedingten Abweichungen dennoch für jede Charge berechnet werden, um deren Ausmass zu kennen und relevante Fehlresultate auszuschliessen. Am präzisesten lässt sich eine Charge über Steigung und Achsenabschnitt definieren. Soweit die Abweichungen im tolerierbaren Rahmen liegen wird nur die Steigung berücksichtigt, wodurch die Anzahl möglicher Kalibrationsnummern, welche einer Streifencharge zugeordnet werden, im Vergleich zu Kombinationen von Steigung und Achsenabschnitt wesentlich niedriger gehalten werden kann (Daten nicht gezeigt).

Bei der erstmaligen Verwendung eines neuen Kalibrationssets oder auch nur einer neuen Charge müssen die INR-Werte vorgängig durch Vergleichsmessungen der neuen mit den bei der Erstellung der Standardtabelle verwendeten Kalibrationslösungen abgeglichen werden. Ein Abgleich auf die früher verwendete Charge ist auch möglich. Jede neue 'Generation' Kalibrationsset birgt die Gefahr eines Verlustes an Richtigkeit. Dieses Problem kann nur gelöst werden, wenn das Biosensor-System gegen ein Referenzplasma geeicht werden könnte, mit definierten INR-Werten, welche von der verwendeten Gerät / Methode-Kombination unabhängig sind.

Zur Berücksichtigung der herstellungsbedingten Unterschiede einer Streifencharge kann die Messzeit  $t_{300}$  also mit einem nach obigem Prozedere abgeleiteten Faktor multipliziert werden. Mit der so erhaltenen chargenkorrigierten Messzeit und der entsprechenden Messtemperatur kann nun auf der Standardtabelle der INR-Wert der Plasmaprobe abgeleitet (bzw. abgelesen) werden.

#### **4.4. Algorithmus zur Bestimmung des INR-Wertes von Plasmaproben**

##### **Absicht**

Es sollte versucht werden, aus der Standardtabelle einen Algorithmus für die INR-Bestimmung abzuleiten.

##### **Methode**

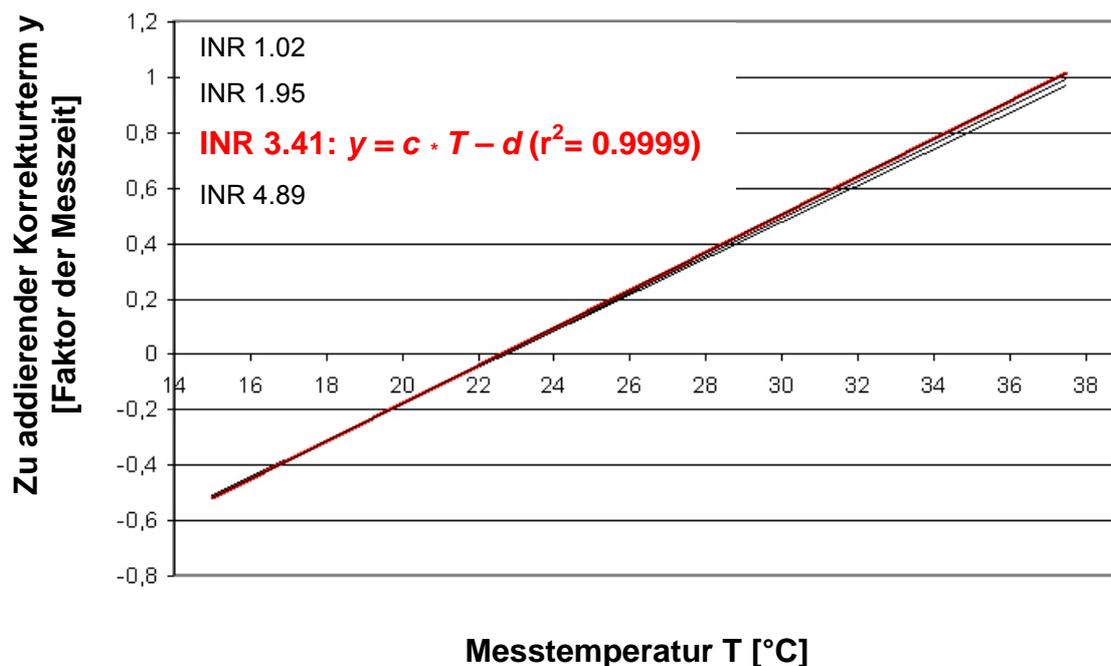
Aufgrund der Temperaturabhängigkeit sollte ein für eine Standardtemperatur von 22.5°C gültiger Algorithmus definiert werden. Die Gerade, welche die Korrelation zwischen Messzeit  $t_{300}$  und INR-Wert bei 22.5°C beschreibt (gestrichelte Linie in Abbildung 39), sollte das Grundgerüst darstellen:

$$\text{INR} = a * t_{300} + b \quad (\text{I})$$

Zur Ableitung eines Algorithmus für die Temperaturkorrektur wurde analog der früheren Bestimmung der Temperaturabhängigkeit (siehe Abschnitt 4.2.) die prozentuale Abweichung der Messzeit zur Messzeit bei 22.5°C berechnet. Diese Berechnungen wurden zum Vergleich für dieselben INR-Werte wie derjenigen unter 4.2. verwendeten Kalibrationsplasmen (INR 1.02, 1.95, 3.41, 4.89) durchgeführt.

## Resultate

In Abbildung 41 sind die INR-abhängigen Funktionen zur prozentualen Temperaturkorrektur der Messzeit auf eine theoretische Messzeit bei 22.5°C graphisch dargestellt.



**Abb. 41:** INR-abhängige Funktionen zur prozentualen Temperaturkorrektur der Messzeit auf eine theoretische Messzeit bei 22.5°C. Die x-Achse stellt die Messtemperatur T in °C dar. Auf der Ordinate ist der entsprechende 'zur Messzeit  $t_{300}$  zu addierende Prozentsatz von  $t_{300}$ ' abzulesen. Beispiel: Um die Messzeit auf 22.5°C zu korrigieren müssen bei einer Messung bei 20°C von der Messzeit  $t_{300}$  noch rund 20% von der Messzeit  $t_{300}$  (Korrekturterm  $-0.2 \cdot t_{300}$ ) subtrahiert werden

Wie in Abbildung 41 ersichtlich nimmt die prozentuale Abweichung der Messzeit von der Messzeit bei 22.5°C über den gesamten Temperaturbereich linear zu bzw. ab. Dieser Effekt ist zudem praktisch unabhängig vom INR-Wert und kann deshalb ohne klinisch relevante Einbusse (Berechnungen nicht aufgeführt) mittels einer Lineargleichung beschrieben werden (z.B. rote Gerade in Abbildung 41; Korrekturgleichung für INR 3.41):

$$t_{300} \text{ (korrigiert auf } 22.5^{\circ}\text{C)} = t_{300} + t_{300} * (c * T - d) \quad \text{bzw.}$$

$$t_{300} \text{ (korrigiert auf } 22.5^{\circ}\text{C)} = t_{300} * [(c * T - d) + 1] \quad (\text{II})$$

Aus dieser Temperaturkorrekturgleichung und der bereits bekannten Beziehung, welche die Korrelation zwischen Messzeit  $t_{300}$  und INR-Wert bei 22.5°C beschreibt

$$\text{INR} = a * t_{300} + b \quad (\text{I})$$

und dem -wie unter 4.3. beschriebenen- Faktor  $x_{\text{Lot}}$ , welcher die Chargenvariabilität einbezieht, liess sich ein allgemeingültiger Algorithmus zusammenstellen, mit welchem der INR-Wert einer Plasmaprobe aus Messzeit und Messtemperatur berechnet werden kann:

$$\text{INR} = a * x_{\text{Lot}} * \{t_{300} * [(c * T - d) + 1]\} + b \quad (\text{III})$$

## Folgerung

Verglichen mit der provisorischen Bestimmung eines Temperaturkorrekturterms, welche noch zu Polynomfunktionen 2. Ordnung führte, die abhängig vom INR-Wert zu sein schienen, stellt die überarbeitete Version eine einfachere Funktion dar. Es ist anzunehmen, dass es sich bei der abweichenden Temperaturkorrektur bei INR 1.07 (siehe Abb. 36) nicht um eine physiologisch bzw. physikalisch erklärbare Tatsache handelte. Vielmehr liegt sie wohl in der noch unvollständigen Auswertung der Temperaturtests begründet.

Die Bestimmung des INR-Wertes aus einer Plasmaprobe lässt sich durch Kenntnis der Messzeit  $t_{300}$  und der Messtemperatur einerseits aus einer Standardtabelle aber auch mittels eines einzigen Algorithmus ableiten.

## **4.5. Messungen mit Vollblut**

### **Absicht**

Bisher wurde eine Methode entwickelt, mit welcher der INR-Wert von Plasmaproben bestimmt werden konnte. Das Verfahren sollte nun auf Messungen mit Vollblut bzw. Kapillarblut ausgeweitet werden.

### **4.5.1. Einfluss des Hämatokritwertes**

#### **Absicht**

Im Unterschied zu Plasma sind beim Vollblut noch alle Zellbestandteile vorhanden. Da der Anteil dieser variieren kann, sollte als erstes der Einfluss des Hämatokritwertes (Hk) auf die Messzeit erfasst werden. In einem späteren Schritt könnte der Zusammenhang von Plasmaproben und Kapillarblut untersucht werden, wobei gleichzeitig –falls notwendig– der Hämatokritwert berücksichtigt werden könnte.

#### **Material**

Zentrifuge Labofuge 400 R, 40283584; Kendro, D-Osterode

Frisches Vollblut eines nicht antikoagulierten Spenders (INR 1.0)

Frisches Vollblut eines oral antikoagulierten Spenders (INR 2.6)

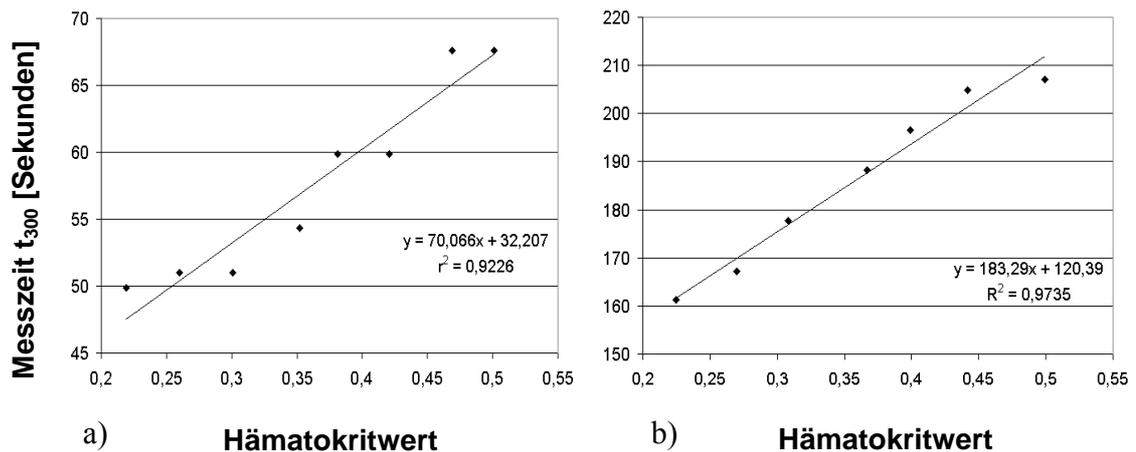
#### **Methode**

Durch Verdünnung bzw. Aufkonzentration von Vollblut wurden zwei Eichreihen zur Bestimmung des Hämatokriteinflusses erstellt, wobei die Messzeit  $t_{300}$  gegen den Hämatokritwert aufgetragen wurde. Die eine basierte auf nicht antikoaguliertem Vollblut, bei der anderen wurde eine Probe eines oral antikoagulierten Patienten (INR 2.6) verwendet. Verdünnt wurde jeweils mit Plasma des 'Spenders'. Zur Aufkonzentrierung wurden die

Proben zuerst während 10 min bei 3000g zentrifugiert (bei 20°C), danach Plasma abgeschöpft und anschliessend das Sediment vorsichtig wieder aufgeschüttelt. Um dem Citratanteil Rechnung zu tragen wurde der entsprechende Hämatokritwert zur Kontrolle jeweils neu bestimmt.

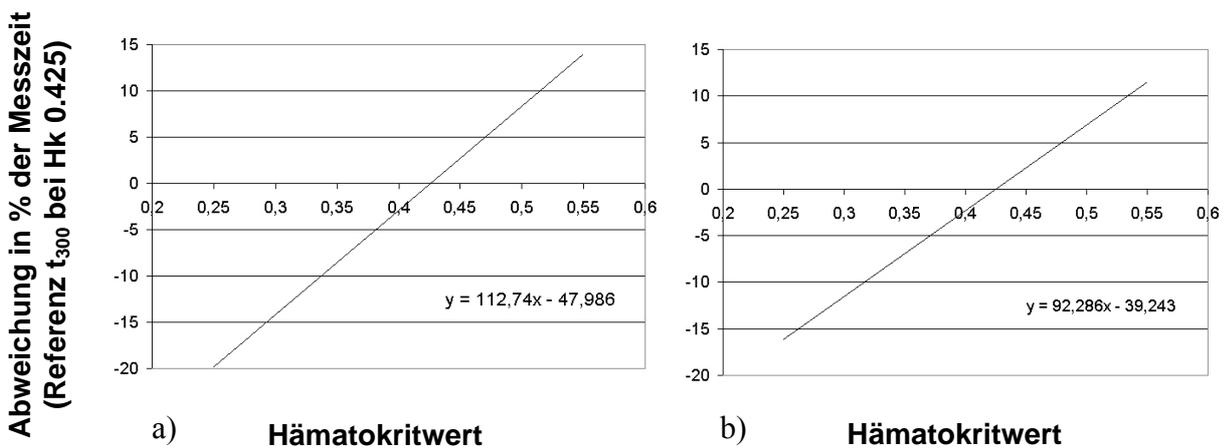
## Resultate

In Abbildung 42 ist der Zusammenhang von Messzeit und Hämatokritwert graphisch dargestellt. Die Messzeiten wurden gemäss Korrekturterm (Abschnitt 4.4. Gleichung II) auf eine Temperatur von 22.5°C korrigiert. Pro Probe wurden drei Messungen gemacht, aufgeführt ist jeweils der Durchschnittswert.



**Abb. 42:** Messzeit in Abhängigkeit des Hämatokritwertes; a) Eichreihe bei INR 1.0, b) Eichreihe bei INR 2.6.

Ausgehend von den Eichkurven in Abbildung 42 zeigt Abbildung 43 die jeweiligen Abweichungen der Messzeiten in Prozent (im Vergleich zu einer Messzeit bei einem Hämatokritwert von 0.425).



**Abb. 43:** Prozentuale Abweichungen der Messzeiten in Abhängigkeit des Hämatokritwertes

[a) INR 1.0 b) INR 2.6]; Vergleich zu einem Hämatokritwert von 0.425

## Folgerung

Mit steigendem Hämatokritwert (Hk) dauert auch die Messzeit  $t_{300}$  länger an. Dies ist wohl damit zu erklären, dass, bedingt durch den höheren Zellenanteil im selben Blutvolumen weniger Plasma und somit eine geringere Konzentration an aktivierbaren Gerinnungsfaktoren vorhanden ist. Die Hk-Norm bei Frauen beträgt 0.36 bis 0.44, bei Männern 0.40 bis 0.50. Der Durchschnitt aus beiden Normmittelwerten wurde als absolute Norm angenommen. Aus Abbildung 43 wird deutlich, dass der Einfluss des Hämatokrits nicht zu unterschätzen ist. Die Messzeiten von Vollblutproben können mittels eines 'Hämatokritkorrekturfaktors' ( $x_{\text{Hk}}$ ) durch Einbezug des Hämatokritwertes auf einen mittleren Hämatokritwert von z.B. 0.425 korrigiert werden (Abbildung 43):  $x_{\text{Hk}} = t_{300} * [(0.92286 * \text{Hk} - 0.39243) + 1]$ .

Hk-Werte von rund 0.33 bzw. 0.52 führen bereits zu einer zehn prozentigen Ab- bzw. Zunahme der Messzeit und somit auch des INR-Wertes verglichen mit den Werten bei einem mittleren Hämatokritwert von 0.425; die Grenzen des Normbereiches 0.36 (unterer Normbereich bei Frauen) und 0.50 (oberer Normbereich bei Männern) fallen schon mit sieben bis acht Prozent Abweichung ins Gewicht. Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, sich dieser Problematik anzunehmen. Einerseits könnte man die Hk-Bandbreite in drei Teile unterteilen, z.B. in Bereiche  $< 0.35$ ,  $0.35 - 0.50$  und  $> 0.50$ . Im mittleren Bereich würde man nichts unternehmen, sofern das Biosensor-System auf einen mittleren Hk von 0.425 programmiert ist. Liegt der Hk des Patienten ausserhalb des tolerierten Normbereiches, was

natürlich vor dem Beginn der Selbstkontrolle vom Arzt diagnostiziert werden müsste, könnte man dies mittels Korrekturfaktor dem Biosensor-System eingeben. Dieses Vorgehen ist bei Patienten mit stark änderndem Hk nicht angebracht. Da der Hk aber ein Wert ist, der kaum grösseren Schwankungen unterliegt, käme diese Rechen-Korrektur bei den meisten Patienten zumindest theoretisch in Frage. Falls sich eine rechnerische Korrektur des INR-Wertes für angebracht erweist, gibt es noch eine dritte, einfachere Möglichkeit: Vor den Messungen müsste dem Gerät eingegeben werden, ob eine `Frau` oder ein `Mann` die Messung vornimmt. Die Software würde dann die  $t_{300}$  entsprechend entweder auf einen Hk 0.40 bzw. 0.45 bezogenen Algorithmus beziehen. Bei dieser Variante würde man aber geschlechtsuntypische, z.B. krankheitsbedingte `Ausreisser` nicht berücksichtigen. Die einfache Unterscheidung zwischen Mann und Frau erweist sich als wenig sinnvoll, da die Hämatokritmittelwerte der beiden Populationen (Frauen Hk 0.396, Männer 0.430) zu nahe beieinander stehen, die Normbereiche sich überlappen und ziemlich breit sind (Frauen 0.347 – 0.447, Männer 0.360 – 0.48). Sinnvoller wäre, bei allen Personen, bei welchen sich der Hämatokrit stabil im geschlechtsunspezifischen Normbereich (0.35 – 0.50) bewegt, keine Hämatokritkorrektur durchzuführen, bei Personen mit stabil tiefem Hk ( $<0.35$ ) die  $t_{300}$  aber mit einem Faktor ( $\sim 1.06$ ) zu korrigieren. Personengruppen mit stabil hohem Hk ( $> 0.50$ ) gibt es in unseren Breiten kaum, allenfalls trifft dies auf Bevölkerungsgruppen in hochgelegenen Gegenden zu. In solchen Fällen würde der Korrekturfaktor 0.94 betragen.

#### **4.5.2. Zusammenhang von Plasma und Kapillarblut**

##### **Absicht**

Es sollte nun eine Methode gefunden werden, mit welcher man den INR-Wert auch von Kapillarblut bestimmen kann. Ein einfachsten wäre ein Verfahren, das bei Messungen mit Kapillarblut einen Bezug zu Plasma herstellt, wobei die INR-Bestimmung inkl. Temperaturabhängigkeit auf dem bereits erarbeiteten Algorithmus für Plasmaproben basieren könnte. Hierfür sollte nun der Einfluss von Kapillarblut auf die Messzeit im Vergleich zu demjenigen von Plasmaproben untersucht werden.

## Material

Streifen hergestellt gemäss Abschnitt 2.4, mit Kapillarkanal

Potentiostat                      Radiometer Copenhagen PGP 201; 450-016

## Methode

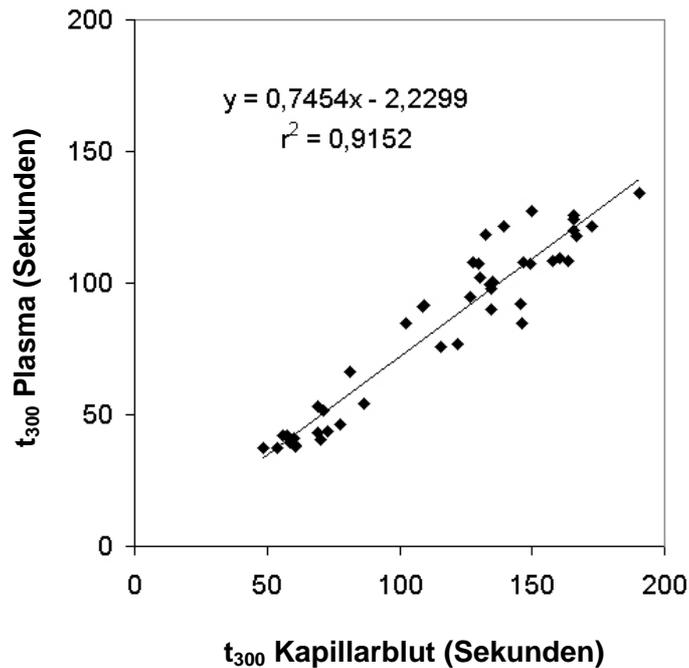
In der Testreihe mit oral antikoagulierten Patienten (siehe Abschnitt 4.2.B) wurden mit dem chronoamperometrischen Messverfahren nebst Plasmaproben auch Kapillarblutproben gemessen und die Kurvenverläufe mittels Potentiostat und Softwareprogramm 'Voltmaster' aufgezeichnet. Die venöse Blutentnahme zur Gewinnung von Plasma und die Fingerpunktionen wurden innerhalb einer halben Stunde durchgeführt, womit von demselben INR-Wert ausgegangen werden konnte. Als Referenzwert wurde die INR im Hämatologischen Zentrallabor des Inselspitals Bern aus der Plasmaprobe bestimmt.

Die gemessenen Zeiten  $t_{300}$  aller Proben wurden mittels Korrekturterm (siehe Abschnitt 4.4. Gleichung II ) auf eine Temperatur von 22.5°C adaptiert. Ebenfalls wurden die Messzeiten nach 4.3. chargenkorrigiert. Sämtliche Hämatokritwerte wurden bestimmt, und die Messzeiten der entsprechenden Kapillarblutproben gemäss Erkenntnisse aus 4.5.1. auf einen Hk von 0.425 'normalisiert'. Es wurden Doppel- oder Dreifachbestimmungen der Messzeiten  $t_{300}$  durchgeführt. Um etwaige Korrelationen abzuleiten, wurden Plasma und Kapillarblut auf verschiedene Weise miteinander in Bezug gebracht:

- Vergleich der  $t_{300}$ -Werte von Plasma und Kapillarblut; Korrelation und Vergleich der Durchschnittswerte
- Vergleich der gemessenen Messzeiten der Kapillarblutproben mit den theoretischen Messzeiten von Plasmaproben desselben INR-Wertes (bestimmt gemäss Algorithmus I in Abschnitt 4.2.); Korrelation und Vergleich der Durchschnittswerte

## Resultate

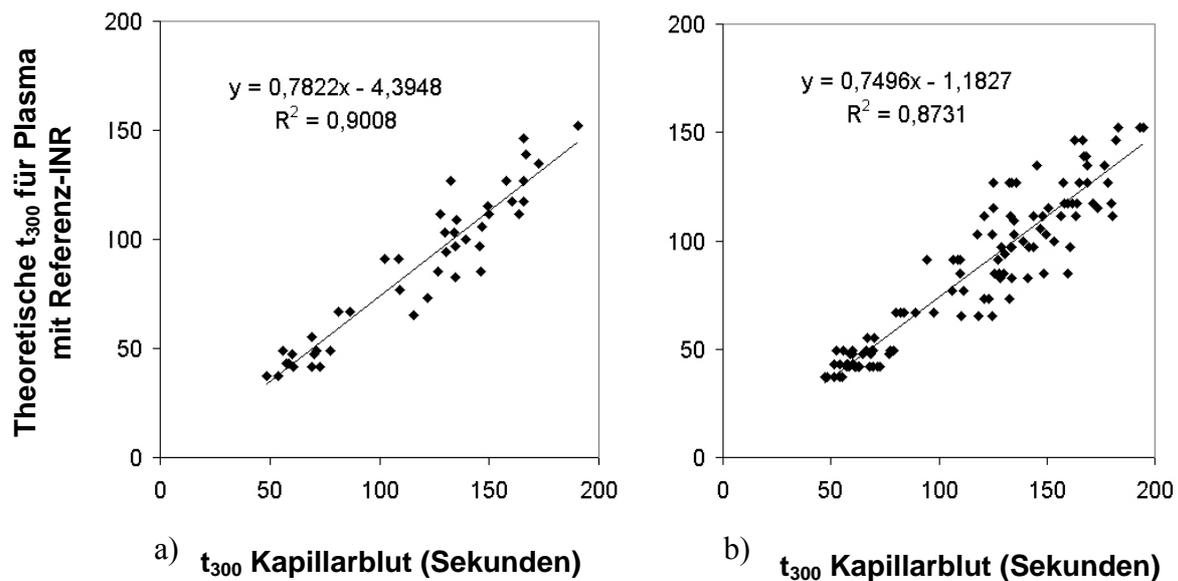
In Abbildung 44 sind die nach Temperatur (auf 22.5°C), Charge (Standardcharge gemäss 4.3.) und Hämatokritwert (auf 0.425) korrigierten Messzeiten der Plasma- und entsprechenden Kapillarblutproben gegeneinander aufgetragen.



**Abb. 44:** Korrelation der nach Temperatur, Charge und Hk normalisierten Messzeiten von Plasma- und entsprechender Kapillarblutproben

Der Durchschnittswert der `normalisierten Messzeiten` von Kapillarblut beträgt 83 Sekunden, der Durchschnittswert der `normalisierten Messzeiten` der Plasmaproben beträgt 115 Sekunden. Mit einem Faktor von 0.72 liessen sich die Kapillarblut-Messzeiten im Mittel zu Plasma-Messzeiten korrigieren.

In Abbildung 45 sind die nach Temperatur (auf 22.5°C), Charge (Standardcharge gemäss 4.3.) und Hämatokritwert (auf 0.425) korrigierten Messzeiten der Kapillarblutproben gegen die theoretischen Messzeiten (bei 22.5°C) für Plasmaproben desselben INR-Wertes aufgetragen.



**Abb. 45:** Korrelation der nach Temperatur, Charge und Hk normalisierten Messzeiten von Kapillarblutproben [a) Mittelwert; b) alle Werte] und der theoretischen Messzeiten von Plasmaproben entsprechenden INR-Wertes (je bei 22.5°C)

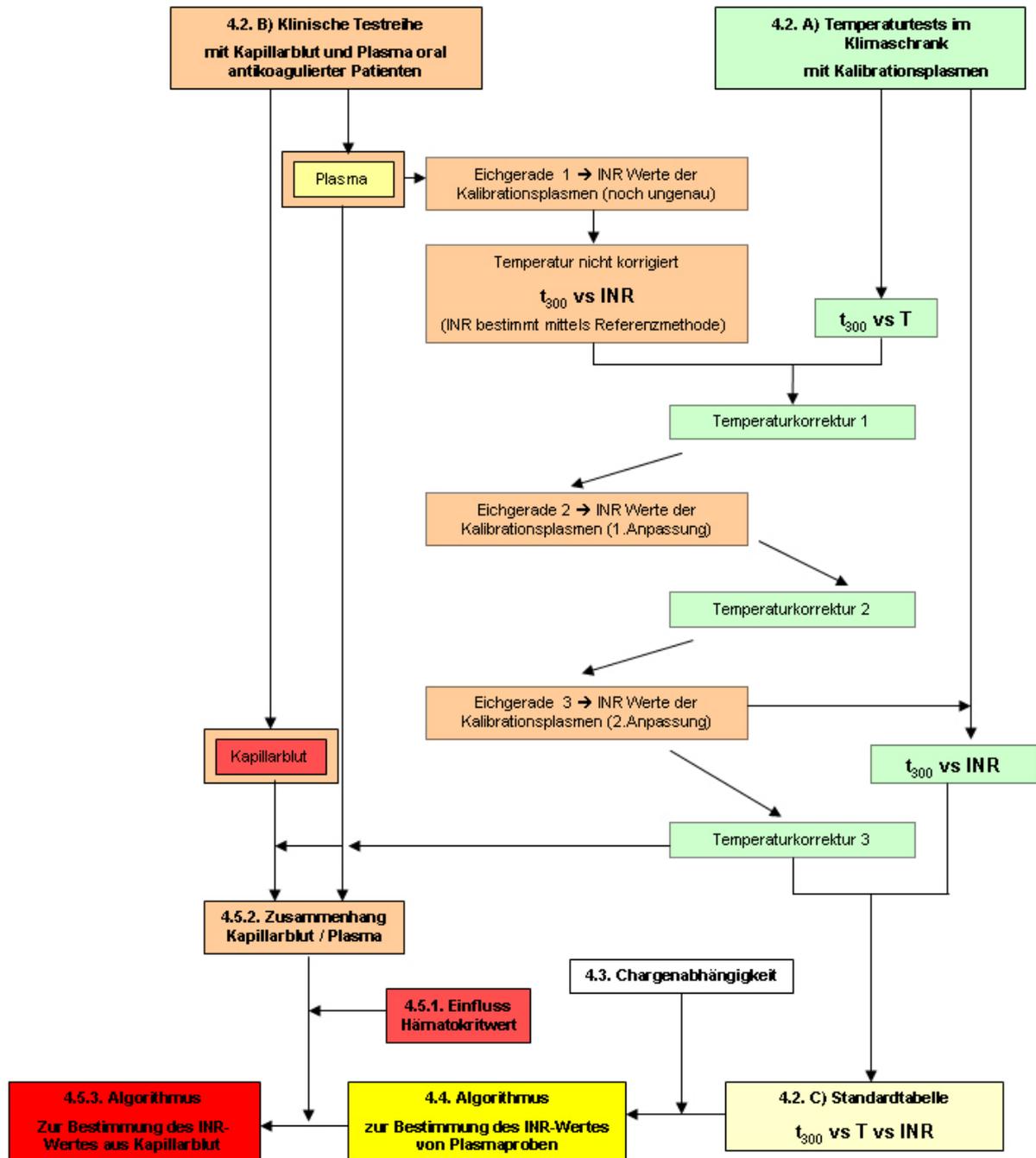
Der Durchschnittswert aller Mittelwerte der `normalisierten Messzeiten` von Kapillarblut (Abbildung 45a) ist 89 Sekunden, der Durchschnitt aller Kapillarblut-Mehrfachmessungen (Abbildung 45b) beträgt 84 Sekunden. Der Durchschnittswert der `theoretischen Messzeiten für Plasmaproben desselben INR-Wertes` beträgt 115 bzw. 114 Sekunden. Die Kapillarblut-Messzeiten liessen sich somit mit einem Faktor von 0.77 bzw. 0.74 zu Plasma-Messzeiten korrigieren.

### Folgerung

Die guten Korrelationen sowie die Gegebenheit, dass alle Regressionsgeraden nahezu durch den Nullpunkt verlaufen, lassen darauf schliessen, dass die Messzeit der einzelnen Kapillarblutproben mittels der Steigung als einfacher Multiplikationsfaktor in die Messzeit der entsprechenden Plasmaproben korrigiert werden kann. Mit einem Faktor von 0.74 lassen sich die Kapillarblut-Messzeiten im Mittel am besten zu Plasma-Messzeiten korrigieren. 0.74 wird als Korrekturfaktor definiert.

### 4.5.3. Algorithmus zur Bestimmung des INR-Wertes von Kapillarblut

In Abbildung 46 ist das gesamte methodische Vorgehen zur Ableitung des INR-Wertes von Kapillarblutproben schematisch dargestellt.



**Abb. 46:** Verfahren zur Ableitung einer Methode zur Bestimmung des INR-Wertes aus Plasmaproben und Kapillarblut aus Messzeit und Messtemperatur; schematische Darstellung; die Ziffern beziehen sich auf den Abschnitt, in welchem der entsprechende Schritt behandelt wird

Es wurde gezeigt, dass sich der INR-Wert von Kapillarblut (bzw. Nativblut) aus der Messzeit  $t_{300}$  und der entsprechenden Messtemperatur  $T$  mittels eines auf der Plasmabestimmung basierenden Algorithmus ableiten lässt.

$$\mathbf{INR}_{\mathbf{Kap}} = \mathbf{a} * \mathbf{0.74} * \mathbf{x}_{\mathbf{Lot}} * \mathbf{x}_{\mathbf{Hk}} * \{\mathbf{t}_{\mathbf{300}} * [(\mathbf{c} * \mathbf{T} - \mathbf{d}) + \mathbf{1}]\} + \mathbf{b}$$

$$\mathbf{INR}_{\mathbf{Kap}} = \mathbf{a} * \mathbf{0.74} * \mathbf{x}_{\mathbf{Lot}} * [(\mathbf{0.9236} * \mathbf{Hk} - \mathbf{0.3927}) + \mathbf{1}] * \{\mathbf{t}_{\mathbf{300}} * [(\mathbf{c} * \mathbf{T} - \mathbf{d}) + \mathbf{1}]\}^2 + \mathbf{b}$$

Die Messzeit  $t_{300}$  soll vom Biosensor-System detektiert und die Messtemperatur mittels Temperatursensor erfasst werden. Die Chargenabweichung  $x_{\text{Lot}}$ , der Korrekturfaktor für Messungen mit Vollblut 0.74 (=  $x_{\text{VB}}$ ) und die Berücksichtigung des Hämatokritwertes  $x_{\text{Hk}}$  könnten zu einem Term  $x_{\text{korr}}$  zusammengefasst werden, der dem Gerät vor der Messung eingegeben werden muss.

Im Rahmen der Selbstbestimmung des INR-Wertes kann eine Berücksichtigung des Hämatokrits aus Gründen der Benutzerfreundlichkeit kaum verlangt werden. Dieser Term könnte –unter Inkaufnahme der entsprechenden Abweichungen (gemäss Abschnitt 4.5.1.)- vernachlässigt werden. Es bleibt ein Algorithmus mit einem Korrekturterm  $x_{\text{korr}}$ , in welchem  $x_{\text{Lot}}$  und  $x_{\text{VB}}$  eingerechnet sind und somit sowohl für Messungen mit Plasma wie auch mit Vollblut eingesetzt werden kann. Bei Messungen mit Plasma ist  $x_{\text{VB}}$  gleich eins. Alle in der Praxis möglichen Faktoren  $x_{\text{korr}}$  könnten im Gerät vorprogrammiert und mittels chargenspezifischer Los-Nummer selektiert werden:

$$\mathbf{INR} = \mathbf{a} * \mathbf{x}_{\mathbf{korr}} * \{\mathbf{t}_{\mathbf{300}} * [(\mathbf{c} * \mathbf{T} - \mathbf{d}) + \mathbf{1}]\} + \mathbf{b}$$

## 4.6. Richtigkeit der Methode

### Absicht

Der Einfluss diverser Parameter auf die INR-Bestimmung wurde in einzelnen Schritten abgeklärt; schliesslich konnte mit diesen Erkenntnissen ein Algorithmus für die Ableitung des INR-Wertes aus Plasmaproben- bzw. Kapillarblut erstellt werden. Bevor erste Biosensor-Prototypen entsprechend kalibriert werden, sollte die Richtigkeit des Verfahrens abgeklärt werden.

### Methoden

#### 4.6.1. Testreihe mit Blutproben oral antikoagulierter Patienten

Es wurde die Testreihe mit Plasma und Kapillarblut oral antikoagulierter Patienten verwendet (siehe 4.2.B), welche bereits der Kalibrierung des Systems diente (Abschnitt 4.2.B und 4.5.2.). Durch Einsetzen der Rohdaten 'Messzeit  $t_{300}$ ' und 'Messtemperatur' sowie des entsprechenden Chargenkalibrationsfaktors in den Algorithmus (gemäss 4.5.3.) sollte die Korrelation der eigenen Ergebnisse verglichen mit den im Referenzlabor (Hämatologisches Zentrallabor des Inselspitals Bern) bestimmten Werten verglichen werden.

#### 4.6.2. Bestimmung 'ISI-Wert des Biosensor-Systems'

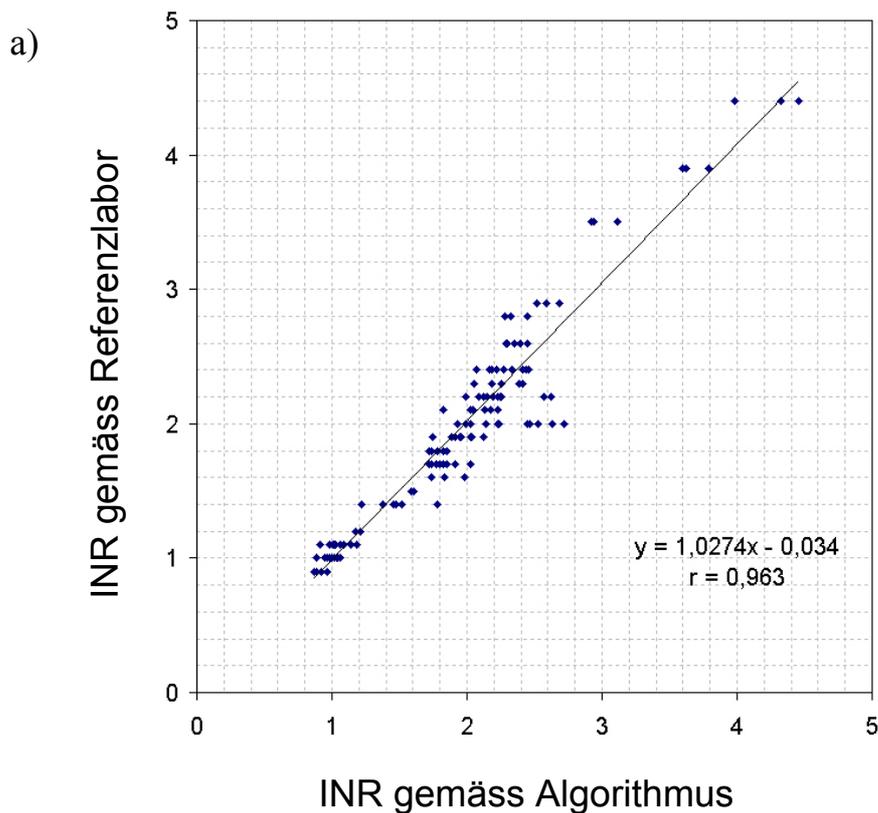
Trotz der Kalibrierung des Systems über INR-Kalibrationslösungen, welche ohne Bestimmung des ISI-Wertes und der MNPT auskommt, liess sich der ISI-Wert und die MNPT jeder Streifencharge anhand der Eichgeraden ableiten (siehe Kapitel I, Abschnitt 4.2.4.), was einen Hinweis auf die Sensitivität des Bestimmungsverfahrens gibt. Da die ISI-Werte der beiden Streifenchargen für Messungen mit Kapillarblut nicht von den Eichgeraden (erstellt mittels Kalibrationsplasmen) abgeleitet werden konnten, behalf man sich der durch die Messpunkte gehenden Regressionsgeraden der Versuchsreihe (x-Achse: log [INR-Werte gemäss Referenzmethode] / y-Achse: log [ $t_{300}$ -Werte Kapillarblutproben]) und leitete ISI-Wert und MNPT daraus ab. Zum Vergleich mit den Resultaten, welche mittels Algorithmus

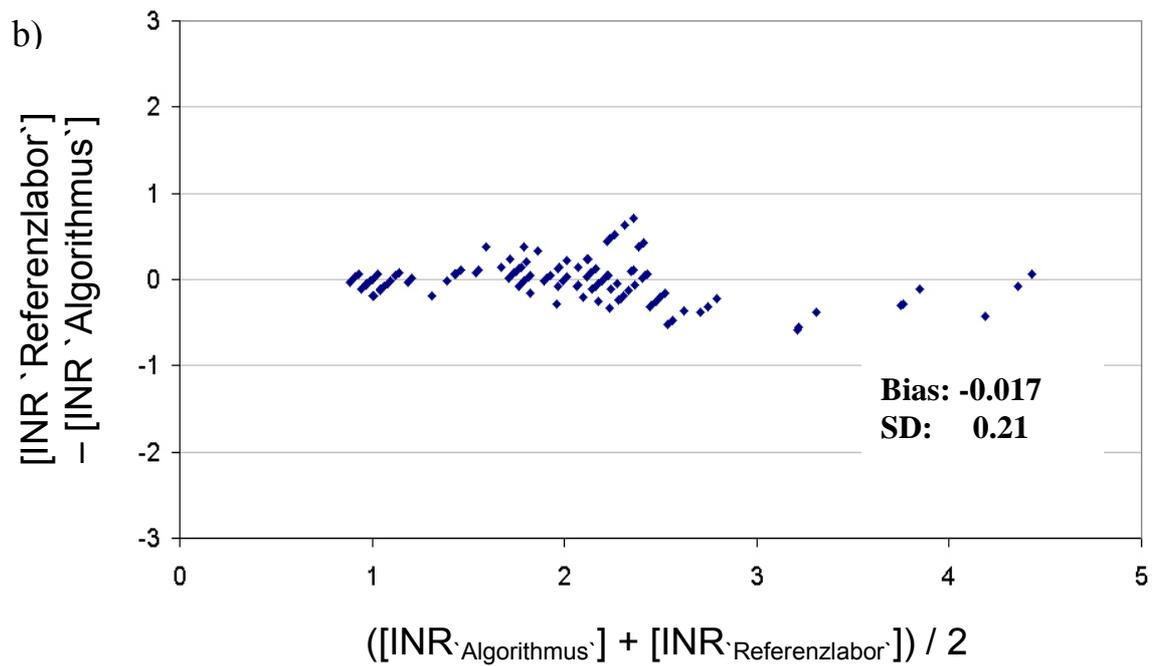
erhalten wurden, wurden die INR-Werte der Patientenproben nun auch über ISI-Wert und MNPT ermittelt.

## Resultate

### 4.6.1. Testreihe mit Blutproben oral antikoagulierter Patienten

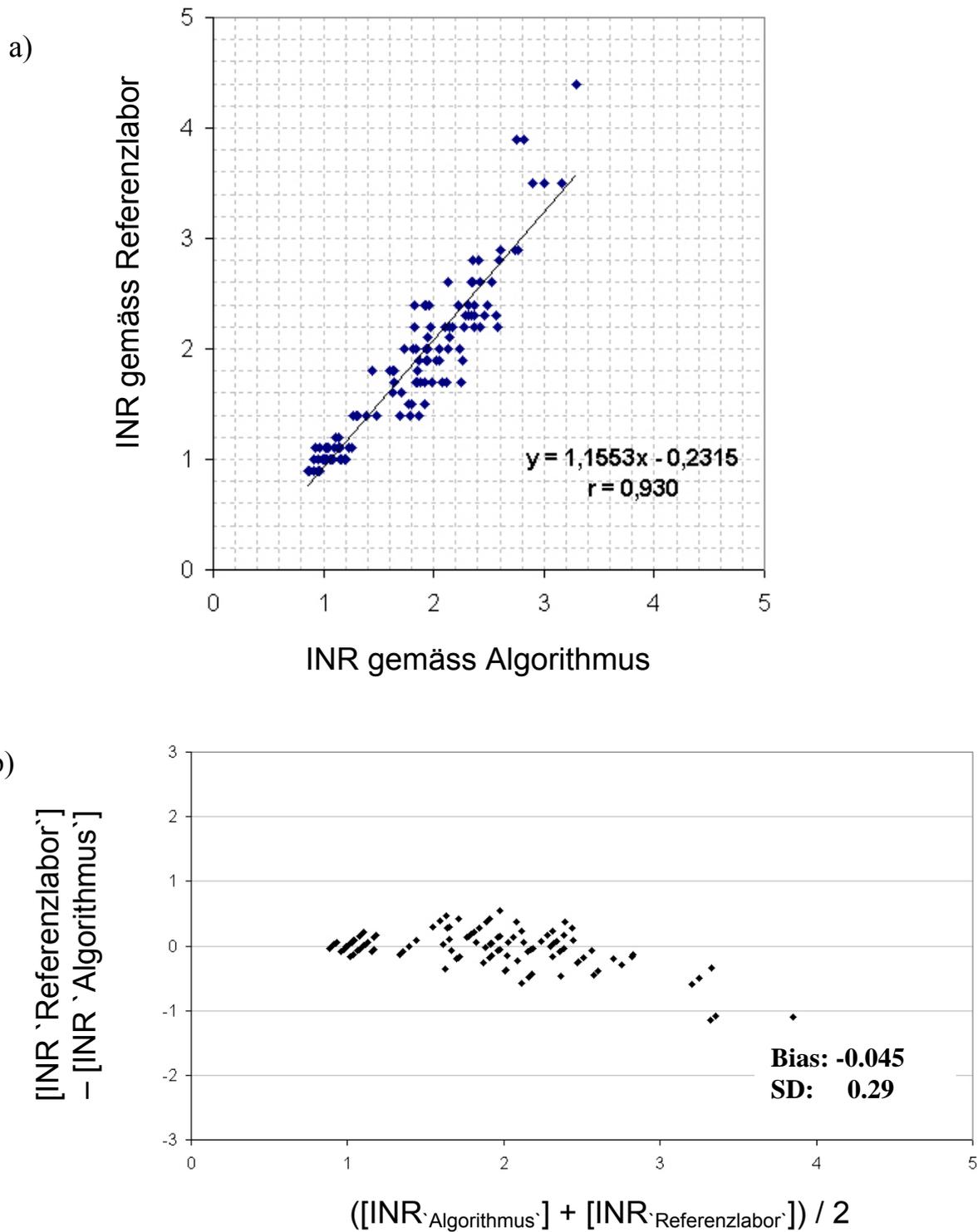
In Abbildung 47 sind die Korrelationen zwischen den mittels Algorithmus erhaltenen und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (in beiden Fällen aus Plasmaproben) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].





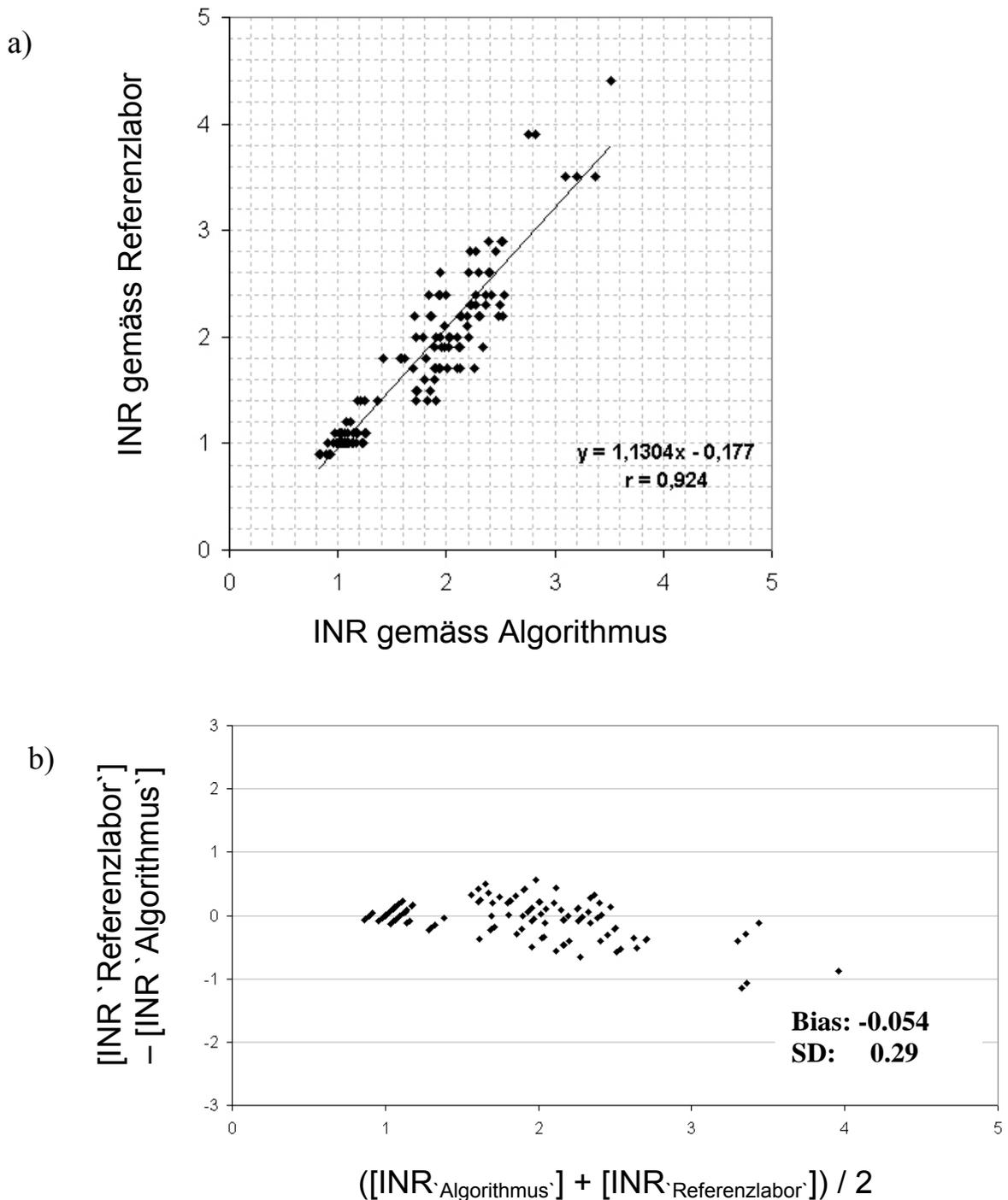
**Abb. 47:** Studie zur Kalibration des Messverfahrens: Korrelationen zwischen den mittels Algorithmus erhaltenen und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (in beiden Fällen aus Plasmaproben) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].

In Abbildung 48 sind die Korrelationen zwischen den mittels Algorithmus erhaltenen (Messungen von Kapillarblut, Hämatokrit berücksichtigt) und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (aus Plasmaproben) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].



**Abb. 48:** Studie zur Kalibration des Messverfahrens: Korrelationen zwischen den mittels Algorithmus erhaltenen (Messungen von Kapillarblut, *Hämatokrit berücksichtigt*) und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (aus Plasmaproben) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].

In Abbildung 49 sind die Korrelationen zwischen den mittels Algorithmus erhaltenen (Messungen von Kapillarblut, Hämatokrit nicht berücksichtigt) und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (aus Plasmaproben) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].



**Abb. 49:** Studie zur Kalibration des Messverfahrens: Korrelationen zwischen den mittels Algorithmus erhaltenen (Messungen von Kapillarblut, **Hämatokrit nicht berücksichtigt**) und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (aus Plasmaproben) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].

#### 4.6.2. Bestimmung `ISI-Wert des Biosensor-Systems`

- ISI-Wert für Messungen mit Plasma:

Die ISI-Werte betragen 0.86 (Streifencharge 1) bzw. 0.88 (Streifencharge 2) und die entsprechenden MNPT-Werte 43 Sekunden bzw. 44 Sekunden (MNPT-Werte gelten für Messungen bei 22.5°C).

Die aus den ISI- und MNPT-Werten der jeweiligen Streifencharge ermittelten INR-Werte der Patientenplasmaproben korrelierten linear mit dem Korrelationskoeffizienten  $r = 0.962$  nach der Gleichung  $y = 0.9806x - 0.0006$ ; im Bland-Altman-Plot beträgt die Standardabweichung 0.21, bei einem Bias von 0.038 INR (Graphiken nicht gezeigt).

- ISI-Wert für Messungen mit Kapillarblut (Hämatokrit nicht berücksichtigt):

Die ISI-Werte betragen 1.10 (Streifencharge 1) bzw. 0.84 (Streifencharge 2) und die entsprechenden MNPT-Werte 68 Sekunden bzw. 58 Sekunden (MNPT-Werte gelten für Messungen bei 22.5°C).

Die aus den ISI- und MNPT-Werten der jeweiligen Streifencharge ermittelten INR-Werte der Patientekapillarblutproben korrelierten linear mit dem Korrelationskoeffizienten  $r = 0.935$  nach der Gleichung  $y = 0.9664x + 0.0572$ ; im Bland-Altman-Plot beträgt die Standardabweichung 0.26, bei einem Bias von 0.002 INR (Graphiken nicht gezeigt).

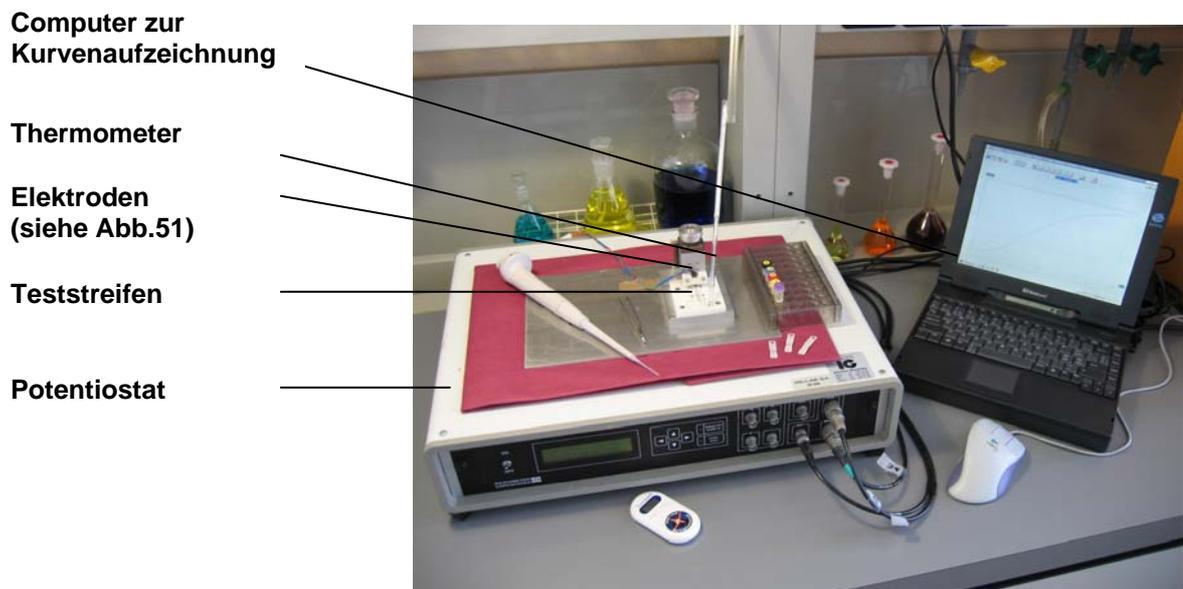
### Folgerung

Die nach Einsetzen der  $t_{300}$ -Werte und entsprechenden Messtemperaturen erhaltenen INR-Werte korrelieren gut mit den mittels Referenzsystem bestimmten INR-Werten. Nicht zu vergessen ist die stets miteinbezogene aber nicht definierte Ungenauigkeit des Referenzsystems. Sowohl mit Plasma- als auch mit Kapillarblutproben werden Korrelationen erreicht, die vermarkteten Systemen ebenbürtig sind. Aufgrund des jeweils geringen Bias` im Bland-Altman-Plot kann ein systematischer Fehler im Algorithmus ausgeschlossen werden. Wurden die Messzeiten nicht `hämatokritkorrigiert`, führt dies zwar zu einer schlechteren

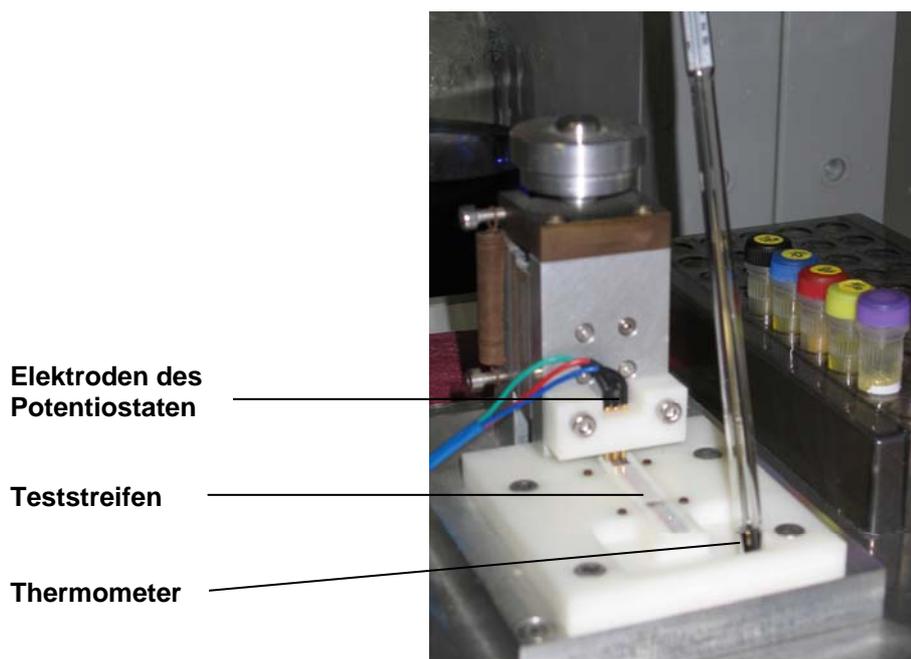
Korrelation, die Einbusse dürfte aber –solange es sich nicht um extreme Hämatokritwerte handelt- in Kauf genommen werden können, insbesondere weil eine Berücksichtigung des Hämatokritwertes im Einzelfall wie bereits besprochen kaum praktikabel ist.

Für Messungen mit Plasma weist unser System einen ISI-Wert von jeweils knapp 0.9 auf, für Messungen mit Kapillarblut einen ISI-Wert von 0.84 bzw. 1.10. Die ISI-Werte liegen alle um 1.0 herum, ein Zeichen für eine sehr gute, hohe Empfindlichkeit des Systems. Dies ist umso bemerkenswerter, da nicht absehbar war, wie sich das Thromboplastin nach der Wiedereintrocknung auf den Teststreifen verhalten würde. Der Vergleich der mittels Algorithmus abgeleiteten INR-Werte mit denjenigen, welche nach herkömmlicher Methode mit MNPT und ISI berechnet wurden, zeigt, dass die Resultateermittlung mittels des kreierten Algorithmus zulässig ist.

Es ist erwiesen, dass das Messverfahren –bisher stets mit Labor-Potentiostat (Abbildung 50) ausgeführt- und die Ableitung der INR mittels Algorithmus zu Werten führt, die der geforderten Richtigkeit entsprechen.



**Abb. 50:** Labor-Gerätschaften zur Ableitung des INR-Wertes mittels Amperometrie



**Abb. 51:** `Kopplung des Teststreifens an die Elektroden des Potentiostaten (Ausschnitt aus Abb.50)

Als nächstes soll das Verfahren mit ersten Prototypen, die für das amperometrische Messprinzip und gemäss entwickeltem INR-Ableitungsverfahren programmiert sind, validiert werden.

## 5. Evaluation erster Biosensor-Prototypen



**Abb. 52:** Prototyp des Biosensor-Systems (Detektionsgerät und Teststreifen) zur Ableitung des INR-Wertes mittels amperometrischem Messverfahren [enthaltend Potentiostat, Elektroden, Thermometer, Computer (siehe Abb. 50)]

### Absicht

Als nächstes sollten nun also erste Prototypen (siehe Abb. 52), die für das amperometrische Messprinzip und gemäss entwickeltem INR-Ableitungsverfahren programmiert wurden, validiert werden. Dies sollte zusätzlich zur Überprüfung der bereits mittels Potentiostat getesteten Funktionen wie dem Messprinzip (Reaktionsgemisch, Kalibrierung, INR-Algorithmus) vor allem der Überprüfung der Elektronik dienen, d.h. der Kontrolle, ob die `Hardware` (inkl. Temperaturmessung) und die `Software` richtig und vollständig eingefügt bzw. programmiert wurden.

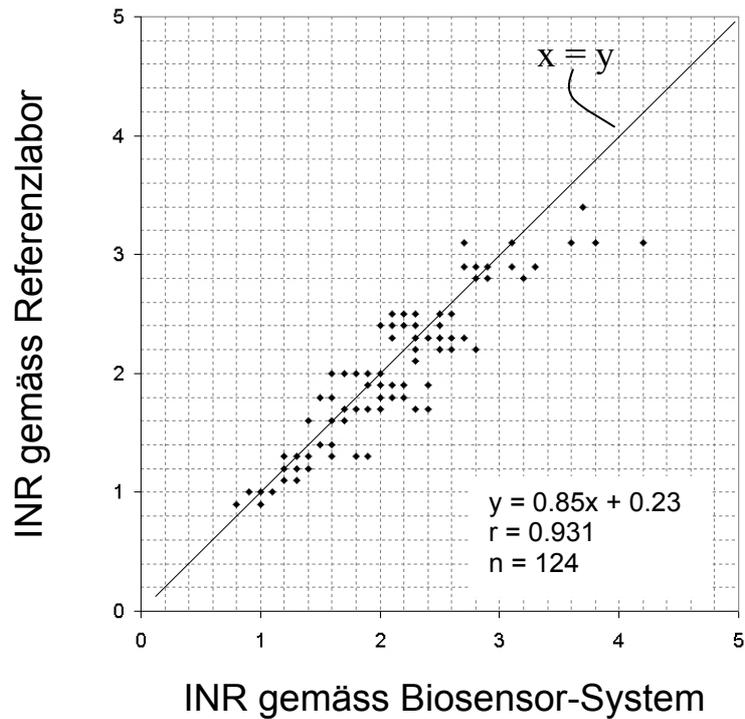
## Methoden

- Zum Zweck der Validierung erster Prototypen wurde die Versuchsreihe, welche zur Kalibrierung des Systems diente (4.2.B und 4.5.2.), fortgesetzt. Das Studienprotokoll wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt. Das Studiendesign unterschied sich nur darin, dass die Messungen nun nicht mittels Potentiostaten, sondern mittels programmiertem Biosensor-System durchgeführt wurden. Die Kurvenauswertung musste nicht mehr im Anschluss an die Messungen separat erfolgen, das Biosensorgerät ermittelte das entsprechende Resultat direkt in `INR-Einheiten`. Der Hämatokritwert wurde nicht berücksichtigt. Zur Gewährleistung der Temperaturadaptation des im Biosensor integrierten Temperaturfühlers wurde darauf geachtet, dass der Biosensor vor der Messung mindestens eine viertel Stunde am Ort der Messung bereit lag. Die Blutproben wurden weiterhin mittels Pipette auf das Reaktionsfeld aufgetragen. Es wurden bei 42 oral antikoagulierten Patienten und 5 gerinnungsgesunden Probanden wiederum in Doppel- oder Dreifachpunktionen jeweils 10 µl Kapillarblut entnommen (zur Messung mittels Biosensor-System), sowie eine venöse Blutentnahme durchgeführt, welche als Referenzwert diente (INR-Wert bestimmt vom Hämatologischen Zentrallabor des Inselspitals aus Plasma). Dieselbe venöse Plasmaprobe wurde schliesslich auch noch mittels Biosensor-System gemessen. Ein direkter Vergleich der INR-Werte von Kapillarblut- und Plasmaproben derselben Person (beide erhalten mittels Biosensor-System; bei Mehrfachmessungen jeweils Durchschnittswerte gegeneinander aufgetragen) sollte schliesslich zeigen, ob der Korrekturterm für Messungen mit Vollblut (0.74) richtig gewählt wurde.
- Die Präzision des Systems, d.h. die Reproduzierbarkeit von Messresultaten, wurde durch jeweils zehnfache Messung derselben Plasmaproben (INR 1.1, INR 2.7; INR 5.6) (bei jeweils 22.0°C) ermittelt.
- Zur Evaluation der Richtigkeit des Systems bestimmte man den INR-Wert von zwei offiziellen Ringversuch-Plasmaproben des CSCQ (Centre Suisse de Contrôle de Qualité). Die Resultate wurden nicht eingesandt. Die entsprechenden Auflösungen des Ringversuches konnten aber offiziell eingesehen werden.

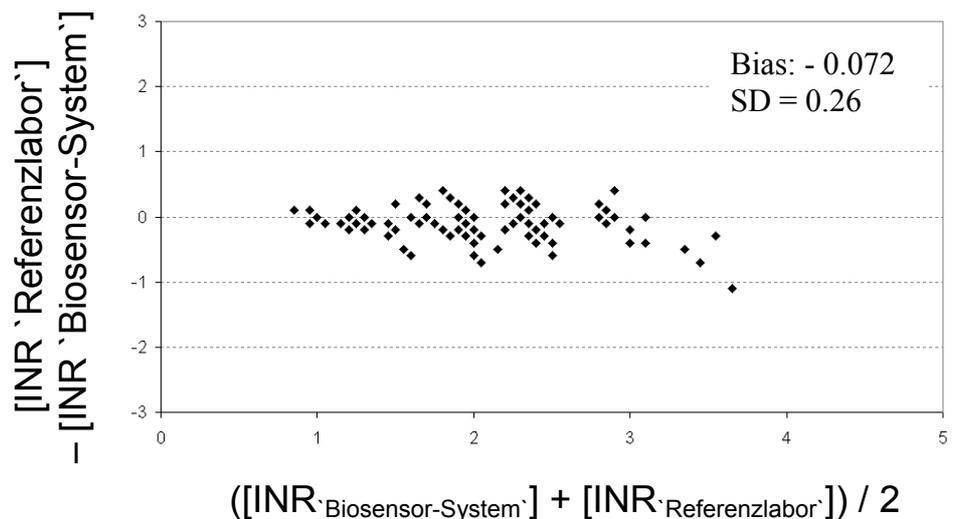
## Resultate

In Abbildung 53 sind die Korrelationen zwischen den mittels Biosensor-System erhaltenen und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (in beiden Fällen aus Plasmaproben) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].

a)

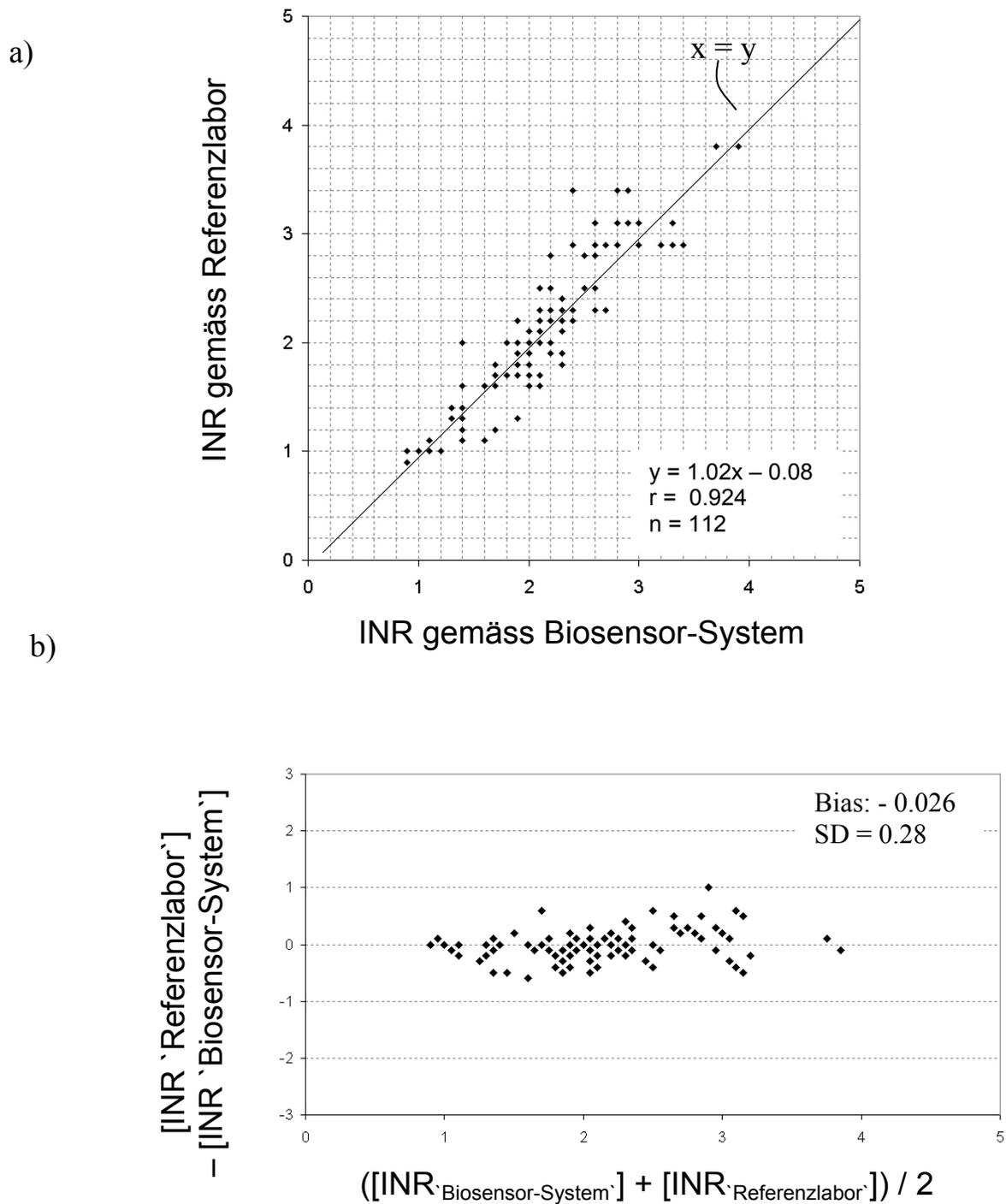


b)



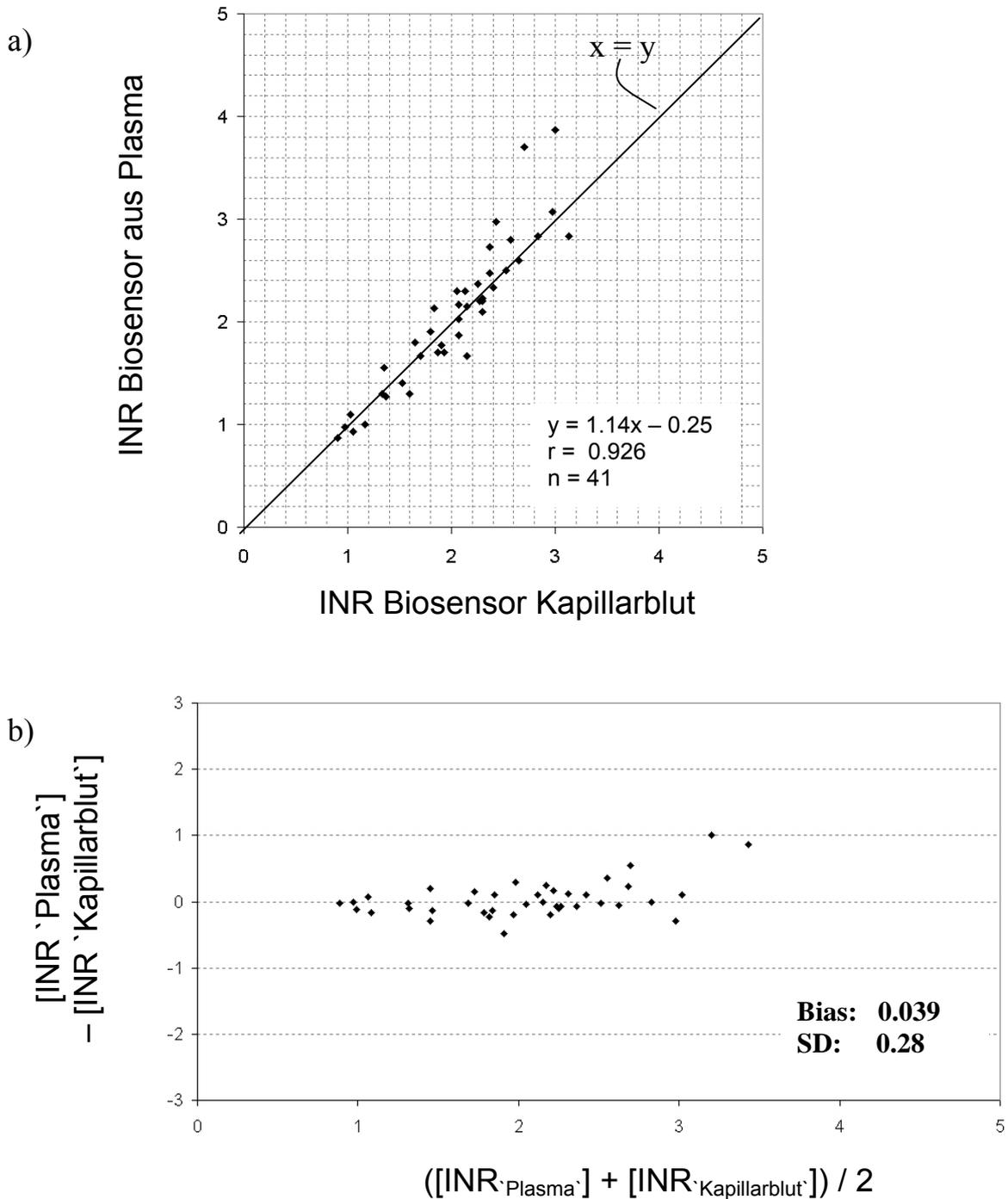
**Abb. 53:** Studie zur Validierung erster Biosensor-Prototypen: Korrelationen zwischen den mittels Biosensor-System erhaltenen und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (in beiden Fällen aus **Plasmaproben**) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].

In Abbildung 54 sind die Korrelationen zwischen den mittels Biosensor-System erhaltenen (Messungen von Kapillarblut, Hämatokrit nicht berücksichtigt) und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (aus Plasmaprobe) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].



**Abb. 54:** Studie zur Validierung erster Biosensor-Prototypen: Korrelationen zwischen den mittels Algorithmus erhaltenen (Messungen von **Kapillarblut**, Hämatokrit nicht berücksichtigt) und den im Referenzlabor bestimmten INR-Werten (aus Plasmaprobe) dargestellt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].

In Abbildung 55 sind die Korrelationen zwischen den aus Kapillarblut (Hämatokrit nicht berücksichtigt) und Plasma erhaltenen INR-Werten (beide mittels Biosensor-System bestimmt) aufgeführt [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].



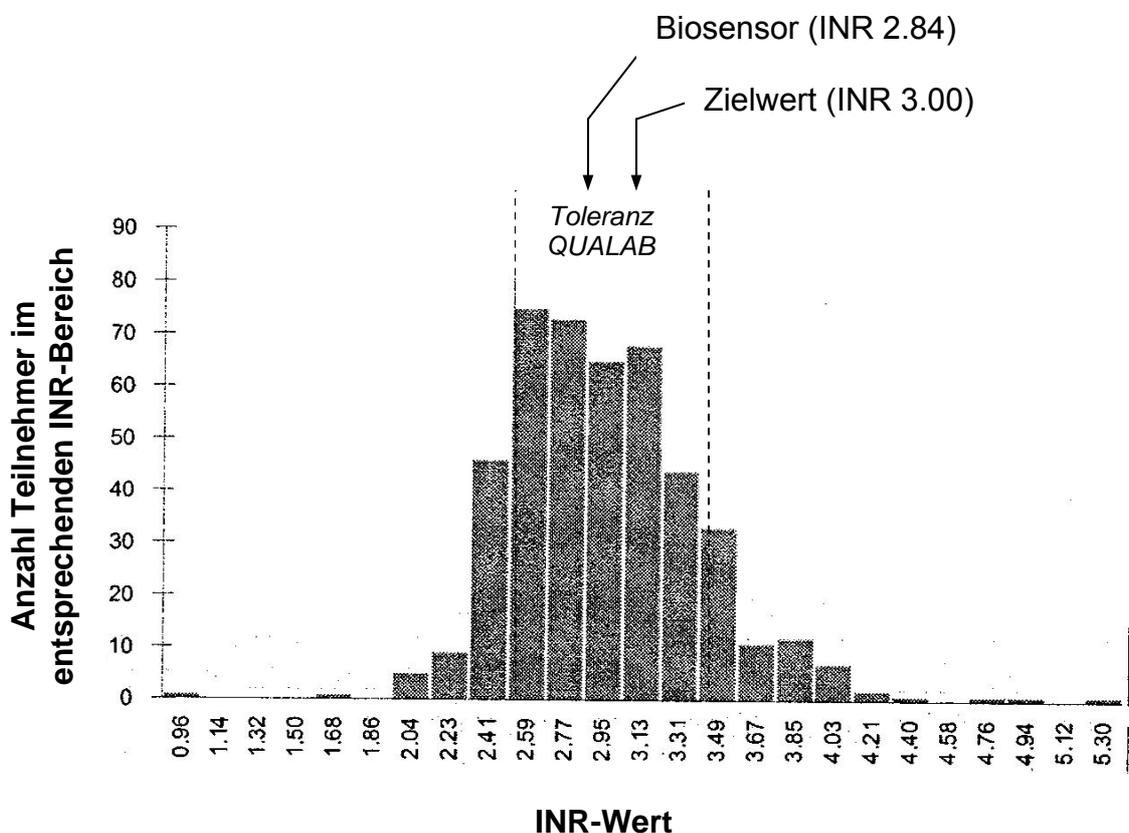
**Abb. 55:** Studie zur Kalibration des Messverfahrens: Korrelationen zwischen den aus Kapillarblut (Hämatokrit nicht berücksichtigt) und Plasma erhaltenen INR-Werten (beide mittels Biosensor-System bestimmt) [a) Scatter-Plot; b) Bland-Altman-Plot].

- Reproduzierbarkeit

- Mehrfachmessungen mit Plasma INR 1.1 zeigen eine relative Standardabweichung von 3.7% (INR  $1.1 \pm 0.05$  bzw.  $49 \pm 2$  sec)
- Mehrfachmessungen mit Plasma INR 2.7 zeigen eine relative Standardabweichung von 3.5% (INR  $2.7 \pm 0.1$  bzw.  $143 \pm 5$  sec)
- Mehrfachmessungen mit Plasma INR 5.6 zeigen eine relative Standardabweichung von 5.2% (INR  $5.6 \pm 0.3$  bzw.  $318 \pm 17$  sec)

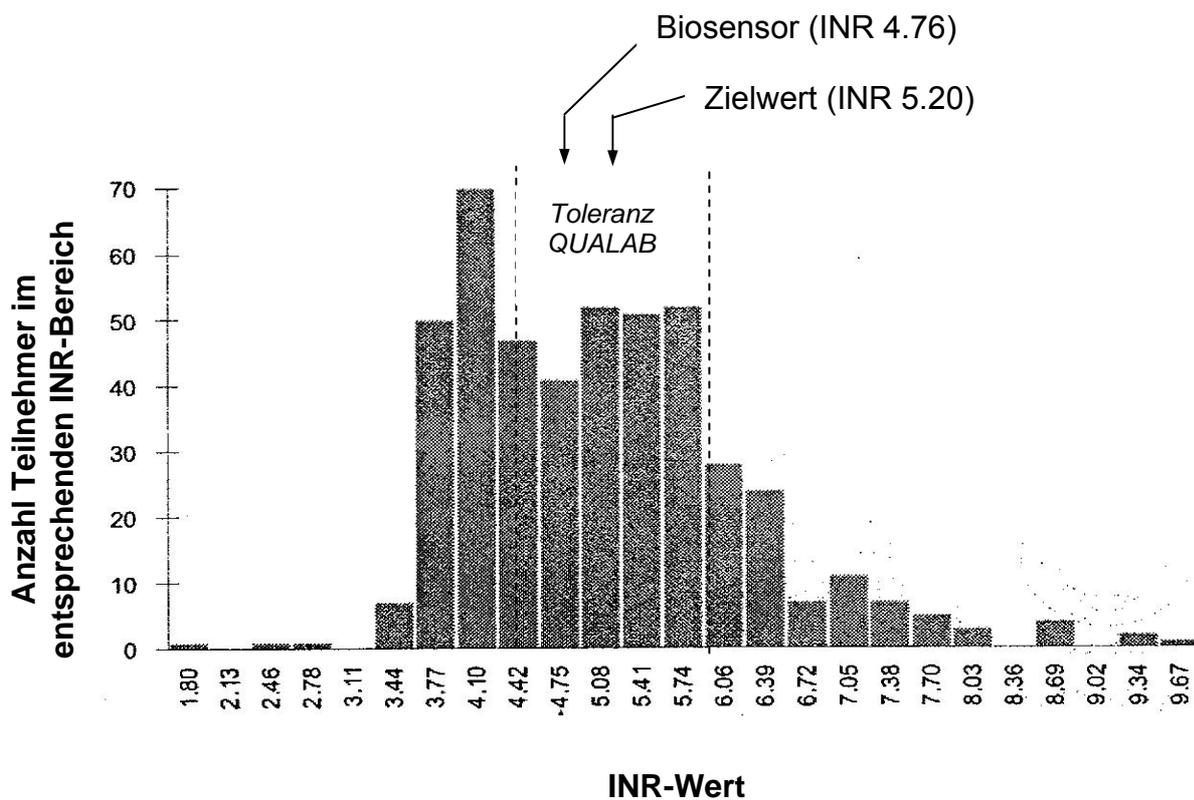
- `Ringversuche`

-Beim einen Ringversuch wurde der INR-Wert des Plasmas mittels Biosensor-System auf INR 2.84 beziffert. Der Zielwert war INR 3.00. Die Abweichung betrug somit 5.33%. Die von der QUALAB, der schweizerischen Kommission für Qualitätssicherung im medizinischen Labor, tolerierten Abweichung von  $\pm 15\%$  entsprechen bei einem Zielwert von 3.00 einer Bandbreite von INR 2.55 – 3.45. Bei diesem offiziellen Ringversuch wurden 462 Teilnehmer einbezogen. Die Standardabweichung betrug INR 0.47, was einer relativen Standardabweichung von 15.46% gleichkommt. Die Verteilung der Resultate ist in Abbildung 56 aufgeführt.



**Abb. 56:** Vergleich des mittels Biosensor-Systems bestimmten INR-Wertes der Ringversuch-Plasmaprobe mit den Resultaten der 462 offiziellen Teilnehmern eines Ringversuches des CSCQ

-Beim zweiten Ringersuch wurde der INR des Plasmas mittels Biosensor-System auf INR 4.76 beziffert. Der Zielwert war INR 5.20. Die Abweichung betrug somit 8.46%. Die von der QUALAB tolerierten Abweichung von  $\pm 15\%$  entsprechen bei einem Zielwert von 5.20 einer Bandbreite von INR 4.42 – 5.98. Bei diesem offiziellen Ringversuch wurden 465 Teilnehmer einbezogen. Die Standardabweichung betrug INR 1.12, was einer relativen Standardabweichung von 21.26% gleichkommt. Die Verteilung der Resultate ist in Abbildung 57 aufgeführt.



**Abb. 57:** Vergleich des mittels Biosensor-Systems bestimmten INR-Wertes der Ringversuch-Plasmaprobe mit den Resultaten der 465 offiziellen Teilnehmern eines weiteren Ringversuches der CSCQ

## Folgerungen

Die Resultate der Validierungstestreihe der ersten Biosensor-Prototypen sind gut. Es wurden in etwa dieselben Korrelationen erzielt wie beim ersten Teil der Testreihe, welcher der Kalibration des Messsystems diente. Der Algorithmus konnte somit bestätigt werden, darunter insbesondere die Relation zwischen Plasma- und Kapillarblutproben. Doch auch das Kalibrationsverfahren der Teststreifen mit der Zuordnung eines Chargenkalibrationsfaktors hat seine Bewährungsprobe bestanden. Die Biosensor-Prototypen sind gemäss den Anforderungen zusammengestellt und programmiert worden. Ein Patient wurde in der Darstellung ausgeschlossen. Er wies einen -verglichen mit dem Biosensor erhaltenen- sehr hohen Referenz-INR-Wert auf (INR 3.7 vs. INR 2.1; Biosensor-Wert bestimmt aus Plasmaprobe wie auch aus Kapillarblut). Der Patient befand sich zur Zeit der Studienteilnahme in spezieller Abklärung bezüglich Thrombophilieneigung. Einige Tage vorher wurden bei ihm extrem hohe D-Dimer-Werte (Fibrinspaltprodukte) gefunden. Diese könnten auch der Grund dafür sein, dass der Wert der Referenzbestimmung derart hoch ist, ein Phänomen, das auf das unterschiedliche Messprinzip zurückgeführt werden könnte (beim entwickelten Biosensor-System wird der unterste Teil der Gerinnungskaskade nicht 'einbezogen'). Die Frage der Kompatibilität des Testverfahrens mit bestimmten Krankheitsbildern oder der Interaktionen mit spezifischen Medikamenten wurde aber im Zusammenhang mit der besprochenen Testreihe nicht konkret untersucht. Der Korrelationsvergleich von Kapillarblut- und Plasmaproben zeigt desweiteren, dass der Korrekturterm für Messungen mit Vollblut (0.74) richtig gewählt wurde.

Die bei der 'Validierung' erster Biosensor-Prototypen unter 'Laborbedingungen' erhaltenen Resultate (Korrelationsvergleich mit Referenzsystem, Reproduzierbarkeitsmessungen sowie 'inoffizielle Teilnahme' an zwei Ringversuchen) zeigen, dass eine neue Methode zur INR-Bestimmung aus Plasma und Kapillarblut entwickelt werden konnte, die -auch 'verpackt' in ein handliches Biosensor-System- den Ansprüchen der Wissenschaft und Medizin an Richtigkeit und Genauigkeit genügt. Zwecks Abklärung der Benutzerfreundlichkeit soll als nächstes eine klinische Studie folgen, in der Patienten, die bereits ein Selbstmanagement der oralen Antikoagulation durchführen, das Biosensor-System zu Hause testen.

## **6. Anwendung durch das Zielpublikum**

### **- eine klinische Studie zur Validierung des Biosensor-Systems**

#### **Absicht**

Das Biosensor-System ist vorgesehen, primär als `Home-Care-Gerät`, d.h. beim Patienten in Eigenanwendung, zum Einsatz zu kommen. Alle vorangegangenen Versuche wurden unter Laborbedingungen durchgeführt. Auch bei der Testreihe mit Kapillarblut antikoagulierter Patienten dienten die Studienteilnehmer gewissermassen `nur` als `Blutquelle`. Es wurden keine Manipulationen durch die Patienten durchgeführt. Das Biosensor-System sollte nun als nächstes von den potentiellen Anwendern, langfristig oral antikoagulierte Patienten, die die Kriterien für ein PSM-OAK erfüllten, in einem `Feldversuch` benutzt und beurteilt werden.

#### **Methode**

Eine klinische Studie mit Patienten, welche bereits ein PSM-OAK mit dem CoaguChek S<sup>®</sup>-System von Roche Diagnostics durchführten, diente einerseits als Datenvergleich mit dem Referenzsystem, andererseits aber auch zur Evaluation der Benutzerfreundlichkeit des Biosensor-Testsystems.

- Organisation der Studie:

Es wurde ein Studienprotokoll gemäss Richtlinien der Kantonalen Ethikkommission Bern verfasst und dieser zur Genehmigung unterbreitet. Ebenfalls wurde der `Swissmedic`, dem schweizerischen Heilmittelinstitut, ein Dossier vorgelegt. Die Ethikkommission genehmigte die Studie; Swissmedic meldete, das zu testende System unterliege nicht der Pflicht einer Durchführung von klinischen Versuchen; das Gesuch sei für Swissmedic somit gegenstandslos. Die Studie wurde desweiteren am Universitätsspital, Inselspital Bern, dem Sitz der Studienleitung, angemeldet. Es wurde ein obligatorischer `Versicherungsschutz für wissenschaftliche Tätigkeit` im Rahmen der klinischen Studie abgeschlossen.

- Patientenrekrutierung:

Am Ende des Rekrutierungsprozesses sollten oral antikoagulierte Patienten eingeschlossen werden können, welche älter als 18 Jahre und urteilsfähig waren, die die Studieninformation gelesen und ihre schriftliche Einwilligung zur Studie gegeben hatten. Sämtliche Studienteilnehmer mussten zu Studienbeginn bereits Erfahrung mit der Selbstmessung des INR-Wertes haben und mindestens während der Dauer der Studie diese Bestimmungen mittels CoaguChek routinemässig fortführen. Zusätzliche Ausschlusskriterien wurden keine definiert. Als potentielle Studienteilnehmer kamen grundsätzlich alle in der Schweiz wohnhaften Personen in Frage, die ihre medikamentöse Behandlung mit oralen Antikoagulantien mittels CoaguChek S<sup>®</sup>-System von Roche Diagnostics, überwachten. In der Schweiz sind sämtliche Patienten, welche ein PSM-OAK durchführen, in der Stiftung 'Coagulation Care' zusammengefasst. Die Stiftungsleitung erlaubte eine Patientenrekrutierung aus ihrer Kartei. Mit dem Ziel rund 30 Patienten schliesslich in die Studie einschliessen zu können, wurden 60 Patienten daraus schriftlich kontaktiert -aus Gründen des Datenschutzes vorerst durch das Sekretariat der Stiftung. Die Anzahl der Studienteilnehmer wurde nicht mittels Poweranalyse bestimmt, sondern richtete sich nach den Kapazitäten der Studienorganisation und an der Grösse der in Frage kommenden Patientenpopulation. In der Schweiz gibt es nur rund 600 Personen, die die Einschlusskriterien erfüllen. 30 Patienten stellten demnach bereits 5% dieser Population dar. Mit Einschluss von 30 Patienten war zu erwarten, dass sich eine genügend gute Aussage über etwaig auftretende Schwierigkeiten bei der Anwendung des Systems 'im Feld' machen liess, insbesondere da die Versuchspersonen allesamt zur Gruppe der potentiellen Anwender gehörten. 42 der 60 angeschriebenen Patienten waren grundsätzlich bereit, an einer solchen Studie teilzunehmen, wovon schliesslich 33 eingeschlossen wurden. Die neun übrigen Personen konnten alle aus terminlichen Gründen nicht berücksichtigt werden. 31 Studienteilnehmer nahmen an einer einführenden Schulung teil, in welcher sie im Gebrauch des Messsystems theoretisch und in praktischer Vorführung instruiert wurden. Es wurde den Teilnehmern die Gelegenheit gegeben, die Anwendung zu üben und Fragen zu stellen. Es wurden fünf Schulungen mit zwischen vier und acht Teilnehmern durchgeführt. Zwecks Beantwortung allfälliger medizinischer Fragen seitens Patienten war an jeder Schulung auch der Prüfarzt der Studie oder ein von ihm delegierter Arzt anwesend. Zwei Studienteilnehmer konnten nicht an einer Schulung teilnehmen. Sie wurden besonders ausführlich schriftlich und telephonisch informiert. Vor dem eigentlichem Studienbeginn wurden die Hausärzte

sämtlicher Patienten über die Studie in Kenntnis gesetzt. Jeder Teilnehmer hätte jederzeit freiwillig und ohne Begründung aus der Studie aussteigen können.

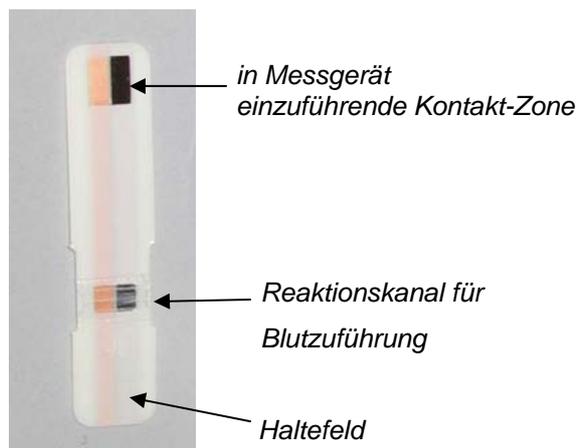
- Studiendesign:

Von der Firma Asulab wurden 33 Biosensor-Geräte bereitgestellt, welche gemäss den oben besprochenen Kriterien konzipiert und programmiert waren. Jedem Studienteilnehmer wurden ein Gerät und 25 Teststreifen, analog jenen im Abschnitt 5 verwendeten, abgegeben. Die Teststreifen waren in aluminiumbeschichteten Plastik-Blistern einzelverpackt. In der Studie wurden vier Streifenchargen eingesetzt (Lot 437 an 8, Lot 438 an 11, Lot 439 an 10 und Lot 442 an 4 Studienteilnehmer). Vorgängig wurde jede Streifencharge gemäss Abschnitt 4.3. kalibriert und einem Kalibrationscode (im Gerät vorprogrammiert) zugeordnet.

Die Studienteilnehmer waren gebeten, während zehn Wochen im Rhythmus ihrer gängigen Selbstkontrolle des INR-Wertes (meist wöchentlich) zusätzlich zur Bestimmung mittels CoaguChek S<sup>®</sup> jeweils innerhalb einer halben Stunde gemäss Anleitung eine zusätzliche Messung mittels Biosensor-Testsystem durchzuführen. Die Resultate (INR-Werte) der Parallelmessungen sollten in ein eigens dafür erstelltes Datenblatt eingetragen werden. Es wurde ausdrücklich darauf verwiesen, dass die Studie keinen Einfluss auf die medikamentöse Therapie mit oralen Antikoagulantien der Patienten ausüben darf. Die Therapie müsse weiterhin auf den mittels CoaguChek<sup>®</sup> erhaltenen Messwerten beruhen. Als schriftliche Anleitung diene den Patienten eine ausführliche, mit Photos illustrierte Gebrauchsanweisung des Biosensor-Systems und zusätzlich eine Kurzfassung in Stichworten. Es wurde verlangt, für die Vergleichsmessungen zwei separate Fingerpunktionen durchzuführen und dabei jeweils auch verschiedene Finger zu wählen. Die Abbildungen 58 bis 66 zeigen eine Auswahl der in der Gebrauchsanweisung figurierenden Illustrationen. Auf weitere Einzelheiten der Gebrauchsanweisung, insbesondere auf die schriftlichen Erörterungen zu den Illustrationen, wird hier nicht weiter eingegangen.



**Abb. 58:** Messgerät



**Abb. 59:** Teststreifen



**Abb. 60:** Eingabe des Kalibrationscodes; Teststreifen in Blistereinzelpackung



**Abb. 61:** Einführen des Teststreifens



**Abb. 62:** Testsystem bereit zur Messung



**Abb. 63:** Entnahme eines Tropfens Kapillarblut mittels Stechhilfe



**Abb. 64:** Auftragen des Blutropfens



**Abb. 65:** Anzeige des INR-Wertes nach der Messung



**Abb. 66:** Ablesen des aktuellen und Abrufen gespeicherter Testresultate

Gegen Ende der Studie wurde den Patienten ein Fragebogen zugesandt, mittels welchem sie Auskunft über die Benutzerfreundlichkeit des Testsystem geben konnten. Zuerst wurden ein paar persönliche Angaben über Indikation der oralen Antikoagulation und über Gewohnheiten bei der Selbstmessung erhoben. Danach war nebst konkreten Fragen über diverse Manipulationsschritte Platz ausgespart, worin die Studienteilnehmer sonstige Bemerkungen und Kritik anbringen konnten. Die Patienten wurden gebeten, den Fragebogen unabhängig von den in den Vergleichsmessungen erhaltenen Daten auszufüllen. Man wollte damit betonen, dass man sich bei der Bewertung der Benutzerfreundlichkeit nicht von den Daten beeinflussen lassen sollte. Anschliessend ist ein Auszug von Fragen des Fragebogens wiedergegeben. Manchmal handelte es sich um `Multiple-choice-Fragen`, bei welchen die Wahl bestand, als Antwort `sehr leicht`, `leicht`, `akzeptabel`, `eher schwierig` und `zu schwierig` anzukreuzen:

- Alles in allem, wie leicht ist Ihnen die Handhabung des Biosensor-Systems gefallen?
- Wie leicht ist Ihnen das Einstellen der Chargen-Nummer des Teststreifens gefallen?
- Wie leicht ist Ihnen das Einführen des Teststreifens gefallen?
- Wie leicht ist Ihnen das Auftragen des Blutropfens gefallen?
- Wie leicht ist Ihnen gefallen, den Finger sauber abzustreifen, damit Blut weder aus dem Reaktionskanal ragt noch auf dem Streifen verschmiert wird?
- Wie leicht ist Ihnen das Ablesen der erhaltenen INR-Werte gefallen?

Desweiteren wurden folgende offene Fragen gestellt:

- Was ist Ihnen ansonsten nicht leicht gefallen, was fanden Sie etwas schwierig?
- Sind während der Studie Probleme aufgetaucht? Falls ja, welche?
- Was gefällt Ihnen am getesteten Biosensor-System nicht ganz so gut?
- Was würden Sie gerne verbessert haben?
- Könnten Sie sich vorstellen, das Biosensor-System zu benutzen, wenn es auf den Markt käme?
- Würden Sie sich wünschen, dass das Biosensor-System noch zusätzliche Funktionen / Eigenschaften hat? Falls ja, welche sind das?

- Studienauswertung:

Bei der Auswertung der Studie wurden einerseits die Daten der Parallelmessungen, andererseits die Fragebogen zur Benutzerfreundlichkeit des Systems analysiert. Bei der Datenanalyse interessierten besonders die Differenzen der Vergleichsmessungen sowie der Anteil der Messwerte, die im -individuell von den Studienteilnehmern angegebenen-therapeutischen Zielbereich lagen. Um die Übereinstimmung zwischen Biosensor-Testsystem-INR ( $INR_B$ ) und CoaguChek-INR ( $INR_C$ ) abzuleiten, wurde die 'mittlere relative Abweichung' (MRD [%]) gemäss van den Besselaar [191] bestimmt (n: Anzahl Vergleichsmessungen):

$$MRD (\%) = 100 \times \Sigma ([INR_B - INR_C] / INR_C) / n$$

Die 33 Studienteilnehmer haben insgesamt 347 Doppelmessungen durchgeführt. Die Messdaten dreier Studienteilnehmer, bei denen man einen begründeten Verdacht hatte, dass zumindest einige davon mittels eines falschen Kalibrationscodes der Teststreifen zustande gekommen waren, wurden nicht berücksichtigt (n=25). Jene Daten, welche gemäss Bemerkungen seitens Studienteilnehmer explizit nicht konform der Gebrauchsanweisung zustande gekommen waren, wurden ebenfalls nicht in die Datenanalyse einbezogen. Bei der Analyse bezüglich der Werte im therapeutischen Zielbereich wurden zudem jene Messwerte nicht berücksichtigt, die nachgewiesenermassen -z.B. aufgrund einer bevorstehenden Operation des Patienten- nicht im üblichen Zielbereich liegen mussten (n=35).

Man wertete die Datensammlung als Ganzes, pro Patient und pro Streifencharge aus. Nach Beginn der Studie wurde bemerkt, dass nicht alle Studienteilnehmer qualitativ gleich verpackte Teststreifen erhalten hatten. Man konnte retrospektiv eruieren, welche Studienteilnehmer welche 'Art Teststreifenverpackung' erhalten hatten. Um diesbezüglich etwaige Konsequenzen für die Messdaten ableiten, sowie um allfällige Lehren bezüglich der Verpackungstechnik ziehen zu können, wurden die Daten schliesslich auch noch nach 'Qualität der Teststreifenverpackung' analysiert.

## Resultate

- Statistische Angaben zu den Studienteilnehmern:

Total:	33 Studienteilnehmer
Geschlecht:	20 Männer, 13 Frauen
Alter:	ø 53 Jahre (23 – 77 Jahre)
- Erfahrung mit PSM-OAK:	ø 1.5 Jahre (1 – 4 Jahre)
- Frequenz der Messungen: (ausserhalb der Studie)	6 Personen mehrmals pro Woche 14 Personen einmal wöchentlich 10 Personen alle zwei Wochen 2 Personen alle 2 – 3 Wochen 1 Person einmal monatlich
- Frequenz der Vergleichsmessungen beim Hausarzt / im Spital:	je 1 Person einmal pro Monat, alle 1.5 Monate, alle 2 Monate, alle 2.5 Monate 3 Personen viermal jährlich 2 Personen dreimal jährlich 18 Personen zweimal jährlich 5 Personen einmal jährlich 1 Person alle zwei Jahre
- INR-Zielbereich:	15 x INR 2.5 – 3.5 11 x INR 2 – 3 2 x INR 3 – 4 1 x INR 2.5 – 3 1 x INR 3 – 3.5 und 2 x INR 2.5 (Zielwert) 1 x INR 3 (Zielwert)

- Grund der oralen Antikoagulation: 15 x künstliche Herzklappe
  - 8 x Thrombophilie (nicht näher bezeichnet)
  - 5 x rezidivierende Lungenembolie
  - 1 x Thrombophilie aufgrund pulmonaler Hypertonie
  - 1 x Vorhofflimmern
  - 1 x Protein S – Mangel
  - 1 x Heterozygote Prothrombinmutation
  - 1 x Antiphospholipid Antikörper - Syndrom

- Auswertung der Fragebogen:

Die Gebrauchsanweisung wurde von allen Studienteilnehmern als genügend gut verständlich erachtet.

In Tabelle 17 sind die Antworten der `Multiple-Choice-Fragen` in prozentualen Anteilen wiedergegeben.

**Tab. 17:** Antworten der `Multiple-Choice-Fragen` in prozentualen Anteilen

	sehr leicht	leicht	akzeptabel	eher schwierig	zu schwierig
<b>Handhabung insgesamt</b>	24.2 %	42.4 %	24.2 %	9.2 %	---
<b>Einstellen der Chargennummer</b>	27.3 %	66.7 %	6 %	---	---
<b>Einführen des Teststreifens</b>	60.7 %	27.3 %	6 %	6 %	---
<b>Auftragen des Blutropfens</b>	12.1 %	21.2 %	27.3 %	33.3 %	6.1 %
<b>Finger sauber abstreifen</b>	12.1 %	21.2 %	24.2 %	33.3 %	9.2 %
<b>Ablesen des Resultates</b>	66.7 %	33.3 %	---	---	---

Die Zellen, welche jeweils in der Zeile den grössten Prozentsatz an `Stimmen` erhalten haben, sind mit der entsprechenden Hintergrundfarbe versehen. Die Handhabung insgesamt und das Einstellen der Chargennummer wurde im Durchschnitt für `leicht` befunden, das Einführen des Teststreifens und das Ablesen des Resultates für `sehr leicht`. Bei den Rubriken `Auftragen des Bluttröpfens` und `Finger sauber abstreifen` votierte jeweils der grösste Prozentsatz für `eher schwierig`; dennoch lässt sich jeweils zusammengefasst eine Mehrheit für `akzeptabel bis sehr leicht` finden. Die betreffenden Prozentanteile sind farblich markiert.

- Auszug von Bemerkungen aus den Fragebogen:

... es ist schwierig, das Blut sauber auf den Teststreifen zu bringen...  
... sehe den Reaktionskanal der Teststreifen noch nicht ausgereift...  
... die Lösung mit dem Blutaustragen von oben finde ich einfacher...  
... schwierig für ältere Personen, die oft noch Sehprobleme haben...  
... das Abstreifen des Blutes ist eher schwer; wenn man nicht oft misst, fehlt eine gewisse Routine...

*aber auch...*

... das Auftragen des Bluttröpfens ist kein Problem...  
... das Auftragen des Bluttröpfens ist sehr einfach...  
... das Auftragen des Blutes ist sehr benutzerfreundlich; es ist viel einfacher mit der Kapillarkraft das Blut aufzutragen als mit dem Tropfen von oben...  
... braucht nur einen kleinen Blutstropfen...  
... die Anwendung ist sehr einfach. Es dürfte auch für Personen einfach sein, die im Umgang mit Messgeräten nicht bewandert sind...

Auf weitere Aspekte wie `Fehlermeldungen`, Ansichten über technische Belange etc. wird hier nicht weiter eingegangen.

*und schliesslich noch:*

Könnten Sie sich vorstellen, das Testgerät zu  
benützen, wenn es auf den Markt käme:

20 mal `Ja`

7 mal `Nein`

6 mal `Weiss nicht` \*

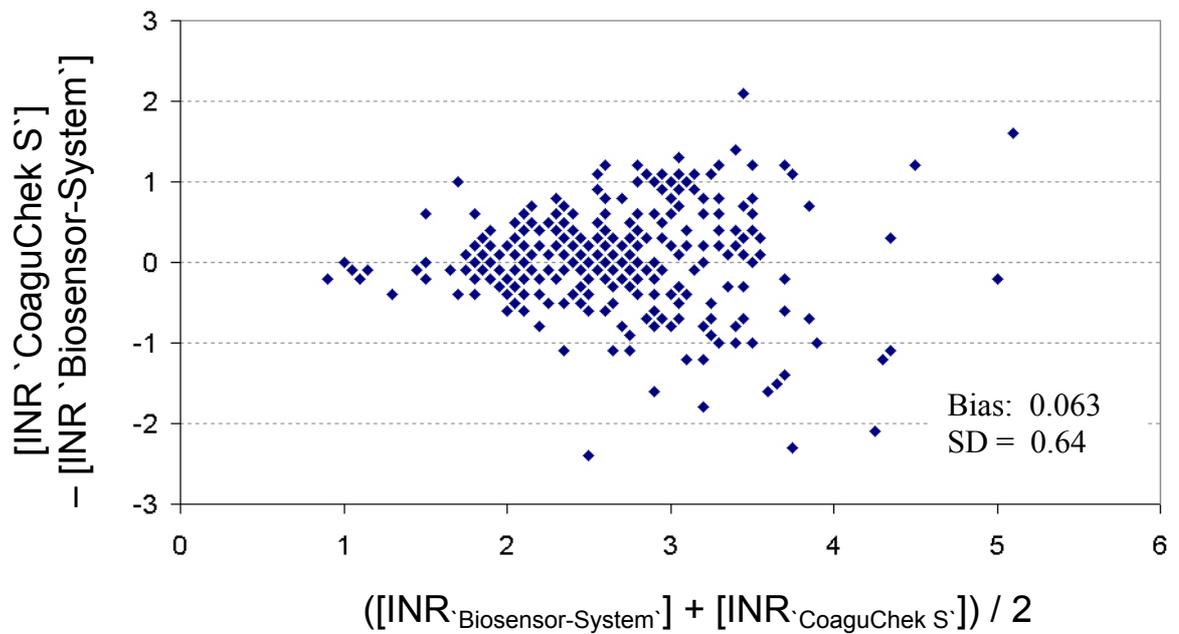
(\* 2 x davon von Kosten abhängig)

- Datenanalyse:

*- allgemeine statistische Vergleiche:*

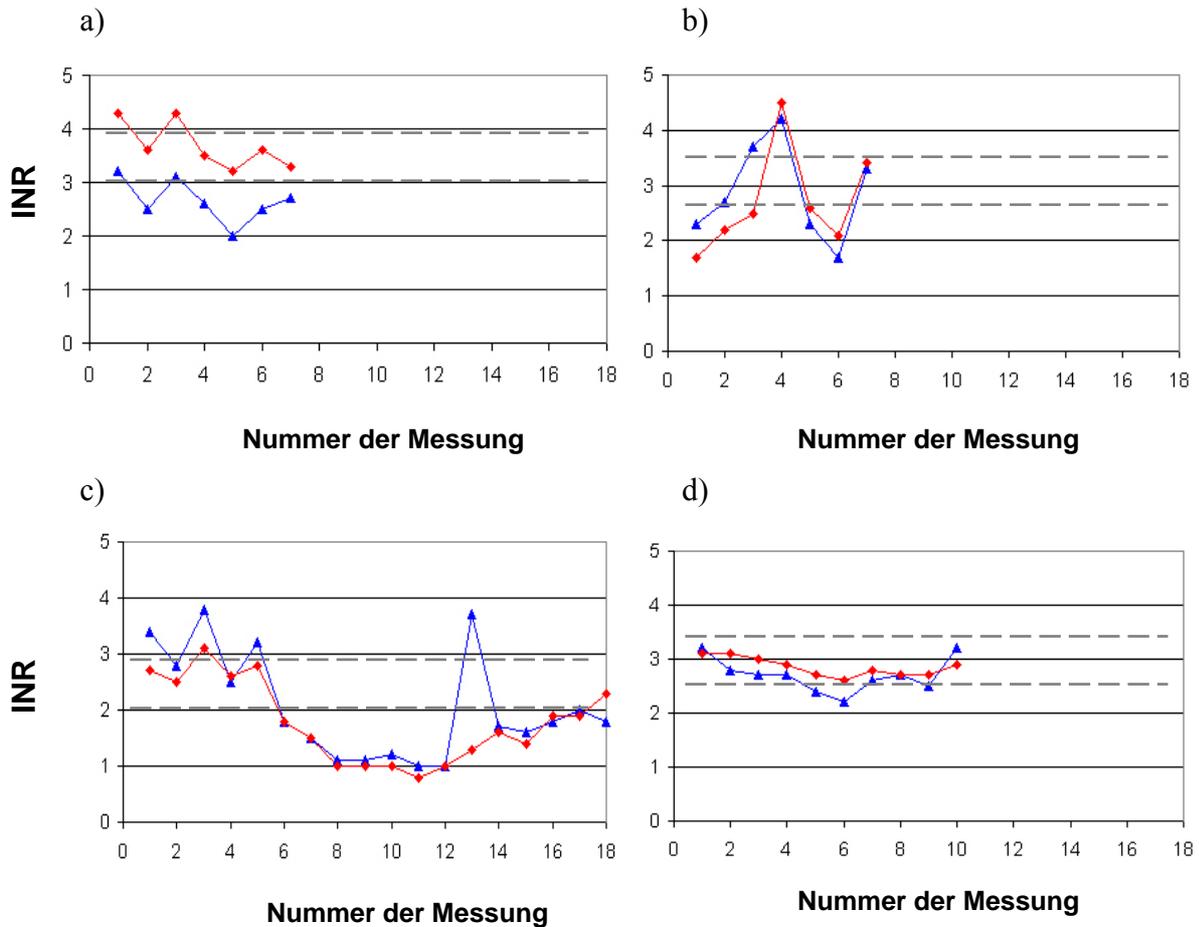
Die 30 für die Datenanalyse einbezogenen Patienten führten zwischen 5 und 18 vorschriftsmässige Vergleichsmessungen durch, durchschnittlich 10.3. Bei den insgesamt 308 Vergleichsmessungen betrug der mittlere Wert der Messungen mit dem Biosensor-Testsystems  $\text{INR } 2.65 \pm 0.72$ , der mittlere Wert der Vergleichsmessungen mit dem CoaguChek S-System  $\text{INR } 2.71 \pm 0.71$ . Die mittlere relative Abweichung (MRD[%]) der beiden Methoden war 0.27%. Der `Bias` der Differenzen betrug  $\text{INR } 0.063 \pm 0.64$  (siehe Abbildung 67). Die grössten absoluten Differenzen zwischen den beiden Messmethoden waren -2.4 INR und +2.1 INR. 34% der Vergleichsmessungen unterschieden sich um mehr als 0.5 INR, 12% um mehr als eine INR-Einheit.

In Abbildung 67 sind die Resultate der einzelnen Vergleichsmessungen in einem Bland-Altman-Plot graphisch wiedergegeben.



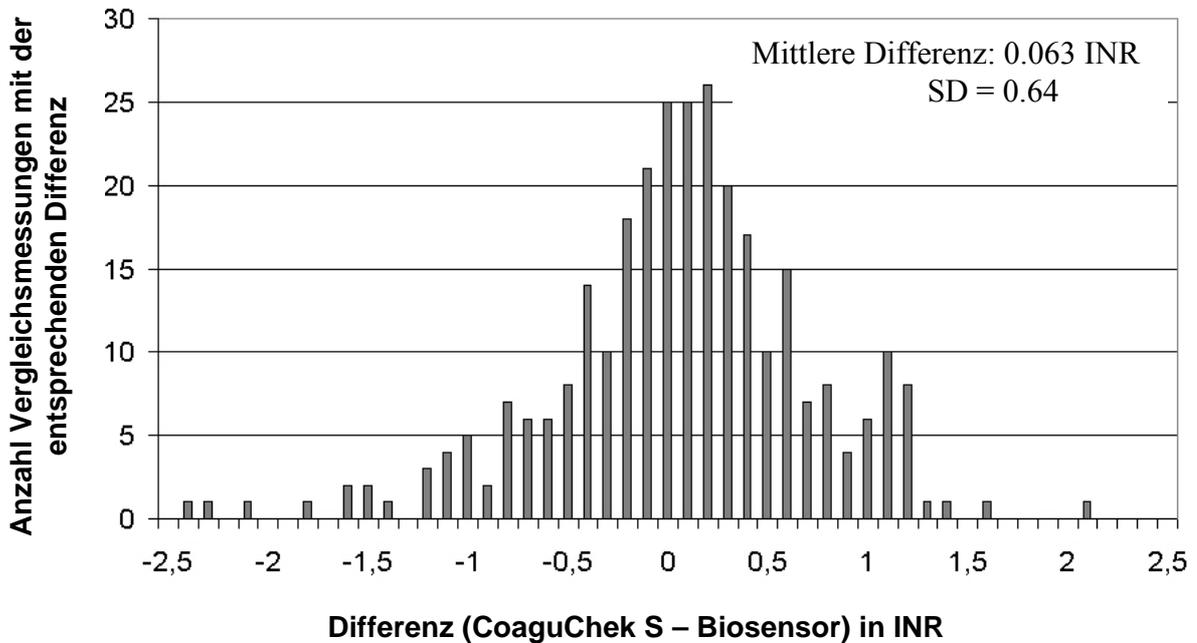
**Abb. 67:** Bland-Altman-Plot: Korrelation der Resultate der einzelnen Vergleichsmessungen (n = 308)

In Abbildung 68 sind die Resultate der Vergleichsmessungen von vier Studienteilnehmern dargestellt. Es handelt sich um repräsentative Beispiele unterschiedlich guter Korrelationen in den Vergleichsmessungen.



**Abb. 68:** Resultate der Vergleichsmessungen von vier Studienteilnehmern: a) Nr. 12, b) Nr. 18, c) Nr. 20, d) Nr. 24; Biosensor-System-Werte jeweils blau, CoaguChek-Werte rot dargestellt; die gestrichelten Linien markieren den therapeutischen Zielbereich

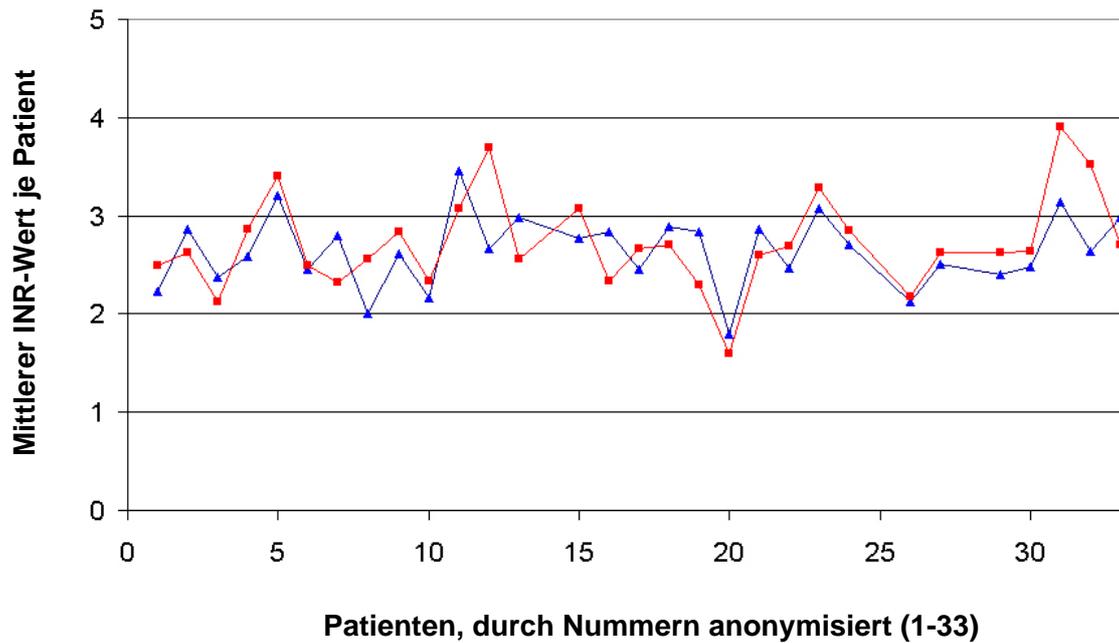
In Abbildung 69 ist die Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen graphisch dargestellt.



**Abb. 69:** Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen (n = 308)

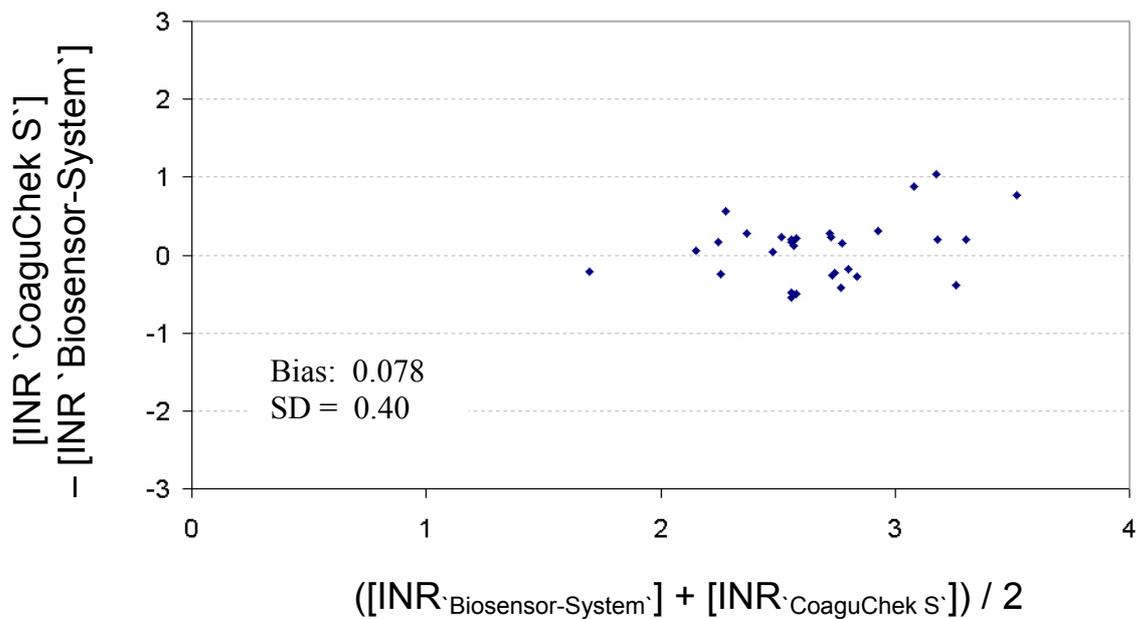
Berücksichtigt man nur jeweils den mittleren INR-Wert der einzelnen Patienten (n = 30) ergibt sich ein mittlerer Biosensor-INR von  $2.64 \pm 0.37$  und ein mittlerer CoaguChek-INR von  $2.72 \pm 0.48$ . Der 'Bias' der Differenzen beträgt nun  $\text{INR } 0.078 \pm 0.40$  (siehe Abbildung 71). Die Standardabweichungen (SD) bei den einzelnen Patienten bezogen auf die Differenzen der beiden Messverfahren variierten bei einem Durchschnitt von SD 0.49 INR zwischen SD 0.18 INR und SD 1.16 INR. 10% der Patientenmittelwerte der beiden Methoden unterscheiden sich noch um mehr als 0.5 INR, es liegen keine Differenzen von mehr als einer INR-Einheit vor (siehe Abbildung 72).

In Abbildung 70 sind die Resultate der Patienten-Durchschnittswerte von Biosensor-Testsystem und CoaguChek S-System dargestellt.



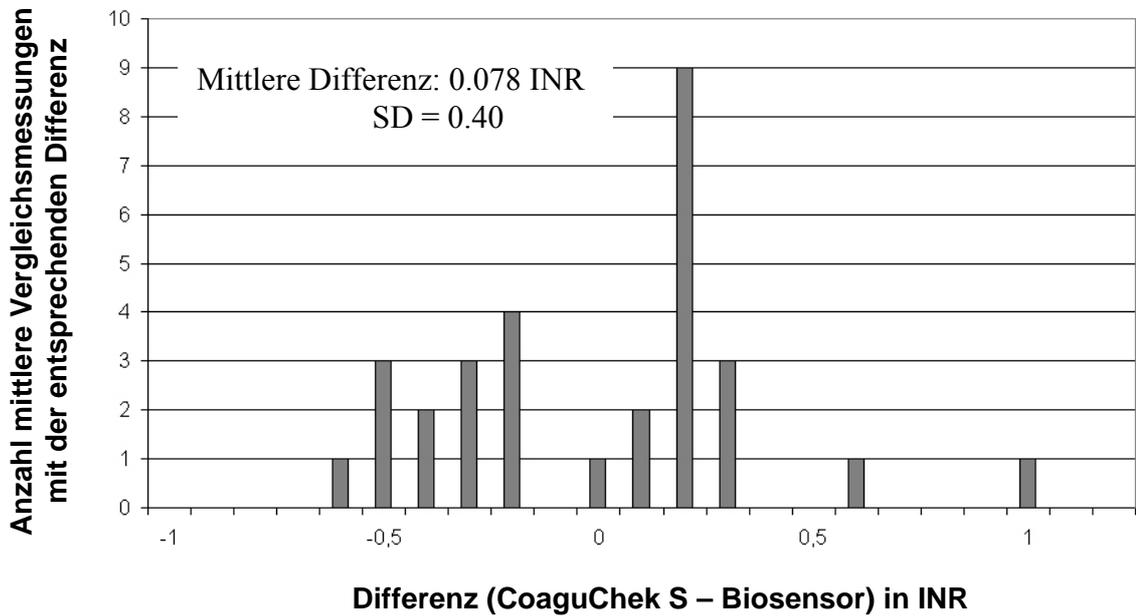
**Abb. 70:** Vergleich der Patienten-Durchschnittswerte von Biosensor-Testsystem (blau) und CoaguChek S-System (rot)

In Abbildung 71 sind die Resultate der Patienten-Durchschnittswerte der Vergleichsmessungen in einem Bland-Altman-Plot graphisch wiedergegeben.



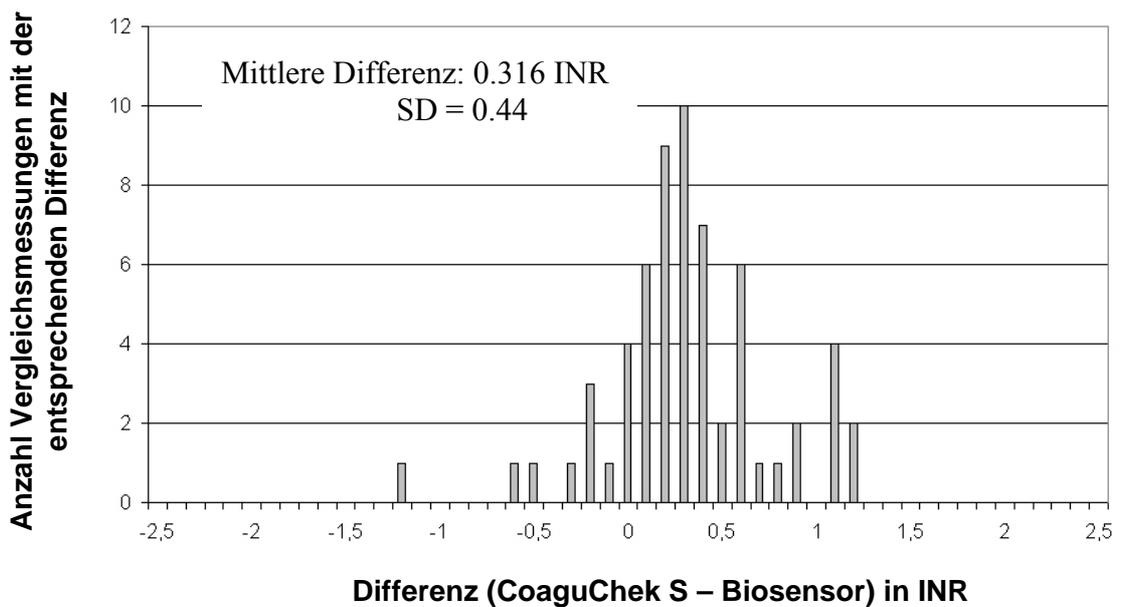
**Abb. 71:** Bland-Altman-Plot: Korrelation der Patienten-Durchschnittswerte der Vergleichsmessungen (n = 30)

In Abbildung 72 ist die Verteilung der mittleren Differenzen pro Patient der Vergleichsmessungen graphisch dargestellt.



**Abb. 72:** Verteilung der mittleren Differenzen pro Patient der Vergleichsmessungen (n = 30)

In den Abbildungen 73 - 76 sind die Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen jeweils pro Teststreifencharge graphisch dargestellt.



**Abb. 73:** Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen; berücksichtigend nur die Biosensor-Teststreifen der Charge 437 (7 Studienteilnehmer, n = 62)

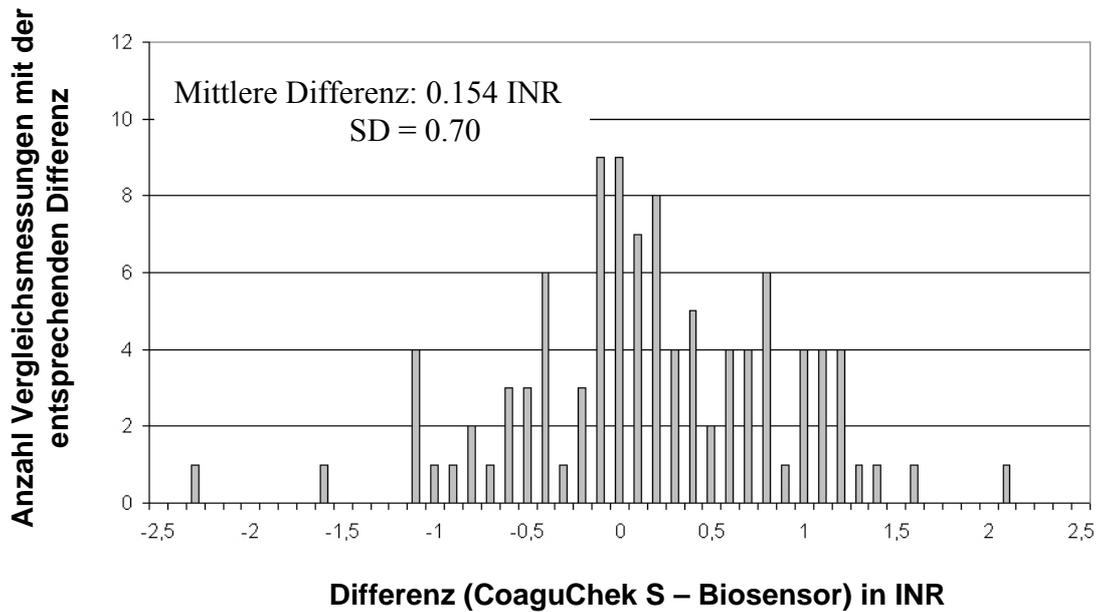


Abb. 74: Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen; berücksichtigend nur die Biosensor-Teststreifen der Charge 438 (10 Studienteilnehmer, n = 109)

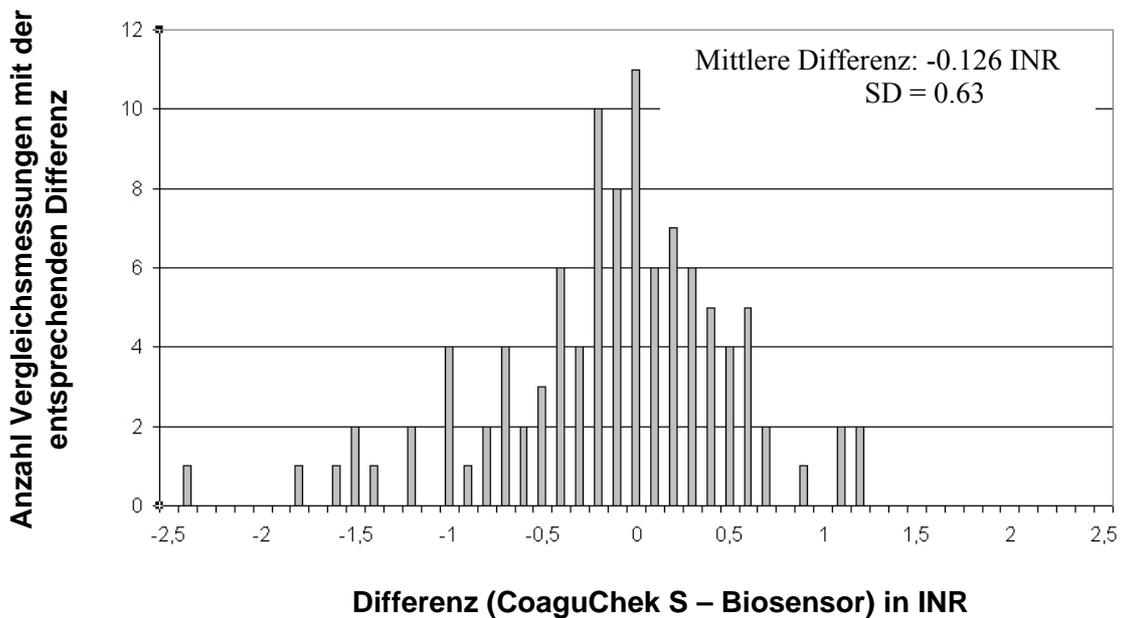
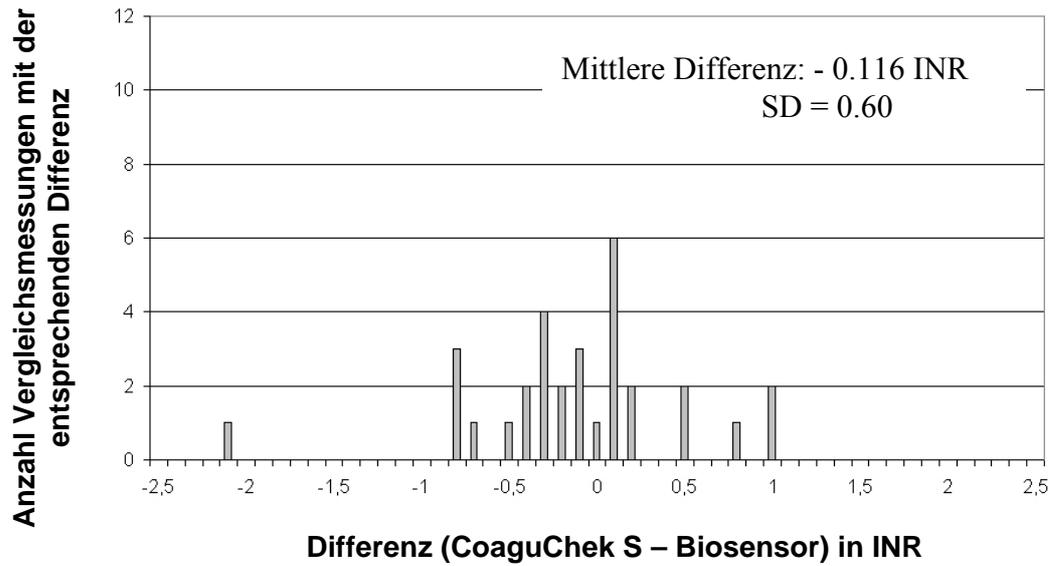
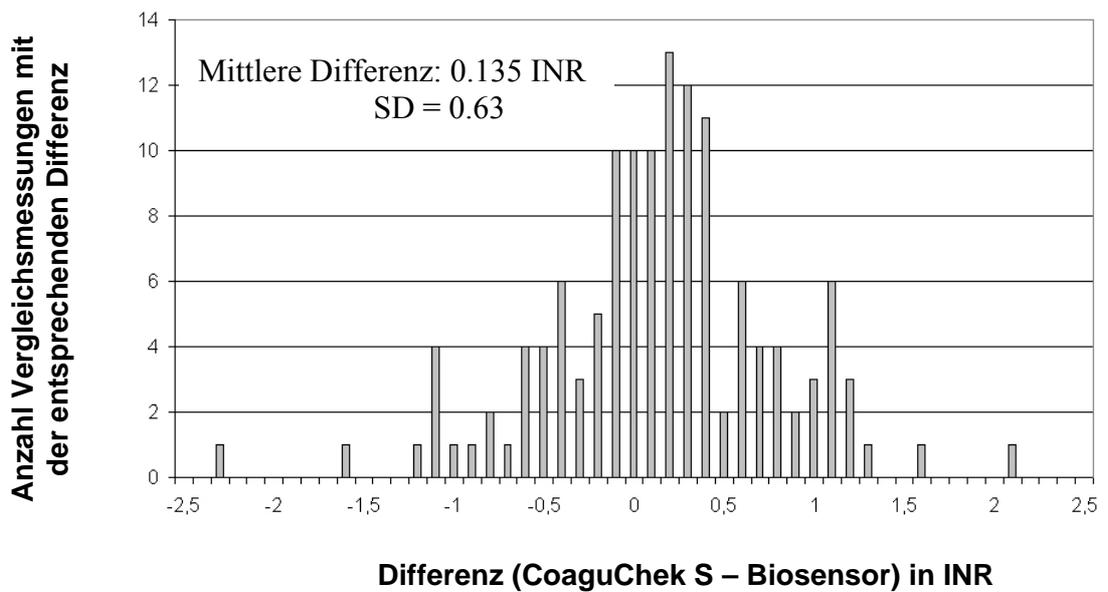


Abb. 75: Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen; berücksichtigend nur die Biosensor-Teststreifen der Charge 439 (10 Studienteilnehmer, n = 106)



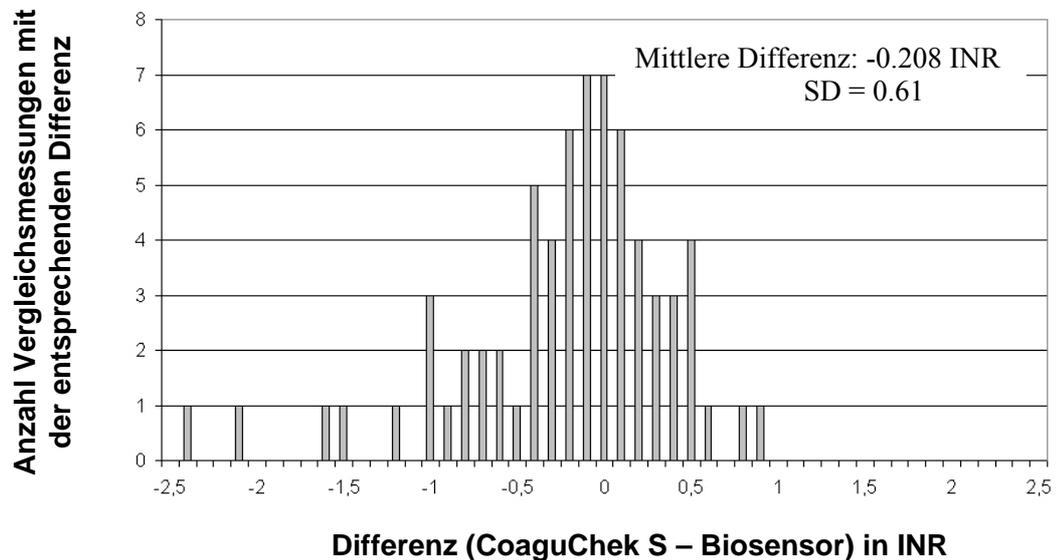
**Abb. 76:** Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen; berücksichtigend nur die Biosensor-Teststreifen der Charge 442 (3 Studienteilnehmer, n = 32)

Abbildung 77 gibt die Verteilung der Differenzen der Vergleichsmessungen wieder, welche mit Biosensor-Teststreifen durchgeführt wurden, die 'mit hoher Wahrscheinlichkeit' qualitativ gut einzelverpackt worden waren.



**Abb. 77:** Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen; berücksichtigend nur die Biosensor-Teststreifen, welche qualitativ gut einzelverpackt worden waren

Abbildung 78 gibt die Verteilung der Differenzen der Vergleichsmessungen wieder, welche mit Biosensor-Teststreifen durchgeführt wurden, bei denen retrospektiv Probleme bei der Einzelverpackung nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 78:** Verteilung der einzelnen Differenzen der Vergleichsmessungen; berücksichtigend nur die Biosensor-Teststreifen, bei denen retrospektiv Probleme bei der Einzelverpackung nachgewiesen werden konnte.

*- Datenanalyse in Bezug auf den therapeutischen Zielbereich:*

Nimmt man jeweils den 'Mittelwert' des von den Studienteilnehmern angegebenen individuellen therapeutischen Zielbereiches als Zielwert an, so finden sich von den mittels CoaguChek erhaltenen Werten 60% im Bereich von Zielwert  $\pm 0.5$  INR, 17 % zwischen  $\pm 0.5 - 0.75$  INR und 23 %  $> 0.75$  INR. Auf die Biosensor-Resultate bezogen sind 56 %  $\pm 0.5$  Einheiten, 18 % zwischen  $\pm 0.5$  und  $0.75$  sowie 26 % der Messwerte mehr als  $0.75$  Einheiten vom Zielwert entfernt. Bei beiden Systemen finden sich ähnlich viele Messdaten innerhalb von  $0.75$  INR vom Zielwert entfernt (CoaguChek 77%, Biosensor-Testsystem 74%).

In Tabelle 18 sind die Vergleichsmessungen in Bezug auf den individuellen therapeutischen Zielbereich der Studienteilnehmer in Kategorien geordnet dargestellt.

**Tab. 18:** Kategorisierung der Vergleichsmessungen in Bezug auf den individuellen therapeutischen Zielbereich (ZB) der Studienteilnehmer, angegeben als Anteil aller Vergleichsmessungen (n = 274) absolut und in Prozent. Die grauen Felder stellen den Bereich übereinstimmender Kategorie zwischen Biosensor und CoaguChek dar.

		Prozentualer Anteil der mittels CoaguChek erhaltenen INR-Werte		
		innerhalb des ZB	> ZB	< ZB
Werte Biosensor	innerhalb ZB	118 (43.1%)	22 (8.0%)	15 (5.5%)
	> ZB	24 (8.8%)	11 (4.0%)	1 (0.4%)
	< ZB	40 (14.6%)	7 (2.5%)	36 (13.1%)

60.2% der Vergleichsmessungen ordnen die beiden Messsysteme derselben Kategorie zu, 39.8% sind diesbezüglich 'nicht übereinstimmend'. In 2.9% der Fälle liegt das Resultat des einen Systems über dem therapeutischen Zielbereich, das des anderen unterhalb. Beim CoaguChek-System liegen 66.5% der Messwerte innerhalb des individuellen therapeutischen Zielbereiches, beim Biosensor-Testsystem sind es 56.6%.

## Folgerungen

- Auswertung der Fragebogen

Die Handhabung des Biosensor-Systems wird insgesamt als 'leicht' eingestuft. Am meisten Probleme bereitete das Auftragen des Blutropfens. Einerseits gelang das 'automatische Einziehen' des Blutropfens nicht immer auf Anhieb, andererseits konnte öfters der Finger – wie in der Anleitung gefordert- nicht sauber abgestreift werden, d.h. ohne dass restliches Blut hängen blieb. Der Bluteinzug ist sicherlich ein Vorgang, der nochmals genauer angeschaut werden muss. Einige Schritte der Streifenproduktion wurden für die Studie noch manuell ausgeführt, gewisse Verbesserungen sind bei einer vollständig industriellen Produktion daher aber noch zu erwarten. Da aus früheren Testreihen bekannt war, dass ein nicht konformes Probenauftragen zu abweichenden Messresultaten führen kann (das System zeigte bei der Studie noch keine entsprechende Fehlermeldung an), wurden bei der Auswertung der Daten die betreffenden Messresultate –soweit unter 'Bemerkungen' deklariert- nicht einbezogen.

Von den bei den offenen Fragen erhaltenen Antworten wurden nicht alle diskutiert. Öfters scheint die Patienten aber die `lange` Testdauer gestört zu haben, ein Umstand, dem nicht weiter Rechnung getragen werden kann, solange es sich um ein Messsystem handelt, das ohne Thermostatisierung auskommen soll und der Patient deshalb –als Kompromiss zu den vorteilhaften kleinen Dimensionen- temperaturabhängig unterschiedlich lange Messzeiten in Kauf nehmen muss. Viele Patienten lobten entsprechend die `Reisetauglichkeit` des Gerätes.

- Datenanalyse

- *allgemeine statistische Vergleiche:*

Die mittlere Differenz zwischen den INR-Werten der beiden Messmethoden ( $0.063 \text{ INR} \pm 0.64$ ) darf als sehr gering bezeichnet werden. Diverse Studien, in welchen das CoaguChek S-System mit anderen Messmethoden verglichen wurde, zeigen höhere Differenzen auf:  $0.23 \text{ INR} \pm 0.50$  [192],  $0.24 \text{ INR} \pm 0.40$  [182],  $-0.543 \text{ INR} \pm 0.31$  [193], wobei meist aber die Standardabweichung niedriger ist. Offensichtlich gibt es statistisch signifikante INR-Abweichungen zwischen dem Biosensor-Testsystem und dem CoaguChek S-System, doch die mittlere relative Abweichung (MRD) beträgt tiefe 0.27 %. Ähnliche Vergleichsstudien von Geräten der CoaguChek-Serie mit anderen Methoden weisen oft MRDs um 10% herum auf [191] [194] [195]. Die grössten absoluten Differenzen ( $-2.4 \text{ INR}$  und  $+2.1 \text{ INR}$ ) sind sicherlich nicht tolerierbar hoch. Solche und noch höhere Unterschiede sind aber in anderen Vergleichsstudien von vermarkteten Systemen ebenfalls zu finden [192] [194] [196]. Die mittlere Streuung der Differenzen zwischen den beiden Methoden ist in den einzelnen Patientenserien noch relativ hoch. Der Umstand, dass Serien mit einer geringen Standardabweichung der Differenzen von unter 0.2 INR vorkommen, zeigt, dass das entwickelte Biosensor-Testsystem durchaus auch reproduzierbar übereinstimmende Resultate liefern kann. Die Datenanalyse nach Qualität der Einzelverpackung lässt auf einen systematischen Fehler zwischen den `gutverpackten` (Bias der Differenzen 0.135 INR) und den `schlechtverpackten` (Bias der Differenzen -0.208 INR) schliessen. Verbesserungen in der Endverpackung der Teststreifen sind möglich.

Nicht zu vergessen ist die Tatsache, dass das CoaguChek S-System, welches als Referenzsystem diente, nicht einem `Goldstandard` entspricht, welcher `wahre` Werte liefert, sondern durchaus und bekanntermassen ebenfalls einen Anteil zur Streuung beiträgt; dem

wurde bei der Datenanalyse statistisch nicht Rechnung getragen. Gemäss Tripodi [197] sollten 'konventionelle Systeme' nicht als Standardmethode betrachtet werden, wenn diese nicht direkt gegen einen internationalen Standard geeicht wurden. Schlüsse auf die Genauigkeit des getesteten Systems sollten entsprechend vorsichtig gezogen werden. Tripodi empfiehlt zum Methodenvergleich daher nicht nur statistische relevante Kriterien zu untersuchen, sondern ebenso klinisch relevante Kriterien. Für Letzteres schlägt er den Vergleich vor, wieviele Datenpaare der Vergleichsmessungen übereinstimmen, im Sinne von wieviele Vergleichsmessungen hätten zu denselben medizinischen Schlüssen, d.h. zu gleichen Dosierungsentscheiden in der Medikation geführt.

*- Datenanalyse in Bezug auf den therapeutischen Zielbereich:*

Gemäss Lit [124] gilt ein INR-Wert innerhalb von  $\pm 0.5$  Einheiten neben dem Zielwert als zufriedenstellend, Abweichungen von zwischen 0.5 und 0.75 Einheiten, bzw. mehr als 0.75 Einheiten müssten im längerfristigen Zusammenhang gesehen werden. Dabei gelte die Richtlinie, dass 50% der INR-Werte innerhalb von 0.5 Einheiten und 80% innerhalb 0.75 Einheiten vom Zielwert entfernt liegen sollen. Die in der Studie hierfür erhaltenen effektiven Prozentanteile sind irrelevant, da sich die Richtlinie auf die medikamentöse Therapie und nicht auf die Genauigkeit der Geräte bezieht. Dass aber bei beiden Systemen ähnlich viele Werte im Abstand von bis 0.5 bzw. bis 0.75 INR-Einheiten vom Zielwert gemessen wurden (56% bzw. 74% vom Biosensor-Testsystem und 60% bzw. 77% vom CoaguChek S-System) darf als gut bezeichnet werden. Bezogen auf die Kategorisierung aufgrund des individuellen therapeutischen Zielbereiches wären bei 60.2% der Messungen ein übereinstimmender Dosierungsentscheid zu erwarten. Bei den 39.2% der diesbezüglich nicht übereinstimmenden Fälle liegen die Datenpaare praktisch ausschliesslich in zwei benachbarten Kategorien. Nur 2.9% der Fälle hätten zu entgegengesetzten Dosierungsänderungen geführt (Steigerung der Dosis vs. Senkung der Dosis).

## **Kapitel III: Diskussion und Schlussbemerkung**

---

### **1. Diskussion der Entwicklungsarbeiten**

Versuche zu Beginn, die plasmatische Blutgerinnung auf den Teststreifen ausschliesslich auf `intrinsischem Weg` zu erreichen, führten zwar nicht zum erhofften Wunschergebnis, konnten aber den positiven Effekt der getesteten Aktivatorssubstanzen nachweisen, in Kombination mit einem Thromboplastinreagenz dessen gerinnungsaktivierendes Potential zu fördern. Daraus konnte Nutzen gezogen werden, ohne dass dadurch –wie in der Folge bestätigt werden konnte- die Gesetzmässigkeiten der Thromboplastinzeitbestimmung verletzt würden. Weshalb nur gewisse Kombinationen von Thromboplastinreagenz und Aktivatorssubstanz einen Effekt zeigten, war nicht Gegenstand von Untersuchungen. Bei der Optimierung des Reaktionsgemisches konnte dem Trocknungsvorgang ein wesentlicher Einfluss auf das schliesslich detektierte Signal zugeschrieben werden. Für die Fortsetzung der Entwicklungsarbeiten fiel die Wahl auf eine Zusammensetzung und ein Herstellungsprozedere, ohne dabei aber Gewähr für eine Langzeitstabilität der fertigen Teststreifen zu haben. Einerseits können bestimmte Zusatzstoffe die Stabilität erhöhen, andererseits sind Umwelteinflüsse wie Temperatur und Feuchtigkeit während der Lagerung beeinflussende Faktoren. Welche Optimierung auch immer man vornimmt, es genügt in diesem Zusammenhang nicht, nur aufgrund von `Stresstests` auf die Stabilität zu schliessen; auf jeden Fall muss die Haltbarkeit in langzeitigen Lagerungstests 1:1 nachgewiesen werden. Auf solche Versuchsreihen konnte im Rahmen der Dissertation nicht eingegangen werden. Die Fertigung der Teststreifen wurde unter `universitären Bedingungen` für eine manuelle Herstellung einer relativ niedrigen Stückzahl von ein paar hundert optimiert, und ist für eine industrielle Massenproduktion nicht validiert. Mit der entwickelten Standardherstellungsprozedur muss hinsichtlich dieser Aspekte der industriellen Fertigung von Teststreifen also noch nicht Genüge getan sein.

Als grosser Vorteil für jegliche Entwicklungsarbeiten am System ist die Möglichkeit zu nennen, bedingt durch ein elektrochemisches Messprinzip nebst Nativblut auch citriertes Plasma einsetzen zu können. Die Vorstellung, alle Arbeiten mit dem nur schwer zugänglichen

und überaus labilen, nicht lagerungsfähigen Rohstoff `frisches Vollblut` (insbesondere mit therapeutischem INR-Wert) durchführen zu müssen, wurde von Beginn weg als `utopisch` verworfen. Mit der Hypothese, schliesslich einen Algorithmus zu finden, mit welchem sich ein von Kapillarblut erzeugtes Signal in ein Signal einer entsprechenden Plasmaprobe umrechnen liesse, wurden somit die meisten Entwicklungsschritte mit Plasmaproben durchgeführt.

Die Ableitung der entsprechenden Einheit `INR` aus den chronoamperometrischen Messkurven einer Blutprobe erwies sich durch die Tatsache erschwert, dass die Kurvenverläufe nicht nur von der Intensität der Antikoagulation, sondern auch in nicht zu vernachlässigendem Ausmass von der Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit abhängig waren. Es konnte theoretisch wie praktisch nachgewiesen werden, dass die beobachtete Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit mit Verdunstungsreaktionen zusammenhängt und sich zum grössten Teil ebenfalls mit dem Temperatureffekt erklären lässt. Eine Adaptation der Streifenarchitektur durch `Überdachung` des Reaktionsfeldes, mit zwangsläufigen Konsequenzen auch für die Art der Blutropfenzuführung, konnte den Temperatureinfluss der Luftfeuchtigkeit signifikant mindern. Für den Einbezug der bleibenden Temperaturabhängigkeit sollte ein Algorithmus gefunden werden, der die -von einem Temperatursensor detektierte- jeweilige Umgebungstemperatur berücksichtigte. Mit den zu diesem Zweck bei verschiedenen Temperaturen in einem `Klimaschrank` durchgeführten Messungen sollte eine Tabelle erstellt werden. Die Bedingungen im `Klimaschrank` (Temperatur, relative Feuchtigkeit, Luftstrom) waren schwierig zu kontrollieren und kaum konstant zu halten. Erschwerend kam zudem hinzu, dass sich den Kalibrationslösungen, mit welchen man die diversen Tests durchführte, vorerst für Messungen mit dem zu entwickelnden System keine definierten INR-Werte zuordnen liessen. Die Kalibrationslösungen mussten zuerst indirekt über eine Testreihe mit antikoagulierten Patienten gegen ein Referenzsystem geeicht werden. Gleichzeitig war die Temperaturabhängigkeit zu bestimmen. Das eine war vom anderen abhängig. Nach aufwendigem Prozedere konnte eine Tabelle erstellt werden. Eine Analyse dieser Tabelle liess Gesetzmässigkeiten zwischen INR-Werten, Messtemperaturen und Messzeiten erkennen, woraus schliesslich ein Algorithmus abgeleitet werden konnte, dessen Grundgerüst sich auf Messungen einer definierten Standardstreifencharge bei 22.5°C bezieht, und worauf sich Messungen, die bei anderen Temperaturen durchgeführt wurden, korrigieren lassen.

Die postulierte Korrelation von Vollblut und Plasma konnte schliesslich auch gefunden werden. Wäre dies nicht der Fall gewesen, hätte allenfalls eine technische Lösung Rettung gebracht: eine Abfiltration der zellulären Blutbestandteile im Kapillarkanal über dem Reaktionsfeld könnte zu Plasma führen.

Es wurde eine Methode definiert, mit welcher sich Teststreifenchargen auf einfache Weise mittels Kalibrationslösungen über eine Eichgerade kalibrieren liessen; eine Methode, die ohne das komplexe Verfahren nach WHO via 'ISI-Bestimmung' auskommt. Der Algorithmus wurde durch einen entsprechenden 'Chargenkalibrationsfaktor' erweitert, der den INR-Wert hinsichtlich Chargenvariabilität korrigiert. Der ISI-Wert des entwickelten Systems wurde zum Vergleich mit anderen Systemen mittels eines vereinfachten Verfahrens dennoch abgeleitet. Er beträgt für Messungen mit Plasma und Kapillarblut annähernd 1.0, ein Zeichen für eine sehr hohe Empfindlichkeit des Systems. Der Vergleich der mittels Algorithmus abgeleiteten INR-Werte mit denjenigen, welche nach herkömmlicher Methode mit MNPT und ISI berechnet wurden, zeigte, dass das gewählte Kalibrationsverfahren grundsätzlich tauglich ist. Dies basiert aber auf der guten Reproduzierbarkeit des Standardherstellungsprozederes und auf den Unterschieden der Eichgeraden, welche sich vorwiegend in der Steigung manifestieren und nur vernachlässigbar im y-Achsenabschnitt.

Untersuchungen zeigten den Einfluss des Hämatokritwertes auf die Messzeit und somit auf den INR-Wert auf. Der Algorithmus konnte entsprechend adaptiert werden. Aus praktischen Überlegungen wurde aber verzichtet, den individuellen Hämatokritwert mathematisch einzubeziehen; man adaptierte den Algorithmus vorerst auf einen mittleren Hämatokritwert, im Bewusstsein aber um die hämatokritbedingte Grösse der Abweichungen im Resultat.

Zusammenfassend lassen sich die Entwicklungsschritte und Faktoren, welche in gewissem Mass bereits 'per se' einen Faktor für Abweichungen im Schlussresultat bergen, stichwortartig auflisten:

- Prinzipieller Unterschied der Thromboplastinzeitbestimmung gegenüber herkömmlicher Methoden: Detektion der Thrombinbildung und nicht der Bildung eines Blutclots (→ u.a. unterschiedliche Gewichtung der Fibrinogenkonzentration)
- Kalibrierung des Systems nicht über ISI-Wert-Bestimmung (gemäss Definition 'INR') sondern direkt mittels Kalibrationslösungen

- Notwendigkeit der Eichung der Kalibrationslösungen:  
`Ur-Eichung` des Biosensor-Systems nur indirekt möglich
- Wechselnde Chargen des Kalibrationssets:  
Eichung jeder neuen Charge Kalibrationsset gegen die vorgängige Charge notwendig;  
potentiell Verlust an Genauigkeit bei jeder Neukalibrierung
- `Ur-Eichung` des Systems nicht gegen `Goldstandard`, sondern gegen Referenzsystem  
mit unabhängigem Thromboplastinreagenz; Einbezug dessen eigener Toleranz von  
 $\pm 10\%$
- `Temperatureichung` unter erschwerten Bedingungen im `Klimaschrank`
- Vereinfachte Eingabe der Teststreifenvariabilität (`Ein-Punkt-Eichung`)
- Korrekturfaktor für Messungen mit Nativblut bezieht sich auf mittleren  
Hämatokritwert – Verzicht auf Einbezug des individuellen Hämatokritwertes

## 2. Diskussion des entwickelten Systems

Zu den unter Abschnitt 1 aufgelisteten entwicklungsbedingten potentiellen Faktoren für Abweichungen kommen nach der Fertigung von Biosensor-Prototypen und bei einer Anwendung `im Felde` noch weitere Faktoren hinzu, die vor allem die Reproduzierbarkeit beeinflussen:

- Art und Qualität der Streifenverpackung
- Anwenderabhängigkeit: Präanalytik (Technik der kapillären Blutentnahme; Vermeiden des Blutverschmierens beim Auftragen des Blutropfens), Einhalten der Gebrauchsanweisung (Lagerung der Teststreifen, Temperaturadaptation, Fernhalten von Wärmequellen,...)
- Eichung des Biosensor-Testsystems erfolgte nicht gegen `CoaguChek S`, welches in der Feldstudie als Vergleichssystem diente

Vergleichbare Systeme für das PSM-OAK sind in gewissem Mass ebenfalls mehr oder weniger von einem oder mehreren der obigen Punkte abhängig. Man muss sich bewusst sein, dass bei der abschliessenden Feldstudie diese Faktoren kumulativ einen Einfluss ausübten.

In zahlreichen Publikationen finden sich Vergleiche von Messsystemen für die Thromboplastinzeit-Bestimmung oder auch spezifischer für das PSM-OAK. In einer grösseren Studie [132] wurden die INR-Werte von 536 Blutproben langfristig oral antikoagulierter Patienten mittels zwei verschiedener Systeme zum PSM-OAK bestimmt. Es handelte sich um eine Multizenterstudie, durchgeführt an 10 spezialisierten Zentren (European Concerted Action on Anticoagulation centres), wo jeweils frische Vollblut-Proben von 50-58 Patienten gemessen wurden. Von jeder Probe wurde mittels `WHO-Standardverfahren` [135] (u.a. mit Verwendung des selben Thromboplastinreagenz wie vom jeweiligen PSM-System verwendet) auch der `wahre` INR-Wert bestimmt. Es wurde für jedes Verfahren ein mittlerer INR-Wert aller 536 Proben errechnet. Der Unterschied zwischen den beiden PSM-Systemen betrug 20.9% (PSM-System A INR 2.91, PSM-System B INR 2.40), vom `wahren` INR-Wert (INR 2.52 bzw. INR 2.59) wichen die Systeme um 15.2% bzw. um -7.1% ab. Das Beispiel zeigt auch, dass es für jedes System sogar einen eigenen `wahren` INR-Wert gibt, der selbst im Rahmen einer grossen Studie im Mittel um 2.75% variieren kann. Bei der Studiauswertung wurden nur Proben einbezogen, die einen `wahren` INR-Wert von 1.5 – 4.5 ergaben. Die Bestimmungen wurden von Fachpersonen durchgeführt, und zur Bestimmung mittels PSM-Systemen wurde venöses Vollblut eingesetzt, was die präanalytische Fehlerquote niedrig halten dürfte. Der Unterschied zwischen den beiden zugelassenen und auf dem Markt erhältlichen Systemen (zum Zeitpunkt der Studie im Jahre 2002 waren es die in der EU am weitesten verbreiteten Geräte) ist dennoch beträchtlich.

Vergegenwärtigt man sich die grosse Zahl von Faktoren, die schliesslich einen Einfluss auf `Richtigkeit` und `Präzision` der Resultate haben können, und studiert man Publikationen wie die eben geschilderte, so dürfen die Resultate der ersten `Feldstudie` des Biosensor-Testsystems für erfreulich gut befunden werden. Geht man davon aus, dass das CoaguChek S-System annähernd `wahre` Werte liefert, kann an der `Richtigkeit` des Systems nichts ausgesetzt werden, eigentlich eine Bestätigung der früheren Erkenntnisse nach inoffizieller Teilnahme an den Ringversuchen. Teststreifenkalibration, Messmethode und mathematische Interpretation der Kurvenverläufe haben nun aber auch dem Feldversuch standgehalten. Und hinsichtlich `Präzision` (inkl. Ausreisser) sieht man durchaus noch Potential für Verbesserungen. So sollten sich eine industriellere Fertigung und Verpackung der Teststreifen positiv auswirken. Allenfalls muss auch die Möglichkeit, den Hämatokritwert doch zu berücksichtigen, nochmals überdacht werden. Was die Handhabung des Systems betrifft, müssen noch ein paar Anpassungen vorgenommen werden. Bei zuvielen Studienteilnehmern

hat der Kapillarbluteinzug nicht reibungslos funktioniert. Dieses Problem sollte aber technisch gelöst werden können. Da die Ableitung des genauen INR-Wertes auf einer korrekten Anwendung des Systems basiert, muss man Gewähr haben, dass auch die Applikation des Blutropfens keine Schwierigkeit darstellt. Die Benutzerfreundlichkeit des Systems scheint offensichtlich dennoch gegeben zu sein. Denn trotz bemängelter `langer` Testdauer und erwähnten Problemen bei der Blutzuführung haben 61% der Studienteilnehmer -die immerhin Erfahrung in der Benutzung des `Marktleaders` haben- die Frage, ob Sie sich vorstellen könnten, das Testgerät zu benützen, wenn es auf den Markt käme, mit `Ja` beantwortet (21% `Nein`, 18% `Weiss nicht`).

### **3. Schlussbemerkung**

Es ist gelungen, die entscheidenden Einflüsse auf die Gerinnungsreaktion in-vitro zu kontrollieren und somit aus dem chronoamperometrischen Messverfahren ein Biosensor-System soweit zu entwickeln, dass dieses `richtige` Resultate liefert und bei Anwendung durch den Patienten den Anforderungen eines ersten Feldversuchs standhalten konnte. Hinsichtlich `Präzision` ist noch Potential für eine Optimierung vorhanden. Die in dieser Arbeit geschilderten Entwicklungen wurden unter `universitären Bedingungen` durchgeführt. Die Erkenntnisse und Umsetzungen wie sie hier geschildert wurden, sind für eine manuelle Herstellung einer relativ niedrigen Stückzahl von Teststreifen optimiert worden und sind für eine industrielle Massenproduktion nicht validiert. Insbesondere auf die Langzeitstabilität der Teststreifen konnte nicht eingegangen werden. Bezogen auf die Sicherheit des Systems sind ebenfalls noch Tests notwendig, darunter solche zur Abklärung allfälliger Störfaktoren (wie z.B. Arzneistoffe im Blut, die mit dem Messprinzip interferieren könnten). Mit der im Rahmen der Dissertation erarbeiteten Standardherstellungsprozedur für Teststreifen und der mathematischen Ableitung des Testresultates muss weder einer industriellen Fertigung des Biosensor-Systems noch dem anspruchsvollen Medizintechnik-Markt in allen Aspekten Genüge getan sein.

## Referenzen

- 1 Cammann K, Fresenius Z. Anal Chem 1977; 287: 1.
- 2 Turner APF, Karube I, Wilson GS (1987) Biosensors, fundamentals and applications. Oxford University Press, Oxford. Seite 770.
- 3 Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classifications (Technical Report) 1999; 71 (12): 2333-48.
- 4 D’Orazio P. Clin Chim Acta 2003; 334: 41-69.
- 5 Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann N Y Acad Sci 1962; 102: 29-45.
- 6 Rogers KR, Gerlach, CL. A Status Report on Biosensors for Ecological and Human Exposure Assessment. Environ Sci Technol 1996; 30: 486A-491A.
- 7 Reach G, Wilson GS. Can continuous glucose monitoring be used for the treatment of diabetes? Anal Chem 1992; 64: 381A-386A.
- 8 Rücker G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 2. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1992, Seite 300.
- 9 Rücker G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 2. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1992, Seite 400.
- 10 Luong JTH, Mulchandani A, Guibault GG. Trends Biotech 1988; 6: 310-316.
- 11 Wagner G, Schmid RD. Food Biotechnol 1990; 4: 215-240.
- 12 Warsinke A. Biosensors for food analysis. In: Frontiers in Biosensorics II. Scheller FW, Schubert F, Fedorowitz J, eds. Birkhäuser Verlag: Basel-Boston-Berlin 1997.
- 13 Ogbomo I, Prinzig V, Schmidt HL. J Biotechnol 1990; 14: 63-70.
- 14 Schumann W, Wohlschläger H, Huber J, Schmidt HL, Stadler H. Anal Chim Acta 1995; 315: 113-122.
- 15 Ruzgas T, Emneus J, Gorton L, Marko-Varga G. Anal Chim Acta 1995; 311: 245-253.
- 16 Mazzei F, Botre F, Lorenti G, Simonetti G, Porcelli F, Scibona G, Botre C. Anal Chim Acta 1995; 316: 79-82.
- 17 D’Urso EM, Coulet PR. Anal Chim Acta 1990; 239: 1-5.
- 18 Lüdi H, Garn MB, Bataillard M, Widmer HM. J Biotechnol 1990; 14: 71-79.
- 19 Lee JI, Karube I. Anal Chim Acta 1995; 313: 69-74.
- 20 Besombes JL, Cosnier S, Labbe P, Reverdy G. Anal Chim Acta 1995; 311: 255-263.
- 21 Damgaard LR, Larsen H, Revsbech NP. Trends Anal Chem 1995; 14: 300-303.
- 22 Marty JL, Mionetto N, La corte S, Barcelo D, Anal Chim Acta 1995; 311: 265-271.
- 23 Colapicchioni C, Barbaro A, Porcelli F. Sens Actuators 1992; B 6: 202-207.
- 24 Su YS, Cagnini A, Mascini M. Chem Analityczna 1995; 40: 579-585.

- 25 Marco MP, Gee S, Hammock BD. *Trends Anal Chem* 1995; 14: 341-350.
- 26 Sadik OA, van Emon JM. *Biosens Bioelectron.* 1996; 11: AR1-11.
- 27 Rawson DM, Willmer AJ, Turner APF. *Biosensors* 1989; 4 : 299-311.
- 28 Wang J. *Anal Chem* 1999; 71: 328R-332R.
- 29 Owen VM, Turner APF. *Endeavour* 1987; 11: 100-104.
- 30 Rechnitz GA, Nakamura RM. *J Clin Lab Anal* 1988; 2: 131-133.
- 31 Guilbault GG, Schmid RD. *Biotechnol. & Appl. Biochem.* 1991; 14: 133-145.
- 32 Pfeiffer D. Commercial biosensors for medical application. In: *Frontiers in Biosensorics II*. Scheller FW, Schubert F, Fedorowitz J, eds. Birkhäuser Verlag: Basel-Boston-Berlin 1997.
- 33 Pandey PC, Mishra AP. *Analyst* 1988; 113: 329-331.
- 34 Trojanowicz M, Lewenstam A, Krawczynski T, Krawczyk V, Lähdesmäki I, Szczepek W. *Electroanalysis* 1996; 8: 233-243.
- 35 Motonaka J, Faulkner LR. *Anal Chem* 1993; 65: 3258-3261.
- 36 Trettnak W, Lioni I, Mascini M. *Electroanalysis* 1993; 5: 753-763.
- 37 Yao T, Satomura M, Nakahara T. *Electroanalysis* 1995; 7: 143-146.
- 38 Ito N, Matsumoto T, Fujiwara H, Kayashima S, Arai T, Kikuchi M, Karube I. *Anal Chim Acta* 1995; 12: 323-328.
- 39 Shram NF, Netchiporouk LI, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Bonnet C, Cespuglio R. *Anal Chem* 1998; 70: 2618-2622.
- 40 Baker DA, Gough DA. *Anal Chem* 1995; 67: 1536-1540.
- 41 Dempsey E, Diamone D, Smyth MR, Urban G, Jobst G, Moser I, Verpoorte EMJ, Manz, A, Widmer HM, Rabenstein K, Freaney R. *Anal Chim Acta* 1997; 346: 341-349.
- 42 Cosnier S, Innocent C, Allien S, Poitry S, Tsacopoulos M. *Anal Chem* 1997; 69: 968-971.
- 43 Wang J. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 19: 47-53.
- 44 Wang J, Rivas G, Cai XH, Shiraishi H, Farias PAM, Dontha N, Luo DB. *Anal Chim Acta* 1996; 332: 139-144.
- 45 Wang J, Dempsey E, Ozsoz M, Smyth MR. *Analyst* 1991; 116: 997-999.
- 46 Thust M, Schoning MJ, Vetter J, Kordos P, Luth H. *Anal Chim Acta* 1996; 323: 115-121.
- 47 Li QS, Zhang SL, Yu JT. *J Microchem* 1995; 52: 166-173.
- 48 Holt PJ, Stephens G, Bruce NC, Lowe CR. *Biosens Bioelectron* 1995; 10: 517-526.
- 49 Cardosi MF, Turner APF. *The Diabetes Annual* 1987: 560-578.
- 50 Cammann K. *Hormone Metab Res Suppl Ser* 1988; 20: 4-8.
- 51 Gunasingham H, Tan CH, Aw TC. *Clin Chem* 1990; 36: 1657-61.

- 52 Gough DA, Lucisano JY, Tse PHS. *Anal Chem* 1995; 57: 2351-2357.
- 53 Aduen J, Bernstein WK, Khastigir T, et al. The use and clinical importance of a substrate specific electrode for rapid determination of blood lactate concentrations. *JAMA* 1994; 272 1678-85.
- 54 Gilmartin MAT, Hart JP. Fabrication and characterisation of a screen printed, disposable amperometric cholesterol biosensor. *Analyst* 1994; 119:2331-6.
- 55 GilisM, Durliat H, Comtat M. Amperometric biosensors for L-alanine and pyruvate assays in biological fluids. *Anal Chim Acta* 1997; 355:235-40.
- 56 Moser I, Jobst G, Urban GA. Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate and glutamine. *Biosens. Bioelectron* 2002;17:297-302.
- 57 Tsuchida T, Yoda K. Multi-enzyme electrodes for determination of creatinine and creatine in serum. *Clin Chem* 1983;29:51-5.
- 58 Bard AJ, Faulkner LR, *Electrochemical Methods*, New York, John Wiley & Sons, 1980.
- 59 Kolde HJ. *Haemostasis*, Pentapharm Ltd., Basel 2001, S. 1.
- 60 Thomas L. *Labor und Diagnose*, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt 1998, S. 561 – 656.
- 61 Nurden AT, Human platelet membrane glycoproteins. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. *Haemostasis and thrombosis*, 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994: 115-65
- 62 White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, 1994: 489-507.
- 63 Hawiger J. Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction. *Thromb Haemostas* 1995; 74: 369-372.
- 64 Sixma JJ, van Zanten GH, Saelman EUM, Verkleij M, Lankhof H, Nieuwenhuis HK, et. al. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemostas* 1995; 74: 454-9.
- 65 Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemostas* 1995; 74: 111-6.
- 66 Kolde HJ. Pentapharm Ltd., Basel 2001, S. 22
- 67 Bartels M, Poliwoda H, *Gerinnungsanalysen*, Georg Thieme Verlag, 6. Auflage, Stuttgart (1998), S. 18f.
- 68 Price GC, Thompson SA, Kam PCA. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia* 2004; 59: 483-492.
- 69 Broze GJ jr, *Annu Rev Med.* 1995; 46: 103-12.
- 70 Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1504-14.
- 71 *Wissenswertes zur Gerinnung*, Roche Diagnostics, 2. erweiterte Auflage, Mannheim (1999), S. 60 ff.
- 72 Broze GJ jr, Leykam JE, Schwarz BD, Miletich JP. Purification of human brain tissue factor. *J Biol Chem* 1985; 260: 10917-20.
- 73 Kolde HJ. Pentapharm Ltd., Basel 2001, S. 47.
- 74 Price GC, Thompson SA, Kam PCA, Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia* 2004; 59: 483-492.

- 75 Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993; 81: 734-44.
- 76 Nemerson Y, Repke D. Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: The role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb Res* 1985; 40: 351-58.
- 77 Morrissey JH, Tissue Factor: An Enzyme Cofactor and a True Receptor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 66-74.
- 78 Scarpati EM, Wen D, Broze GJ jr, Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, et al. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 1987; 26: 5234.
- 79 Giesen PL, Nemerson Y. Tissue Factor on the loose. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2000; 26: 379-84.
- 80 Giesen PLA, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor. Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2311-5.
- 81 Berckmans RJ, Neuwland R, Boing AN, et al. Cell-derived micro particles circulate in healthy humans and support low-grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85: 639-46.
- 82 Muller I, Klocke A, Alex M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; 17: 476-478.
- 83 Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003; 197: 1585-1598.
- 84 Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL, Gorman CM. Lipid association, but not the transmembrane domain, is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem* 1991; 266: 21911-6.
- 85 Morrissey JH, Tissue factor: in at the start...and the finish? *J Thromb Haemost* 2003; 1: 878-880.
- 86 Doshi SN, Marmur JD. Evolving role of tissue factor and its pathway inhibitor. *Critical Care Medicine* 2002; 30 (5 Suppl.): S241-50.
- 87 Rottingen JA, Enden T, Camerer E, Iversen JG, Prydz H. Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 4650-60.
- 88 Ruf W, Fischer EG, Huang HY, Hiyagi Y, Ott I, Riewald M, et al. Diverse functions of protease receptor tissue factor in inflammation and metastasis. *Immunol Res* 2000; 21: 289-92.
- 89 Barthels M, Depka von M. *Das Gerinnungskompodium*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003. S. 397.
- 90 Stubbs MT, Bode W. A Player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure. *Thrombosis Research* 1993; 69: 1.
- 91 Hemker HC, *Handbook of synthetic substrates for the coagulation and fibrinolytic system*. M. Nijhoff Publ. The Hague, 1986.
- 92 Knight CG, in: Barrett AJ, *Proteinases in mammalian cells and tissues*, North Holland Publ. Company New York, 1977.
- 93 Pentapharm Diagnostic Catalogue, Pentapharm Ltd, Basel 2000.

- 94 Schenone M, Furie BC, Furie B. The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol* 2004; 11 (4):272-277.
- 95 Barthels M, das Gerinnungskompodium, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003), S. 56.
- 96 Ferland G. The vitamin K-dependent Proteins: an update. *Nutrition Reviews* 1998; 56 (8): 223-230.
- 97 Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick: occurrence and chemical nature. *Nature* 1935; 135: 652-3.
- 98 Barthels M, Depka von M. Das Gerinnungskompodium. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003. S. 125.
- 99 Haas S. Thromboseforum – Antithrombotika. Chronomed Verlag, Emsdetten 2004.
- 100 Kimball DS. Thrombin active site inhibitors. *Current Pharmaceutical Design* 1995; 1: 441-468
- 101 Schofield FW. Damaged sweet clover: the cause of a new disease in cattle simulating hemorrhagic septicemia and blackleg. *J Am Vet Med Assoc* 1924; 64: 553-575.
- 102 Campbell HA, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. The isolation and crystallization of the hemorrhagic agent. *J Biol Chem* 1941; 138: 21-33.
- 103 Link KP. The discovery of the dicoumarol and its sequels. *Circulation* 1959; 19: 97-107.
- 104 Matzdorff A, Kemker-Matthes B. Pharmakologie oraler Antikoagulantien. *Hämostaseologie* 1997; 17 (3): 149-52.
- 105 Hirsh J, Dalen JE, Deykin D, Poller L, Bussey H. Oral Anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 1995; 108 (4): 231S-246S.
- 106 Nutescu EA, Point of Care Monitors for Oral Anticoagulant Therapy. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2004; 30 (6): 697-702.
- 107 Arzneimittelkompendium der Schweiz 2004. Documed AG, Basel 2003. Marcoumar.
- 108 Morawitz P. Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergebn Physiol* 1905; 4: 307.
- 109 Quick AJ. The prothrombin time in haemophilia and in obstructive jaundice. *J Biol Chem* 1935; 109: 73-4.
- 110 Owen CA. (2001) A History of Blood Coagulation (Nichols WL & Bowie WEJ, eds), S. 214, Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester.
- 111 Poller L. International Normalized Ratios (INR): the first 20 years. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 849-60.
- 112 Jackson CM. Monitoring oral anticoagulant therapy – INR values for the Owren prothrombin time. *Thromb Haemost* 2004; 91: 210-212.
- 113 Barthels M, Depka von M. Das Gerinnungskompodium. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003. S. 317-330.
- 114 Owren PA. Thrombotest. A new method for controlling anticoagulant therapy. *Lancet* 1959; 2: 754-758.
- 115 Houdijk WPM, Van den Besselaar AMHP. International Multicenter International Sensitivity Index (ISI) calibration of a new human tissue factor thromboplastin reagent derived from cultured human cells. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 266-70.
- 116 Renier JL, Baufine-Ducrocq H, Samama MM. Variability of INR due to thromboplastin. Comparison of two recombinant thromboplastins and one rabbit thromboplastin. *Ann Biol Clin* 1995; 53: 353-356.

- 117 Tilsner V, Heimburger N, Becker U, Göpfert H, Kolde HJ (1986) Gerinnungsdiagnostik. Behringdiagnostika Marburg. 56-57.
- 118 Dati F et al. Multicenter evaluation of a chromogenic substrate method for photometric determination of prothrombin time. *Thromb Haemostas* 1987; 58: 856-865.
- 119 Smeets EHJ, van Wersch JWJ. Automation of the prothrombin time assay on a centrifugal analyser using two different chromogenic substrate reagents. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 877-84.
- 120 WHO Expert Committee on Biological Standardisation. Requirements for thromboplastins and plasmas used to control oral anticoagulation therapy. WHO Tech Rep Series 1983; 687: 81-105.
- 121 Requirements for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy (Requirements for Biological Substances no.30, revised 1982). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-Third report. Annex 3, WHO Technical Report Series, no 687. Geneva: World Health Organization, 1983.
- 122 Hirsh J, Dalen JE, Andersen DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, Deykin K, Brankt JT. Oral Anticoagulants. Mechanism of action, clinical effectiveness and optimal therapeutic range. *Chest* 1998; 114; 445S-469S.
- 123 Taberner DA, Poller L, Thomson JM, Darby KV. Effect of international sensitivity index (ISI) of thromboplastins on precision of international normalised ratios (INR). *J Clin Pathol* 1989; 42(1):92-6.
- 124 Haemostasis and Thrombosis task force for The British Committee for Standard in Haematology. Guidelines on Oral Anticoagulation: Third Edition. *Br J Haematol* 1998; 101: 374-87.
- 125 Rose P. Audit of Anticoagulant therapy. *Journal of Clinical Pathology* 1996; 49: 5-9.
- 126 Kjeldsen J, Lassen JF, Petersen PH, Brandslund I. Biological variation of International Normalized Ratio for prothrombin times, and consequences in monitoring oral anticoagulant therapy: computer simulation of serial measurements with goalsetting for analytical quality. *Clin Chem* 1997; 43 (11): 2175-2182.
- 127 Spaethe R. Hämostase Teil A, Physiologie, Pathophysiologie, Therapie. Baxter Deutschland GmbH, Unterschleissheim 1992. S.189.
- 128 Cannegieter SC, Rosendaal FR, Wintzen AR, van der Meer FJ, Vandenbroucke JP, Briet E. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med* 1995;333: 11-7.
- 129 van den Besselaar AMHP. Use of lyophilized calibration plasmas and control blood for international normalized ratio calculation in external quality assessment of the prothrombin time. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 123-7.
- 130 Houbouyan LL, Goguel AF. Long-term French experience in INR standardization by a procedure using plasma calibrants. *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 83-9.
- 131 Ng VL, Levin J, Corach L, Gottfried EL. Failure of the international normalized ratio to generate consistent results within a local medical community. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 689-94.
- 132 Poller L, Keown M, Chauhan N, van den Besselaar AMHP, Tripodi A, Shiach C, Jespersen J. Reliability of international normalised ratios from two point of care test systems: comparison with conventional methods; *BMJ* 2003; 327: 30-2.
- 133 Fairweather RB. CAP Coagulation Resource Committee. CG2 Survey Sample CG2-12/CG2-14, 1999.
- 134 Van den Besselaar AMHP, Precision and accuracy of the international normalized ratio in oral anticoagulant control. *Haemostasis* 1996; 26 (Suppl 4): 248-265.
- 135 WHO Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulation therapy. Annex 3. WHO Technical Report Series 1999; 889: 64-93.

- 136 Hemker HC, Veltkamp JJ, Loeliger EA. Kinetic aspects of the interaction of blood clotting enzymes. III. Demonstration of the existence of an inhibitor of prothrombin conversion in vitamin K deficiency. *Thromb Diath Haemorrh* 1968;19:346—363.
- 137 Talstad I. Why is the Standardization of Prothrombin Time a Problem? *Haemostasis* 2000; 30: 258-267.
- 138 Poller L, Triplett DA, Hirsh J, Carroll J, Clarke K. The value of plasma calibrants in correcting coagulometer effects on international normalized ratios. An international multicenter study. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 358-65.
- 139 Kirkwood TBL. Calibration of reference thromboplastins and standardisation of the prothrombin time ratio: *Thromb Haemost* 1983; 49: 238-44.
- 140 Attermann J. Definition of the INR and its consequences for the calibration procedure of thromboplastin preparations: reply to a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1492-4.
- 141 Ng VL, Valdes-Calmin R, Gottfried EL, Echaves SA, Stead AG, Ebert RG. Highly sensitive thromboplastins do not improve INR precision. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 338-346.
- 142 Jackson CM, Esnouf MP, Lindahl TL. A critical evaluation of the prothrombin time for monitoring oral anticoagulant therapy. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 43-51.
- 143 Poller L. The effect of the use of different tissue extracts on one-stage prothrombin times. *Acta Haematol* 1964; 32: 292.
- 144 Kitchen S, Jennings I, Woods TAL, Walker ID, Preston FE. Two recombinant tissue factor reagents compared to conventional thromboplastins for determination of International Normalized Ratio: a thirty-three-laboratory collaborative study. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 76 (3): 372-6.
- 145 Testa S, Morstabilini G, Fattorini A, et al. Discrepant sensitivity of thromboplastin reagents to clotting factor levels explored by the prothrombin time in patients on stable oral anticoagulant treatment: impact on the international normalized ratio system. *Haematologica* 2002; 87: 1265-73.
- 146 Tripodi A, Arbini AA, Chantarangkul V, Bettega D, Mannucci PM. Are capillary whole blood coagulation monitors suitable for the control of oral anticoagulant treatment by the International Normalized Ratio? *Thrombosis and Haemostasis* 1993; 70 (6): 921-924.
- 147 van den Besselaar AMHP, Poller L, Tripodi A. Definition of the International Normalized Ratio (INR) and its consequences for the calibration procedure of thromboplastin preparations: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1490-1.
- 148 Tripodi A, Chantarangkul V, Manotti C, Poggi M, Braga M, Akkawat B, et al. A simplified procedure for thromboplastin calibration: the usefulness of lyophilized plasmas assessed in a collaborative study. *Thromb Haemost* 1996; 75: 309-12.
- 149 Johnston M, Brigden M. A cross-Canada survey of prothrombin time testing: does the establishment of local ISI values improve the accuracy of international normalized ratio reporting? *Thrombosis Interest Group of Canada. Am J Clin Pathol* 1998; 110: 683-90.
- 150 Chantarangkul V, Tripodi A, Cesana BM, Mannucci PM. Calibration of local systems with lyophilized calibrant plasmas improves the interlaboratory variability of the INR in the Italian external quality assessment scheme. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1621-6.
- 151 Fairweather RB, Ansell J, van den Besselaar AMHP, Brandt JT, Bussey HI, Poller I, Triplett DA, White RH. College of American Pathologists Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 768-81.
- 152 Brien WF, Baskerville JC, Taberner DA, Crawford L. Calculation vs calibration curve for INR determination. Results of an interlaboratory proficiency scheme. *Am J Clin Pathol* 1999; 111(2): 193-201.

- 153 Hubbard AR, Margetts SM, Barrocliffe TW. International Normalized Ratio determination using calibrated reference plasmas. *Br J Haematol* 1997; 98 (1): 74-8.
- 154 van den Besselaar AMHP, Houbouyan-Réveillard LL. Field study of lyophilized calibrant plasmas for fresh plasma INR determination. *Thromb Haemost* 2002; 87: 277-81.
- 155 Poller L, van den Besselaar AMHP, Jespersen J, Tripodi A, Houghton D. A comparison of linear and orthogonal regression analysis for local INR determination in ECAA coagulometers studies. *Br J Haematol* 1998; 102: 910-7.
- 156 Merz M, Doerr H, Engelhardt W. Direct INR determination by use of linear or orthogonal regression. Research Laboratories, Poster session, GTH Congress 2005.
- 157 Adcock DM, Johnston M. Evaluation of frozen plasma calibrants for enhanced standardization of the International Normalized Ratio (INR): a multicenter study. *Thromb Haemost* 2002; 87: 74-9.
- 158 Caliezi C, Waber M, Pfiffner D, Lämmle B, Saner H, Wuillemin W. Patienten-Selbstkontrolle der oralen Antikoagulation mit CoaguChek. *Schweiz Med Wochenschrift* 2000; 130: 916-23.
- 159 Taborski U, Muller-Berghaus G. State-of-the-art patient self-management for control of oral anticoagulation. *Semin Thromb Haemost* 1999; 25 (1): 43-7.
- 160 Schulman S. Clinical practice. Care of patients receiving long-term anticoagulant therapy. *N Engl J of Med* 2003; 349: 675-83.
- 161 Beyth RJ. Patient self-management of anticoagulation: an idea whose time has come. *Ann Intern Med* 2005; 142: 73-74.
- 162 Bodenheimer T, Wagner EH, Grumbach K. Improving primary care for patients with chronic illness: the chronic care model, Part 2. *JAMA* 2002; 288: 1909-14.
- 163 Bernardo A, Völler H. Leitlinien Gerinnungsselbstmanagement. *DMW* 2001; 126:346-351.
- 164 Jacobson AK, Scott RD, Peckham NH, Earp B. Reliability of patient self-reporting of self-test results to a central database utilizing a computerized interactive voice response system. Supplement to the journal *Thrombosis and Haemostasis* ( July 2001)
- 165 Sawicki PT. A structured teaching and self-management program for patients receiving oral anticoagulation. A randomised controlled trial. *JAMA* 1999; 281: 145-150.
- 166 White RH, McCurdy SA, von Marensdorff H, Woodruff DE, Leftgoff L. Home prothrombin time monitoring after the initiation of warfarin therapy. *Ann Intern Med* 1989; 111: 730-7.
- 167 Anderson D, Harrison L, Hirsh J. Evaluation of a portable prothrombin time monitor for home use by patients who require long-term oral anticoagulant therapy. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1441-7.
- 168 Cromheecke S. Oral anticoagulation self management and management by a specialist anticoagulation clinic: a randomised cross-over comparison. *Lancet* 2000; 356: 97-102.
- 169 Horstkotte D, Piper C, Wiemer M. Optimal frequency of patient monitoring and intensity of oral anticoagulation therapy in valvular heart disease. *J Thromb Thrombolysis* 1998; 5: 19-24.
- 170 Menéndez-Jándula B, Souto JC, Oliver A, Montserrat I, Quintana M, Gich I, Bonfill X, Fontcuberta J. Comparing self-management of oral anticoagulant therapy with clinic management. A randomised trial. *Ann Intern Med*. 2005; 142: 1-10.
- 171 Taborski U, Wittstamm FJ, Bernardo A. Cost-Effectiveness of Self-Managed Anticoagulant Therapy in Germany. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1999; 25 (1): 103-7.

- 172 Watzke HH. A prospective controlled trial comparing weekly self testing and self dosing with the standard management of oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 2000; 83: 661-5.
- 173 Beyth RJ. A multicomponent intervention to prevent major bleeding complications in older patients receiving warfarin. *Ann Intern Med* 2000; 133: 687-95.
- 174 Körtke H, Körfer R. International normalized ratio self-management after mechanical heart valve replacement: is an early start advantageous? *Ann Thorac surg* 2001;72: 44-8.
- 175 Fitzmaurice DA. A randomised controlled trial of patient self management of oral anticoagulation treatment compared with primary care management. *J Clin Pathol* 2002; 55: 845-9.
- 176 Völler H, Glatz J, Taborski U, Bernardo A, Dovifat C, Heidinger K. Self-management of oral anticoagulation in nonvalvular atrial fibrillation (SMAAF study). *Z Kardiol* 2005; 94: 182-186.
- 177 Gosselin R, Owings JT, White RH, Hutchinson R, Branch J, Mahackian K, Johnston M, Larkin EC. A comparison of Point-of-care Instruments designed for monitoring oral anticoagulation with standard laboratory methods. *Thromb Haemost* 2000; 83: 698-703.
- 178 Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Negri B, Mannucci PM. Determination of the International Sensitivity Index of a new near-Patient testing Device to Monitor Oral Anticoagulant Therapy. *Thromb Haemost* 1997; 78: 855-8.
- 179 Poller L, Keown M, Chauhan N, van den Besselaar AMHP, Tripodi A, Shiach C, Jespersen J. European concerted action on anticoagulation. Comparison of fresh plasma and whole blood multicentre ISI calibrations of CoaguChek Mini and TAS PT-NC whole blood prothrombin time point-of-care monitors. *Thromb Haemost* 2002; 87: 859-66.
- 180 Poller L, Keown M, Chauhan N, van den Besselaar AMHP, Tripodi A, Shiach C, Jespersen J. European concerted action on anticoagulation. Evaluation of a method for International Sensitivity Index calibration of two point-of-care prothrombin time (PT) monitoring systems (CoaguChek Mini and TAS PT-NC) with fresh plasmas based on whole-blood equivalent PT. *Clin Chem* 2002; 48 (10): 1672-1680.
- 181 Poller L, Keown M, Chauhan N, van den Besselaar AMHP, Tripodi A, Shiach C, Jespersen J. European concerted action on anti-coagulation (ECAA). Correction of displayed INR on two point of care test whole blood prothrombin time monitors (CoaguChek Mini and TAS PT-NC) by independent International Sensitivity Index (ISI) calibration. *Br J Haematol* 2002; 116; 844-50.
- 182 Havrda DE, Hawk TL, Marvin CM. Accuracy and precision of the CoaguChek S versus Laboratory INRs in a clinic. *Ann Pharmacother* 2002; 36; 769-75.
- 183 Attermann J, Andersen NT, Korsgaard H, Maegaard M, Hasenkam JM. Patient-specific errors in agreement between International Normalized Ratios measured by a whole blood coagulometer and by a routine plasma-based method. *Haematologica* 2004; 89; 504-505.
- 184 Fitzmaurice DA, Machin SJ. Recommendation for patients undertaking self management of oral anticoagulation. *BMJ* 2001; 323: 985-989.
- 185 Poller L, Keown M, Chauhan N, van den Besselaar AMHP, Tripodi A, Shiach C, Jespersen J. European concerted action on anticoagulation. Quality assessment of the CoaguChek Mini and TAS PT-NC point-of-care whole-blood prothrombin time monitors. *Clin chem.* 2004; 50 (3): 537-544.
- 186 Moresi A. Development of an amperometric Biosensor for thrombin (2001) Inauguraldissertation Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Basel.
- 187 Frenkel EJ, Haerberli A, Moresi A. Electrochemical system for determining blood coagulation time. Patent US 6352630 B1, March 5, 2002.
- 188 Ludin C, Wikstroem P, Svendsen LG, Schulze A. Oligopeptide derivatives for the electrochemical measurement of protease activity. Patent US 6495336 B1, December 17, 2002.

- 189 Barthels M, Depka von M. Das Gerinnungskompodium. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003. S. 330-348.
- 190 [http://www.td.mw.tum.de/tum-td/de/studium/lehre/thermo\\_2/kgtsite/kgt.htm](http://www.td.mw.tum.de/tum-td/de/studium/lehre/thermo_2/kgtsite/kgt.htm)
- 191 van den Besselaar AMHP. A comparison of INRs determined with a whole blood prothrombin time device and two international reference preparations for thromboplastin. *Thromb Haemost* 2000; 84: 402-412.
- 192 Jonsson M, Hillarp A, Svensson P. Comparison between CoaguChek S- and Owren-type prothrombin time assay for monitoring anticoagulant therapy. *Thromb Res* 2004; 114: 83-89.
- 193 Kind A. Wie zuverlässig ist die Messung von Quick und INR mit den Geräten CoaguPlus Biotrack und CoaguChek S? *PrimaryCare* 2004; 4 (44): 873-875.
- 194 Poller L, Keown M, Chauhan N, van den Besselaar AMHP, Tripodi A, Shiach C, Jespersen J. European concerted action on anticoagulation (ECAA): an assessment of a method for ISI calibration of two whole blood point-of-care PT monitor systems based on lyophilized plasmas using whole blood equivalent PT. *J of Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 766-772.
- 195 Hasenkam JM, Knudsen L, Kimose HH, Grønnesby H, Attermann J, Andersen NT, Pilegaard HK. Practicability of patient self-testing of oral anticoagulant therapy by the international normalized ratio (INR) using a portable whole blood monitor. *Thromb Res* 1997; 85 (1): 77-82.
- 196 Schmid HR, Fricker U, Ilg G, Beer JH. Prothrombin time / INR determination based on capillary blood methods. Is there a difference between CoaguChek Pro and S? Poster 7AP042 at International Swiss MedLab 2004 and 8<sup>th</sup> Alps Adria Congress; Lucerne 2004.
- 197 Tripodi A. Control of oral anticoagulant therapy with whole blood prothrombin time devices: the future has begun. *Thromb Haemost* 2000; 84: 362-363.

## Curriculum vitae

Charles Bernard Thürlemann

Adresse	Seewiesenstrasse 44d, 9322 Egnach TG
Geburtsdatum	20. Juli 1974
Geburtsort	Grabs SG
Heimatort	Waldkirch SG
1981 – 1983	Primarschule in Wangen SZ
1984 – 1987	Primarschule in Egnach TG
1987 – 1992	Gymnasium Marienburg, Rheineck SG
1992 – 1994	Klosterschule Disentis GR – Matura Typus A
1994 – 1996	Grundstudium der Pharmazie an der Universität Fribourg
1996/97	Pharmazie-Praktikumsjahr in Arbon TG Assistenten-Examen 1997, ETH Zürich
1997 – 1999	Fachstudium der Pharmazie an der Universität Basel Staatsexamen Nov. 1999 – Eidg. dipl. Apotheker
2000/2001	Sprachaufenthalt in London Vertretungen in verschiedenen Offizin-Apotheken Mehrmonatige Militärdienstleistungen
10. 2001 – 07. 2005	Doktorat an der Universität Basel; Dissertationsstelle extern am Thromboselabor der Universität Bern, Inselspital Bern

**Während meiner akademischen Ausbildung habe ich Vorlesungen und Praktika besucht, welche von folgenden Professoren und Dozenten gehalten wurden:**

Allan M, Belser B, Brenneisen R, Bruppacher R, Buchala A, Canevascini J, Conzelmann A, Demierre G, Drenhaus U, Drewe J, Dreyer JL, Durant M, Eichholzer M, Eppenberger U, Fracheboud D, Fraefel, Gabriel JP, Grasshoff G, Güntert TW, Hädener A, Haefeli WE, Haegeli A, Hersberger K, Hof R, Hofbauer KG, Hüsler J, Imanidis G, Jenny T, Jörg A, Kaup B, Kern, Kessler M, Lampel G, Leuenberger H, Meier B, Meier UA, Métraux JP, Müller-Schärer H, Nicholls JG, Perriard F, Renaud P, Rusconi S, Ryser U, Schaffner W, Schellenberg L, Schläpfer CW, Schlapbach L, Stöckel K, Thormann W, Tobler H, Vozeh S, Wattendorff J, Wirz-Justice A, van Hoogevest P, von Zelewsky A, Zimmermann H.





