Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. M. Nauck)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Optimierung der Zentrifugationsbedingungen für Gerinnungsproben im automatisierten Laborbetrieb

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin

der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2016

vorgelegt von:
Juliane Suchsland
geb. am: 20.06.1986
in: Rendsburg

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Matthias Nauck
2. Gutachter:	PD Dr. med. Thomas Streichert
Ort, Raum:	Universitäsmedizin Greifswald, Seminarraum Transfusionsmedizin P 0.75
Tag der Disputation:	04.07.2017

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **1**

1 Einleitung 2

1.1 Zielsetzung 6

2 Material und Methoden 7

2.1 Proben 7
2.2 Probenfluss und Laboranalysen 7
2.3 Qualitätskontrollen und VK 9
2.4 Statistik 9

3 Ergebnisse 10
4 Diskussion 14
5 Ausblick 18
6 Zusammenfassung 19
I. Anhang 21
II. Literaturverzeichnis 27
III. Abbildungsverzeichnis 29
IV. Tabellenverzeichnis 30
V. Eidesstattliche Erklärung 31
VI. Lebenslauf 32
VII. Danksagung 33

Abkürzungsverzeichnis

aPTT	activated partial thromboplastin time
APC	activated protein C
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
dRVVT	dilute Russell Viper Venom Time
INR	International Normalized Ratio
Min.	Minuten
Plt	platelet concentration = Thrombozytenkonzentration
PPP	platelet poor plasma = thrombozytenarmes Plasma
Rili-BÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen
RT	Raumtemperatur
QK	Qualitätskontrolle
TAT	turnaround time

1 Einleitung

Die Einführung und Weiterentwicklung der Automatisation in klinischen Laboratorien ist seit vielen Jahren und auch aktuell von großem Interesse [1–3]. Der anhaltende technische Fortschritt ermöglicht es, stetig weitere Arbeitsschritte in die Automatisation einzubinden, und erlaubt so die Automatisation immer komplexerer Prozesse. Die Automatisation führt in erster Linie zur Standardisierung von Prozessen und soll unter anderem zur Bewältigung des steigenden Probenaufkommens, zur Optimierung der gesamten „turnaround time“ (Gesamt-TAT; Zeit von Anforderung der Analyse bis zur Übermittlung des Ergebnisses an den Anfordernden [4]) und zur Kostensenkung beitragen [3]. Außerdem können durch die Übernahme bestimmter Arbeitsschritte durch Maschinen die Ressourcen des Laborfachpersonals für andere Tätigkeiten (z.B. Ergebnisvalidierung [2] oder Kalibration von Assays) genutzt werden. Es können sowohl Teilbereiche des Labors (z.B. Hämatologie [2], klinische Chemie [5]), als auch ein komplettes Labor automatisiert werden [2,6]. Seit Einführung der „dritten Generation“ der Laborautomationssysteme um 1990 können diese Systeme auch einen Großteil der prä– und postanalytischen Prozesse abdecken [2].

Eine Laborstraße entsteht durch die Verbindung einzelner Module mit Hilfe eines automatisierten Probentransportes, z.B. durch ein Transportband. Zu diesen Modulen gehören z.B. Probeneingabe- und Ausgabemodule, Barcodeleser, Zentrifugen, Aliquotiermodule, Decapper, Recapper, Probenkühlschränke und natürlich die eigentlichen Analysegeräte. Die Probenröhrchen werden manuell oder mittels speziellen Rohrpostsystemen direkt in das Eingabemodul der Laborstraße gegeben [7]. Alle folgenden Arbeitsschritte werden voll automatisiert ausgeführt, dazu gehören unter anderem Probenidentifikation, Probentransport zu Zentrifugen und Analysegeräten, Öffnen (Decapper) und Wiederverschluss (Recapper) von Probenröhrchen, Aliquotierung und Etikettierung sowie Archivierung von Proben, Bearbeitung von Nachforderungen und Entsorgung der Proben [2,6].

Die Durchführung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen wird klassischerweise in präanalytische, analytische und postanalytische Phase unterteilt [8,9]. Dieses System dient unter anderem zur Identifizierung und Klassifizierung von

Fehlern [10]. Außerdem lassen sich dadurch die jeweiligen Zeitanteile der einzelnen Verfahrensabschnitte an der Gesamt-TAT ermitteln [4]. Zur präanalytischen Phase werden alle Vorgänge gezählt, die bis zur Messung der angeforderten Analyte am Messgerät stattfinden [8,9], u.a. das Beauftragen der Analytik, die Patientenvorbereitung, Probenentnahme, Probentransport, Probenaufbereitung für die Analytik und die Lagerung der Proben. Jeder dieser einzelnen Schritte innerhalb der präanalytischen Phase kann einen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Während der Blutabnahme können beispielsweise eine lange Stauung oder zu starkes Aspirieren von Blut mittels Spritzen zur Hämolyse führen [11]. Die unzureichende Fixierung von Probenröhrchen während des Probentransportes in einer Rohrpostanlage [11] sowie zu hohe Beschleunigungen innerhalb des Rohrpostsystems [12] können ebenfalls eine Hämolyse verursachen. Die Lagerungsdauer von Gerinnungsproben vor Zentrifugation hat einen Einfluss auf die Messergebnisse von Quick/INR (International Normalized Ratio) und aPTT (activated partial thromboplastin time) [13].

In der analytischen Phase erfolgt die Messung der angeforderten Analyte [9]. Zur anschließenden postanalytischen Phase gehören Befundinterpretation und Befundübermittlung [10].

Die TAT für klinisch–chemische Analysen kann durch kurze Zentrifugationszeiten und hohe Zentrifugationsbeschleunigungen reduziert werden [5]. Durch die Integration der Bearbeitung von Gerinnungsproben in den automatisierten Laborbetrieb könnten ineffiziente parallele Arbeitsabläufe vermieden werden (beispielsweise manuelle Zentrifugation von Gerinnungsröhrchen, manueller Transport zu Zentrifugen und Gerinnungsarbeitsplätzen). Ein Laborauftrag kann zeitkritische Gerinnungsanforderungen (z.B. für Quick/INR oder aPTT) in Kombination mit weniger dringenden Anforderungen (z.B. Protein S) enthalten. Dabei müssen bei der Probenvorbereitung für die zeitkritisch und zuerst durchzuführenden Gerinnungsanalysen bereits die präanalytischen Anforderungen an die weniger zeitkritische Gerinnungsanalytik berücksichtig werden.

Für die Durchführung von Gerinnungsanalysen gibt es eine Vielzahl unterschiedliche Empfehlungen. Einerseits liegen für die verschiedenen Assays individuelle Herstellerangaben vor, andererseits haben Fachgesellschaften wie das CLSI

(Clinical and Laboratory Standards Institute) Leitlinien für diese Thematik entwickelt. In der CLSI Leitlinie H21-A5 – „Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays“ - wird als Kriterium für eine ausreichende Zentrifugation thrombozytenarmes Plasma (PPP; platelet poor plasma) genannt. Die Thrombozytenkonzentration soll nach der Zentrifugation weniger als 10 *x* 10^9/L betragen. Für die Messungen von aPTT und Quick/INR aus frischem Plasma ist eine Obergrenze von 200 *x* 10^9/L für die Thrombozytenkonzentration ausreichend. Allerdings werden die Zentrifugationsbedingungen in der Richtlinie nicht strikt vorgegeben. Eine Zentrifugation bei 1500 *x* g für mindestens 15 min. und bei Raumtemperatur (RT) wird als Richtwert genannt. Die Etablierung eines laborinternen Zentrifugationsprotokolls wird ausdrücklich empfohlen, in welchem auch höhere Zentrifugationsbeschleunigungen und kürzere Zentrifugationszeiten genutzt werden dürfen [14].

Für verschiedene Gerinnungsassays existieren unterschiedliche Herstellerangaben. Die empfohlenen Zentrifugationsbedingungen variieren erheblich bezüglich Zentrifugationsdauer (15 – 25 min.) und -beschleunigung (1500 – 5000 *x* g).

Bei der Zentrifugation kann die Dauer durch unterschiedliche Beschleunigungskräfte ausgeglichen werden, um eine identische Separation zu erzielen. Um die TAT für Gerinnungsanalysen zu verkürzen, wurden in Studien verschiedene Zentrifugationsprotokolle etabliert [1,15–18], in denen jeweils die Zentrifugationsbeschleunigungen zugunsten kürzerer Zentrifugationszeiten erhöht wurden.

Es wurden Vergleichsmessungen der Globalteste der Gerinnung (Quick/INR und aPTT) [15–18], Fibrinogen [15,16,18] sowie D – Dimer, Antithrombin und dilute Russel Viper Venom Time (dRVVT) [18] durchgeführt. Boudaoud et al. empfehlen eine zweiminütige Zentrifugation bei 4400 *x* g [15], Lippi et al. 5 - 10 min. bei 1500 *x* g [16] und Sultan eine fünfminütige Zentrifugation bei 3000 *x* g [17].

Nelson et al. verglichen Routine- und Hochgeschwindigkeitszentrifugation, um die Bearbeitungszeit von Gerinnungsanforderungen in Notfallsituationen beschleunigen zu können. Für alle getesteten Analyte (Quick/INR, aPTT, Fibrinogen, D - Dimer, Antithrombin und dRVVT) wird eine zweiminütige Zentrifugation bei 11000 *x* g empfohlen [18]. Sédille-Mostafaie et al. beschrieben den Einfluss

einer automatisierten Laborstraße auf die Messergebnisse von Quick, aPTT, Fibrinogen, D – Dimer, sowie der Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI und XII. Für die Bearbeitung von Quick, aPTT, Fibrinogen und D – Dimer mithilfe der automatisierten Laborstraße werden sieben Minuten Zentrifugationszeit bei 3000 *x* g empfohlen [1].

1.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung und Evaluierung eines Zentrifugationsprotokolls für Gerinnungsproben im automatisierten Laborbetrieb.

Hierfür sollen die für die klinisch-chemischen Analysen etablierten Routinezentrifugationsbedingungen (fünf Minuten Zentrifugation bei 3280 *x* g, T = 19°C, Zentrifugen integriert in automatisierte Laborstraße) für die Bearbeitung von Gerinnungsanalysen genutzt werden.

Die Qualität der Zentrifugation soll mittels folgender Kriterien beurteilt werden:

- Thrombozytenkonzentration nach Zentrifugation
- Analyseergebnisse der Globalteste für die Gerinnung (Quick/INR, aPTT)
- Analyseergebnisse der Spezialanalysen Protein S und Gerinnungsfaktor VIII.

Außerdem werden weitere Einflüsse (z.B. automatisierte Aliquotierung) der automatisierten Laborstraße auf die Thrombozytenkonzentration untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Proben

Aus den Routineeinsendungen der Universitätsmedizin Greifswald an das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin wurden 175 Citratröhrchen (0,129 mol/L Natriumcitrat, 2,7 ml; Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland) zufällig ausgewählt. Die Probenröhrchen wurden etwa zu gleichen Anteilen durch einen Kurier in das Labor gebracht oder über eine Rohrpostanlage (Aerocom; Wildau, Deutschland) eingesendet.

Ein Votum der Ethikkommission der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern bei der Ernst–Moritz–Arndt-Universität Greifswald lag vor.

Als Ausschlusskriterien wurden definiert:

- falsch befüllte Citratröhrchen
- Gerinnselbildung
- Hämatokritwerte > 0,4
- Einsendungen aus der Kinderklinik
- Proben, die mit „Notfall“ oder „Lebensgefahr“ gekennzeichnet wurden.

2.2 Probenfluss und Laboranalysen

Die Probenabarbeitung der eingeschlossenen Gerinnungsproben entsprach der bis dato durchgeführten Bearbeitung: die Globaltestest Quick und aPTT wurden im frischen Plasma innerhalb der etablierten TAT des Labors sofort und die Spezialteste einmal wöchentlich aus zuvor eingefrorenen Aliquoten durchgeführt.

Nach dem Eintreffen der Probenröhrchen im Labor wurde eine Messung der Thrombozytenkonzentration und des Hämatokrits im Citrat-Vollblut im Originalröhrchen am Sysmex XE5000 (Sysmex; Norderstedt, Deutschland) durchgeführt.

Sofort im Anschluss erfolgte über das integrierte Eingabe–Ausgabe–Modul die manuelle Eingabe der Probenröhrchen auf die automatisierte Laborstraße „FlexLab“ (Inpeco; Turin, Italien). Es folgte der automatische Transport zu einer der beiden baugleichen Zentrifugen ROTANTA 460 Robotic (Andreas Hettich

GmbH & Co. KG; Tuttlingen, Deutschland). Die Proben wurden fünf Minuten bei 3280 *x* g (T = 19°C) zentrifugiert, über das Transportband zum Eingabe–Ausgabe–Modul zurück transportiert und dort manuell entnommen.

Am Sysmex XE5000 erfolgte die Messung der Thrombozytenkonzentration im Plasmaüberstand der Citratröhrchen (Eintauchtiefe etwa 1,5 cm über buffy coat). Anschließend wurde die Messung von Quick/INR und aPTT aus dem frischen Plasma an einem der zwei baugleichen BCS XP (Siemens Healthcare; Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Für die Quickmessungen wurde Innovin®, für die aPTT Messungen Actin®FS benutzt (beide Reagenzien: Siemens Healthcare Diagnostics; Marburg, Deutschland).

Es folgte eine erneute manuelle Eingabe der Originalröhrchen auf die „FlexLab“ über das Eingabe–Ausgabe–Modul. Durch ein in die „FlexLab“ integriertes Aliquotiermodul wurde aus dem Plasmaüberstand des Originalröhrchens ein Aliquot von 510 µl entnommen. Aliquot- und Originalröhrchen wurden am Eingabe–Ausgabe–Modul entnommen. Es erfolgte eine Messung der Thrombozytenkonzentration am Sysmex XE5000, danach wurde das Aliquotröhrchen bei -20°C eingefroren.

Der beschriebene Ablauf wurde mit dem Originalröhrchen ein zweites Mal durchgeführt (Zentrifugation, Messung der Thrombozytenkonzentration im Plasmaüberstand, Messung von Quick/INR und aPTT, Aliquotierung, Messung der Thrombozytenkonzentration im Aliquotröhrchen, Einfrieren des Aliquot-röhrchens). Der Probenfluss nach Eintreffen der Probenröhrchen im Labor ist in Abbildung 1 dargestellt.

Nach spätestens zwei Wochen wurden die Aliquotröhrchen paarweise bei 37°C fünf Minuten lang aufgetaut. Dann erfolgten die Messungen von F. VIII (Coagulation Factor VIII Deficient Plasma, Actin ® FSL; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Deutschland) und Protein S Aktivität (Protein S Ac; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Deutschland) in beiden Aliquotröhrchen aller in die Untersuchung eingeschlossenen Proben am BCS XP.

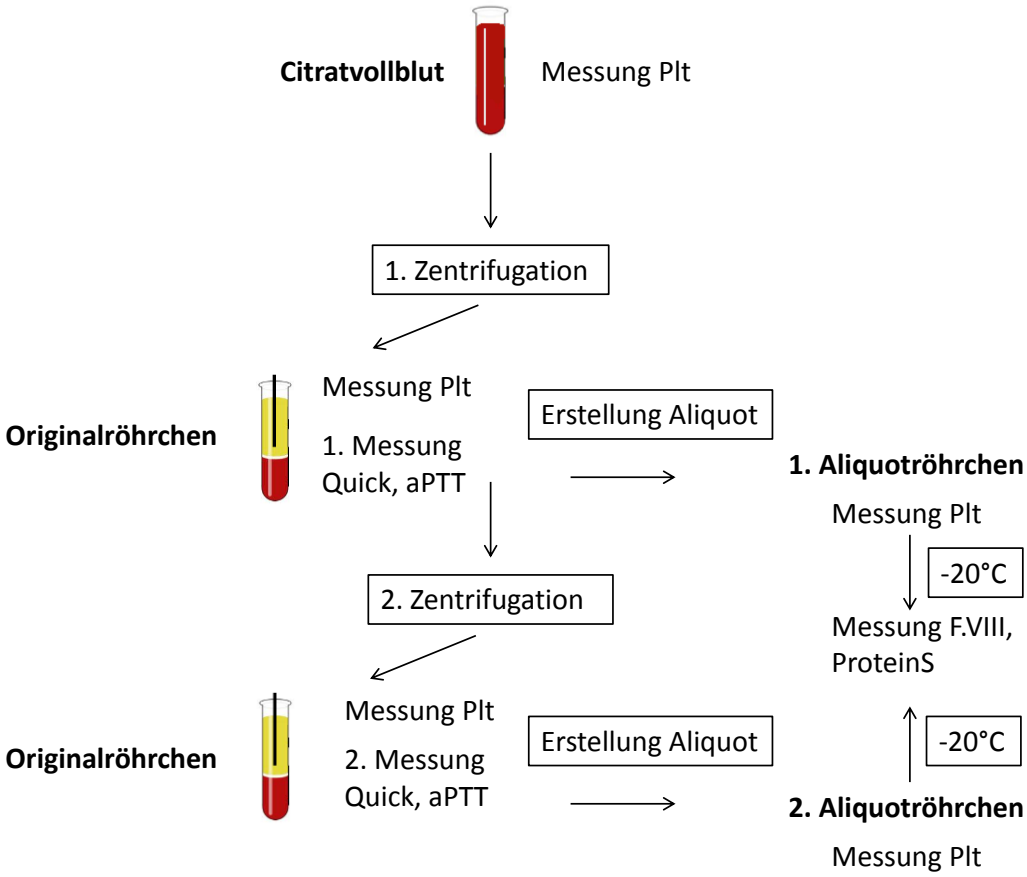

Abbildung 1: Probenfluss nach Eintreffen der Probenröhrchen im Labor.

2.3 Qualitätskontrollen

Interne Qualitätskontrollen (QK) wurden gemäß Rili-BÄK (Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen) durchgeführt. An jedem Messtag wurden für jeden durchgeführten Assay zwei Level einer internen QK gemessen. Probenmessungen wurden nur durchgeführt, wenn beide QK den Anforderungen der Rili-BÄK entsprachen.

2.4 Statistik

Die Methodenvergleiche wurden mit EVAPAK (Add-In-Programm für MS-EXCEL von Roche Diagnostics; Basel, Schweiz-) erstellt. Regressions- und Korrelationsanalysen wurden mittels Passing Bablok Regression durchgeführt. Boxplots wurden mit SigmaPlot 12.0 erstellt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Für weitere Korreleationsanalysen wurde SAS 9.4 (SAS Institute GmbH; Heidelberg, Deutschland) genutzt.

3 Ergebnisse

Thrombozytenkonzentrationen

Es wurden 175 Proben eingeschlossen. Davon wiesen 125 Proben Thrombozytenkonzentrationen innerhalb des Referenzbereiches (140-440 *x* 10^9/L), 38 Patientenproben eine Thrombozytenkonzentrationen unterhalb des Referenzbereiches (< 140 *x* 10^9/L; Thrombozytopenie) und 12 Patientenproben eine Thrombozytenkonzentrationen oberhalb des Referenzbereiches (> 440 *x* 10^9/L; Thrombozytose) auf.

Die Verteilungen der Thrombozytenkonzentrationen vor Zentrifugation (gemessen im Citrat-Vollblut) sowie nach der ersten und zweiten Zentrifugation (gemessen in Aliquotröhrchen im Citratplasma) sind in Abbildung 2 dargestellt.

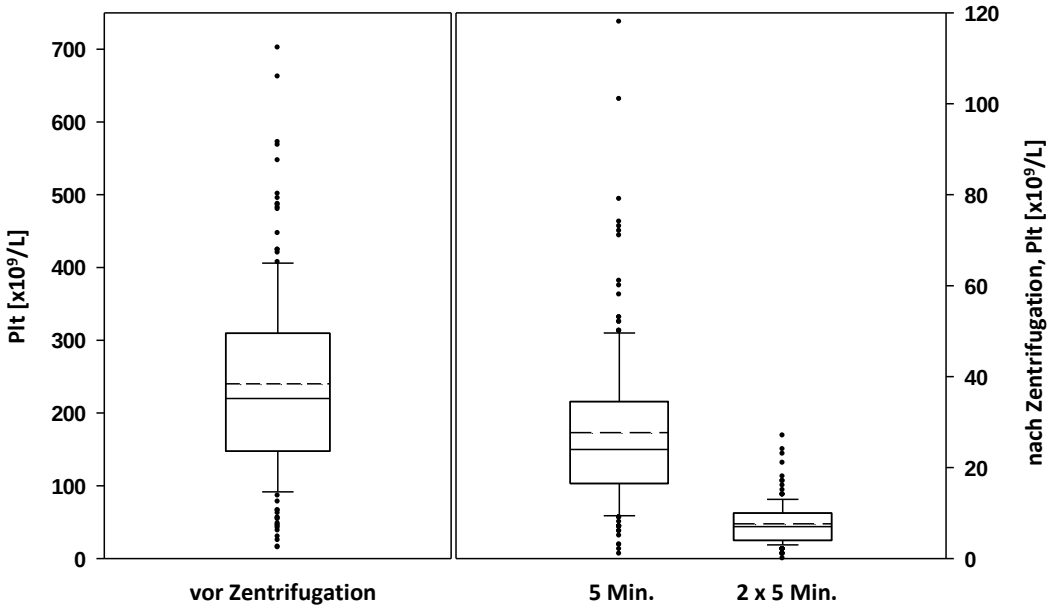

Abbildung 2: Verteilungen der Thrombozytenkonzentrationen (Plt).
Links: im Vollblut vor Zentrifugation und im Originalröhrchen. Rechts: im Citratplasma, nach der ersten (5 Min.) und nach der zweiten (2 x 5 Min.) Zentrifugation beides in Aliquotröhrchen. Gestrichelte Linie: Mittelwert; durchgezogene Linie: Median.
***Beachte:* unterschiedliche Skalierung der Y-Achsen**

Vor der Zentrifugation lag der Median der Thrombozytenkonzentration bei 220 *x* 10^9/L und reduzierte sich nach der ersten Zentrifugation (5 Min.) auf 24 *x* 10^9/L. Nach der ersten Zentrifugation wiesen alle Proben eine Thrombozytenkonzentrationen < 200 *x* 10^9/L auf. Nach der zweiten Zentrifugation (2 *x* 5 Min.) konnte eine weitere Reduktion des Medians auf 7 *x* 10^9/L beobachtet

werden (Tabelle 1). Die Thrombozytenkonzentrationen betrugen nach der zweiten Zentrifugation in allen Proben < 30 *x* 10^9/L und in 73% der Proben unter < 10 *x* 10^9/L.

Die Thrombozytenkonzentrationen nach der ersten und zweiten Zentrifugation wurden sowohl im Original- als auch im Aliquotröhrchen gemessen. Die Thrombozytenkonzentrationen in den Aliquotröhrchen waren gegenüber den Thrombozytenkonzentrationen in den Originalröhrchen leicht erhöht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mediane der Thrombozytenkonzentrationen (Plt).
Mediane nach der ersten (5 Min.) und der zweiten (2 x 5 Min.) Zentrifugation. Minimum (Min) und Maximum (Max) der Thrombozytenkonzentrationen im Original- und im Aliquotröhrchen. In Klammern: 25%-Quantil (Q1) und 75%-Quantil (Q3).

	5 Min., Plt [10^9/L]				2 *x* 5 Min., Plt [10^9/L]		
	Min	Max	Median (Q1; Q3)		Min	Max	Median (Q1; Q3)
Originalröhrchen	1	117	19 (12; 30)		0	23	3 (2; 6)
Aliquotröhrchen	1	118	24 (16; 35)		0	27	7 (4; 10)

Gerinnungsparameter

Die Vergleiche der Messungen von Quick/INR, aPTT, F. VIII und Protein S nach der ersten und zweiten Zentrifugation wurden mittels Passing Bablok Regression durchgeführt und sind in Abbildung 3 dargestellt.

Aufgrund der begrenzten Mengen an Probenvolumen des Restmaterials war es nicht möglich, alle Messungen in allen Proben (Tabelle 2) durchzuführen.

Tabelle 2: Probenanzahl (n) und Thrombozytenkonzentrationen nach der ersten (5 Minuten) und zweiten (2 x 5 Minuten) Zentrifugation gemessen in Aliquotröhrchen

Gerinnungsassay	5 Min., Plt [10^9/L], Median (Min-Max)	2 x 5 Min., Plt [10^9/L], Median (Min-Max)	n
Quick	20 (2–117)	3 (0-23)	171
aPTT	19 (1-117)	3 (0-23)	175
F. VIII	23 (3-79)	7 (2-15)	82
Protein S	22 (3-79)	7 (2-15)	67

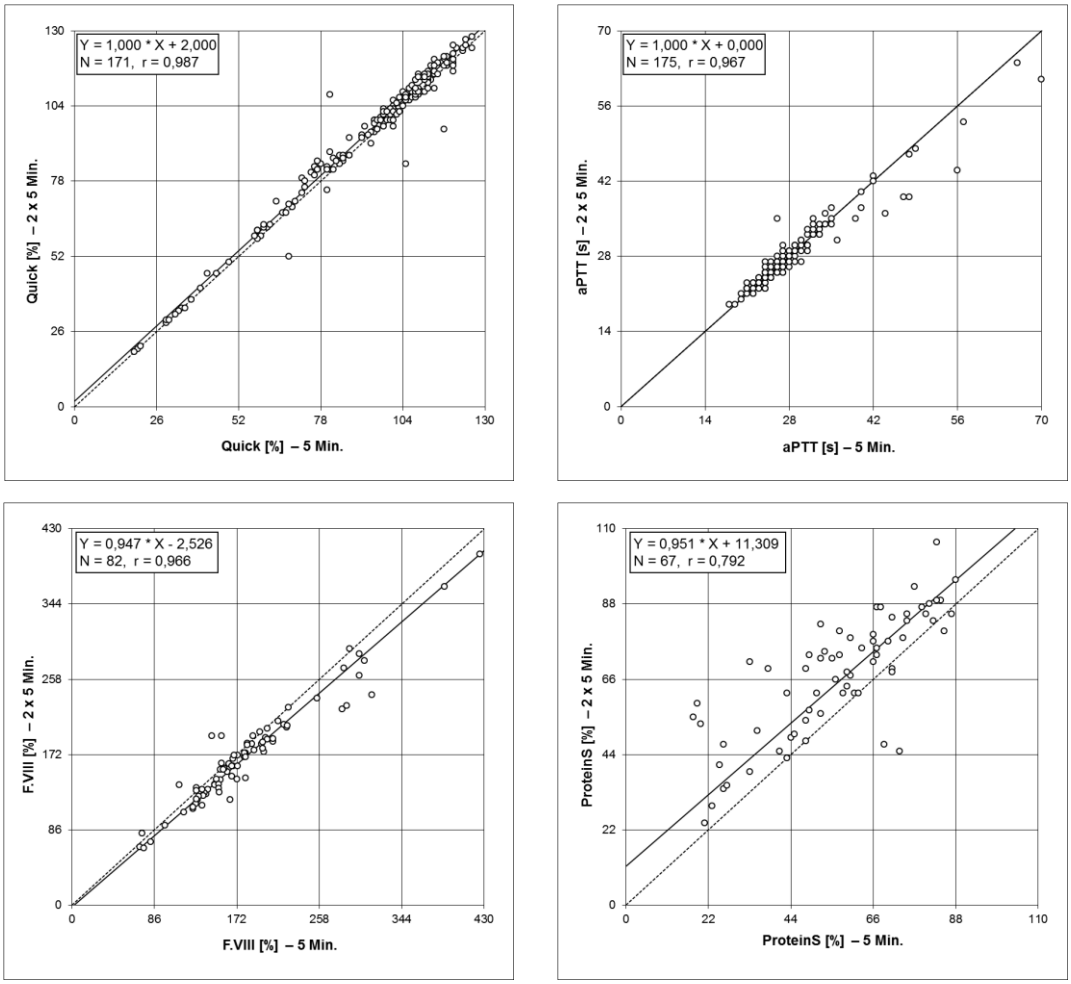

Abbildung 3: Ergebnisse der Passing Bablok Regression.

Weder nach der ersten noch nach der zweiten Zentrifugation bestand eine Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und den Messergebnissen von Quick, aPTT und F. VIII.

Nach der ersten Zentrifugation bestand eine schwache Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der Plasmakonzentration von Protein S ($r^2 = 0,36$; $p < 0,01$). Nach der zweiten Zentrifugation korrelierten diese Werte nicht mehr miteinander ($r^2 = 0,04$; $p = 0,08$) (Abbildung 4).

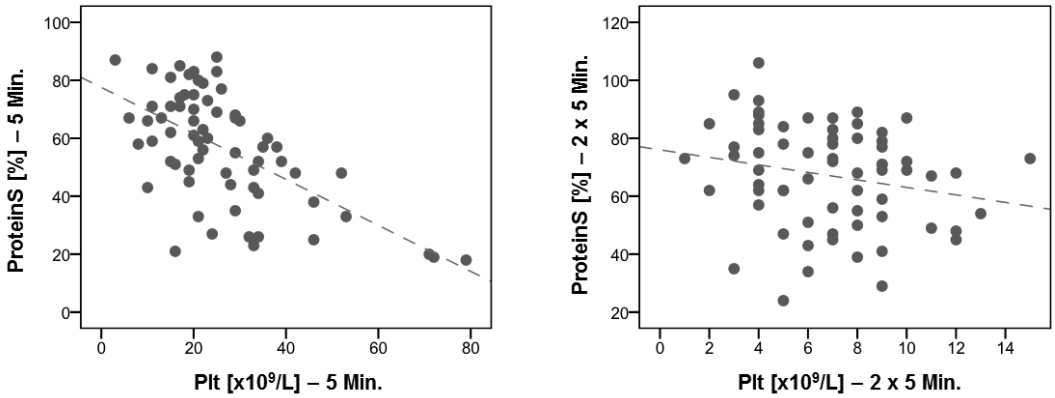

Abbildung 4: Korrelation Thrombozytenkonzentration (Plt) mit der ProteinS Aktivität.

Die Messwertpaare der Protein S Aktivitäten wurden anhand der in den Proben bestimmten Thrombozytenkonzentrationen in 5 Untergruppen unterteilt (8-21 Messwertpaare pro Untergruppe). Bis zu einer Thrombozytenkonzentration in den Aliquotröhrchen von etwa 40 *x* 10^9/L zeigte sich eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Messwertpaaren (r^2 zwischen 0,8119 und 0,9064 bis zu einer Thrombozytenkonzentration von 40 *x* 10^9/L). Diese Übereinstimmung geht bei höheren Thrombozytenkonzentrationen verloren (r^2 = 0,1005).

4 Diskussion

In der CLSI Leitlinie H21-A5 wird für Messungen von Quick/INR, aPTT und Thrombinzeit aus frischem Plasma eine Thrombozytenkonzentration von < 200 Gpt/L empfohlen. Gemäß der Leitlinie sollen andere als die vorbenannten Gerinnungsassays bei Thrombozytenkonzentrationen < 10 *x* 10^9/L durchgeführt werden [14]. Als Begründung für diesen Cut-off Wert werden in der Leitlinie zwei im Folgenden kurz beschriebenen Studien, mit n = 5 bzw. 42 Proben zitiert, die Gerinnungsteste für Lupusantikoagulanz und APC-Resistenz zum Gegenstand hatten (Brien et al. und Tripodi et al.).

Brien et al. untersuchten Lupusantikoagulans positive Plasmen von fünf Patienten. Ziel war es, den Einfluss der Thrombozytenkonzentration im Plasma auf die Ergebnisse von aPTT Messungen in frischen und wieder aufgetauten Proben zu untersuchen. Die Ergebnisse von einmal eingefrorenen Proben wurden von einer Thrombozytenkonzentration ≥ 10 *x* 10^9/L beeinflusst [19].

Tripodi et al. untersuchten die Plasmen von 42 Patienten. Dabei wurde u.a. der Einfluss der Thrombozytenkonzentration in frischen und aufgetauten Plasmen auf die Ergebnisse dreier APC Resistenz Testmethoden geprüft. Es wurden plättchenfreies Plasma ($\bar{x}$ = 0 *x* 10^9/L) und plättchenarmes Plasma ($\bar{x}$ = 19 *x* 10^9/L +/- 6,6 *x* 10^9/L) hergestellt. Die APC Resistenz Messungen erfolgten vor und nach dem Auftauen der Plasmen. Im plättchenarmen Plasma waren die Messergebnisse nach dem Auftauen signifikant verändert im Vergleich zu den Messungen vor dem Auftauen. Im plättchenfreien Plasma zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Messwerten vor und nach dem Auftauen [20].

Die vorliegende Arbeit untersucht daher die CLSI Empfehlung bezüglich der Thrombozytenkonzentrationen < 10 *x* 10^9/L für spezielle Gerinnungsassays mit Hilfe weiterer Assays. In dieser Arbeit wurden die Thrombozytenkonzentrationen im Citratplasma durch einmaliges Zentrifugieren (3280 *x* g, 5 Minuten) in allen Proben auf < 200 *x* 10^9/L reduziert. Mittels einer zweiten Zentrifugation bei gleichen Bedingungen konnten die Thrombozytenkonzentrationen in allen untersuchten Primär- und Aliquotröhrchen auf < 30 *x* 10^9/L gesenkt werden (Tabelle 1).

Die Thrombozytenkonzentrationen in den Aliquotröhrchen lagen sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Zentrifugation höher als in den Originalröhrchen. Diese Unterschiede der Thrombozytenkonzentration waren jedoch mit absolut 3 bzw. 7 *x* 10^9/L sehr niedrig. Möglicherweise werden die höheren Konzentrationen in den Aliquotröhrchen durch den automatisierten Transport zu den Aliquotiermodulen oder durch den Aliquotierungsprozess selbst verursacht. Bei der automatisierten Aliquotentnahme wird der Plasmaüberstand zwar vom oberen Rand in Richtung des buffy coats abpipettiert, durch den entstehenden Sog könnten jedoch Thrombozyten aus der Nähe des buffy coats aufgewirbelt und angesaugt werden.

Zusätzlich zu den Thrombozytenkonzentrationen wurden die Messergebnisse von Quick/INR, aPTT, F. VIII und Protein S nach der ersten und zweiten Zentrifugation miteinander verglichen. Dies erfolgte mittels Passing Bablok Regression.

Die Messwertpaare der Quick/INR und aPTT Bestimmungen waren gut vergleichbar (Abbildung 3). Dies bestätigt, dass die vom CLSI für diese Analysen empfohlenen Thrombozytenkonzentrationen von < 200 *x* 10^9/L ausreichend sind. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass diese Thrombozytenkonzentration durch eine einmalige, fünfminütige Zentrifugation bei 3280 *x* g erreicht und unterschritten werden kann.

Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Beobachtungen von Lippi, Boudaoud und Sultan überein [15–17]. Allerdings konnten die Thrombozytenkonzentrationen durch die hier getesteten Zentrifugationsbedingungen nicht in so starkem Maß gesenkt werden, wie bei Sultan [17] und Sédille-Mostafaie et al. [1] angegeben. Laut Sultan konnten die Thrombozytenkonzentrationen im Citratplasma durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 3000 *x* g in 98% (n = 46) der untersuchten Proben auf < 10 *x* 10^9/L gesenkt werden [17]. Sédille-Mostafaie et al. konnten durch eine siebenminütige Zentrifugation bei 3000 *x* g sogar in allen untersuchten Proben (n = 10) < 10 *x* 10^9/L Thrombozyten messen.

Der Vergleich der Messwertpaare der F. VIII Messungen nach der ersten und zweiten Zentrifugation zeigte ebenfalls eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse, obwohl die Thrombozytenkonzentrationen nach der ersten Zentrifugation

bis zu 80 *x* 10^9/L betrugen. Dies zeigt, dass entgegen der CLSI Leitlinie Thrombozytenkonzentrationen von mehr als 10 *x* 10^9/L auch für andere Gerinnungsassays als Quick/INR und aPTT akzeptabel sein könnten.
Die Protein S Messergebnisse nach erster und zweiter Zentrifugation wiesen im Gegensatz zu den Messergebnissen von Quick/INR, aPTT und F. VIII eine schlechtere Vergleichbarkeit auf. Eine genauere Untersuchung dieser Beobachtung mittels Untergruppenanalysen zeigte, dass bei Thrombozytenkonzentrationen unter 40 *x* 10^9/L eine gute Vergleichbarkeit der Messergebnisse vorliegt. Diese geht erst bei Thrombozytenkonzentrationen über diesem ermittelten Grenzwert verloren.
Die relativ geringen Zahlen der Messwertpaare in den Untergruppen machen eine genaue Abgrenzung für eine maximale Thrombozytenkonzentration für die Protein S Analyse nicht sicher möglich. Die Ergebnisse lassen allerdings den Schluss zu, dass Protein S in Plasmen, die mehr als 10 *x* 10^9/L enthalten, gemessen werden kann. Dies gilt nicht für Plasmen, die mehr als etwa 40 *x* 10^9/L Thrombozyten enthalten. Mehr Messungen innerhalb der Untergruppen wären nötig, um die Wahl dieser Grenze weiter zu untermauern. Thrombozytenkonzentrationen < 40 *x* 10^9/L können durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen von jeweils 5 Minuten bei 3280 *x* g erreicht werden.

Dieser Arbeit wurden die spezifischen Zentrifugationsbedingungen der vorhandenen Automatisation zu Grunde gelegt. Diese können von den Empfehlungen der Hersteller abweichen. Die Anzahl der untersuchten Proben ist zur Beurteilung der Vergleiche der Quick, aPTT und Faktor VIII Messungen ausreichend. Für eine detaillierte Untergruppenanalyse der Protein S Messungen hat sich gezeigt, dass eine höhere Anzahl Proben erforderlich ist.
Die Thrombozytenkonzentration im Citratplasma gilt als generell anerkannter Indikator für die Güte der Zentrifugation [14]. In dieser Arbeit wurde dieses Gütekriterium ergänzt um Vergleichsmessungen von vier Gerinnungsassays nach zwei aufeinander folgenden Zentrifugationen. Auf diese Weise konnte das getestete Zentrifugationsprotokoll evaluiert und etabliert werden. In der Folge können die hohen Zentrifugationsbeschleunigungen, die im Routinebetrieb für die Bearbeitung klinisch-chemischer Analysen genutzt werden, auch für die Gerinnungsanforderungen Quick, aPTT und F. VIII genutzt werden. Dies erlaubt die

Integration von Gerinnungsproben in den automatisierten Laborbetrieb, der an der Universitätsmedizin Greifswald bereits für die klinisch-chemischen Analysen genutzt wird. Die wiederholte, also zweifache Anwendung der beschriebenen Zentrifugationsbedingungen auf eine Probe bietet eine Möglichkeit, auch Gerinnungsproben mit Anforderungen für Protein S über eine Laborstraße vollständig zu bearbeiten.

5 Ausblick

Für eine gezieltere Untersuchung der Untergruppen der Protein S Messvergleiche wären weitere Proben erforderlich. Auf diese Weise könnte eine genauere Aussage bezüglich eines Cut-off Wertes für die Thrombozytenkonzentration für diesen Assay getroffen werden.

Außerdem könnte die Austestung weitere Gerinnungsassays bezüglich der Beeinflussung der Messergebnisse durch die Thrombozytenkonzentrationen hilfreich sein, um die Aussagen dieser Arbeit weiter zu festigen.

6 Zusammenfassung

In klinischen Laboratorien wird die Zentrifugation mit Beschleunigungen über 3000 *x* g genutzt, um die TAT für klinisch-chemische Analysen zu senken. Gerinnungsanalysen werden bisher nur selten in die Laborstraßen integriert, auch auf Grund der besonderen Anforderungen an die Zentrifugationsbedingungen. Daher sind im Laborbetrieb häufig ineffiziente parallele Arbeitsabläufen nötig. Die CLSI Richtlinie zielt für Gerinnungsassays auf die Reduktion der Thrombozytenkonzentration ab. Für die Messungen von Quick/INR und aPTT wird eine Thrombozytenkonzentrationen von 200 *x* 10^9/L als Obergrenze genannt. Für andere Gerinnungsassays sollen sehr viel geringere Thrombozytenkonzentrationen von < 10 *x* 10^9/L erforderlich sein. Die Vereinheitlichung der Zentrifugationsbedingungen kann die Integration von Gerinnungsassays in den automatisierten Laborbetrieb ermöglichen.

Es wurde ein Zentrifugationsprotokoll für die Etablierung und Evaluierung von Gerinnungsassays in den automatisierten Laborbetrieb untersucht. Dafür wurden die Proben 5 Minuten lang bei 3280 *x* g und 19°C zentrifugiert. Danach erfolgten Messungen von Thrombozytenkonzentration, Quick, aPTT, F. VIII und Protein S. Die Proben wurden anschließend ein zweites Mal unter o.g. Bedingungen zentrifugiert und alle Messungen erneut durchgeführt. Die Zentrifugen waren in eine automatisierte Laborstraße integriert. Es erfolgten Vergleichsuntersuchungen der gemessenen Parameter.

Nach einmaliger Zentrifugation konnten in allen Proben Thrombozytenkonzentrationen < 200 *x* 10^9/L gemessen werden. Nach der zweiten Zentrifugation enthielten 73% der Proben < 10 *x* 10^9/L Thrombozyten. Die Ergebnisse der Passing Bablok Regression zeigten eine gute Vergleichbarkeit der Messergebnisse von Quick, aPTT und F. VIII nach erster und zweiter Zentrifugation. Der Vergleich der Protein S Messergebnisse zeigte eine schlechtere Übereinstimmung, wenn die Thrombozytenkonzentration über 40 *x* 10^9/L lag.

Die Integration von Gerinnungsassays in den automatisierten Laborbetrieb unter Verwendung von Zentrifugationsprotokollen mit hohen Zentrifugationsbeschleunigungen ist möglich. Eine einmalige Anwendung des Zentrifugationsprotokolls ist ausreichend für die Bearbeitung von Anforderungen für Quick, aPTT

und F. VIII. Für die Protein S Bestimmung ist eine zweite Zentrifugation erforderlich.

Die vorliegende Arbeit bildet die Grundlage zur Einführung der hier ausgeführten Zentrifugationsbedingungen, mit denen inzwischen an der Universitätsmedizin Greifswald rund um die Uhr gearbeitet wird.

I. Anhang

wissenschaftliche Arbeit:

Juliane Suchsland, Nele Friedrich, Anne Grotevendt, Anders Kallner, Jan Lüdemann, Matthias Nauck and Astrid Petersmann

Optimizing centrifugation of coagulation samples in laboratory automation

Clin Chem Lab Med 2014; 52(8): 1187–1191

DE GRUYTER DOI 10.1515/cclm-2014-0038 — Clin Chem Lab Med 2014; 52(8): 1187–1191

Juliane Suchsland, Nele Friedrich, Anne Grotevendt, Anders Kallner, Jan Lüdemann, Matthias Nauck and Astrid Petersmann*

Optimizing centrifugation of coagulation samples in laboratory automation

Abstract

Background: High acceleration centrifugation conditions are used in laboratory automation systems to reduce the turnaround time (TAT) of clinical chemistry samples, but not of coagulation samples. This often requires separate sample flows. The CLSI guideline and manufacturers recommendations for coagulation assays aim at reducing platelet counts. For measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) platelet counts (Plt) below 200×10^9/L are recommended. Other coagulation assays may require even lower platelet counts, e.g., less than 10×10^9/L. Unifying centrifugation conditions can facilitate the integration of coagulation samples in the overall workflow of a laboratory automation system.

Methods: We evaluated centrifugation conditions of coagulation samples by using high acceleration centrifugation conditions (5 min; 3280×*g*) in a single and two consecutive runs. Results of coagulation assays [PT, APTT, coagulation factor VIII (F. VIII) and protein S] and platelet counts were compared after the first and second centrifugation.

Results: Platelet counts below 200×10^9/L were obtained in all samples after the first centrifugation and less than 10×10^9/L was obtained in 73% of the samples after a second centrifugation. Passing-Bablok regression analyses showed an equal performance of PT, APTT and F. VIII after first and second centrifugation whereas protein S measurements require a second centrifugation.

Conclusions: Coagulation samples can be integrated into the workflow of a laboratory automation system using high acceleration centrifugation. A single centrifugation was sufficient for PT, APTT and F. VIII whereas two successive centrifugations appear to be sufficient for protein S activity.

Keywords: centrifugation; coagulation; laboratory automation system; pre-analytic phase; robotics; turnaround time; work flow.

***Corresponding author: Dr. med. Dipl. Biol. Astrid Petersmann,** Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Str., 17475 Greifswald, Germany, Phone: +49 3834 865670, E-mail: astrid.petersmann@uni-greifswald.de

Juliane Suchsland, Nele Friedrich, Anne Grotevendt, Jan Lüdemann and Matthias Nauck: Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany
Anders Kallner: Department of Clinical Chemistry, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

Introduction

Workflow improvement in highly automated clinical laboratories is of ongoing interest. Short centrifugation high acceleration conditions [1] can help to reduce the turnaround time (TAT) for clinical chemistry samples. Also increasing the number of standardized procedures across the complete analytical process and reducing hands-on time are important goals. Modern automated laboratory systems cover a considerable part of the pre- and post-analytical phase including sorting of samples, centrifugation, aliquoting and storage of samples. It is desirable to include coagulation samples into this automated workflow in order to avoid inefficient parallel workflows. Furthermore, one coagulation sample can hold test orders for urgent tests like activated partial thromboplastin time (APTT) or factor VIII in combination with other tests which are not as urgent as the former ones, e.g., protein S. Due to the tight pre-analytical requirements, special coagulation tests are linked to more urgent coagulation tests with the same or similar pre-analytical requirements.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) developed guidelines for treatment of specimens in clinical chemistry and hemostasis H21-A5 recommending the preparation of platelet poor plasma (PPP) which should contain a platelet (Plt) count of less than 10×10^9/L after centrifugation [2]. However, the guideline lacks defined centrifugation conditions. Manufacturer of coagulation assays recommend varying centrifugation conditions with respect to length (15–25 min) and acceleration (1500–5000×*g*).

In settings where a short TAT is needed PPP can be produced by increasing centrifugal acceleration. Nelson et al. compared routine and high-speed centrifugation using stand-alone centrifuges to establish short conditions and recommended these for patients in emergency

situations [3]. Recently, Sédille-Mostafaie et al. investigated the influence of laboratory automation on a wide variety of coagulation assays concluding that automated processing of the studied quantities is suitable using a centrifugation time of 7 min at 3000×*g* [4].

The 5-min centrifugation at 3280×*g* is the routine centrifugation conditions in our laboratory for clinical chemistry samples [1]. In the present study we evaluate the performance of our standard centrifugation procedure in four coagulation assays. Furthermore, the impact of automated laboratory systems, e.g., sample transport and automated aliquoting were investigated.

Materials and methods

Samples

Citrate plasma samples of routine patients (n=175) treated at the University Medicine Greifswald were included in this study. Sample tubes (Becton Dickinson; Heidelberg, Germany) 0.129 mol/L sodium citrate) were randomly chosen from routine workload. Exclusion criteria were defined as incorrect filling of sample tubes, clot formation, and hematocrit >0.4 or emergency requests. The samples were sent to the laboratory through a pneumatic tube system by Aerocom (Wildau, Germany) as described in [5] or delivered by couriers, each with approximately equal shares of sample numbers. Permission of the Local Ethics Committee of the University of Greifswald was obtained.

Testing procedure and sample flow

All Plt counts were performed by a Sysmex XE5000 (Sysmex; Norderstedt, Germany). Plt count in whole blood was measured in primary tubes before entering the automation system. The primary tubes were transported by the laboratory automation system 'FlexLab' (Inpeco; Turin, Italy) to the centrifuges (ROTANTA 460; Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen, Germany) and centrifuged for 5 min at 3280×*g* (T=19 °C). Platelets were counted in the supernatant plasma approximately 1.5 cm above the buffy coat in the primary tube. An aliquot was withdrawn by the automation system for further analysis. For the second centrifugation and a second aliquot the primary tube was resubmitted to this workflow. Platelet counts were measured in the primary tubes after each centrifugation and in both aliquot tubes before storing at –20 °C.

The BCS XP (Siemens Healthcare; Erlangen, Germany) was used for all coagulation assays of this study with reagents from Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (Marburg, Germany; PT: Innovin®; APTT: Actin® FS; F. VIII: Coagulation Factor VIII Deficient Plasma, Actin® FSL; protein S activity: Protein S Ac).

Measurements of prothrombin time (PT) and APTT were performed after each centrifugation in primary tubes. Analyses of coagulation factor VIII (F. VIII) and protein S were performed in aliquot tubes. Samples were thawed at 37 °C for 5 min prior to measurement.

Quality controls and coefficients of variation

Internal quality control was performed according to the German RiLi-BAEK [6]. Before each run two levels of internal quality controls were measured. A run was only accepted and results were used for this study if both quality controls passed the requirements of the RiLi-BAEK.

Statistics

Method comparison was assessed by EVAPAK (add-in program for MS-EXCEL by Roche Diagnostics; Basel, Switzerland). Regression and correlation analyses were performed using Passing-Bablok linear regression. Boxplots were created using SigmaPlot 12.0. The level of statistically significance was set at $p<0.05$.

Results

In total 125 patient samples presented a platelet count within reference interval (140–440×10^9/L), 38 patients showed Plt counts below 140×10^9/L (thrombocytopenia) and 12 patients above 440×10^9/L (thrombocytosis). Figure 1 displays Plt count distribution before centrifugation (whole blood) and after the first and second centrifugation (plasma). Plt counts after centrifugation were obtained from aliquot tubes. After the first centrifugation all samples showed a Plt count of less than 200×10^9/L. After the second centrifugation the Plt count was less than 30×10^9/L in all samples with 73% below 10×10^9/L in the aliquots.

The Plt were counted in the primary tubes and the aliquots after the first and second centrifugation. The count was statistically significantly higher in the aliquots than in the primary tube (Table 1).

Linear regression (Passing-Bablok) and correlation analyses were performed between results of PT, APTT, F. VIII and protein S after first and second centrifugation. Regression functions, coefficient of correlation and numbers of observations are given in Table 2.

Due to the limited amount of sample volume it was not possible to perform all measurements in all samples (Table 3).

There was no correlation of PT, APTT, and F. VIII to the platelet count after the first or second centrifugation. The poor correlation between the platelet count and plasma concentration of protein S decreased after the second centrifugation as indicated by the change in the coefficient of determination (r^2) 0.36 ($p<0.01$) after the first and 0.04 ($p=0.08$) after the second centrifugation, but only one of these observations showed a p-value below 0.05.

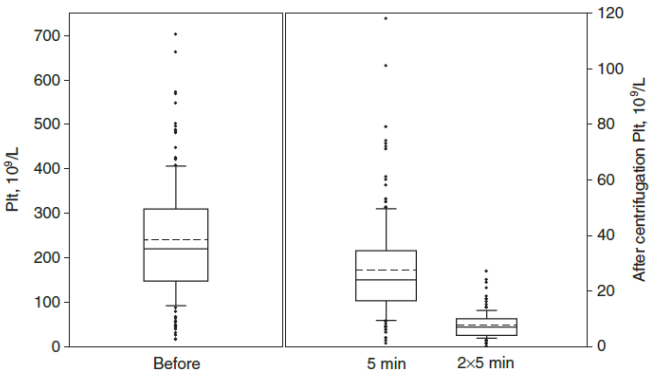

Figure 1 Distribution of platelet counts.
Left: Distribution of platelet counts (plt) in whole blood before (primary tubes). Right: distribution of platelet counts (plt) in whole blood after first (5 min) and second centrifugation (2×5 min) in citrate plasma (aliquot tubes). Note the different scales of the Y-axes. Dotted line: average; solid line: median.

Table 1 Median Plt counts after first (5 min) and second (2×5 min) centrifugation with minimum and maximum Plt counts in primary and aliquot tubes.

	5 min Plt, 10^9/L median (min–max)	2×5 min Plt, 10^9/L Median (min–max)
Primary tube	19 (1–117)	3 (0–23)
Aliquot tube	24 (1–118)	7 (0–27)

The results of measuring protein S were partitioned into groups of 8–21 results with respect to platelet counts. There was a significant correlation between the first and second results up to a platelet count of about 40×10^9/L. At higher Plt counts there was no correlation between the protein S concentrations.

Discussion

The CLSI guideline H21-A5 recommends Plt count below 200×10^9/L for PT and APTT measurements performed in fresh plasma [2]. This guideline also recommends Plt counts below 10×10^9/L for other coagulation tests citing two studies, one investigating lupus anticoagulants testing [7], using an APTT sensitive method and including five patient samples (spiked with varying numbers of platelets), the other investigating activated protein C resistance [8]. In our study a single high acceleration centrifugation reduced Plt counts to below 200×10^9/L in all investigated primary tubes and aliquots thereof. After the second high acceleration centrifugation Plt counts were reduced to below 30×10^9/L (Table 1).

The Plt counts of the aliquoted samples are higher than those found in the primary tubes which might indicate that the automatic transporting and/or the aliquoting processes have an influence on the platelet concentration. This difference is statistically significant (Table 1), but may not be of a clinical importance.

In addition to the Plt counts we compared the results of the measurements after the first and second centrifugation. This was estimated by Passing-Bablok regression analysis (Table 2). The proximity to equality indicates that for PT and APTT the single high acceleration centrifugation

Table 2 Passing-Bablok regression analysis of results after the first (5 min) and second (2×5 min) centrifugation.

Coagulation assay	Linear regression	r^2	n
PT	Y=1.000*X+2.000	0.987	171
APTT	Y=1.000*X+0.000	0.967	175
F. VIII	Y=0.947*X–2.526	0.966	82
Protein S	Y=0.951*X+11.309	0.792	67

Table 3 Number of samples (n) and Plt counts after the first (5 min) and second (2×5 min) centrifugation measured in aliquot tubes.

	5 min Plt, 10^9/L median (min–max)	2×5 min Plt, 10^9/L median (min–max)	n
PT	20 (2–117)	3 (0–23)	171
APTT	19 (1–117)	3 (0–23)	175
F. VIII	23 (3–79)	7 (2–15)	82
Protein S	22 (3–79)	7 (2–15)	67

is sufficient supporting the CLSI recommendation of Plt count of 200×10^9/L or less. These results are also in agreement with the observations of Lippi et al., Boudaoud et al. and Sultan on centrifugation of PT and APTT [9–11]. However, the decrease in Plt count after our first centrifugation was not of the same order of magnitude as that Sultan reported [11].

Passing-Bablok regression analysis of F. VIII also showed a close proximity to equality of the first and second centrifugation (Table 2) despite Plt counts of up to 80×10^9/L (Table 2) after the first centrifugation. This indicates that Plt counts of more than 10×10^9/L might be acceptable for this assay despite the recommendation by H21-A5.

For protein S Passing-Bablok regression analysis did not show a close proximity to equality (Table 2), indicating that substantial changes occur during the second centrifugation. The good correlation between the protein S results after the first and second centrifugation at low Plt counts is lost at higher Plt concentrations. The relatively low number of results in the partitions precluded a detailed delineation of the Plt. However, based on the correlation findings we conclude that protein S may be measured in plasma that contains more than 10×10^9/L but not more than about 40×10^9/L. More measurements in the partitions would be necessary to further underpin the choice of this limit. This Plt count would be achieved by two consecutive high acceleration centrifugations.

Limitations of the study

The present study only compared the centrifugation conditions that were defined in the study design and may deviate from the recommendations of the manufacturer. The number of samples is appropriate for the evaluation of the measurements of PT, APTT and F. VIII but is insufficient for a detailed partitioning of the protein S analysis.

Conclusions

The generally accepted quality indicator of centrifugation – the Plt count – was enhanced by comparing the results of the coagulation assays after successive centrifugations to verify the performance. Routine high acceleration centrifugation conditions used for clinical chemistry assays in laboratory automation can be applied to coagulation samples with test orders for PT, APTT and F. VIII. This allows integration of coagulation samples in the automated workflow for clinical chemistry samples. Applying these centrifugation conditions twice may be a way to also integrate coagulation samples with orders for protein S.

Acknowledgments: We wish to thank BD Diagnostics for sponsoring parts of the reagents used for this study. Besides this there is no other conflict of interest.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research sponsoring played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.
Research funding: None declared.
Employment or leadership: None declared.
Honorarium: None declared.

Received January 10, 2014; accepted March 5, 2014; previously published online April 2, 2014

References

1. Mensel B, Wenzel U, Roser M, Ludemann J, Nauck M. Considerably reduced centrifugation time without increased hemolysis: evaluation of the new BD Vacutainer SSTTMII Advance. Clin Chem 2007;53:794–5.
2. Adcock DM. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: approved guideline, 5th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
3. Nelson S, Pritt A, Marlar RA. Rapid preparation of plasma for 'Stat' coagulation testing. Arch Pathol Lab Med 1994;118:175–6.
4. Sedille-Mostafaie N, Engler H, Lutz S, Korte W. Advancing haemostasis automation – successful implementation of robotic centrifugation and sample processing in a tertiary service hospital. Clin Chem Lab Med 2013;51:1273–8.
5. Streichert T, Otto B, Schnabel C, Nordholt G, Haddad M, Maric M, et al. Determination of hemolysis thresholds by the use of data loggers in pneumatic tube systems. Clin Chem 2011;57:1390–7.
6. Bundesärztekammer BÄ. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen: BÄK Bundesärztekammer; 2013 Available

from: http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=1.120.121.1047.6009. Accessed 11 September, 2013.
7. Brien WF, Schaus MR, Cooper KE, O'Keefe BT, Inwood M. Lupus anticoagulant testing: effect of the platelet count on the activated partial thromboplastin time. Br J Biomed Sci 1993;50:114–6.
8. Tripodi A, Valsecchi C, Chantarangkul V, Battaglioli T, Mannucci PM. Standardization of activated protein C resistance testing: effect of residual platelets in frozen plasmas assessed by commercial and home-made methods. Br J Haematol 2003;120:825–8.
9. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Manzato F, Guidi GC. Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2007;18:525–8.
10. Boudaoud L, Divaret G, Marie P, Bezeaud A. Rapid centrifugation for routine coagulation testing. Ann Biol Clin (Paris) 2006;64:315–7.
11. Sultan A. Five-minute preparation of platelet-poor plasma for routine coagulation testing. East Mediterr Health J 2010;16:233–6.

II. Literaturverzeichnis

[1] Sedille-Mostafaie N, Engler H, Lutz S, Korte W. Advancing haemostasis automation - successful implementation of robotic centrifugation and sample processing in a tertiary service hospital. Clin Chem Lab Med 2012:1–6.

[2] Hoffmann GE. Concepts for the third generation of laboratory systems. Clin Chim Acta 1998;278(2):203–16.

[3] Hawker CD, Garr SB, Hamilton LT, Penrose JR, Ashwood ER, Weiss RL. Automated transport and sorting system in a large reference laboratory: part 1. Evaluation of needs and alternatives and development of a plan. Clin Chem 2002;48(10):1751–60.

[4] Guder WG. Diagnostic samples: From the patient to the laboratory the impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. 4th ed. Weinheim: Wiley-Blackwell; 2009. S.46.

[5] Mensel B, Wenzel U, Roser M, Ludemann J, Nauck M. Considerably reduced centrifugation time without increased hemolysis: evaluation of the new BD Vacutainer SSTTMII Advance. Clin Chem 2007;53(4):794–5.

[6] Bauer S, Teplitz C. Laboratory automation, Part 1. Total laboratory automation: a view of the 21st century. MLO Med Lab Obs 1995;27(7):22–5.

[7] Suchsland J, Winter T, Greiser A, Streichert T, Otto B, Mayerle J et al. Extending laboratory automation to the wards: effect of an innovative pneumatic tube system on diagnostic samples and transport time. Clin Chem Lab Med 2016. [Epub ahead of print]

[8] Dörner K, Deufel T. Klinische Chemie und Hämatologie: 69 Tabellen. 7th ed. Stuttgart: Thieme; 2009. S. 17-18.

[9] Thomas L (ed.). Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8th ed. Frankfurt/Main: Th-Books Verl.-Ges; 2012. S. 2276.

[10] Plebani M, Laposata M, Lundberg GD. The brain-to-brain loop concept for laboratory testing 40 years after its introduction. Am J Clin Pathol 2011;136(6):829–33.

[11] Young DS. Conveying the importance of the preanalytical phase. Clin Chem Lab Med 2003;41(7):884–7.

[12] Streichert T, Otto B, Schnabel C, Nordholt G, Haddad M, Maric M et al. Determination of Hemolysis Thresholds by the Use of Data Loggers in Pneumatic Tube Systems. Clin Chem 2011;57(10):1390–7.

[13] Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. Int J Lab Hematol 2009;31(4):462–7.

[14] Adcock DM. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: Approved guideline. 5th ed. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. S. 11.

[15] Boudaoud L, Divaret G, Marie P, Bezeaud A. Rapid centrifugation for routine coagulation testing. Ann Biol Clin (Paris) 2006;64(4):315–7.

[16] Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Manzato F, Guidi GC. Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2007;18(5):525–8.

[17] Sultan A. Five-minute preparation of platelet-poor plasma for routine coagulation testing. East Mediterr Health J 2010;16(2):233–6.

[18] Nelson S, Pritt A, Marlar RA. Rapid preparation of plasma for 'Stat' coagulation testing. Arch Pathol Lab Med 1994;118(2):175–6.

[19] Brien WF, Schaus MR, Cooper KE, O'Keefe BT, Inwood M. Lupus anticoagulant testing: effect of the platelet count on the activated partial thromboplastin time. Br J Biomed Sci 1993;50(2):114–6.

[20] Tripodi A, Valsecchi C, Chantarangkul V, Battaglioli T, Mannucci PM. Standardization of activated protein C resistance testing: effect of residual platelets in frozen plasmas assessed by commercial and home-made methods. Br J Haematol 2003;120(5):825–8.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Probenfluss nach Eintreffen der Probenröhrchen im Labor..... 9
Abbildung 2: Verteilungen der Thrombozytenkonzentrationen (Plt). 10
Abbildung 3: Ergebnisse der Passing Bablok Regression. 12
Abbildung 4: Korrelation Thrombozytenkonzentration (Plt) mit der ProteinS Aktivität. 13

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mediane der Thrombozytenkonzentrationen (Plt)..... 11

Tabelle 2: Probenanzahl (n) und Thrombozytenkonzentrationen nach der ersten (5 Minuten) und zweiten (2 x 5 Minuten) Zentrifugation gemessen in Aliquotröhrchen..... 11

V. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum Unterschrift

VI. Lebenslauf

VII. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Nauck für die Überlassung dieser Arbeit und die außerordentlich guten Arbeitsbedingungen, die mir zur Verfügung gestellt wurden.

Ich möchte außerdem Frau Dr. med. Astrid Petersmann für ihre Unterstützung und für ihren außergewöhnlich hohen persönlichen Einsatz danken.

Für die praktische Hilfe in der Laborphase danke ich Frau Bredlow, Frau Leschnikowski, Frau Ihrke und Frau Rudolf sowie allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrallabors.

Den Co-Autoren des Artikels, der dieser Arbeit zu Grunde liegt, danke ich für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Frau Sophia Lamp danke ich für die tatkräftige und geduldige Unterstützung bei der Fertigstellung und Einreichung des Artikels.