

© Bitte beachten Sie die Hinweise zu Copyright, Urheberrecht und Produkthaftung.

GTH Akademie
Highlights 2019
 Aktuelle Entwicklungen
 in der Hämostaseologie

Labordiagnostik

Bernd Pötzsch
 Universitätsklinikum Bonn

UNIVERSITÄT  **ukb** universitäts
 klinikum **bonn**

1

Urheberrecht, Copyright und Produkthaftung

Veranstalter und Herausgeber:
 GTH Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V.
 Geschäftsziele
 Hansaring 61
 53070 Köln / Germany
 Telefon +49 221 3612-516
 Telefax +49 221 3612-200
 mail@gth-online.org
 www.gth-online.org

Wissenschaftliche Leitung / Steering Committee:
 Prof. Dr. Andreas Tiede, Hannover
 Prof. Dr. Jari Beyen-Niederstorf, Dresden
 Prof. Dr. Andreas Greifzuher, Greifswald
 Prof. Dr. Ingrid Rabinger-Wies
 Prof. Dr. Barbara Zieger, Freiburg

© Dieses Dokument ist urheberrechtlich geschützt. Die Weitergabe der Inhalte, Texte, Grafiken, Zeichnungen, Tabellen, Bilder o. Ä. im Ganzen oder in Teilen ist grundsätzlich untersagt. Es dürfen keinerlei Kopien oder Abschriften – auch in digitaler Form – gefertigt werden. Ausnahmen bedürfen der schriftlichen Genehmigung der GTH.

Produkthaftung:
 Die Informationen der einzelnen Beiträge sind von den Autoren mit der beruflichen Sorgfalt extrahiert und auf der Grundlage des jeweils neuesten Standes der Wissenschaft entstanden. Die Autoren und der Veranstalter übernehmen keinerlei Haftung für etwaige Personen- oder Sachschäden, die durch den Rückgriff auf die wissenschaftlichen Beiträge entstanden sind.

GTH **Highlights 2019**
 Aktuelle Entwicklungen
 in der Hämostaseologie

2

Interessenskonflikte

Forschungsunterstützung durch Firmen (letzte 5 Jahre):
 keine

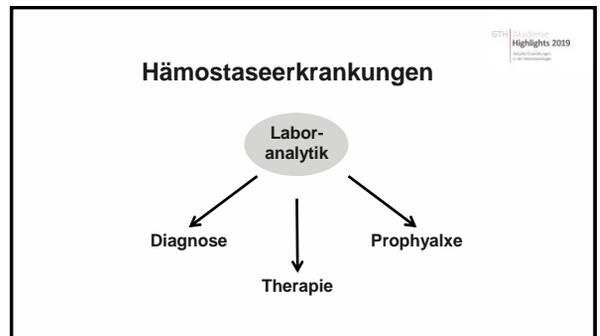
Honorare für Vorträge und Beratung (letzte 5 Jahre):
 keine

Unterstützung für Teilnahme an Kongressen und Fortbildungen (letzte 5 Jahre):
 keine

Sonstiges (letzte 5 Jahre):
 keine

GTH **Highlights 2019**
 Aktuelle Entwicklungen
 in der Hämostaseologie

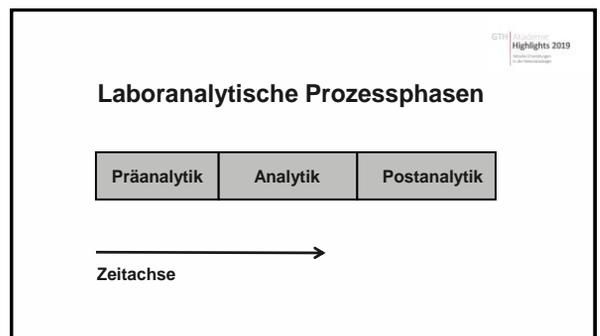
3

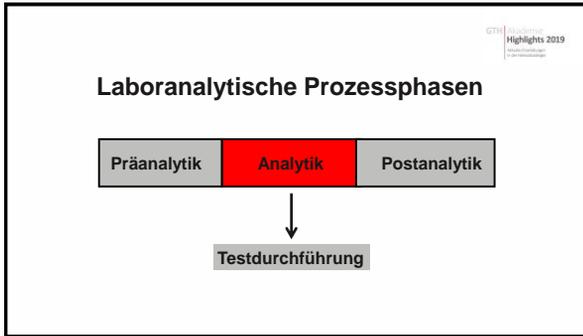


Laboranalytik

- Grundprinzipien
- Qualitätskriterien
- Möglichkeiten

GTH **Highlights 2019**
 Aktuelle Entwicklungen
 in der Hämostaseologie



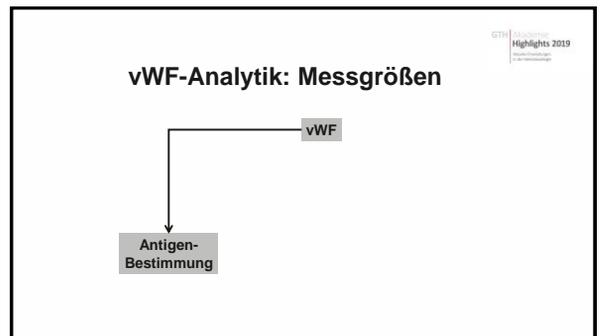
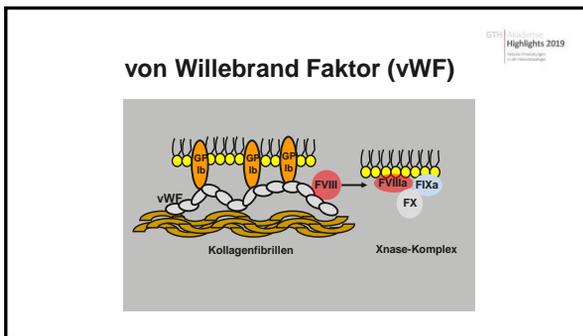
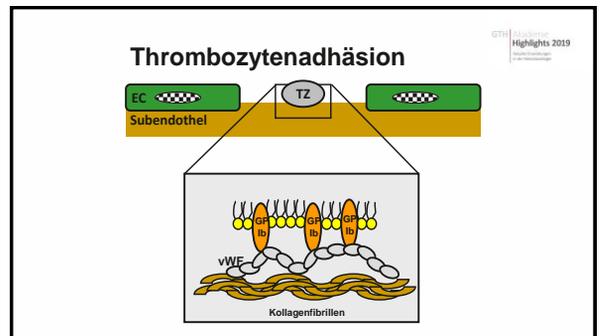
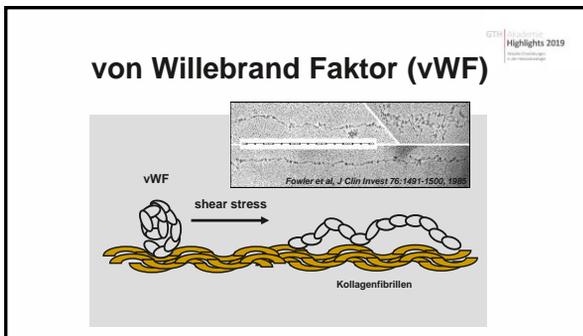


GTH Highlights 2019

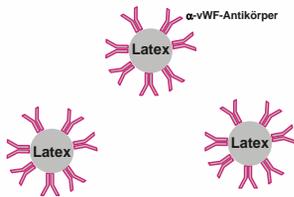
Laboranalytik: Nomenklatur (1)

Analyt = der zu messende Parameter

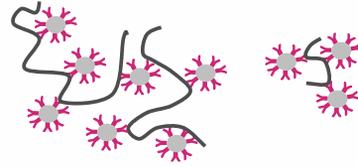
Messgröße = Eigenschaft des Analyten



vWF-Antigen-Bestimmung (1)



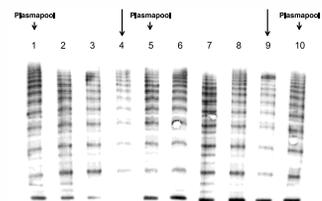
vWF-Antigen-Bestimmung (2)



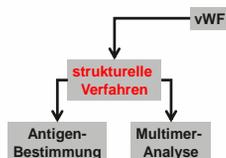
Analytische Spezifität

- Fähigkeit eines Testverfahrens nur den gesuchten Analyten zu erfassen.
- In einer komplexen Matrix (Plasma) wird die analytische Spezifität durch Verwendung von spezifischen Liganden (z. B. Antikörpern) erreicht.

vWF-Multimeranalyse

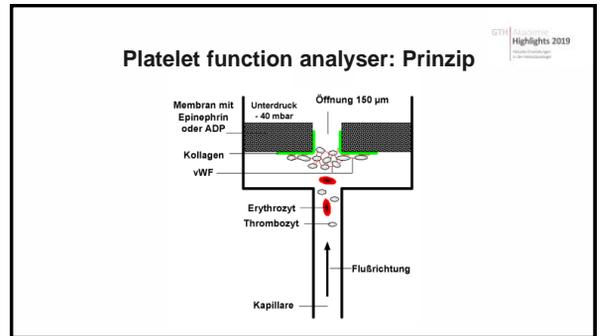
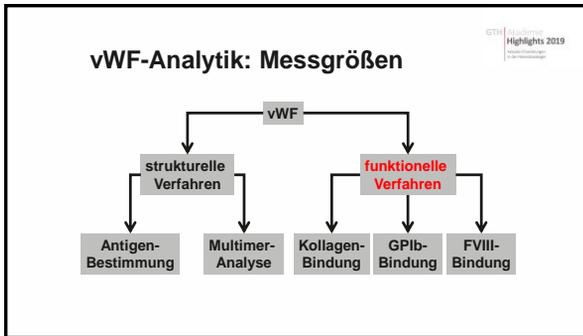
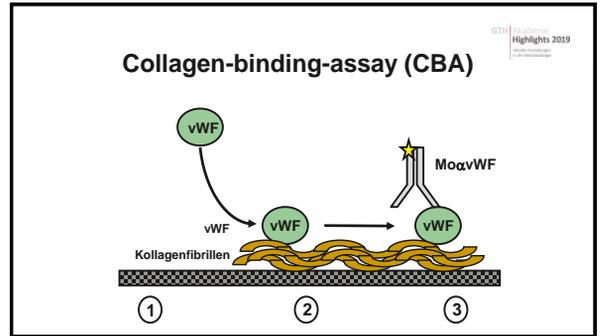
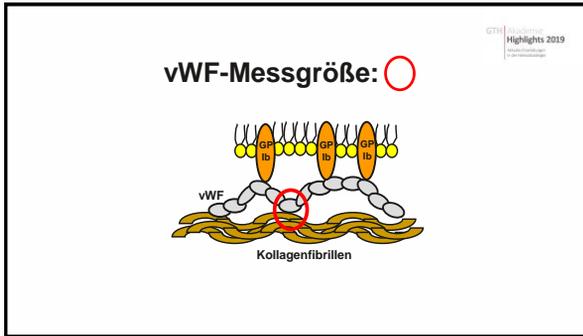


vWF-Analytik: Messgrößen



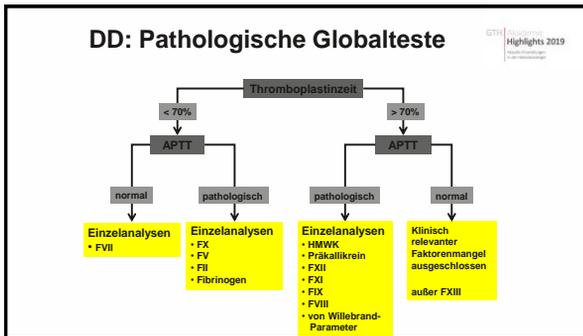
Strukturelle Testverfahren ...

- erfassen die molekulare Struktur und die Konzentration eines Analyten.
- werden nicht direkt durch die biologische Funktion eines Analyten beeinflusst.



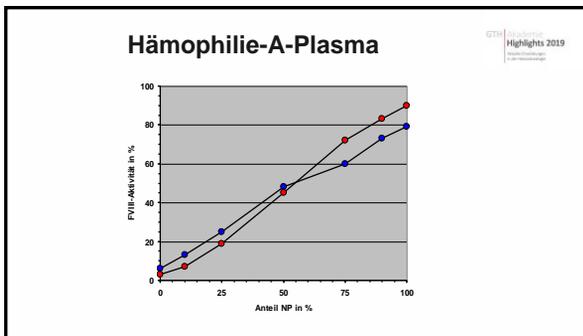
- ### PFA-Analytik
- Testmatrix: Vollblut
 - Das Messergebnis wird durch mehrere Analyte beeinflusst.
 - Eingeschränkte analytische Spezifität.
 - Die PFA-Analytik ist ein typischer Screeningtest.
- Highlights 2019

- ### Global-/Gruppenteste: Definition
- Das Testverfahren erfasst eine Gruppe von Analyten
- Thromboplastinzeit (Quick-Wert)
 - aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)
- Highlights 2019



Analytische Spezifität

- In einer komplexen Matrix (Plasma) wird die analytische Spezifität durch Verwendung von spezifischen Liganden (z. B. Antikörpern) erreicht.
- Selektive Standardisierung der Untersuchungsmatrix.

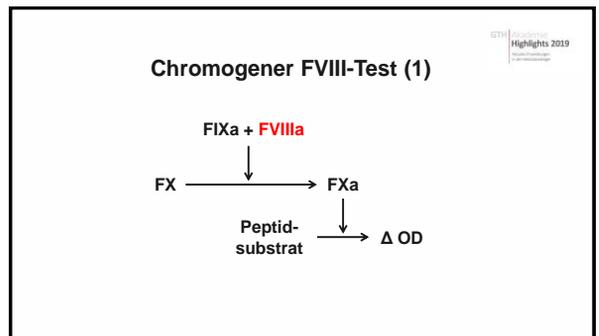


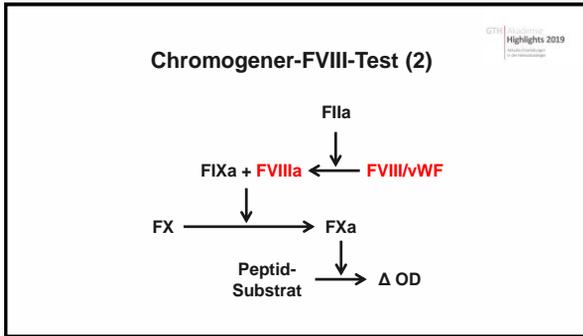
Mangelplasma

- Durch Mischen der Plasmaprobe mit einem Mangelplasma werden die Konzentrationen der Plasmafaktoren mit Ausnahme des Analyten normalisiert.
- Natürliche vs. immunadsorbierte Mangelplasmen

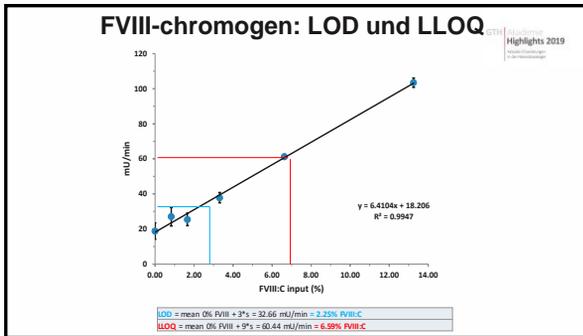
Analytische Spezifität

- In einer komplexen Matrix (Plasma) wird die analytische Spezifität durch Verwendung von spezifischen Liganden (z. B. Antikörpern) erreicht.
- Selektive Standardisierung der Untersuchungsmatrix.
- Minimierung der Untersuchungsmatrix.





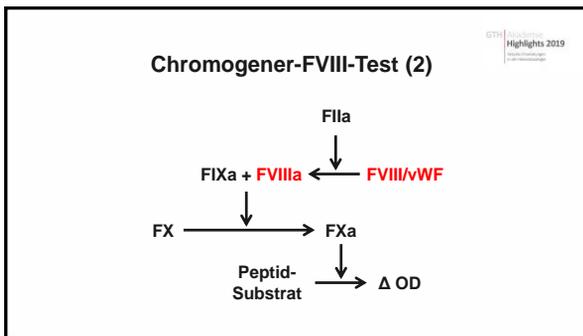
- ### Analytische Sensitivität
- Fähigkeit eines Testverfahrens den gesuchten Analyten zu quantifizieren.
 - Nachweisgrenze: Konzentration ab der das Vorhandensein eines Analyten nachgewiesen werden kann.
 - Bestimmungsgrenze: Konzentration ab der ein Analyt quantifiziert werden kann.



Analytische Sensitivität

	FVIII-OSC	FVIII-CSA
LOD	0,51%	2,25%
LLOQ	1,49%	6,59%

OSC: one stage clotting assay, CSA: chromogenic substrate assay
 LOD: limit of detection, LLOQ: lower limit of quantification



- ### Chromogener FVIII-Test: Vorteile
- bessere Standardisierbarkeit
 - höhere analytische Spezifität
 - höhere analytische Plastizität

Analytische Spezifität

GTH Highlights 2019

- In einer komplexen Matrix (Plasma) wird die analytische Spezifität durch Verwendung von spezifischen Liganden (z. B. Antikörpern) erreicht.
- **Gezielte Veränderung der Untersuchungsmatrix.**
- Minimierung der Untersuchungsmatrix.

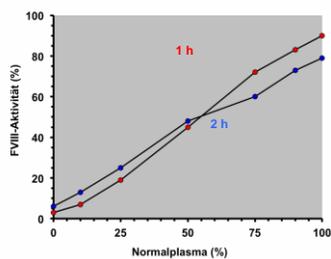
Plasmamischversuch

GTH Highlights 2019

- Dem Patientenplasma wird in steigenden Konzentrationen Normalplasma zugesetzt.
- Die Mischungsansätze werden bei 37° C für 1 und 2 h inkubiert.
- Bestimmung der Gerinnungsaktivität (Globaltest oder Einzelfaktoraktivität)

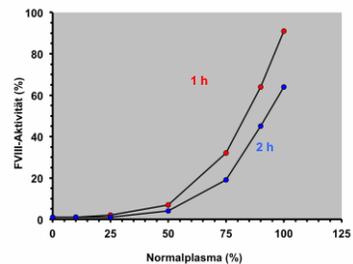
Inhibitor screen: Faktorenmangel

GTH Highlights 2019



Inhibitor kinetik

GTH Highlights 2019



Nijmegen-Bethesda-Assay

GTH Highlights 2019

- Methode zur funktionellen Quantifizierung einer Hemmkörper-Aktivität: Nijmegen-Bethesda-Units (NBU)
- 1 NBU reduziert die Faktorenaktivität in Normalplasma um 50%.
- Methode basiert auf dem Plasmamischversuch

Analytgruppen

GTH Highlights 2019

- thrombozytäres System
- prokoagulatorisches System
- **endogene Inhibitoren/Thrombophilie**
- intravasale Fibrinolyse
- drug monitoring

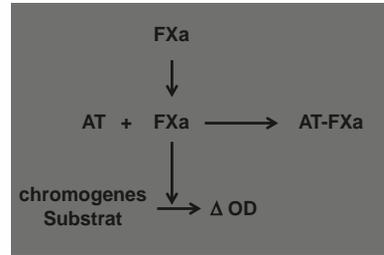
Funktionelle AT-Bestimmung

Exogener Enzyminhibitionstest

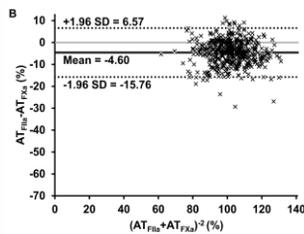
Prinzip:

Die Inaktivierungsrate von exogen zugegebenem aktiviertem Faktor X (FXa) oder Thrombin korreliert mit der AT-Aktivität.

Antithrombin-Aktivitätstestung

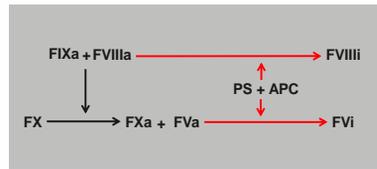


AT-FXa vs. FIIa-AT

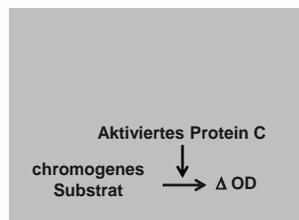


Rühl H et al. *Thromb Haemost* 2018; 118: 381-387

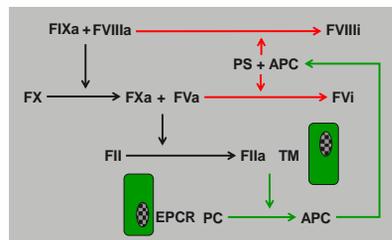
Aktiviertes Protein C (APC)

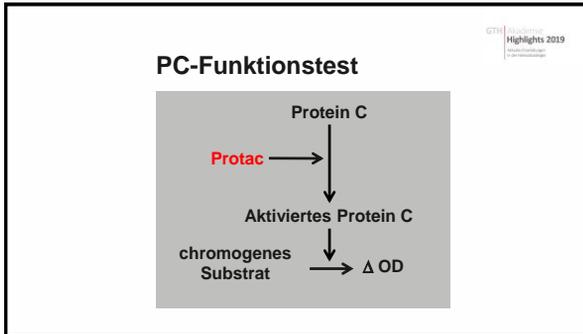


PC-Funktionstest



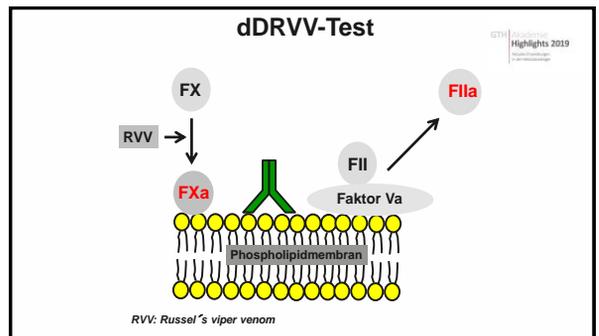
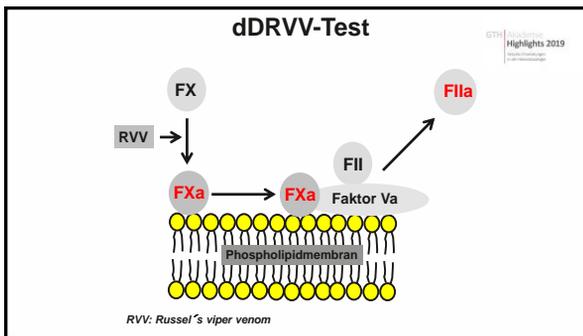
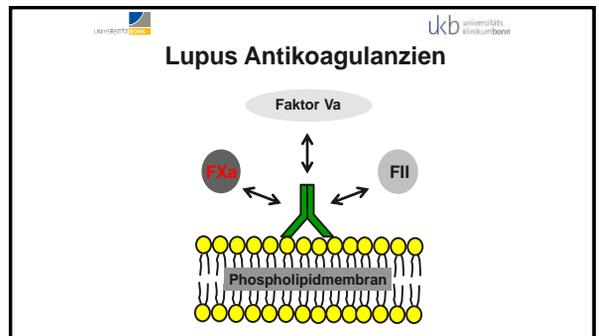
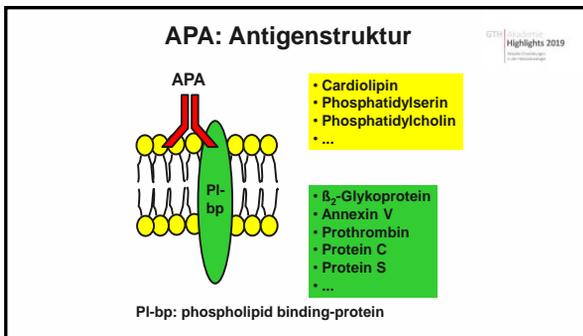
PC-Aktivierung





Lupus Antikoagulans (LA)

- LA verlängern Phospholipid-abhängige Gerinnungszeiten.
- In vivo besteht kein erhöhtes Blutungsrisiko.



LA-Testung: Einflussgrößen

- Endogener Mangel an Gerinnungsfaktoren z. B. VKA-Therapie.
- Behandlung mit direkten oralen Antikoagulanzen.
- Unterschiedliche Phospholipid-Konzentration durch variable Restthrombozytenzahlen.

In-vitro DOAC-“Elimination“

- Durch Zugabe von Aktivkohle soll das im Plasma vorhandene DOAC gebunden und anschließend durch Zentrifugation eliminiert werden.

Exner T, et al. Thromb Res 2018; 163: 117-122

DOAC adsorbtion

DOAC	w/o DOAC-Stop	with DOAC-Stop
Rivaroxaban	0,6	0
Rivaroxaban	1,15	0
Rivaroxaban	>1,17	0
Rivaroxaban	>1,17	0
Apixaban	1,03	0
Apixaban	0,81	0
Rivaroxaban	>1,17	0
Rivaroxaban	>1,17	0
Rivaroxaban	>1,17	0
Rivaroxaban	0	0

DOAC-Stop: dRVV-Ratio

DOAC	w/o DOAC-Stop	with DOAC-Stop
Rivaroxaban	1,3	1,4
Rivaroxaban	1,7	1,4
Rivaroxaban	2	1,1
Rivaroxaban	1,5	1,1
Apixaban	1,1	1,2
Apixaban	2,8	2,3
Rivaroxaban	2,1	1,1
Rivaroxaban	1,9	1,1
Rivaroxaban	2,1	1,2
Rivaroxaban	1,7	1,1

Referenzbereich: 0 – 1,2

DOAC-Stop: α - β 2-GP-IgG

DOAC	w/o DOAC-Stop	with DOAC-Stop
Rivaroxaban	0,8	0,4
Rivaroxaban	0,7	0,4
Rivaroxaban	1	0,3
Rivaroxaban	0,4	0,4
Apixaban	34	0,4
Apixaban	160,9	188,9
Rivaroxaban	1	0,6
Rivaroxaban	0,5	0,5
Rivaroxaban	0,8	0,5
Rivaroxaban	1	0,9

Referenzbereich: 0 – 20 G-E

In-vitro DOAC-“Elimination“

- Durch Zugabe von Aktivkohle wird das im Plasma vorhandene DOAC gebunden und anschließend durch Zentrifugation eliminiert werden.
- DOAC-Stop ermöglicht die in-vitro Elimination von DOAC.
- DOAC senkt die APA-Sensitivität.

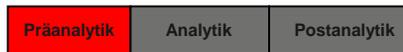
Antithrombotika-Screen

Laborparameter	Ergebnis bei klinisch relevanter Medikamentenwirkung				Referenzbereich
	LMWH/ Fondaparinux	DTI	VKA	Xabane	
APTT	< 35s	pathologisch	pathologisch	pathologisch	< 35s
INR	< 1,2	pathologisch	pathologisch	pathologisch	< 1,2
Fibrinogen	> 180	leicht erniedrigt	> 180	> 180	> 180
Thrombinzeit	< 21	pathologisch	normal	normal	< 21
Reptilasezeit	< 21	normal	normal	normal	< 21
anti-FXa-Einheiten	Reaktivität	keine Reaktivität	keine Reaktivität	Reaktivität	< 0,1
Thrombininhibitionstest	keine Reaktivität	Reaktivität	keine Reaktivität	normal	

Antithrombotika-Screen

Laborparameter	Ergebnis bei klinisch relevanter Medikamentenwirkung				Referenzbereich
	LMWH/ Fondaparinux	DTI	VKA	Xabane	
APTT	< 35s	pathologisch	pathologisch	pathologisch	< 35s
INR	< 1,2	pathologisch	pathologisch	pathologisch	< 1,2
Fibrinogen	> 180	leicht erniedrigt	> 180	> 180	> 180
Thrombinzeit	< 21	pathologisch	normal	normal	< 21
Reptilasezeit	< 21	normal	normal	normal	< 21
anti-FXa-Einheiten	> 0,5	keine Reaktivität	keine Reaktivität	> 0,5	< 0,1
Thrombininhibitionstest	keine Reaktivität	Reaktivität	keine Reaktivität	normal	

Prozessphasen



Zeitachse →

Präanalytik

- Indikationsstellung
- Parameterauswahl
- Probengewinnung
- Probenversand

Präanalytik

- Blutabnahme
- Antikoagulanzenwahl
- Probenversand

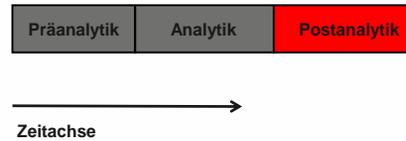
Fehlerquelle Blutabnahme

- Unterfüllung der Abnahmemonovette
- Heparinkontamination während der Blutabnahme
- Falsches Antikoagulans

PS-Diagnostik: „Pitfalls“

- PS ist lagerungsinstabil (max. 4 h bei RT)
- PS ist hormonabhängig: spezielle Referenzbereiche für Frauen (prä- und postmenopausal)
- Die Spezifität von funktionellen Testen wird durch die Faktor-V-Leiden-Mutation eingeschränkt.

Prozessphasen



Postanalytik

- Technische Freigabe
- Medizinische Befundung
- Befundübermittlung

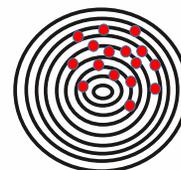
Qualitätskontrolle (1)

- Kontrollproben werden in jeder Messserie mitgeführt.
- Die Kontrollproben enthalten den Analyten in physiologischer und pathologischer Konzentration.

Qualitätskontrolle (2)

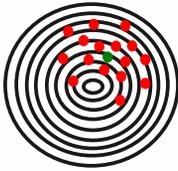
- Kontrollprobensystem
- Unpräzision
- Unrichtigkeit

Messwertverteilung



Qualitätskontrolle (3)

GTH Geplantes
Tageslabor
Highlights 2019
Das Qualitätsmanagement
im Labor

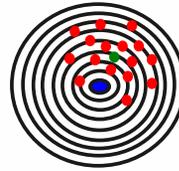


- Messwert
- Mittelwert der Messwerte

Unpräzision:
relative Abweichung der
Messwerte zum Mittelwert

Qualitätskontrolle (4)

GTH Geplantes
Tageslabor
Highlights 2019
Das Qualitätsmanagement
im Labor



- Messwert
- Mittelwert der Messwerte
- Zielwert

Unpräzision:
relative Abweichung der
Messwerte zum Mittelwert

Unrichtigkeit:
relative Abweichung zum
Zielwert

Postanalytik

GTH Geplantes
Tageslabor
Highlights 2019
Das Qualitätsmanagement
im Labor

- Technische Freigabe
- **Medizinische Befundung**
- Befundübermittlung

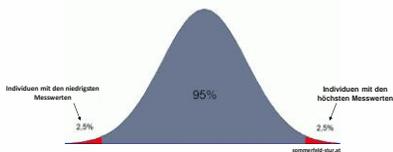
Befundinterpretation

GTH Geplantes
Tageslabor
Highlights 2019
Das Qualitätsmanagement
im Labor

- Lagebeurteilung zu einem Referenzbereich, einem Cut-off-Wert oder einer Entscheidungsgrenze.

Referenzintervall: Definition

GTH Geplantes
Tageslabor
Highlights 2019
Das Qualitätsmanagement
im Labor



Willkürliche Festlegung: 95% der gesunden Individuen einer Population sind "normal!"

Einflussgrößen ...

GTH Geplantes
Tageslabor
Highlights 2019
Das Qualitätsmanagement
im Labor

- beeinflussen die biologische Streuung eines Analyten.

Beispiele:

- Geschlecht
- Alter
- AB-Blutgruppenmerkmal

GTH Gerinnungsstörungen
Highlights 2019

vWF-Parameter: Referenzbereiche*

Parameter	Blutgruppen A/B	0
vWF-Ag:	68 – 165 %	54 – 136 %
vWF-GPIb:	62 – 170 %	42 – 122 %
CBA:	69 – 126 %	61 – 121 %

* IHT Uniklinikum Bonn 2019

- GTH Gerinnungsstörungen
Highlights 2019
- ### Entscheidungsgrenzen
- Entscheidungsgrenzen korrelieren eine klinische Symptomatik mit einem Messwert.
 - Entscheidungsgrenzen können nur an einem Kollektiv von erkrankten Personen ermittelt werden.
 - Entscheidungsgrenzen und Referenzgrenzen sind nicht deckungsgleich.

GTH Gerinnungsstörungen
Highlights 2019

Referenzwerte*

Proenzyme		
-	Faktor II:	70 - 120%
-	Faktor VII:	70 - 120%
-	Faktor IX:	70 - 120%
-	Faktor X:	70 - 120%
-	Faktor XI:	70 - 120%
-	Faktor XIII:	65 - 135%
Kofaktoren		
-	Faktor V:	70 - 120%
-	Faktor VIII:	70 - 120%
Substrat		
-	Fibrinogen:	150 - 450 mg/dl

* IHT 2019

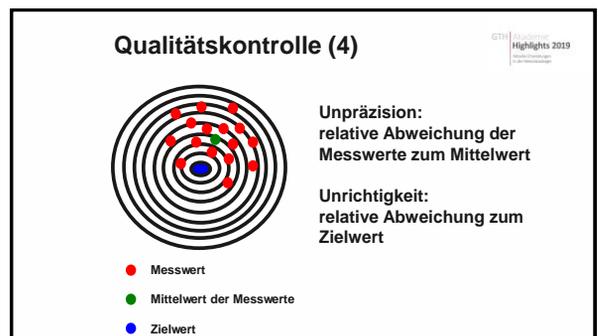
GTH Gerinnungsstörungen
Highlights 2019

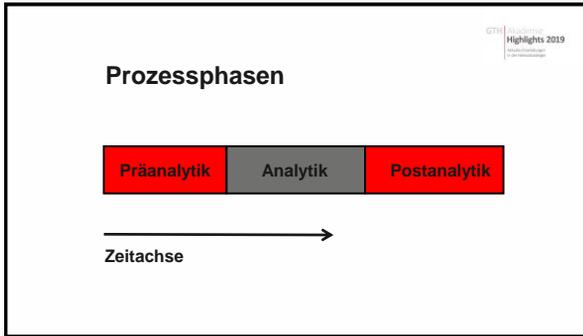
Relevante Konzentrationen*

Proenzyme		
-	Faktor II:	< 20%
-	Faktor VII:	< 20%
-	Faktor IX:	< 30%
-	Faktor X:	< 20%
-	Faktor XI:	< 20%
-	Faktor XIII:	< 40%
Kofaktoren		
-	Faktor V:	< 20%
-	Faktor VIII:	< 20%
Substrat		
-	Fibrinogen:	< 50 mg/dl

* gültig für hereditäre Gerinnungsstörungen

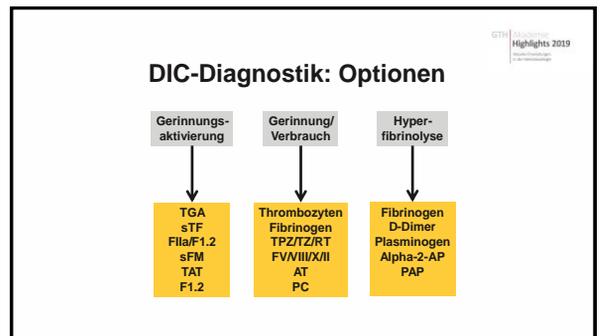
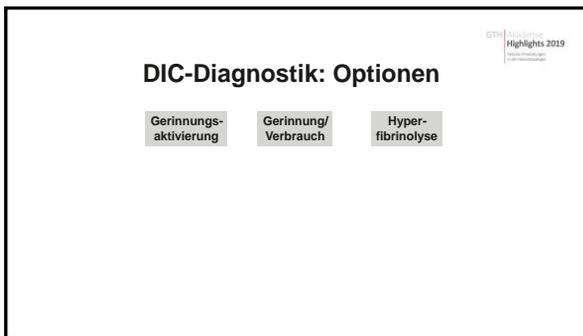
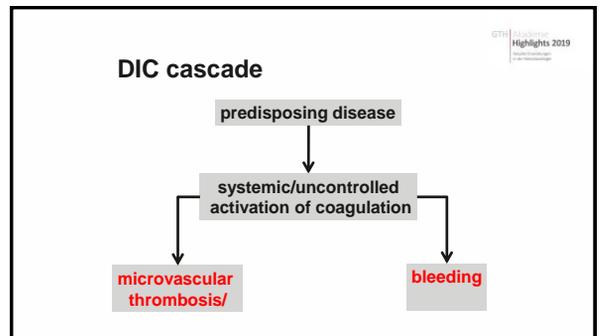
- GTH Gerinnungsstörungen
Highlights 2019
- ### Befundinterpretation
- Transversalbeurteilung
Lagebeurteilung zu einem Referenzbereich, einem Cut-off-Wert oder einer Entscheidungsgrenze.
 - Horizontalbeurteilung
Änderung der Laborwerte im zeitlichen Verlauf.





- ### Kriterien zur Parameterwahl
- Wertigkeit der Diagnostik bezogen auf:
- Diagnosestellung
 - Therapieführung
 - Prognose
 - Praktikabilität

- ### Disseminated intravascular coagulopathy
- erworbene komplexe Gerinnungsstörung
 - hohe Morbidität
 - erhöhtes Mortalitätsrisiko
 - Inzidenz¹: 20-30/100.000 pro Jahr
- ¹ Singh B et al. Chest 2013; 143:1235-1242



DIC: ISTH-Score

Parameter	0	1	2
Platelets (/µl)	> 100.000	< 100.000	< 50.000
Quick (%)	> 70	< 70	< 50
Fibrinogen (mg/dl)	> 100	< 100	
D-Dimer (µg/ml)	< 2	> 2	> 5

< 5 Punkte: DIC unwahrscheinlich
> 4 Punkte: DIC möglich, tägliche Wiederholung des Scores

Levi M, et al. Br J Haematol 2009; 145: 24-33

DIC-Diagnostik: Optionen

Kriterien zur Parameterwahl

Wertigkeit der Diagnostik bezogen auf:

- Diagnosestellung
- Therapieführung
- Prognose
- Praktikabilität

DIC-Profil: SwissLab-Befund

Beschreibung	Resultat	Einheit	Referenzbereich
Thrombozyten: Thr-Zahl (EDTA-BLut) (30)	-- 12	G/l	160 - 370
Gruppentests: Quick-Test (31)	-- 13	%	70 - 120
Thromboplastinzeit (32)		sdg	
INR (33)		sdg	
Gerinnungsfaktoren: Fibrinogen (34)	- 50	mg/dl	180 - 355
Faktor VIII (35)	- 250	%	75 - 250
Gerinnungshemmer: Antithrombin (AT BLut) (36)	- 12	%	85 - 120
Molekulare Aktivierungsmarker: D-Dimer-Fibrinolyseprodukt (37)	+ 5,80	mg/l	0 - 0,75
DIC-Score: DIC-Score	+ 7		< 5

DIC-Score: Bewertung

Highlight-Paper

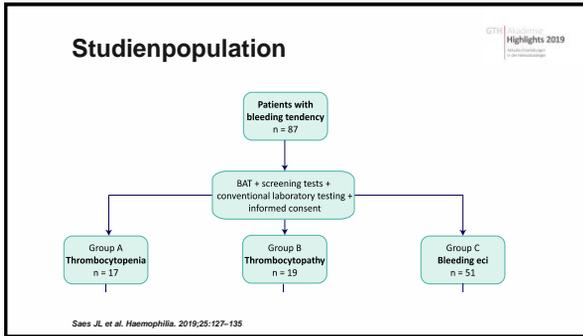
Received: 18 May 2018 | Revised: 26 October 2018 | Accepted: 27 October 2018
DOI: 10.1111/hae.13638

ORIGINAL ARTICLE
Genetics

WILEY Haemophilia

Whole exome sequencing in the diagnostic workup of patients with a bleeding diathesis

Joline L. Saes^{1,2} | Annet Simons³ | Sonja A. de Munnik³ | Marten R. Nijziel⁴ | Nicole M. A. Blijlevens¹ | Marjolijn C. Jongmans^{3,5,6} | Bert A. van der Reijden⁷ | Yolba Smit¹ | Paul P. Brons^{2,8} | Waander L. van Heerde² | Saskia E. M. Schols^{1,2}

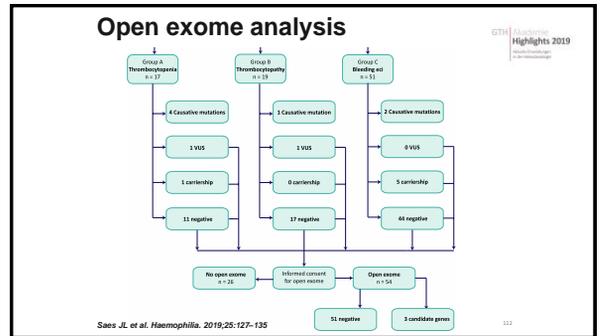
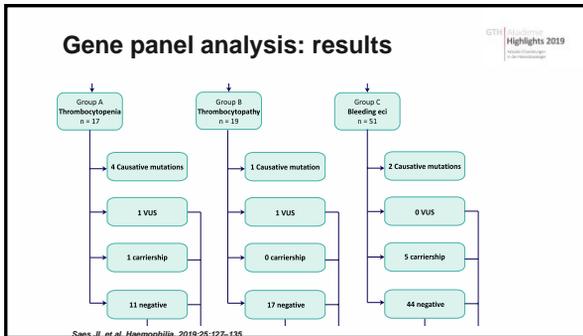


Gene panel analysis

TABLE 2 Reported variants detected by gene panel analysis using WES

Patient	Gene	Transcript	Variant ^a	Class	AF, gnomAD, %
1	MYH9	NM_002473.4	c.287C>T p.Ser94Leu	5 th 44	0
2	MYH9	NM_002473.4	c.3493C>T p.Arg1165Cys	5 th 44	0
3	SFN14	NM_001298201	c.657A>C p.Lys219Asn	5 th	0
4	GPIIb	NM_00174.3	c.182A>G p.Arg65Ser ^b	5 th 40	0.002
5	P2RX12	NM_022784.4	c.772C>A p.Pro257His ^b	5 th 44	0.0002
6	F7	NM_000314	c.3045C>T p.Ala1014Val	4 th 14	0.007
6	F13A1	NM_001029.3	c.949G>T p.Val317Phe	4 th	0.00041
7	F2	NM_000506.3	c.260A>G p.Tyr87Cys	5 th	0.00081
7	F8	NM_000122.3	c.2155G>T p.His713Asp	5 th 44	0
7	VWF	NM_000552.3	c.2561G>A p.Arg854Gln	5 th 46	0.34
8	GPIIB	NM_00188.6	c.521C>A p.Thr174Asn	3	0.012
9	VWF	NM_000552.3	c.495C>T p.Ser232Leu	3	0.0012
10	F10	NM_021692.2	c.323A>G p.Ala108Gln	4 th 100	0.20
11	GPIIb	NM_000122.3	c.2756A>G p.Val919	5 th 40	0
12	MPL	NM_005373.2	c.305G>C p.Arg201Pro	5 th	0.038
13	F2	NM_000506.3	c.260A>G p.Tyr87Cys	5 th	0.00081
14	F5	NM_000130.4	c.652AA>T p.Lys217Asp	5 th 42	0
15	F11	NM_000128.3	c.403G>T p.Cys35Stop	5 th 40	0.088

Saas JL et al. Haemophilia. 2019;25:127-135



Highlight-Paper: Interessante Befunde

Die Analyse des kodierenden Genoms ...

- erweitert die diagnostischen Möglichkeiten.
- ermöglicht den Nachweis neuer pathogenetischer Mechanismen.
- ist nicht ausreichend, um die molekularen Ursachen von hereditären hämorrhagischen Diathesen aufzuklären.

Saas JL et al. Haemophilia. 2019;25:127-135

Take home messages (1)

- Die Laboranalytik ist ein integraler Bestandteil der Diagnostik und Therapie von Hämostasestörungen.
- Die Leistungsfähigkeit der einzelnen Testverfahren ist an Kenngrößen ablesbar und muss in die medizinische Bewertung einbezogen werden.

Take home messages (2)

GTH | Akademie
Highlights 2019

- Das klinische Bild und die diagnostische Sensitivität und Spezifität sind für die Parameterauswahl entscheidende Kriterien.
- Die Präanalytik ist für die Prozessqualität entscheidend.
- Für die Interpretation der Laborbefunde ist die Kenntnis des klinischen Verlaufs unabdingbare Voraussetzung.

Herzlichen Dank
für Ihre Aufmerksamkeit.

GTH | Akademie
Highlights 2019

114

GTH | Akademie
Highlights 2019
Aktuelle Entwicklungen
in der Hämostaseologie

GTH Highlights 2020

Save the date: 08. – 09. Mai 2020

Besuchen Sie uns unter gth-online.org unter „Termine“