



Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V. Ständige Kommission Labor (STA EKOLA)

Protokoll der 4. Sitzung der Ständigen Kommission Labor

am 18.01.2020, 13.00 Uhr-14.15 Uhr im Raum Danzig, Congress Center, Bremen

Anwesenheit: Dr. Mohammed Alrifai (Gießen), Erika Aillaud* (Eschborn), Andrea Annawald (Mörfelden), Urban App* (Eschborn), Hans Ullrich Barthelmes (Kassel), Monika Esser* (Eschborn), Günther Kappert (Duisburg), Barbara Katzenberg (Schwerin), Norber Klier (Nürnberg), Dr. Michael Krause (Leipzig), Dr. Elisabeth Langer (Berlin), Petra Moosberger (Gießen), PD Dr. Jens Müller (Bonn), Isabell Pekrul (München), Prof. Dr. Ulrich Sachs (Marburg), Dr. Ute Scholz (Leipzig), Dr. Thomas Siegemund (Magdeburg), Hildegard Stoll (Frankfurt am Main), Michael Timme* (Marburg); *kennzeichnet Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Industrie.

Entschuldigt: Prof. Dr. Tamam Bakchoul (Tübingen), Dr. Frauke Bergmann (Hannover), PD Dr. Florian Prüller (Graz), Dirk Varnholt (Hannover).

Die Tagesordnung war vorab an alle Mitglieder versendet worden. Ergänzungen oder Änderungen zur Tagesordnung wurden nicht beantragt.

1. Begrüßung

Prof. Sachs begrüßt die Mitglieder der Ständigen Kommission und die anwesenden Gäste. Das Protokoll der 3. Sitzung wird ohne Gegenstimmung genehmigt.

2. Empfehlungen der STA EKOLA zu Emicizumab

Die gemeinsam von Jens Müller (Bonn) und Ute Scholz (Leipzig) erstellte Empfehlung der STA EKOLA zur Gerinnungsanalytik bei Patienten mit Emicizumab (siehe Anlage 1) wurde genehmigt.

3. Publikationen zu den Empfehlungen der STA EKOLA zu halbwegszeitverlängerten Gerinnungsfaktoren

Frau Scholz (Leipzig) berichtet, dass die Empfehlungen häufig nicht bekannt seien, nach einer Umfrage z. B. bei ca. einem Drittel der deutschen Hämophiliebehandler. Die STA EKOLA beabsichtigt, die Übersicht in einer wissenschaftlichen Zeitung zu veröffentlichen und richtet dazu eine Arbeitsgruppe (Siegemund, Prüller, Müller) ein, Koordination durch Jens Müller (Bonn). Frau Stoll (Frankfurt am Main) wird darüber hinaus eine Darstellung für das dvta-Journal verfassen. Herr Sachs (Marburg) wird Herrn Peetz (Berlin) noch einmal kontaktieren im Hinblick auf die mögliche Mitversendung mit Unterlagen von INSTAND e. V.

Aktion: Arbeitsgruppe Veröffentlichung: Müller (Bonn), Scholz (Leipzig). Dvta-Info: Stoll (Frankfurt am Main). INSTAND: Sachs (Marburg), Peetz (Berlin).

4. Projektgruppe Hemmkörperdiagnostik

Die Projektgruppe (Siegemund, Müller, Stoll, Königs) muss ein Positionspapier vorbereiten. Herr Siegemund (Magdeburg) erklärt sich zur Koordination bereit.

Aktion: Projektgruppe Hemmkörperdiagnostik: Siegemund (Magdeburg).

5. Projektgruppe ISO 15189

Ulrich Sachs (Marburg) stellt den aktuellen Stand der Checkliste vor. In der Diskussion ergeben sich zunächst keine inhaltlichen Änderungswünsche. Ergänzt werden sollte ein Punkt zur Probenmanipulation allgemein (z. B. Absorber für DOAC o. ä.); es wird beschlossen, die Liste zirkulieren zu lassen (siehe Anhang 2). Die Liste wird auch den Fachkollegen der DGKL e. V. zur Stellungnahme vorgelegt.

Aktion: Rückmeldung zur Liste (siehe Anhang). Kontakt DGKL durch U. Sachs.

6. Kompetenznetzwerk

Lediglich drei Labore haben sich für das Kompetenznetzwerk der Gerinnungslabore gemeldet: Universitätsklinikum Bonn (Jens Müller), Universitätsklinikum Gießen-Marburg (Ulrich Sachs), Zentrum für Blutgerinnungsstörungen Leipzig (Ute Scholz, Michael Krause). Alle aktiven Labore der STAEKOLA werden erinnert.

Aktion: gesonderte E-Mail an die Labor durch U. Sachs.

7. Referenzbereiche – Problemstellung im Alltag hämostaseologischer Labore

Jens Müller (Bonn) leitet ein mit einer Darstellung der hämostaseologischen Referenzbereiche in Bonn, die mit Umstellung der Analysensysteme angepasst werden mussten. Es werden verschiedene Aspekte diskutiert, insbesondere zu den Problembereichen Früh- und Neugeborene; Übernahme von Herstellerwerten und/oder Arzt und Umfang einer Eigenermittlung; Art und Umfang von Methodenvergleichen;

Aktion: Einsetzung einer Projektgruppe mit Müller (Bonn), Sachs (Gießen-Marburg), Krause (Leipzig), App* (Eschborn).

Protokoll: Prof. Dr. Ulrich Sachs

An alle Mitglieder, mit der Bitte um Prüfung und Änderung bis 17.03.2020

Mit einer Änderung an den Vorstand der GTH am 02.04.2020

2 Anlagen

Anlage 1

Empfehlung zur Messung der Plasmaspiegel von Emicizumab sowie zur Bestimmung der FVIII-Aktivität und des Nachweises von FVIII-Hemmkörpern unter Emicizumab

Struktur und Biochemie von Emicizumab

Hemlibra® (Emicizumab [Chugai / Roche Pharma AG]) ist ein humanisierter, monoklonaler, bi-spezifischer IgG4-Antikörper, welcher die Faktoren (F) IX(a) und X(a) bindet und somit die Kofaktor-Funktion des FVIIIa innerhalb des Tenase-Komplexes imitiert [1]. Hierbei ist eine Phospholipid-abhängige, korrekte Ausrichtung von FIXa bzw. FX Bedingung für die Emicizumab-vermittelte Aktivierung des FX. Im Gegensatz zu FVIIIa unterliegt Emicizumab keinen Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsmechanismen und bindet mit nur moderater Affinität und nicht-diskriminatorisch an die humanen (Pro)enzym-Varianten von FIX(a) bzw. FX(a) [1-3]. Diese Eigenschaften bedingen eine im Vergleich zu FVIIIa differierende funktionelle Kofaktor-Aktivität von Emicizumab, welche die nachfolgend beschriebenen Interferenzen mit aPTT-basierten Testsystemen zur Folge haben.

Pharmakokinetik und klinische Wirksamkeit von Emicizumab

Die pharmakokinetischen Eigenschaften wurden mittels nicht-kompartimenteller Analyse gesunder Teilnehmer und mittels einer populationspharmakokinetischen Analyse eines Datenstammes von 389 Patienten mit Hämophilie A ermittelt. Emicizumab zeigte nach der ersten Dosis bei Patienten mit Hämophilie A eine dosisproportionale Pharmakokinetik über einen Dosisbereich von 0,3 mg/kg bis 6 mg/kg. Das Alter hat keinen Einfluss auf die Pharmakokinetik bei Kindern und Jugendlichen oder bei älteren Patienten (< 65 Jahre). Die Wirksamkeit von Emicizumab bei der Routineprophylaxe wurde in 4 klinischen Studien bei Patienten mit Hämophilie A mit und ohne Hemmkörper gegen Faktor VIII untersucht (HAVEN 1-4). Zusammenfassend ist eine deutliche Reduktion der Blutungsereignisse bei Jugendlichen und Erwachsenen mit/ohne Hemmkörpernachweis gegeben [4-8].

Interferenz von Emicizumab mit etablierten Testsystemen

Wie einleitend beschrieben, bedarf Emicizumab im Gegensatz zu FVIII keiner Aktivierung und unterliegt auch keiner Regulation. Insbesondere die erstgenannte Charakteristik führt dazu, dass FVIII-abhängige, koagulometrische Testverfahren, welche für den quantitativen Nachweis der Aktivität von plasmatischen Gerinnungsfaktoren konfiguriert wurden, in der Anwesenheit von Emicizumab verkürzte Gerinnungszeiten außerhalb des dynamischen Bereichs dieser Systeme aufweisen. Somit findet sich bzgl. plasmabasierter Testsysteme ein signifikanter, artifizieller Einfluss von Emicizumab auf die aPTT sowie alle aPTT-basierten Verfahren wie z. B. Einstufen-Tests zur Einzelfaktorenbestimmungen. Im Gegensatz hierzu bewegt sich Emicizumab in therapeutischen Konzentrationen durchaus im dynamischen Bereich chromogener FVIII-Messverfahren, welche auf humanen Faktoren IXa bzw. X basieren. Hierbei ist jedoch zwingend zu beachten, dass etwaig erhobene „FVIII-Aktivitäten“ keinesfalls auf vermeintliche FVIII-äquivalente Wirkungen von Emicizumab zu übertragen sind, sondern lediglich aus entsprechender Kalibration (fälschlicherweise) abgeleitet werden. Ein anderes Bild ergibt sich unter der Verwendung von auf bovinen Faktoren basierenden chromogenen FVIII-Testsystemen, welche nicht in der Lage sind, Emicizumab zu detektieren, da dieses lediglich an humane Faktoren zu binden vermag [9,10].

Bestimmung der Plasmaspiegel von Emicizumab

Um eine Bestimmung der Emicizumab-Plasmaspiegel mittels etablierter koagulometrischer Messsysteme zu ermöglichen, wurde ein modifizierter FVIII-Einstufen-Test entwickelt. Im Vergleich zur Bestimmung der FVIII-Aktivität erfolgt hierbei eine höhere Vorverdünnung der Plasmaprobe, um der unmittelbaren Aktivität von Emicizumab Rechnung zu tragen. Unter Verwendung entsprechender Kalibratoren ist es somit möglich, die Konzentration bzw. Aktivität von Emicizumab in einem Bereich von 10 bis 100 µg/ml zu bestimmen, was den therapeutischen Erwartungsbereich von ca. 40 bis 70 µg/ml adäquat abdeckt [4,5]. Die zur Durchführung benötigten Kalibratoren und Kontrollen werden von der Firma r² Diagnostics hergestellt und können über deren Distributoren (etwa Haemochrom) bezogen werden. Es ist zu beachten, dass trotz der höheren Vorverdünnung der Probe zusätzlich vorhandener FVIII das Messergebnis konzentrationsabhängig verfälschen kann. Sollte eine Bestimmung des Plasmaspiegels von Emicizumab in Anwesenheit von FVIII notwendig sein, könnte somit eine vorherige Hitzeinaktivierung der Plasmaprobe in Betracht gezogen werden [9,10]. Unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Emicizumab-Kalibratoren und Kontrollen erscheint eine quantitative Bestimmung von Emicizumab ebenfalls mittels auf humanen Faktoren basierenden chromogenen FVIII-Testverfahren möglich [11]. Hierbei sollte jedoch der verfälschende Einfluss von FVIII in der Probe besonders berücksichtigt werden.

Messung der FVIII-Aktivität in Anwesenheit von Emicizumab

Wie vorstehend beschrieben, interferiert Emicizumab nicht mit chromogenen FVIII-Messverfahren, wenn sie auf bovinen Faktoren basieren. Somit kann die Aktivität von zusätzlich appliziertem oder endogenem FVIII störungsfrei mittels solcher Testsysteme ermittelt werden, auch wenn der Patient Emicizumab erhalten hat [9,10].

Nachweis von FVIII-Hemmkörpern in Anwesenheit von Emicizumab

Aufgrund der artifiziellen Verkürzung der Gerinnungszeiten von für die Bestimmung der FVIII-Aktivität ausgelegten, aPTT-basierten Einstufen-Tests können diese nicht im Rahmen der Durchführung von Bethesda-Assays zum Nachweis von FVIII-Hemmkörpern in Plasmaproben von Patienten unter Therapie mit (hitzeresistentem!) Emicizumab eingesetzt werden. Auch in diesem Fall muss zur Bestimmung der FVIII-Restaktivitäten ein auf bovinen Faktoren basierendes, chromogenes FVIII-Testverfahren eingesetzt werden [9,10].

Literatur

- 1) Sampei et al. PLoS One. 2013;8: e57479.
- 2) Kitazawa et al. Nat Med. 2012; 18: 1570-4.
- 3) Lenting et al. Blood. 2017; 130:2463-2468.
- 4) Oldenburg et al. N Engl J Med. 2017; 377: 809-818.
- 5) Mahlangu et al. N Engl J Med. 2018; 379: 811-822.
- 6) Pipe et al. Lancet Haematol. 2019; 6: e295-e305.
- 7) Young et al. Blood. 2019; 134: 2127-2138.
- 8) Fachinformation Hemlibra®April 2019
- 9) Adamkewicz et al. Thromb Haemost. 2019; 119: 1084-1093.
- 10) Müller et al. Thromb Haemost. 2019; 119: 1384-1393.
- 11) Amiral und Seghatchian. Transfus Apher Sci. 2018; 57: 363-369.

Zusammenfassende Übersicht

	FVIII-Einstufentest	Modifizierter FVIII-Einstufentest	Humaner chromogener FVIII-Assay	Boviner chromogener FVIII-Assay
Sensitivität für Emicizumab	überempfindlich	sensitiv	sensitiv	nicht sensitiv
Sensitivität für FVIII	sensitiv	schwach sensitiv	sensitiv	sensitiv
Konzentration Emicizumab	X	✓	(✓)	X
FVIII-Aktivität unabhängig von Emicizumab	X	X	X	✓
(Nijmegen)-Bethesda-Assay	X	X	X	✓

Anlage 2

Checkliste Hämostaseologie

Stand: 13.02.2020

ISO 15189			
4.13	Qualitäts- und technische Aufzeichnungen		
	Sind die Aufzeichnungen in Bezug auf individuelle Untersuchungsreihen sowie Testbedingungen spezifisch hinsichtlich: Menge, Konzentration, Spezifität, Qualität der eingesetzten Reagenzien?		
	Sind die Chargennummer aller kritischen Reagenzien (Stimulator, Enzym, usw.) in den Untersuchungsprotokollen enthalten?		
	Werden die Untersuchungsprotokolle ausreichend gekennzeichnet und personalisiert?		
5.1	Personal		
	Werden alle Mitarbeiter nachweislich in die hämostaseologischen Methoden eingearbeitet?		
	Finden nachweisbar und geplant interne und externe Fortbildungen zu relevanten hämostaseologischen Themen statt?		
	Wird das Personal auf Farbunterscheidungsfähigkeit (Rot/Grün) untersucht?		
	Wird, soweit entsprechende Techniken (z. B. Mikroskopie) Anwendung finden, ein regelmäßiges Konsenstraining durchgeführt und dokumentiert?		
5.3	Laboratoriumsausrüstung		
	Werden relevante physikalische Größen, insbesondere Temperaturen, durchgehend überprüft und rückgeführt, einschließlich Inkubatoren, Wasserbäder, Heiztischen, Trockenschränken usw.?		
	Wird die Funktion aller Geräte anwendungstäglich überprüft und diese Funktionsprüfung auch dokumentiert – z. B. Durchflusszytometer, Aggregometer, usw.		
	Wird bei Vorhandensein mehrerer Geräte zur Erstellung gleicher Analyte in der Verantwortung des Labors ein regelmäßiger Abgleich durchgeführt? Sind Toleranzgrenzen definiert? Sind Maßnahmen definiert, wenn diese überschritten werden?		
	Sind POCT Geräte vorhanden und, falls ja, in diesen Abgleich eingebunden?		
	Wird im Labor bei quantitativer		

	Hochdurchsatzanalytik der gleitende Mittelwert (<i>Bull</i> -Algorithmus) der Analyte berechnet, um einen Gerätedrift rechtzeitig zu erkennen?		
5.4	Präanalytische Maßnahmen		
	Werden dem Kunden gesonderte präanalytische Maßnahmen für die Entnahme und den Transport für spezifische Gerinnungsuntersuchungen erläutert (z. B. Fristen für APTT unter i.v. Heparin; z. B. Fristen für Thrombozytenfunktionsprüfungen; z. B. Ausschluss von Rohrpostsystemen für bestimmte Analyte).		
	Werden dem Kunden relevante, kritische Störgrößen für einzelne hämostaseologische Untersuchungen angezeigt (z. B. DOAC auf DRVVT o. ä.)?		
	Kann der Einsender gesonderte klinische Angaben, insbesondere auch zur Einnahme von Antikoagulantien oder Antiaggregantien, auf dem Anforderungsbogen bzw. elektronisch machen?		
	Wie prüft das Labor das Einverständnis des Patienten nach dem Gentechnikgesetz vor Durchführung genetischer Analytik?		
	Hat das Labor den Einfluss verschiedener Transportwege (Postversand, Rohrpostanlage) auf die relevanten Analyte untersucht?		
	Stellt das Labor regelmäßig sicher, dass der Transport zum Labor ordnungsgemäß erfolgt?		
	Werden alle Proben bei Laboreingang auf ihren Zustand hin untersucht (Gerinnsel, Lipidämie, Hämolyse, Ikterus)?		
	Ist gewährleistet, dass Abweichungen beim Probeneingang auch bei der Untersuchung und Befund berücksichtigt werden (z. B. Kennzeichnung von Proben aus dem Versand oder aus dem Rohrposttransport)?		
	Können Abnahmezeiten bei der Einsendung vom Kunden dokumentiert werden?		
	Sind die Zentrifugationsbedingungen definiert, entsprechen sie den Herstellervorgaben oder den Ergebnissen interner Validierung, und sind gesonderte Vorgaben für das Einfrieren von Citratblutproben/für die funktionelle Lupusanalytik vorhanden?		
	Wenn zentrifugierte Proben/eingefrorenes Material zur Analytik akzeptiert werden, wie stellt das Labor die sachgerechte Probenvorbereitung durch den Einsender sicher?		

	Ist die Identifikation einer Probe durchgehend, auch bei manuellen Untersuchungen und Spezialtesten (z. B. bei Thrombozytenfunktionsprüfungen) gewährleistet?		
5.5	Untersuchungsverfahren		
	Sind alle eingesetzten Verfahren, auch <i>in house</i> -Verfahren, nach allgemein anerkannten Kriterien auf ihre Verwendungsfähigkeit hin geprüft worden (Verifizierung oder Validierung) bevor sie eingesetzt wurden?		
	Wir die Annahme, Wareneingangsprüfung und Haltbarkeit aller Reagenzien, Kalibratoren und internen Kontrollen, einschließlich selbst hergestellter Reagenzien und Kontrollen, vor/nach Anbruch dokumentiert und eingehalten?		
	Gibt es gesonderte Vorschriften zur Handhabung von Proben mit hohem Hämatokrit?		
	Sind Verfahren zur Identifikation angeronnener Proben etabliert (z. B. Spateltest)?		
	Sind Ober- und Untergrenzen für den Messbereich der automatisierten, der manuellen und der <i>in house</i> -Verfahren festgelegt?		
	Sind Verdünnungsvorschriften und Zeitgrenzen für die Messung verdünnter Proben vorhanden?		
	Sind Grenzwerte für kurzfristige Wiederholungsmessungen festgelegt?		
	Sind Vorschriften für den Umgang mit Proben erstellt, die in optischen Messverfahren keine verwertbaren Resultate liefern (z. B. Kugelkoaguometrie, ROTEM o. a.)?		
	Sind Vorschriften für die weitere Lagerung von Proben zur späteren Bearbeitung im Labor oder zum Versand an ein Fremdlabor vorhanden und entsprechen diese den Kriterien der Folgeuntersuchung bzw. den Vorschriften des Fremdlabors (z. B. Multimeranalytik)?		
	Sind Referenzbereiche bzw. Entscheidungswerte für alle angebotenen Analyte festgelegt? Wurden diese am eigenen Patientenkollektiv ermittelt oder ist bei Übernahme von anderen Quellen die Übertragbarkeit auf das eigene Kollektiv sichergestellt worden?		
	Besonderheiten mikroskopischer Verfahren		
	Wird die gewünschte Reaktivität der Färbungen am Tag ihrer Verwendung durch Kontrollmaterial geprüft?		
	Ist eine Präparatesammlung zu Schulungszwecken vorhanden?		
	Besonderheiten funktioneller Verfahren		

	Besonderheiten gendiagnostischer Verfahren		
	vgl. Checkliste		
	Besonderheiten in der Durchflusszytometrie		
	vgl. Checkliste Immunologie, Abschnitte 5.5.1 und 5.5.2 (Immunphänotypisierung)		
	Besonderheiten bei der Multimeranalyse		
5.6	Sicherung der Qualität der Untersuchungsverfahren		
	Werden an jedem Tag der Analyse und bei jedem Chargenwechsel für alle Tests bekannte Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt?		
	Werden alle Reagenzien an jedem Tag der Verwendung auf ihre beabsichtigte Reaktivität geprüft?		
	Wird bei sequenzieller Abarbeitung am Ende des Durchlaufs eine erneute Positivkontrolle mitgeführt?		
	Werden für alle vom Labor berichteten Messgrößen Ringversuche (oder Laborvergleiche) durchgeführt?		
	Wird bei Laborvergleichen sichergestellt, dass die Akzeptanzkriterien vor der Analyse festgelegt und bei der Bewertung des Vergleichs berücksichtigt werden?		
	Erfolgt eine systematische Protokollierung schwieriger, lehrreicher oder außergewöhnlicher Fälle?		
5.7	Postanalytische Maßnahmen		
	Werden Ergebnisse der Gerinnungsanalytik einer Plausibilitätskontrolle unterzogen (z.B. Abgleich APTT und Thrombinzeit, z. B. Abgleich Fibrinogen und TPZ)?		
	Wird ein regelhafter Vergleich mit Vorwerten durchgeführt, um Verwechslungen oder Fehlbestimmungen aufzudecken?		
	Gibt es ein etabliertes System, um die Herausgabe falscher Messergebnisse (z. B. Heparinüberdosierung, z. B. Blutentnahme unter DOAC) zu verhindern?		
	Existiert ein Manual für das Labor, aus dem der Einfluss häufig verwendeter Antiaggregantien auf die Gerinnungsanalytik erkennbar ist?		
	Werden bearbeitete Proben so aufbewahrt, dass eine Nachtestung möglich ist?		
	Gibt es Regelungen zum Umgang mit dem Patientenwillen bei gendiagnostischen Proben (z. B. Rücknahme einer Zustimmung)?		
	Ist ein Verfahren zur sicheren Anonymisierung von Patientenmaterial zur weiteren		

	Verwendung (z. B. für interne Kontrollzwecke) etabliert?		
5.8	Befunde		
	Ist in den Befunden ein Referenzbereich je nach Alter des Patienten oder nach Entnahmezzeitpunkt der Probe angegeben und erfolgt eine klinische Interpretation?		
	Werden Messerergebnisse verschiedener Analyte im Befund in Beziehung gesetzt (z. B. immunologisches und funktionelles Fibrinogen; F VIII:c Aktivität und Mutation; Verschlusszeit im PFA-100 und Ergebnis der Aggregometrie)?		
	Wird die Vorgeschichte des Patienten im ärztlichen Befundbericht auf Wunsch des Einsenders berücksichtigt?		
	Werden Fremdbefunde, die in Kumulativbefunde eingebunden werden (z. B. Spezialuntersuchungen, genetische Untersuchungen) deutlich als Fremdbefunde gekennzeichnet?		
	Ist sichergestellt, dass therapeutische Empfehlungen (z. B. zu Heparinen oder VKA) ausschließlich durch Ärzte erteilt werden?		