

Laboruntersuchungen der Hämostase

Dr. Előd László PhD
Péterfy Krankenhaus, Budapest

Definition der Hämostase

- Die Hämostase ist ein lebenswichtiger Prozess, dessen ***Gleichgewicht*** sichert, dass
 - bei Verletzungen der Blutgefäße entstehende Blutungen zum Stehen kommen (durch *begrenzte* Aktivierung) und andererseits
 - innerhalb des intakten Gefäß-Systems keine Gerinnung (Thrombose) zustande kommt.

Prozessorientierte Auffassung der Hämostase

- **Eingabe (input)**
 - zelluläre, humorale Komponente
- **Verarbeitung (process)**
 - Wechselwirkungen der Komponenten
(Biochemie, Physiologie, Pathophysiologie)
- **Ausgabe (output)**
 - klinische (anamnestische und aktuelle)
Symptome (Innere Medizin, Kinderheilkunde
usw.)

Schritte des hämostatischen Prozesses I. Eingabe (input)

Funktionelle, zelluläre und humorale Komponenten, die an dem „process“ teilnehmen, und deren quantitative und qualitative Abnormalität die Ausgabe (output) beeinflusst.

Schritte des hämostatischen Prozesses II. Verarbeitung (process)

- Gerinnungsbildung

- Zelluläre (vaskuläre- thrombozytäre /primäre/) Phase

- Plasmatische /sekundäre/ Phase, die eigentliche Gerinnung

- Gerinnungsaflösung

- Fibrinolyse

Die einzelnen Phasen stehen in enger Wechselwirkung miteinander!

Teile des hämostatischen Prozesses III. Erkrankungen (Ausgabe, output)

- Blutungsneigung
- Thromboseneigung

Mangel oder
Dysfunktion
verschiedener
prokoagulant
wirkender
Komponenten
(angeboren o.
erworben)

Mangel oder
Dysfunktion
verschiedener
antikoagulant
wirkender
Komponenten
(angeboren o.
erworben)

Struktur des Vortrages I.

- ▶ Die Untersuchung der Blutungsneigung
 - Physiologie- Pathophysiologie (kurzgefasst)
 - Untersuchungsmethoden (Prinzipien, Praxis)
 - Auswertung der Ergebnisse

Struktur des Vortrages II.

- ▶ Die Untersuchung der Thromboseneigung (Thrombophilie)
 - Physiologie- Pathophysiologie (kurzgefasst)
 - Untersuchungsmethoden (Prinzipien, Praxis)
 - Auswertung der Ergebnisse

Struktur des Vortrages III.

- ▶ Die Untersuchung der aktuellen Veränderungen
 - pathologische Veränderungen (Thrombose, DIC)
 - therapiebedingte Veränderungen
 - ASA
 - Kumarinderivate
 - Heparin, NOAK

Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase (Physiologie)

Schritte:

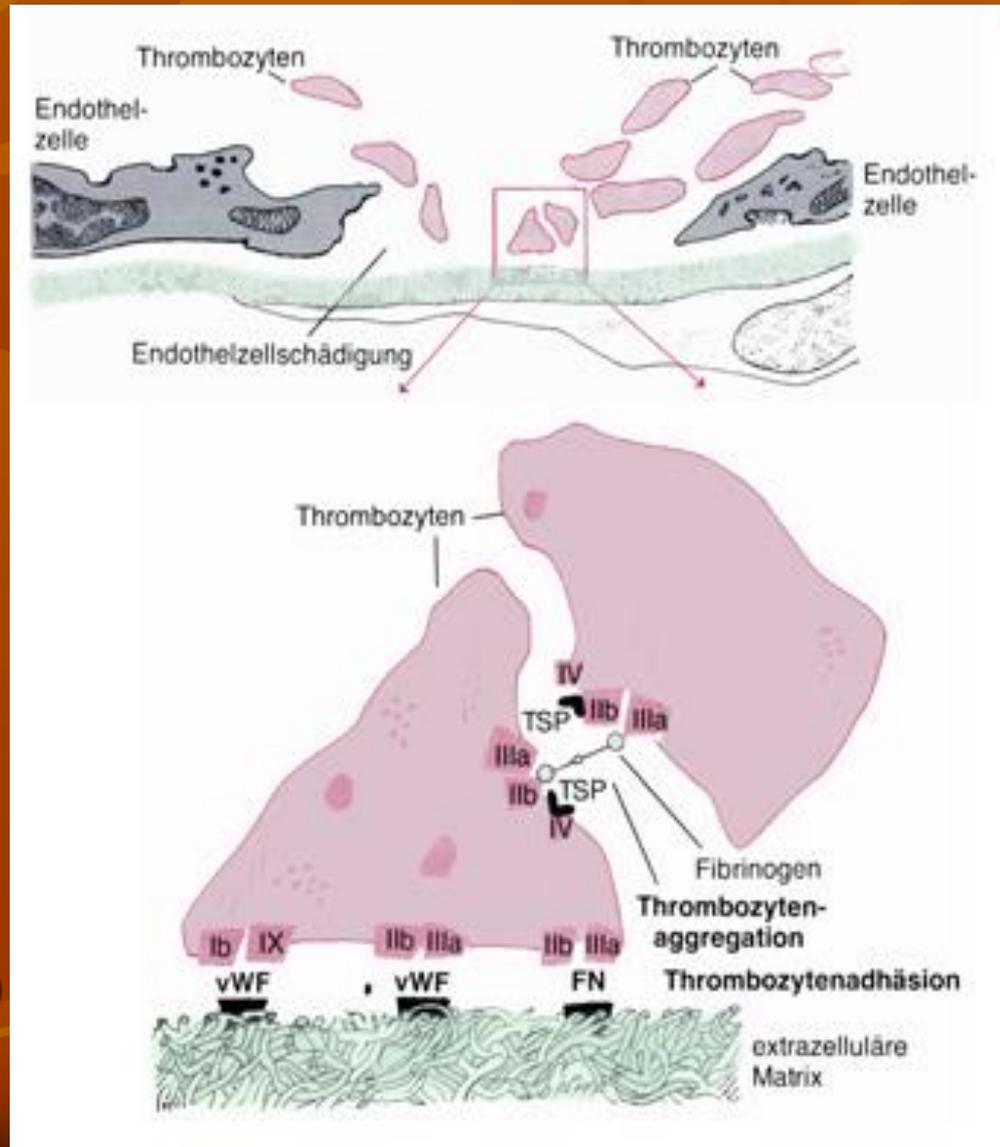
- Endothelverletzung
- Vasokonstriktion
- Freisetzung der subendothelialen Matrix
- Plättchenadhesion-
Plättchenaktivierung
- Plättchenaggregation

Endprodukt:

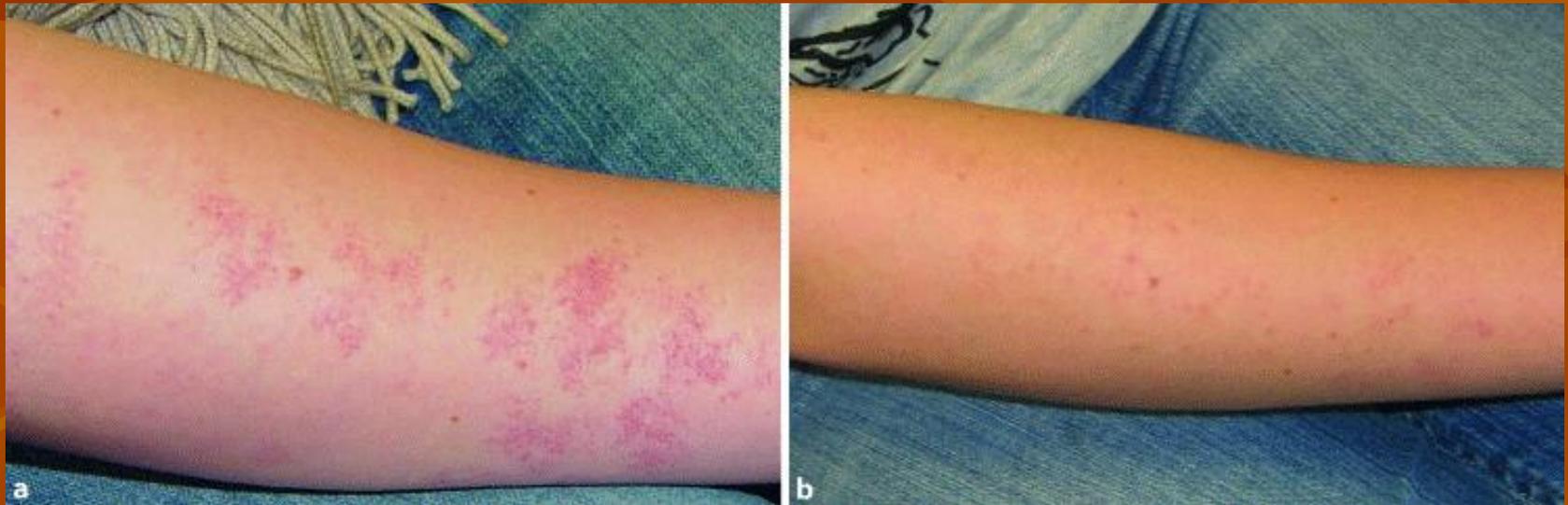
- Thrombozytenthrombus

Untersuchungen

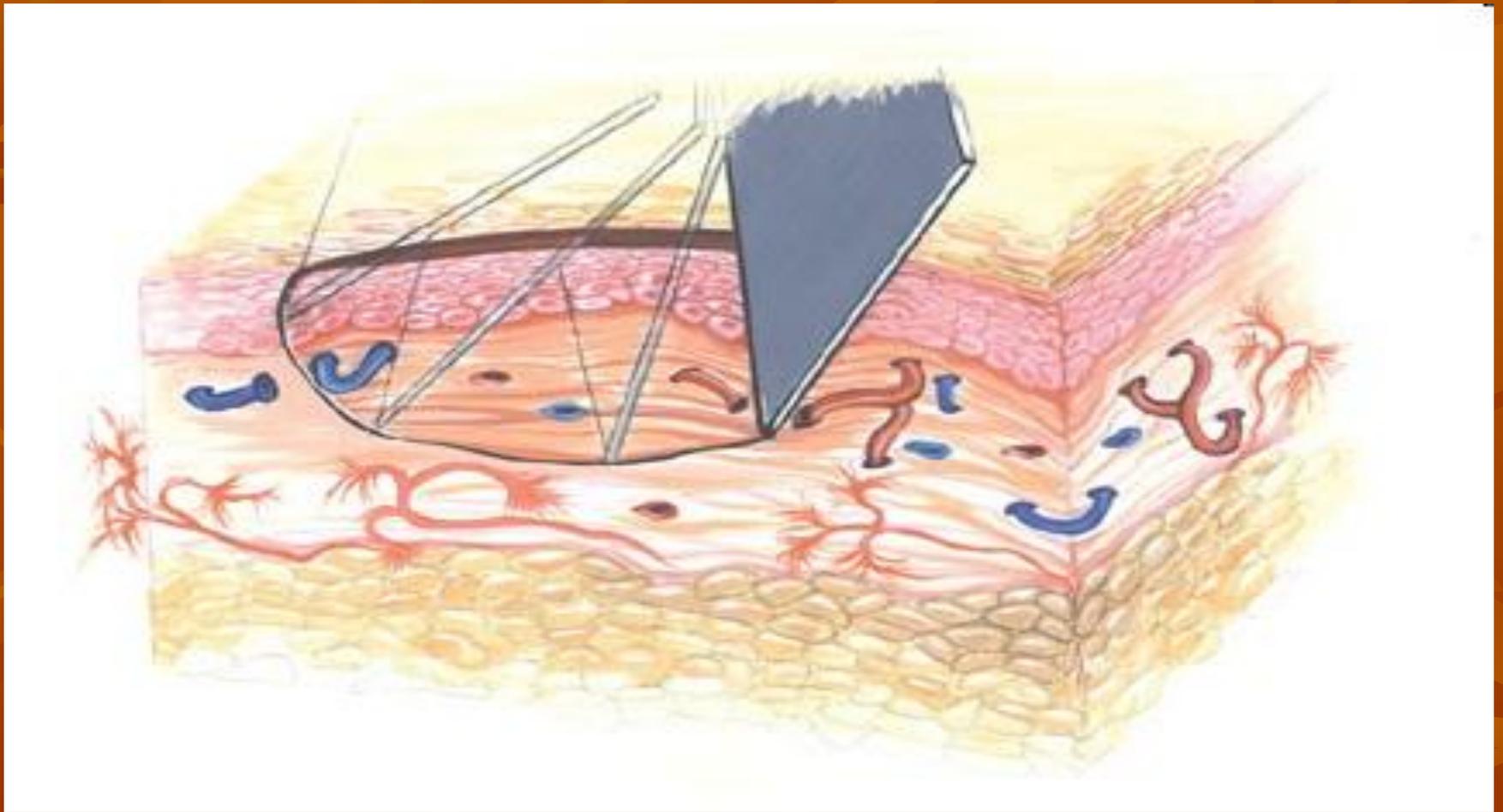
- Blutungszeit
- PFA („in vitro“ Blutungszeit)
- Aggregometrie

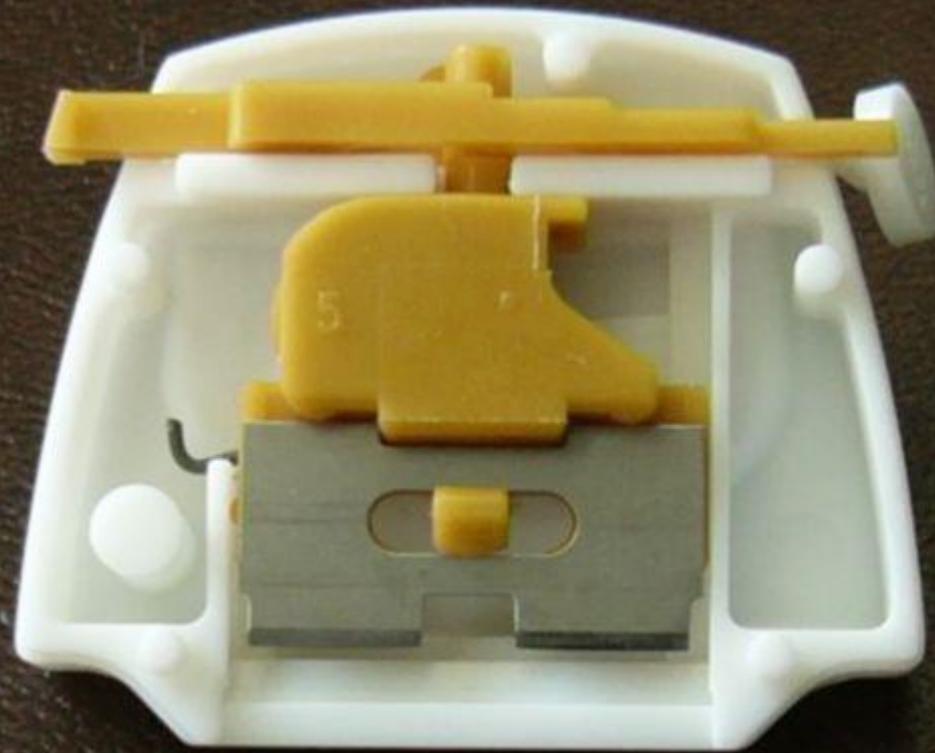


Hautveränderungen bei Störungen der primären Hämostase



Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase (Untersuchungen , Blutungszeit I.)





3 cm

Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase (Untersuchungen , Blutungszeit II., Durchführung)



Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase (Untersuchungen , Blutungszeit III., Auswertung)

- Referenzbereich: 2- 9 Min.
- Pathologisch verlängert:
 - Thrombozytopenie
 - von Willebrand- Jürgens Syndrom
 - Plättchenfunktionsstörungen

Beschränkter diagnostischer Wert.

Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase (Untersuchungen , PFA, Prinzip, Durchführung)

Vollblut fließt durch eine mit einer Membran beschichteten Kapillare, in der sich eine mikroskopische Öffnung befindet. Die Kapillarmembran besteht entweder aus

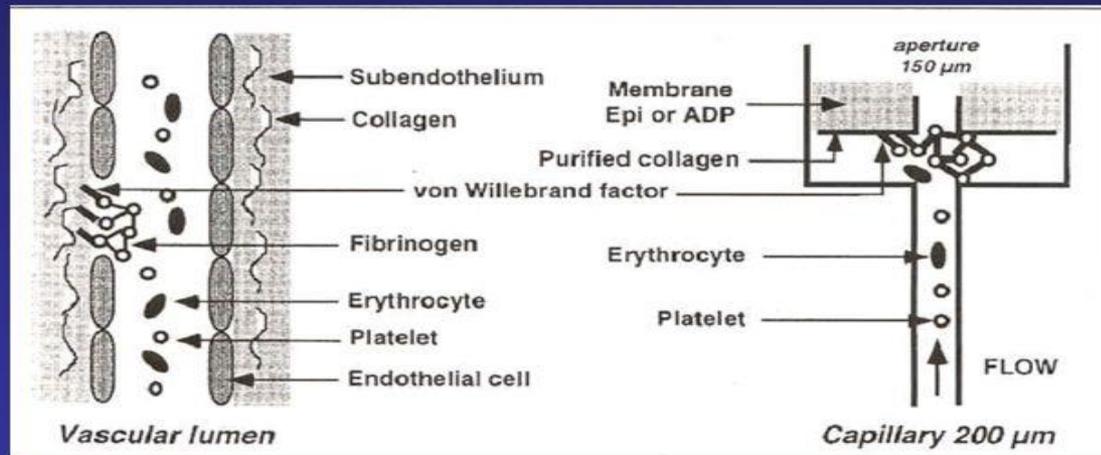
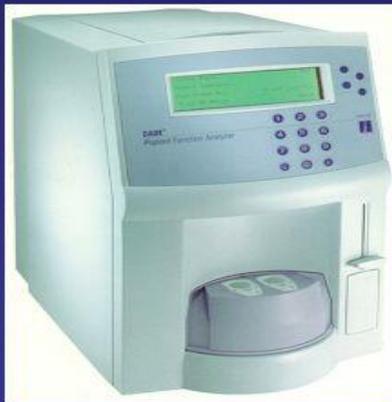
Kollagen/Epinephrin oder Kollagen/ADP.

Die Zeit bis zum Stillstand des Blutflusses wird als
Verschlusszeit
in Sekunden gemessen.

Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase (Untersuchungen , PFA 100., Prinzip, Durchführung)

Platelet Function Analyzer PFA-100™

Test de fonction global, non spécifique



Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase

(Untersuchungen , PFA I., Auswertung)

Referenzbereich:

Epinephrin: 68 –121 sec

ADP: 84 –160 sec

Verlängerte Verschlusszeit:

Epinephrin:

Aspirin Effekt

Epinephrin und ADP:

Plättchenfunktionsstörung

Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase

Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) I., Prinzip

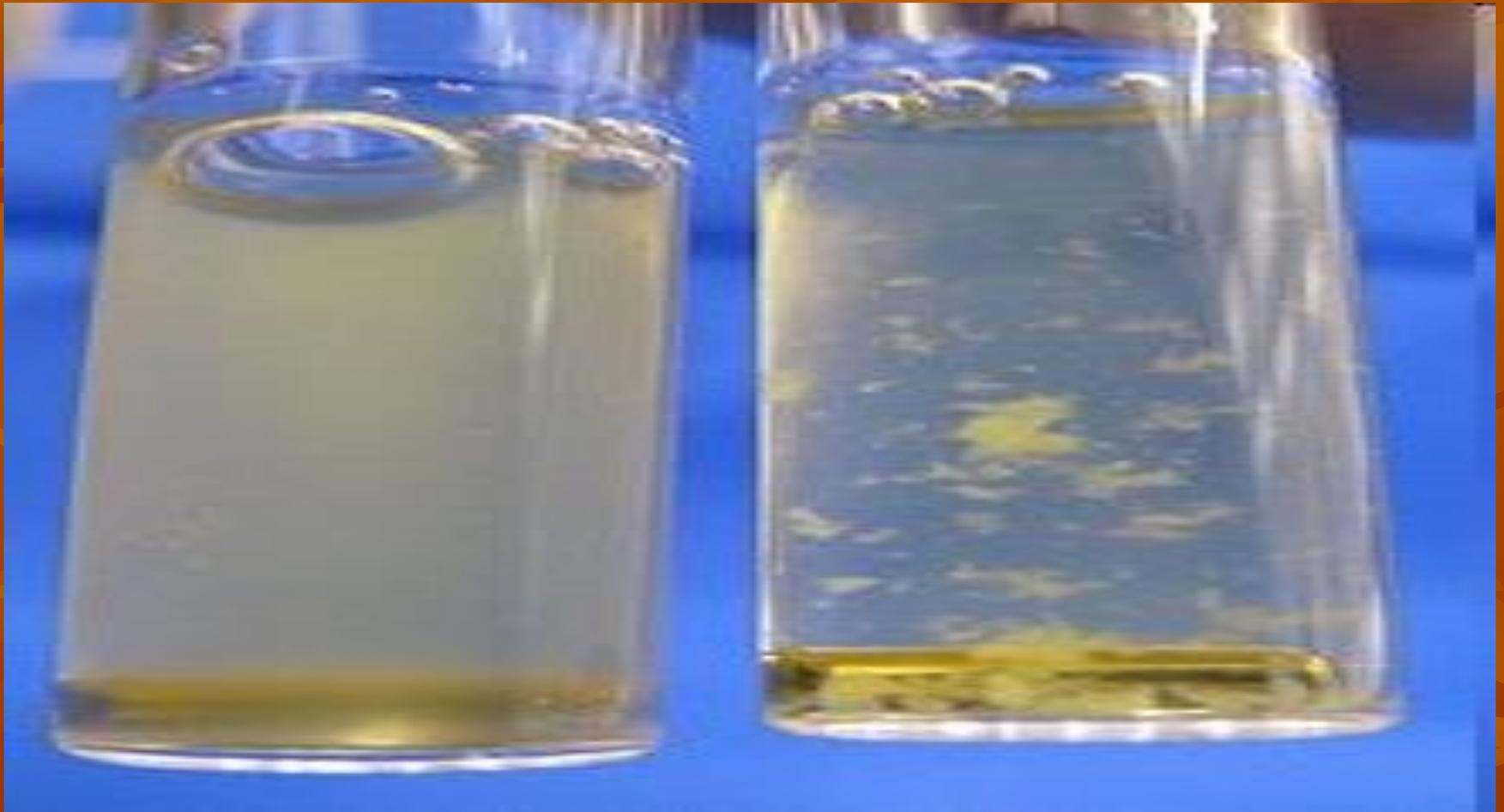
Die Messung erfolgt im plättchenreichen Plasma, in dem durch Zugabe von Agonisten, wie z.B.

**Ristocetin, ADP, Arachidonsäure,
Thrombinrezeptor aktivierendes
Peptid (TRAP) oder Kollagen,**

eine Plättchenaggregation induziert wird. Das Ausmaß der

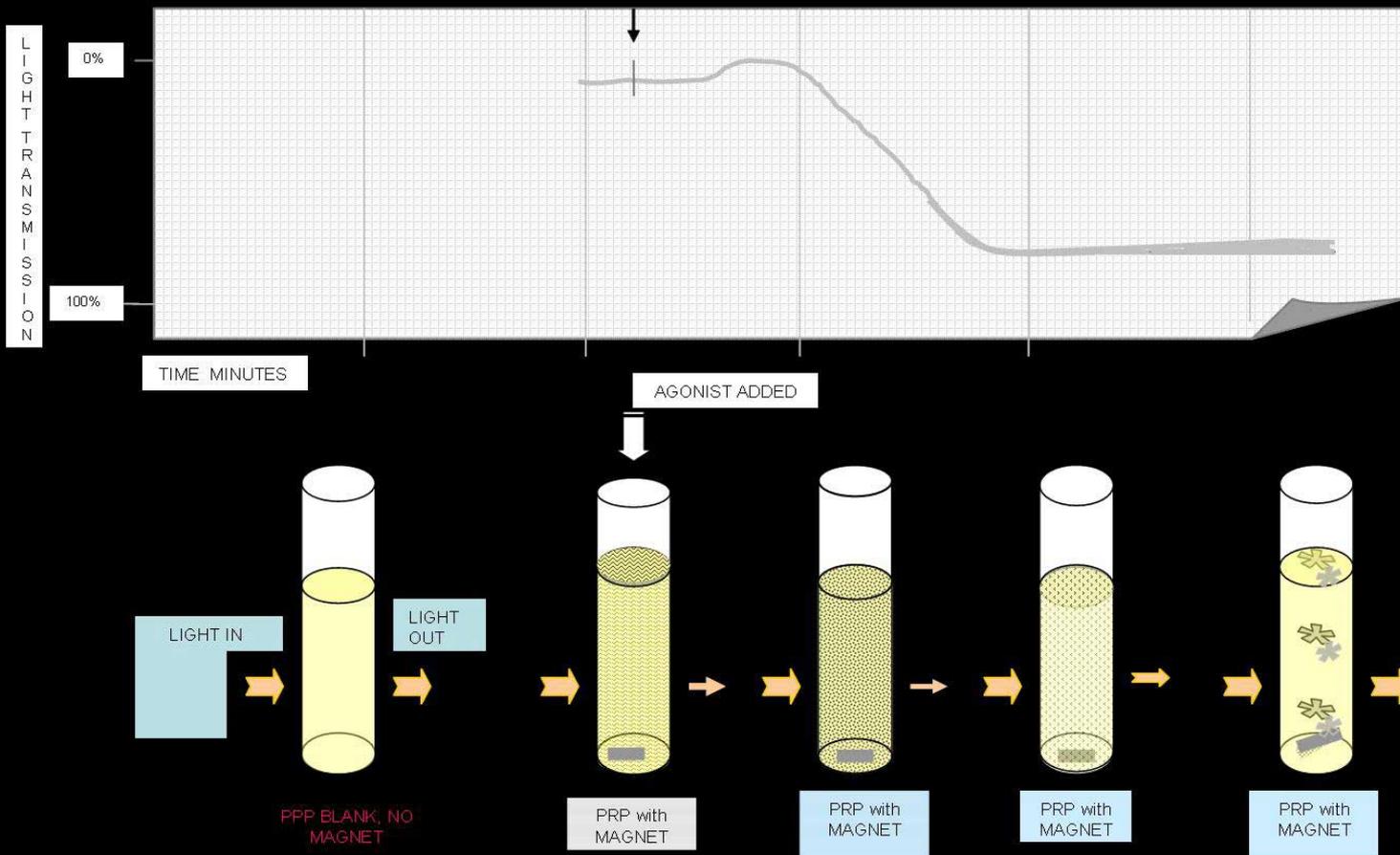
Aggregation wird durch die Zunahme der Lichttransmission nach Aggregatbildung turbidimetrisch quantifiziert.

**Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase
LTA II., Plattenreiches Plasma**

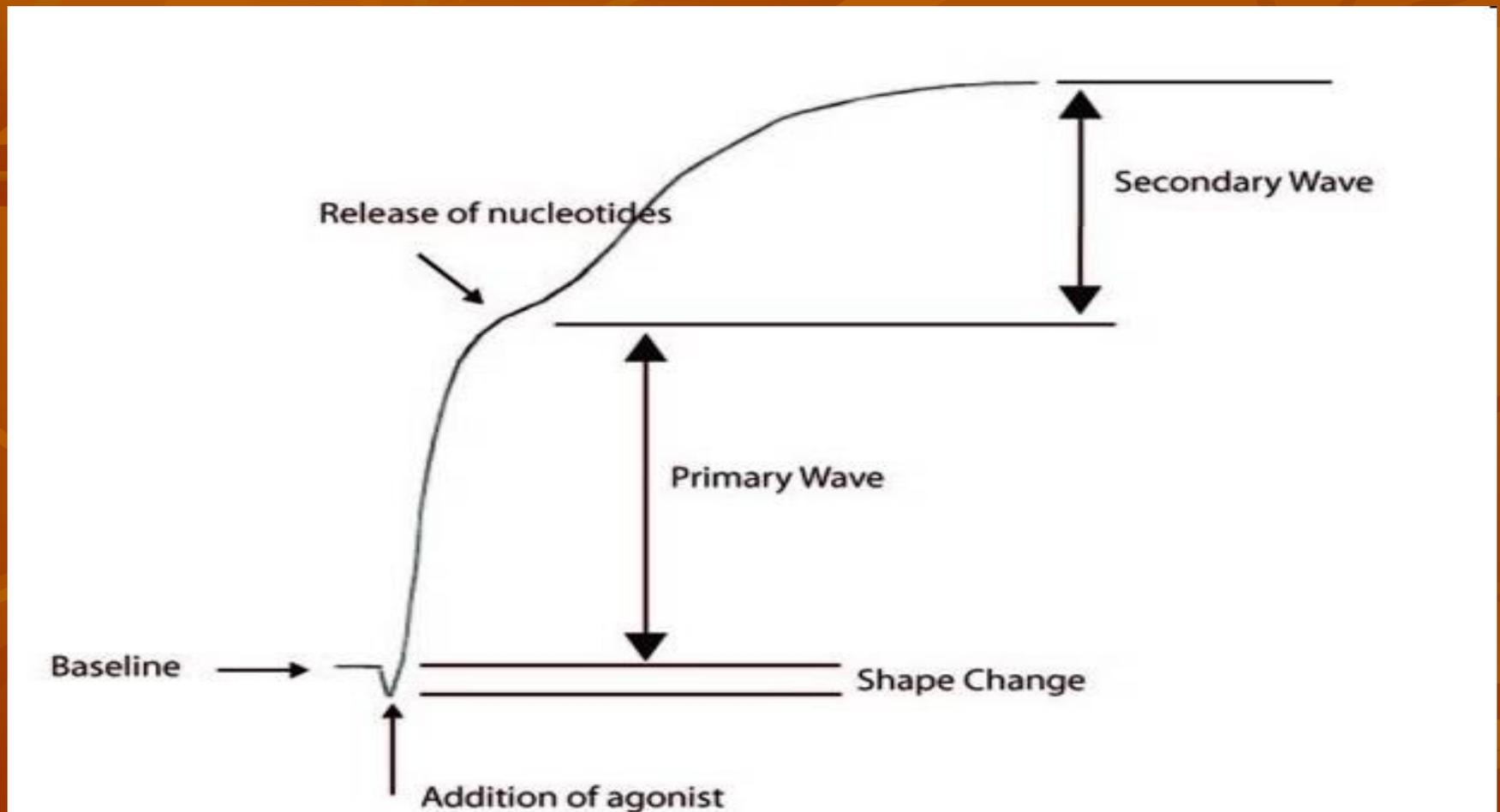


Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase LTA III., Durchführung

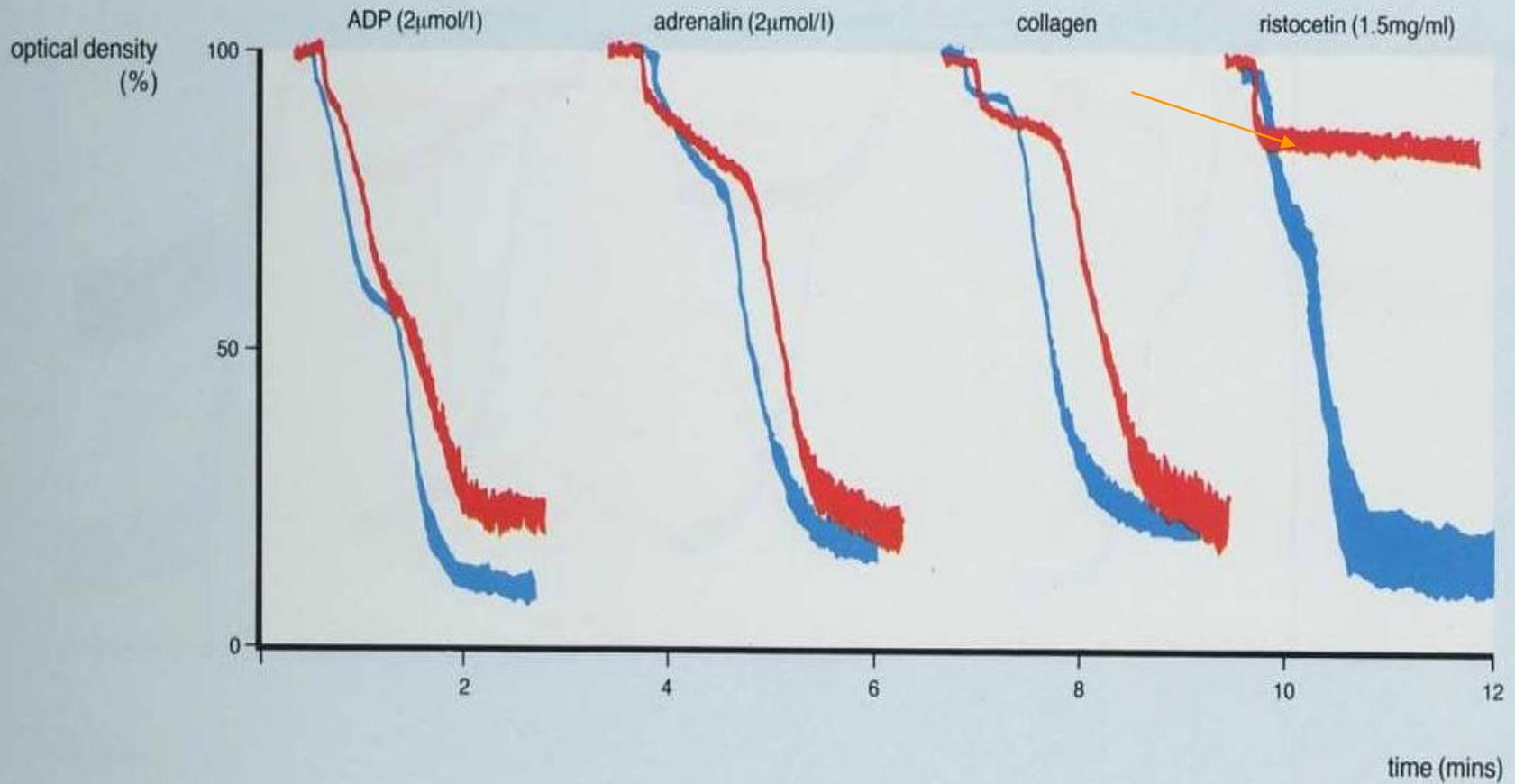
OPTICAL PLATELET AGGREGOMETRY: BORN PRINCIPLE



Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase LTA IV., Auswertung



Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase LTA IV., Auswertung des v. Willebrand.-J. Syndrom



Primäre Hämostase, vaskuläre, thrombozytäre Phase

LTA V., Auswertung

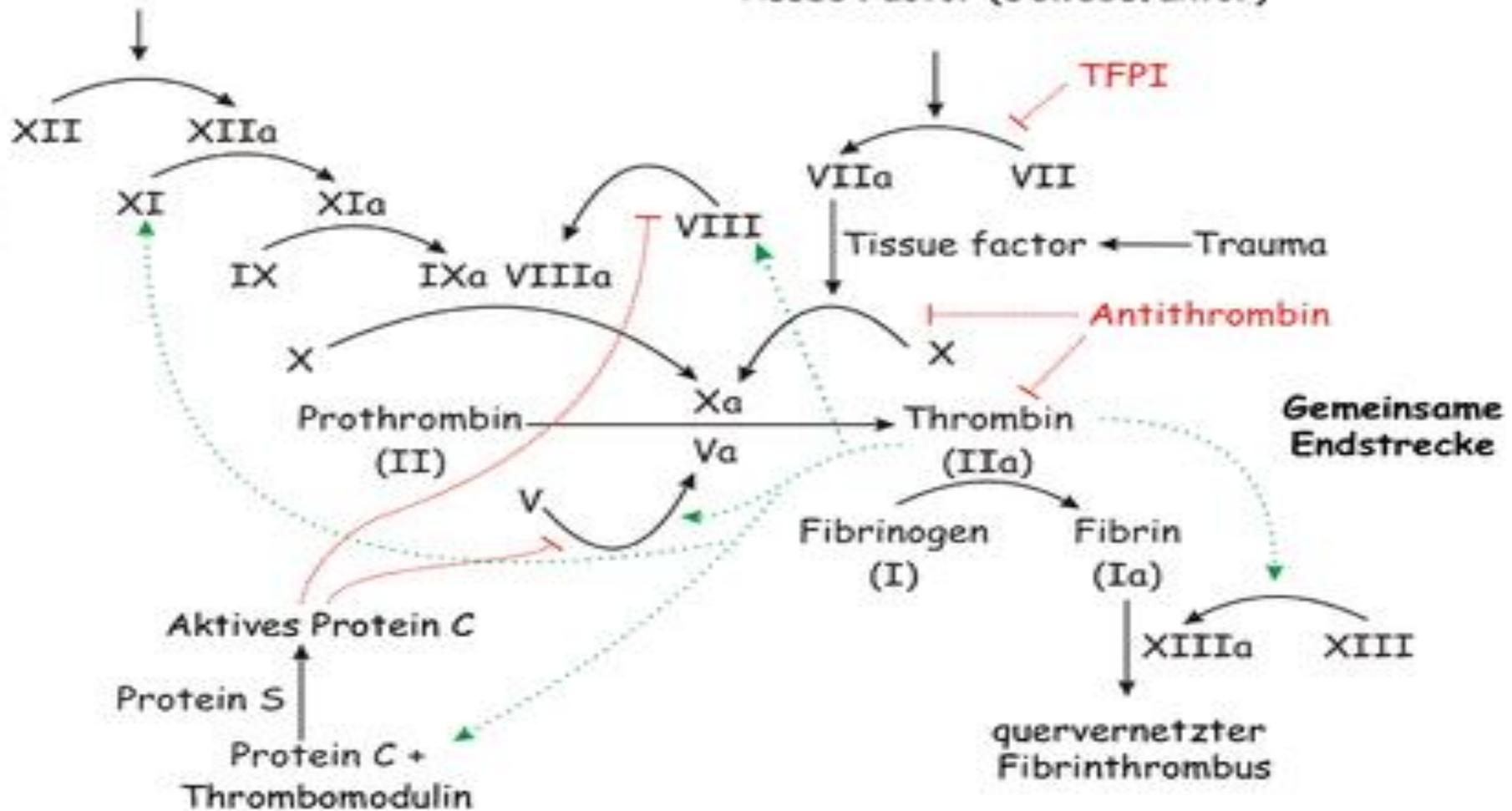
- Pathologische Aggregation mit Ristocetin
Adhäsionsstörung:
 - von Willebrand- Jürgens Syndrom
 - Bernard- Soulier Syndrom
- Pathologische Aggregation mit anderen Agenzien
Sekretionsstörung (keine zweite Welle):
 - verschiedene ARD-s (agonist response defect)
 - „Aspirin- like” SyndromAdhäsion- und Sekretionsstörung (keine Aggr.):
 - Glanzmann Thrombasthenie

Sekundäre, plasmatische Phase, Gerinnungskaskade

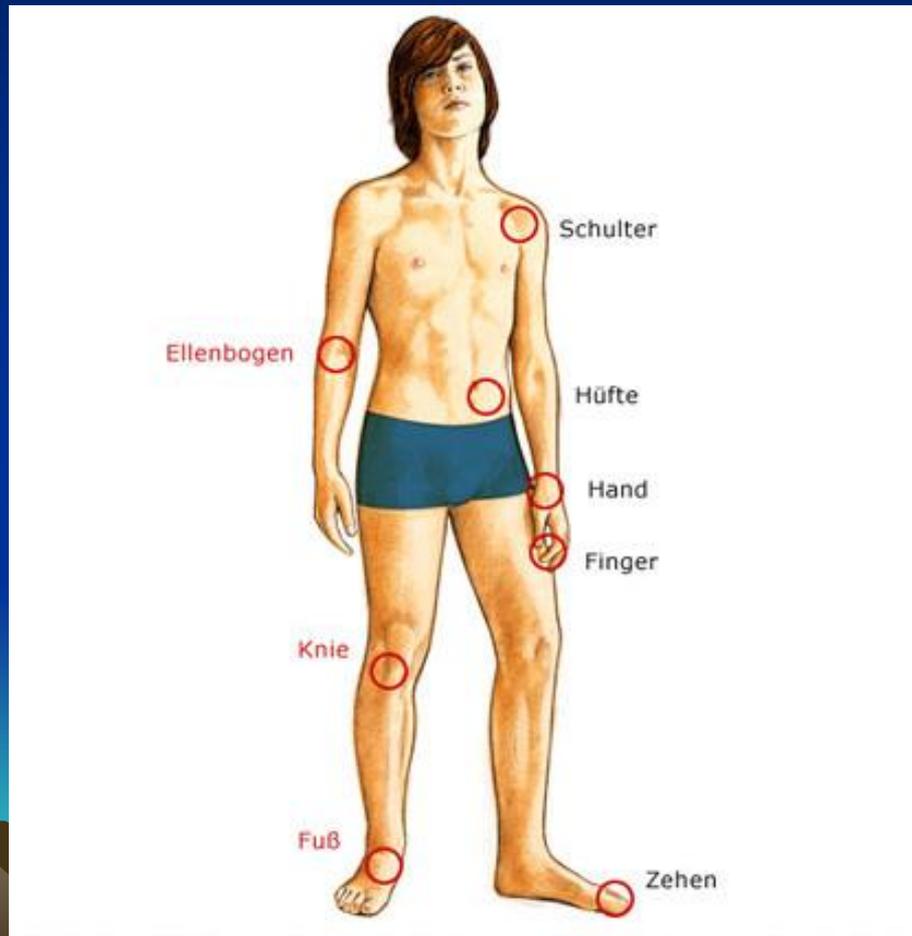
Intrinsischer Weg

Extrinsischer Weg

Freisetzung von Tissue Factor (Gewebsfaktor)



Plasmatische Gerinnungstörungen. Klinisches Bild I.



Plasmatische Gerinnungstörungen. Klinisches Bild II.



Untersuchungen der plasmatischen Phase I. Qualitätssicherung

- Präanalytisch
 - Plasma- Ziträt Verhältnis
 - „entsprechende“ Blutprobe
 - sorgfältiges Mischen
 - Zeit zwischen Blutentnahme und Untersuchung
 - Temperatur der Aufbewahrung
- Analytisch
 - Passende Geräte und Reagenzien
 - Temperatur der Untersuchung
 - Sicherung der inneren und äusseren
Qualitätskontrolle



Untersuchungen der plasmatischen Phase II. Untersuchungsarten

- Globale Untersuchungen
- Spezielle Untersuchungen
(Faktorbestimmungen)



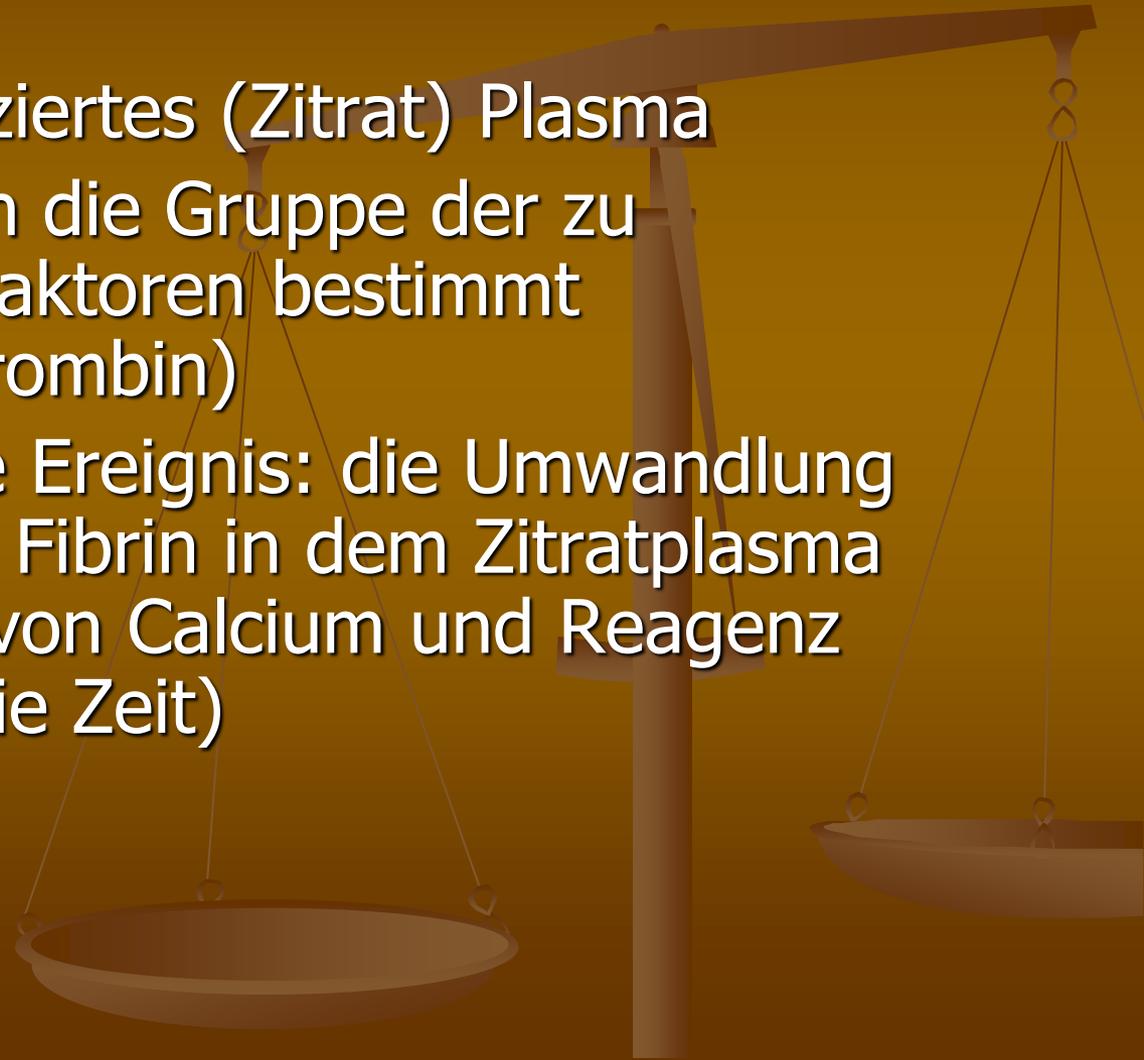
Untersuchungen der plasmatischen Phase III. Globale Untersuchungen

- Vollblutgerinnungszeit
 - Bestimmung der Gerinnungszeit des Blutes unter mehr oder weniger standardisierten Umständen (praktisch wertlos!)



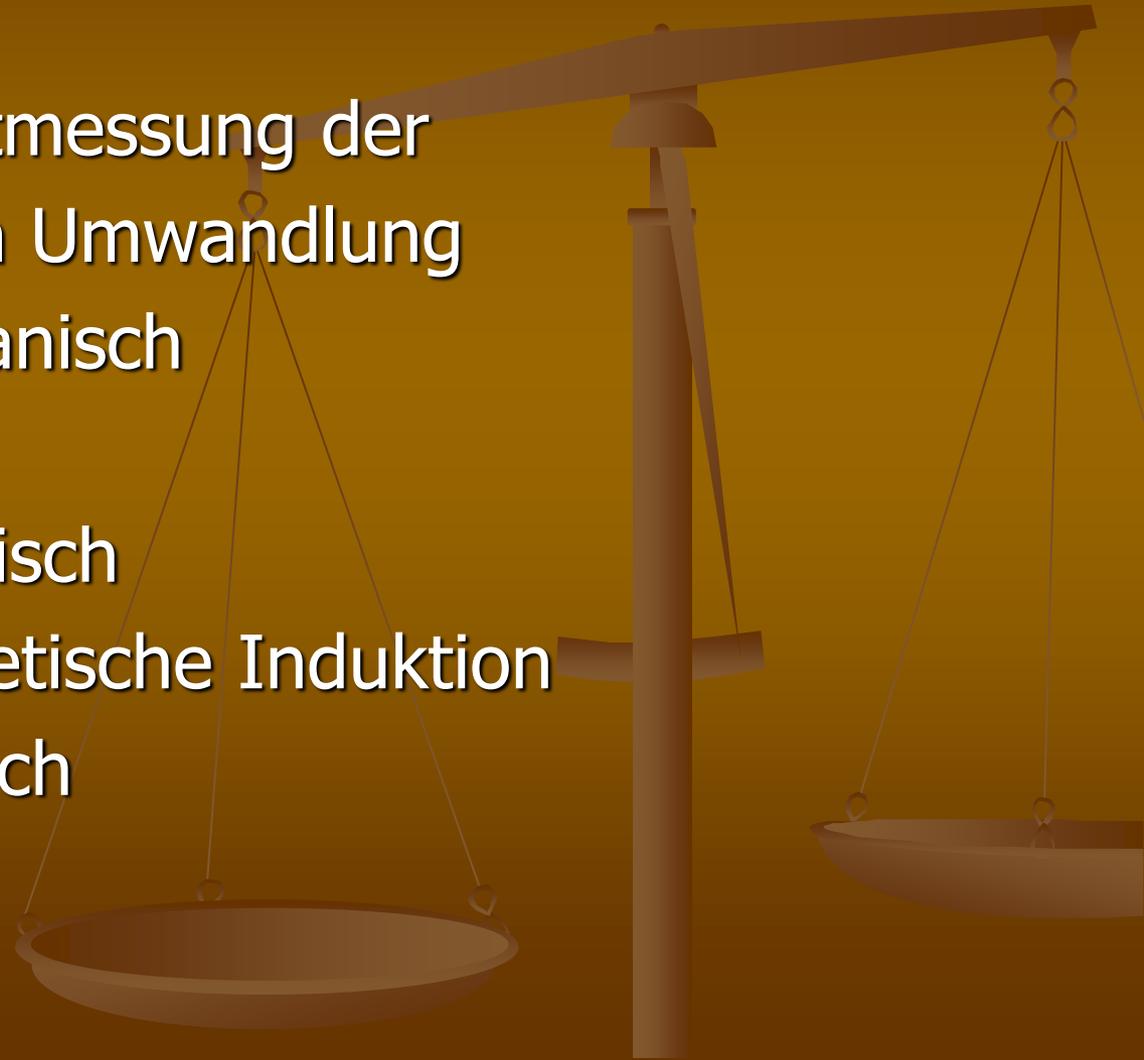
Untersuchungen der plasmatischen Phase VII. Globale Untersuchungen, Prinzipien

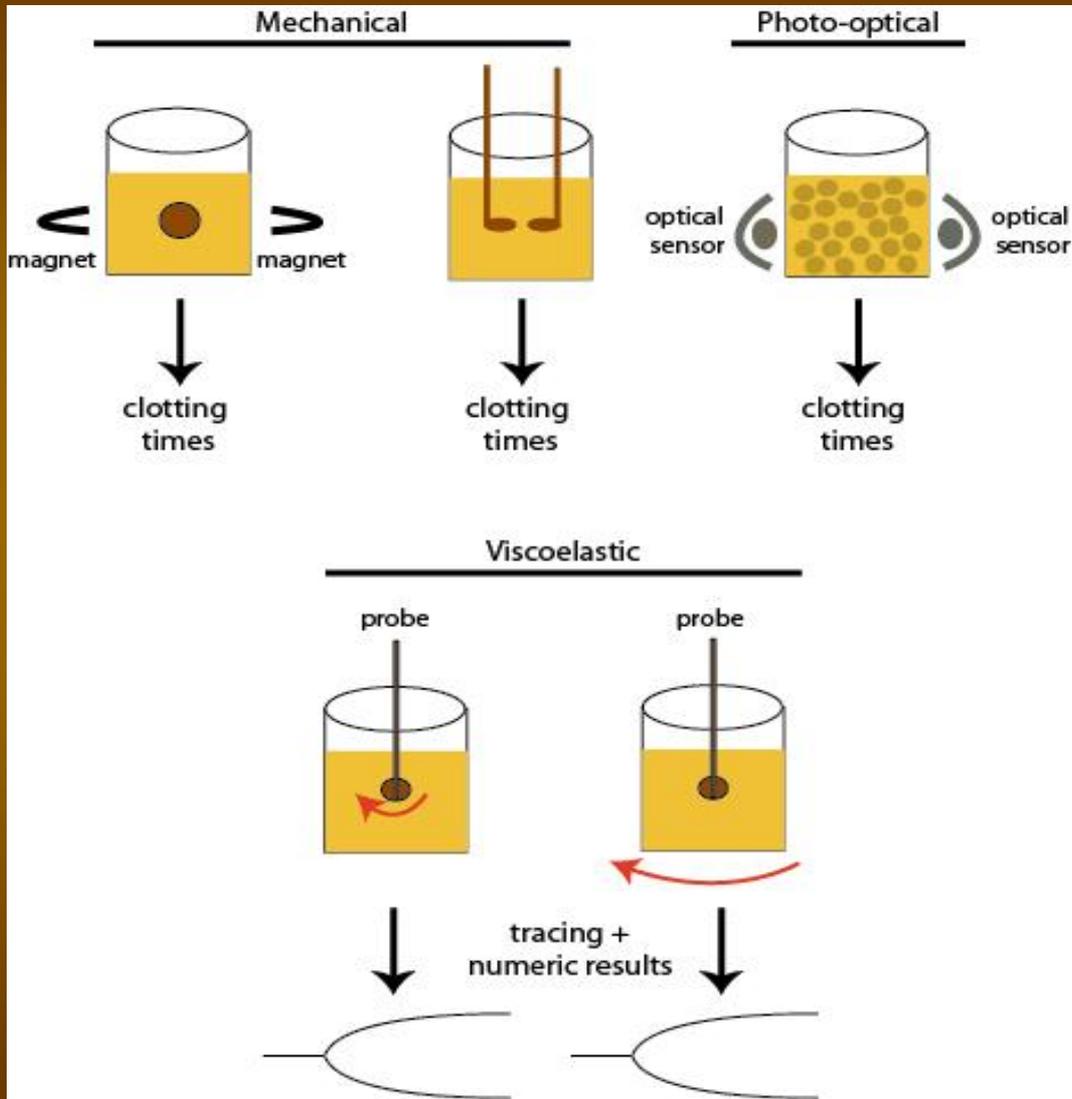
- Material: dekalzifiziertes (Zitrat) Plasma
- Reagenz: ist durch die Gruppe der zu untersuchenden Faktoren bestimmt (Phospholipid, Thrombin)
- Das zu erfassende Ereignis: die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin in dem Zitratplasma nach der Zugabe von Calcium und Reagenz (gemessen wird die Zeit)



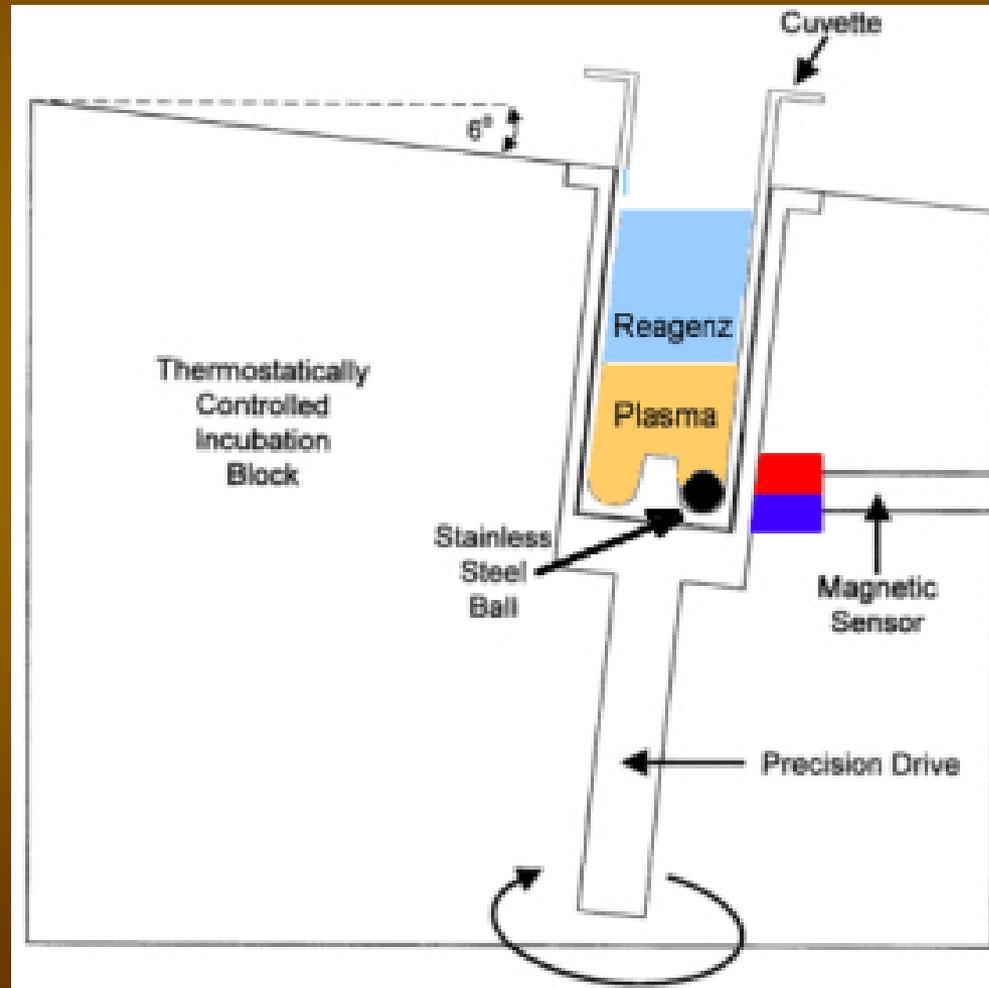
Untersuchungen der plasmatischen Phase VIII. Globale Untersuchungen, Prinzipien

- Methoden zur Zeitmessung der
- Fibrinogen- Fibrin Umwandlung
 - Elektromechanisch
 - Fotometrisch
 - Nephelometrisch
 - Elektromagnetische Induktion
 - Viskosimetrisch





Untersuchungen der plasmatischen Phase IX. Globale Untersuchungen, Prinzipien



Untersuchungen der plasmatischen Phase

Globale Untersuchungen, Prinzipien

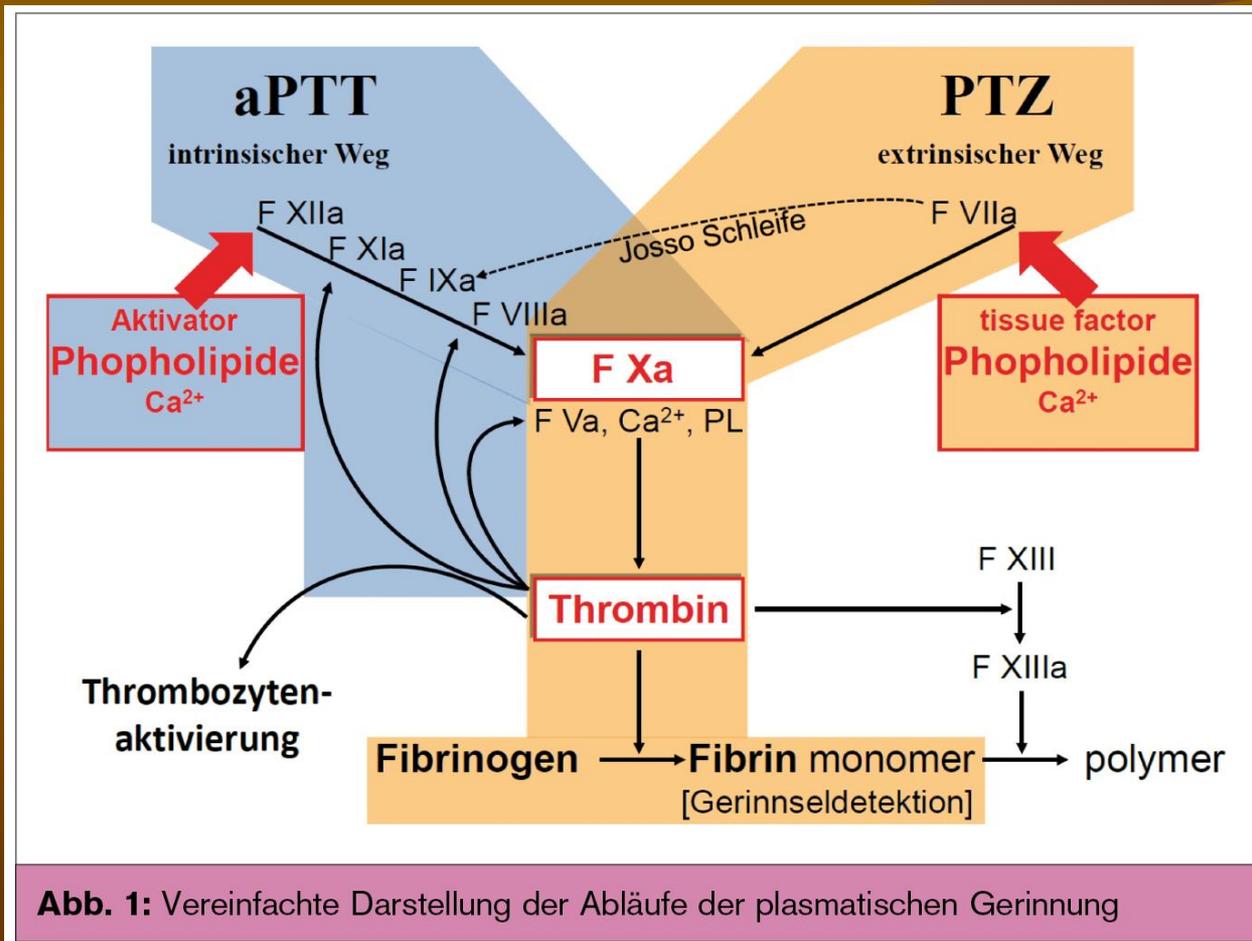


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Abläufe der plasmatischen Gerinnung

Untersuchungen der plasmatischen Phase XI. Globale Untersuchungen, Partielle Thromboplastinzeit

- Dem **Zitratplasma des Patienten** werden gerinnungsaktivierende
- ***Partielle* Thromboplastine (Lipoproteine)** und
- **Oberflächenaktivatoren (z. B. Kaolin) + Ca** zugesetzt.

Bei diesem Test werden alle Faktoren des intrinsischen (endogenen) und des gemeinsamen Gerinnungswegs getestet. Die Gerinnungszeit ist konzentrationsabhängig. Der Test ist gegenüber Faktor II (Prothrombin) und Fibrinogen weniger empfindlich.

Untersuchung bei Verdacht auf Hemmkörper

Patientenplasma:

APTZ verlängert: Faktorenmangel
oder
Hemmkörper (pl. LA)

Patientenplasma + Normalplasma:

APTZ verkürzt: Faktorenmangel
APTZ bleibt verlängert: Hemmkörper

Untersuchungen der plasmatischen Phase XII.

Globale Untersuchungen, Prothrombinzeit

- Dem **Zitratplasma des Patienten** wird gerinnungsaktivierendes
- **Thromboplastin (Lipoproteine + F III, /Glykoprotein, Gewebsthrombokinase/) + Ca** zugesetzt.

Bei diesem Test werden alle Faktoren des extrinsischen (exogenen) und des gemeinsamen Gerinnungswegs getestet.

Die Gerinnungszeit ist konzentrationsabhängig.

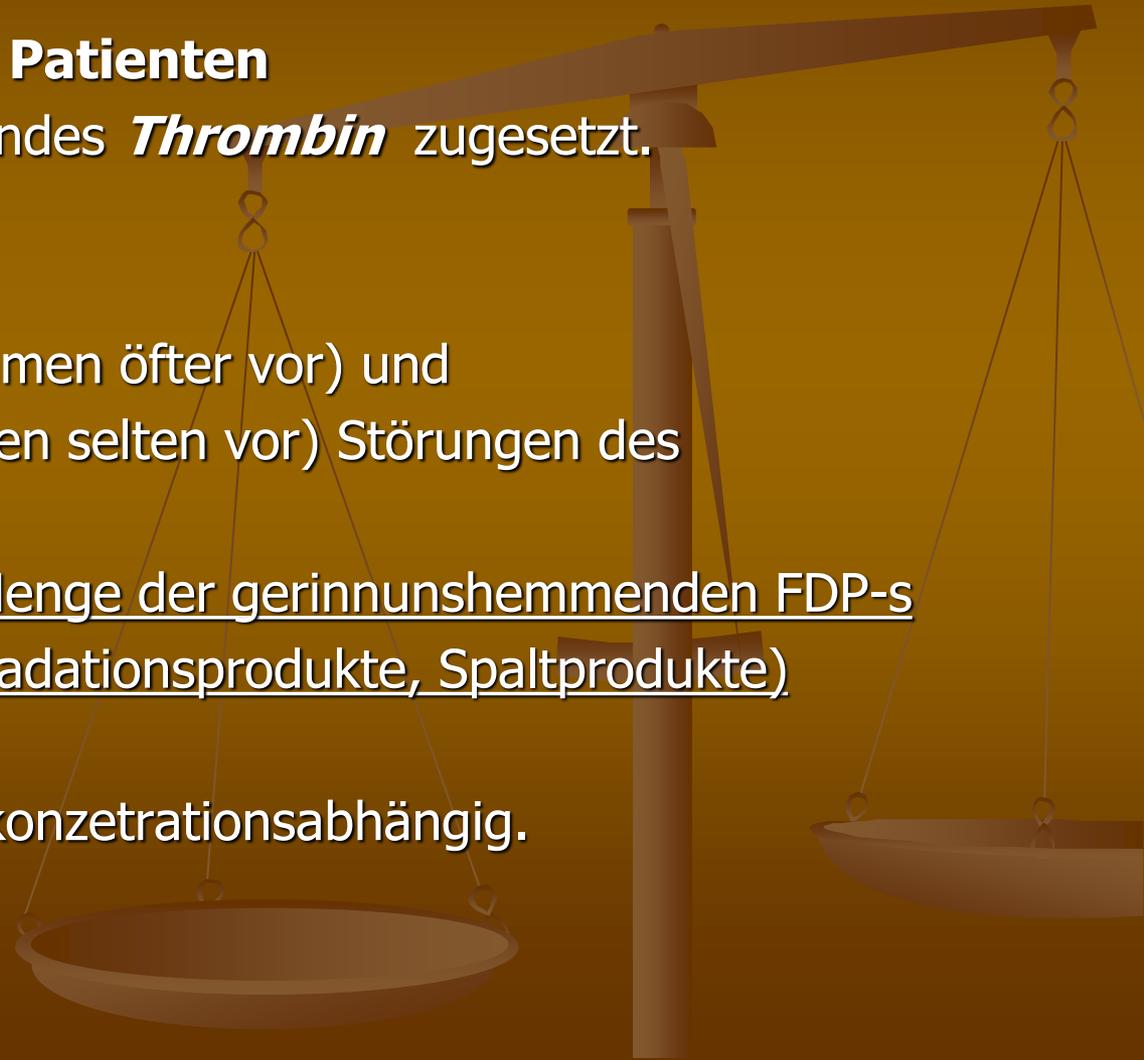
Der Test dient vor allem als der Kontrolluntersuchung der Kumarintherapie.

Untersuchungen der plasmatischen Phase XIII. Globale Untersuchungen, Thrombinzeit

- Dem **Zitratplasma des Patienten** wird gerinnungsaktivierendes ***Thrombin*** zugesetzt.

Bei diesem Test werden

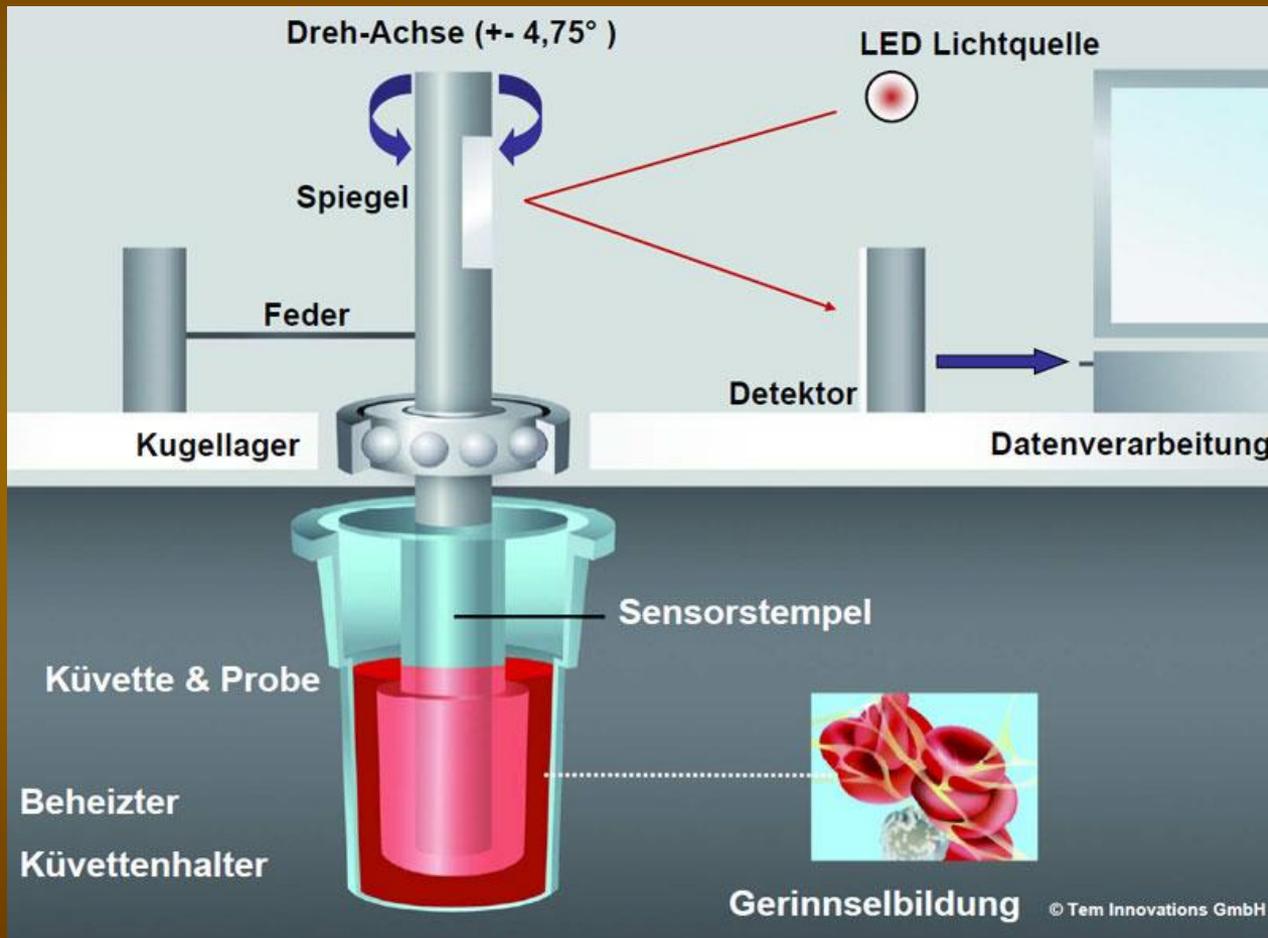
- die quantitativen (kommen öfter vor) und
 - die qualitativen (kommen selten vor) Störungen des Fibrinogens weiterhin
 - die Anwesenheit und Menge der gerinnunshemmenden FDP-s (Fibrinogen-Fibrin Degradationsprodukte, Spaltprodukte) getestet.
- Die Gerinnungszeit ist konzentrationsabhängig.



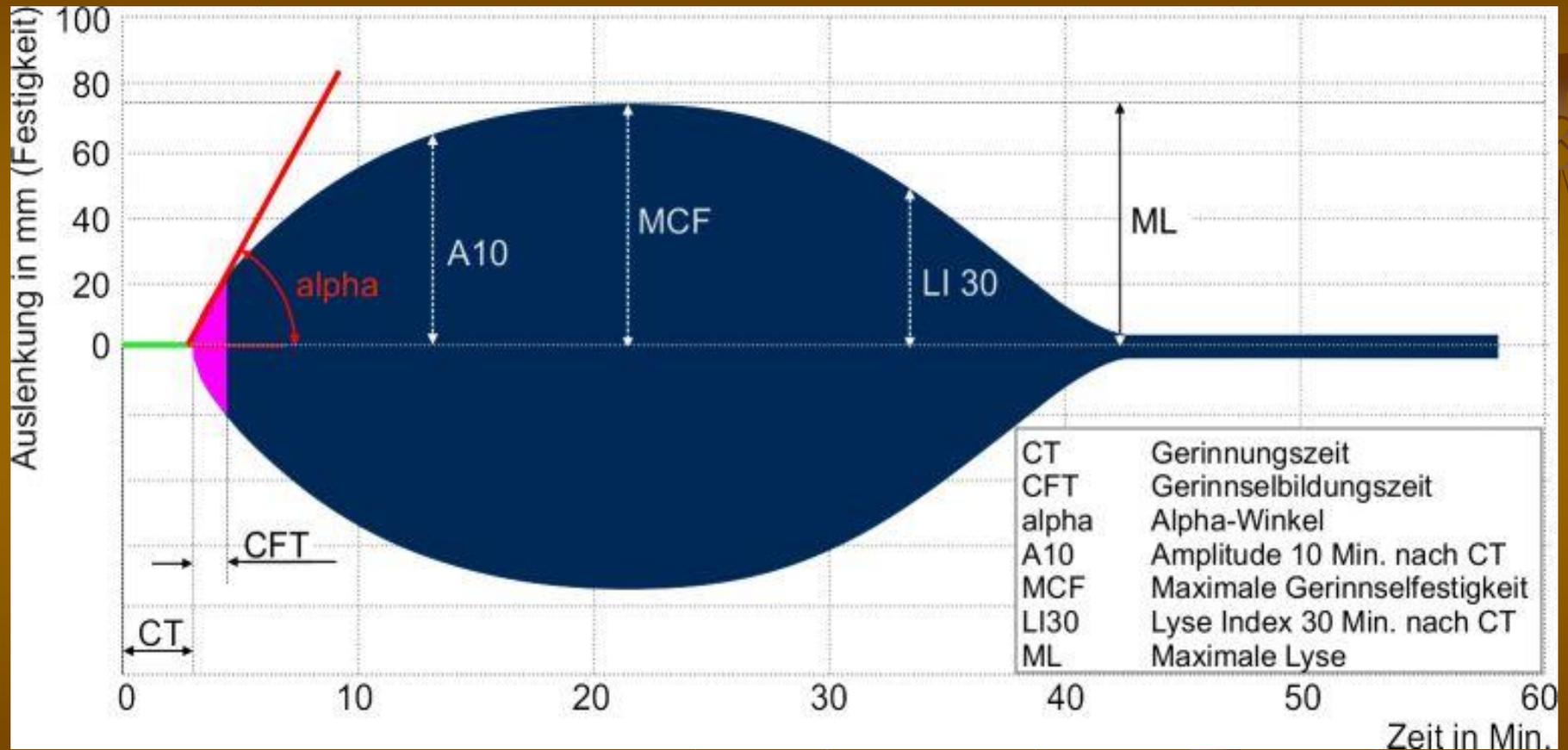
ROTEM (Messprinzip)

- Die Vollblutprobe wird in eine Küvette (Cup) gefüllt, und ein zylindrischer Stempel (Pin) wird eingetaucht. Zwischen Stempel und Küvette bleibt ein 1 mm breiter, mit Blut gefüllter Spalt. Der Stempel wird durch eine elastische Feder nach rechts und links gedreht. Solange keine Gerinnung eintritt, ist die Bewegung des Pins unbeeinflusst. Sobald sich zwischen Cup und Pin ein Gerinnsel bildet, wird die rotierende Bewegung des Pins durch das Gerinnsel zunehmend eingeschränkt. Die kinetischen Änderungen werden optisch erfasst und von einem integrierten Computer berechnet. Es entstehen die typischen Kurven (TEMogramm) und numerische Parameter.

ROTEM (Messprinzip)



ROTEM (Auswertung)

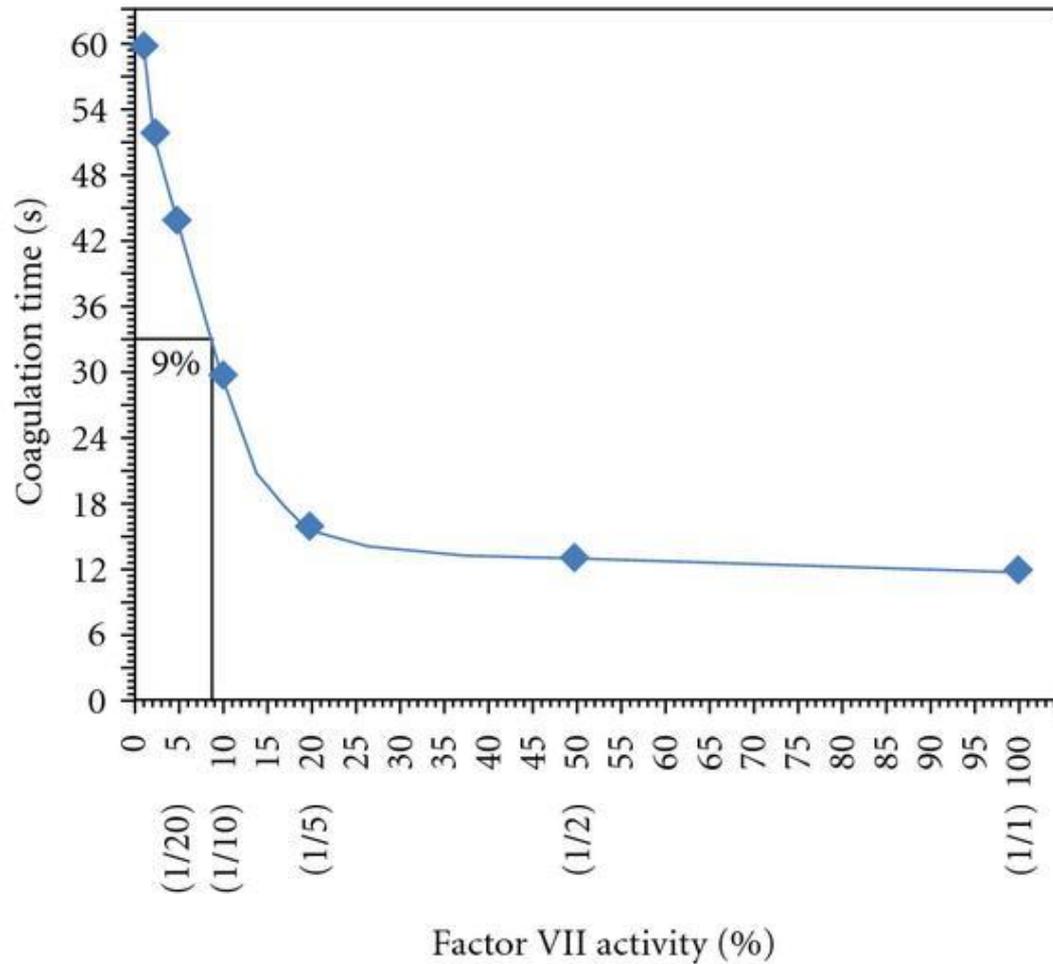


Faktorenbestimmungen

- Dem **Zitratplasma des Patienten** werden gerinnungsaktivierende
- **Thromboplastine** oder *Partielle* **Thromboplastine** ohne oder mit
- **Oberflächenaktivatoren (z. B. Kaolin) + Ca** und
- **Plasma mit Mangel des zu untersuchenden Faktors** zugesetzt.

Die Gerinnungszeit ist von der Faktorkonzentration des Patientenplasmas abhängig, die mit Hilfe einer Dilutionskurve bestimmt wird.

Dilutionskurve für Faktorbestimmungen



Häufigere Faktormangelerkrankungen (Prävalenz)

- **Von Willebrand- Jürgens Syndrom (F VIII)**

alle Fälle: 800/100.000

symptomatische Fälle: 12,5/100.000

schwere Fälle: <0,3/100.000

- **Hämophilie A (F VIII)**

etwa 8500 in Deutschland

- **Hämophilie B (F IX)**

etwa 1500 in Deutschland

Seltene Faktormangelerkrankungen (Prävalenz)

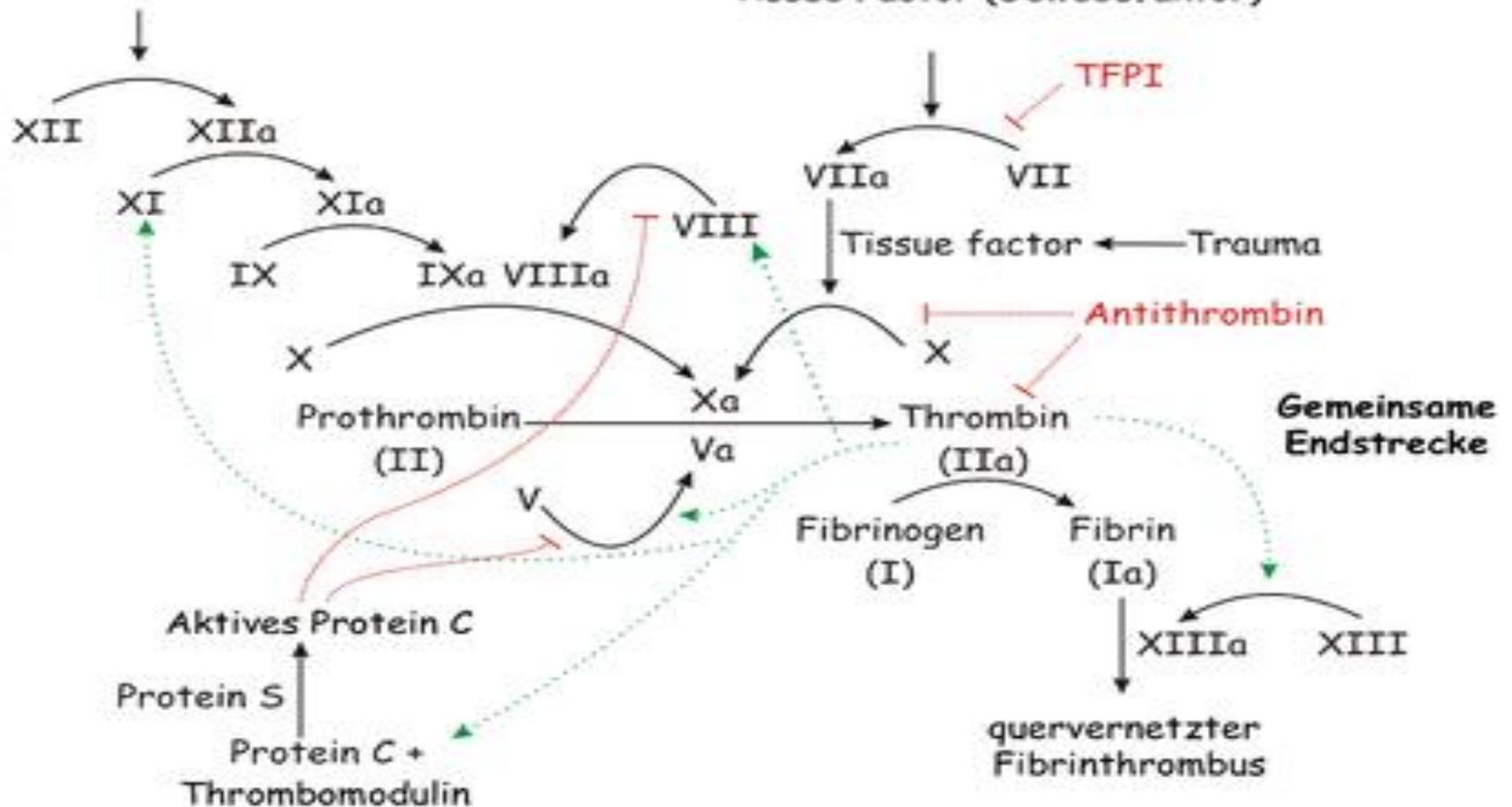
- Faktor I 5 in 10 million
 - Afibrinogenämie
 - Hypofibrinogenämie
 - Dysfibrinogenämie
- Faktor II 1 in 2 million
- Faktor V 1 in 1 million
- Kombiniertes Faktor V and Faktor VIII Mangel 1 in 1 million
- Faktor VII 1 in 500,000
- Faktor X 1 in 1 million
- Kombiniertes Mangel Vitamin K abhängiger Gerinnungsfaktoren keine Angaben
- Faktor XI 1 in 100,000
- Faktor XIII 1 in 3 million

Sekundäre Phase, Gerinnungskaskade

Intrinsischer Weg

Extrinsischer Weg

Freisetzung von
Tissue Factor (Gewebsfaktor)



Thrombophile Diathesen Häufigkeit (I.)

Hereditär	Häufigkeit
Antithrombin – Mangel	< 1 %
Protein C – Mangel	< 1 %
Protein S – Mangel	< 1 %
■ APC- Resistenz » F V-Leiden	5-7 %
Prothrombin G20210A	1-2 %
F XII-Mangel	1,5%
Dysfibrinogen	< 1 %
Erworben	
Antiphospholipidsyndrom	2-5 (10 ?) %

Thrombophile Diathesen Häufigkeit (II.)

- Homocysteinämie 3 %
- C677T im MTHFR-Gen (homozygot) 5 %
- Lipoprotein(a) – Erhöhung 3-5 %

Thrombophile Diathesen

Diagnostik (I.)

- **Allgemeine Gerinnungsteste**

Dysfibrinogen » Globalteste + TZ, ggf.
Fibrinogen-Antigen

F XII-Mangel » PTT-Verlängerung und
Bestimmung F XII mit Einphasentest

Lupusantikoagulant » Bei verlängerter
aPTT

Thrombophile Diathesen

Diagnostik (II.)

- **Bestimmung der natürlichen Inhibitoren**
- Antithrombin » chromogenes Substrat
Protein C - Aktivität » chromogenes Substrat,
Protein C - Antigen » Elektrophorese,
Immundiffusion
Protein S - Aktivität » chromogenes Substrat,
Protein S - Antigen und freies Antigen »
Elektrophorese, Immundiffusion

Thrombophile Diathesen

Diagnostik (III.)

- **Erfassung der APC-Resistenz**

Genanalyse » Untersuchung der Patienten-DNA mit PCR

- **Erfassung der Prothrombinvariante G20210A**

Genanalyse » Untersuchung der Patienten-DNA mit PCR

Thrombophile Diathesen

Diagnostik (IV.)

- **Erfassung des Homocystein – Status**
 - Messung von Homocystein, Vitamin B 12 und Folsäure
 - Genanalyse » Untersuchung der Mutation C677T im MTHFR - Gen (PCR)
-
- **Lipoprotein(a) - Messung**
 - Immunologische Bestimmung

Thrombophile Diathesen

Diagnostik des APS (I.)

- **Erfassung eines Antiphospholipidsyndroms**
 - Antikörperanalyse » Cardiolipin-AK (IgG/IgM), b -2 Glykoprotein IgG
 - Lupusantikoagulant» Bestätigungsteste

Thrombophile Diathesen

Diagnostik des APS (II.)

- Der Test basiert auf dem Prinzip, dass Antikörper gegen Thrombin und beta-2-Glycoprotein I mit Vitamin-K-abhängigen Blutgerinnungsfaktoren um Bindungsstellen
- auf anionischen Phospholipiden konkurrieren und dadurch *in vitro* die Gerinnungszeit des Plasmas in APTZ verlängern.

Thrombophile Diathesen

Diagnostik des APS (III.)

- I.: Screening Test, (APTZ) zum Nachweis der Verlängerung der Phospholipid-abhängigen Gerinnungszeit
- II.: Verdrängungstest, bei dem die Probe mit normalem Plasma gemischt wird. Er soll ausschließen das Fehlen eines Gerinnungsfaktors nachgewiesen werden.

Thrombophile Diathesen

Diagnostik des APS (IV.)

- III.:
- Verwendung von Phospholipiden in *geringer Konzentration*: die Gerinnungszeit ist bei Anwesenheit von LA verlängert.
- Verwendung von *hoher Konzentration* wird die AK neutralisiert und die Gerinnungszeit verkürzt.
- Das Verhältniss der Ergebnisse ermöglicht die Bestätigung, dass die Hemmung der Blutgerinnung tatsächlich Phospholipid-abhängig ist und nicht auf Mangel eines spezifischen Gerinnungsfaktors beruht.

Kontrolle der antiaggregatorischen Therapie (ASA)

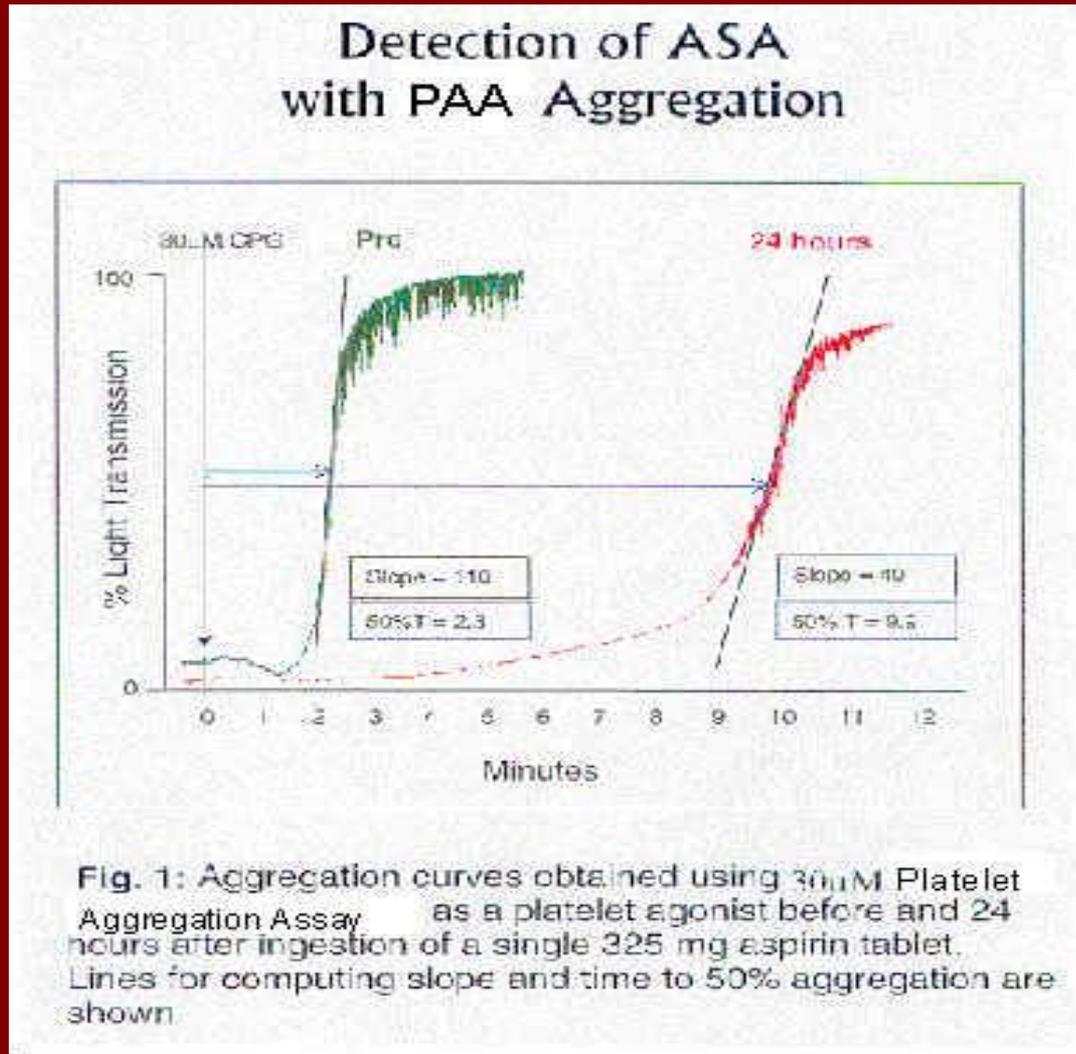
Wirkungsmechanismus: Hemmung der
Plättchenaggregation

Untersuchung: Aggregation in vitro (ausgefallene
oder schwache zweite Welle)

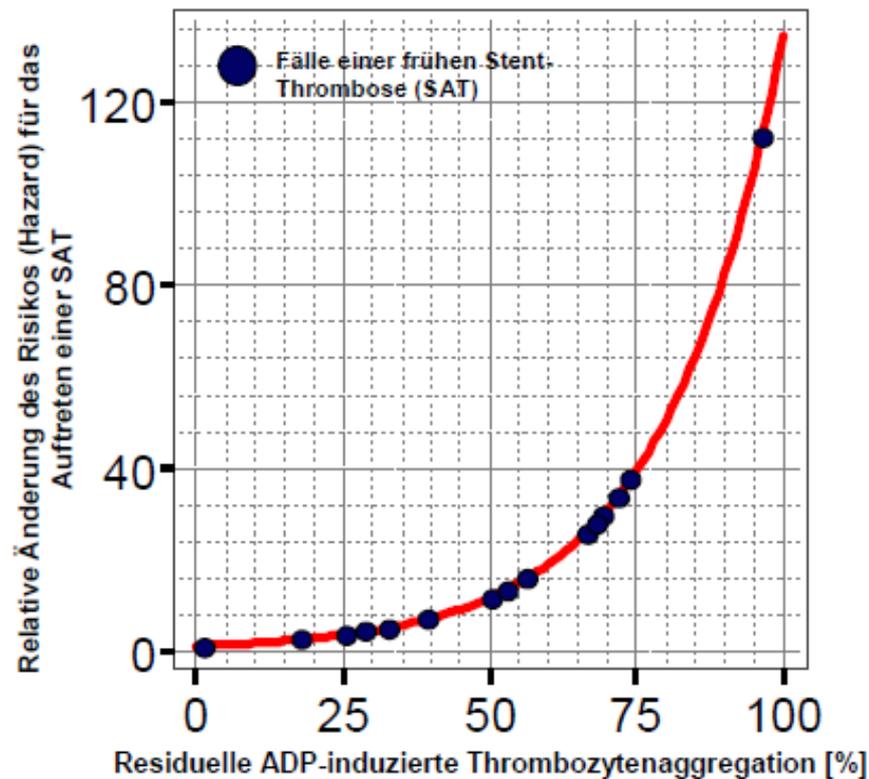
PFA (verlängerte Verschlusszeit)

Etwa 1/3 der Patienten ist resistent !

Aggregationskurve vor und nach ASA-gabe



ASA-Wirkung / Stentthrombose



Modifiziert nach Geisler T, Eur Heart J 2009

Kontrolle der Antikoaguloantientherapie (Heparin, NOAK /Rivaroxaban/)

- Hoch- Molekulargewicht- Heparin

Wirkungsmechanismus: Hemmwirkung gegen Thrombin (hauptsächlich)

Untersuchung: aPTZ (TZ zu empfindlich)

- Niedrig- Molekulargewicht -Heparin, Rivaroxaban

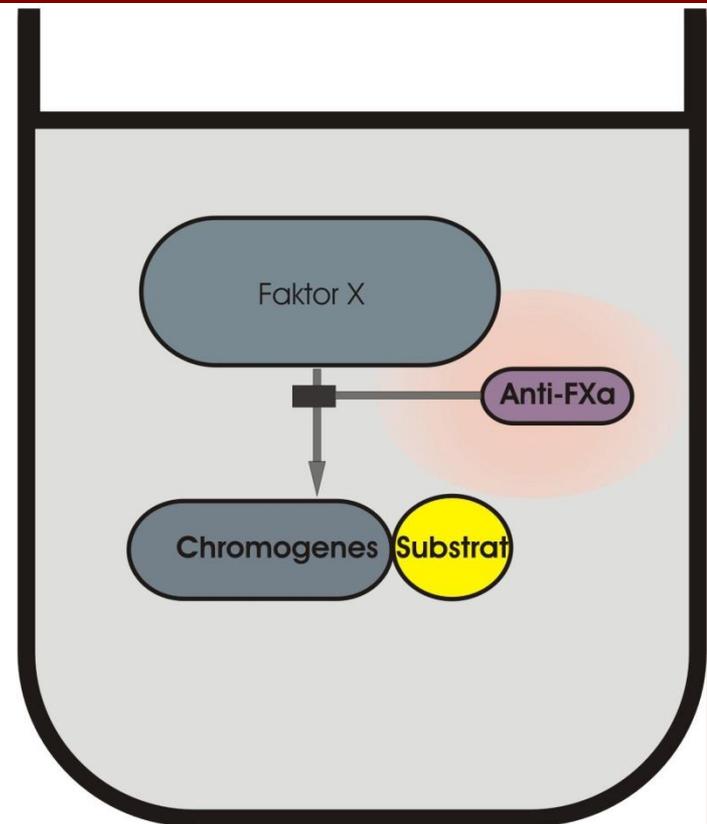
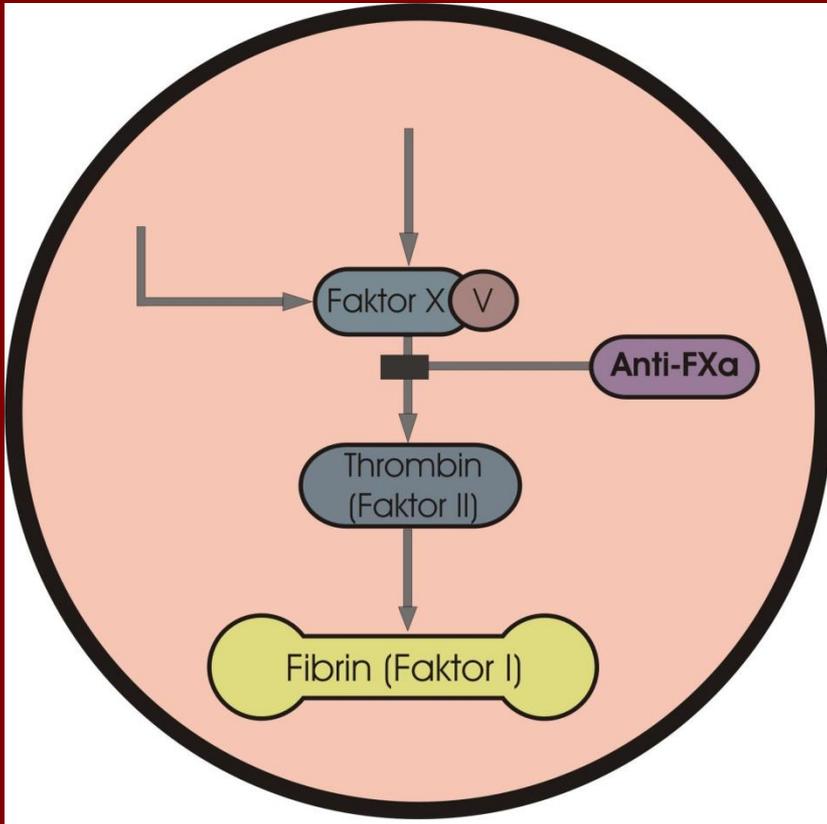
Wirkungsmechanismus: anti- aX Effekt

Untersuchung: anti- aX Aktivität

Bestimmung der Anti-FXa-Aktivität (I.)

Man gibt eine bestimmte Menge Faktor Xa zum Blutplasma des Patienten. Dieser Faktor Xa wird dann von den im Blutplasma befindlichen Hemmstoffen (NMW Heparin) gehemmt. Je mehr Hemmwirkung im Plasma vorhanden ist, desto weniger (ungehemmter) Faktor Xa bleibt übrig. Wie viel Faktor Xa geblieben ist, misst man, indem man einen Stoff (chromogernen Substrat) zusetzt, von dem Faktor Xa einen Farbstoff abspalten kann. Je mehr photometrisch bestimmbarer Farbstoff entsteht, desto mehr Faktor Xa war noch vorhanden.

Bestimmung der Anti-FXa-Aktivität (II.)



Kontrolle der Antikoagulantientherapie (Kumarine)

- Wirkungsmechanismus: Hemmung der Synthese der K-Vitamin dependenten Koagulationsfaktoren (II, VII, IX, X) in der Leber.
- Chemie: Acenocumarol (Syncumar)
4-Hydroxycumarin (Marfarin)
- Anwendung: oral
- Untersuchung: Prothrombin Zeit (PZ, PT)
- Interpretation: Aktivität (% , Verdünnungskurve)
INR (International Normalised Ratio)

INR Berechnungsformel aus der Prothrombinzeit PT:

International Normalized Ratio (INR) Calculation



$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT patient}}{\text{PT normal}} \right)^{\text{ISI}}$$

Erklärung der „Berechnungsformel aus der Prothrombinzeit PT“:

- „ISI“: Internationaler Sensitivitätsindex. Dieser ist für jeden Hersteller oder jede Prothrombinase im Vergleich zu einer international standardisierten Probe festgelegt .
- (Normalerweise zwischen 1,0 und 1,4)

Laboruntersuchung des DIC (I.)

- Diffuse intravaskuläre Gerinnung mit dem Verbrauch von Thrombozyten und verschiedenen Gerinnungsfaktoren, „Verbrauchskoagulopathie“ (mit sekundärer Fibrinolyse).
- Pathomechanismus: kontinuierliche Aktivierung der Gerinnung von verschiedenster Ursachen durch Gewebefaktor und Zytokine.
- Sich änderndes Krankheitsbild (thrombotische und hämorrhagische Symptome) und Laborergebnissen.

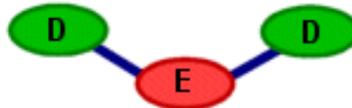
Laboruntersuchung des DIC (II.)

- Untersuchungen
 - Thrombinzeit
 - Thromboplastinzeit (Prothrombinzeit)
 - aktivierte Partielle Thromboplastinzeit
 - D- Dimer Bestimmung
 - Thrombozytenzahl

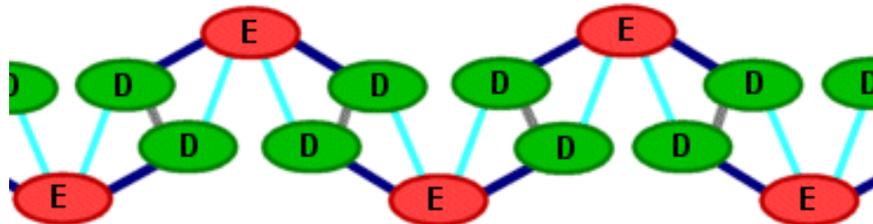
D- Dimer Bestimmung

Schema der D-Dimer Bildung

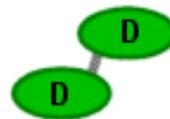
Fibrin-Einzelmolekül besteht aus einem E
und 2 D-Abschnitten:



Bei der Blutgerinnung verbinden sich viele
Fibrin-Einzelmoleküle zu einem Aggregat:



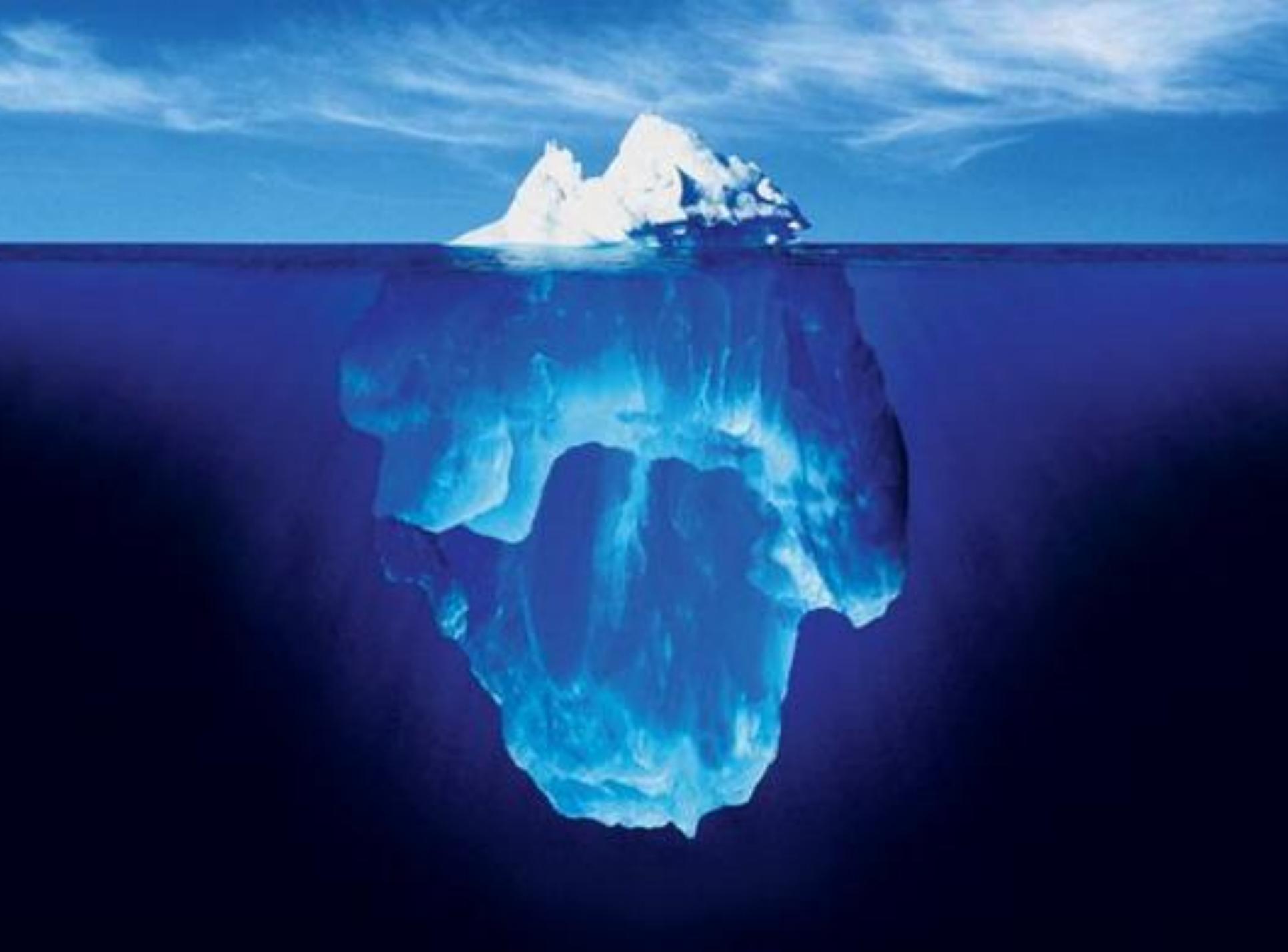
Bei der Auflösung des Gerinnsels entstehen
unter anderem D-Dimere:





D- Dimer Bestimmung

- Indikation:
 - Verdacht auf tiefe-Venenthrombose
 - Verdacht auf PE
 - Verdacht auf DIC
- Methode
 - Agglutination mit spezifischem, monoklonalem Antikörper
- Auswertung: automatisch o. per Augenmass
 - Referenzbereich: methodenabhängig
 - Auswahl der Methode: grosse Sensitivität!



Empfohlene Literatur

Clinical Hematology 6. Ed.

Mary Lou Turgeon

Wolters Kluwer 09. 03. 2017

Wintrobe's Clinical Hematology 14. Ed.

Autoren

Wolters Kluwer 28. 11. 2018

Ich bedanke mich für Ihre
Aufmerksamkeit!