

Hemosztázis laboratóriumi vizsgálata

Kristóf Katalin

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet,
Mikrobiológiai Laboratórium

Hemosztázis vizsgálata

- Anamnézis (egyéni és családi anamnézis, örökletes defektus kiderítése, hemosztázisra ható gyógyszerek ismerete)
- Fizikális vizsgálat (petechia, szuffúzió, hematóma)
- Vérerek állapotának vizsgálata
- Laboratóriumi vizsgálatok

Mikor kérjük?

- Műtét előtti - preoperatív - kivizsgálás
- Műtét közbeni - perioperatív - vizsgálatok
- Antikoaguláns ill. fibrinolitikus terápia ellenőrzése
- Vérzékenységi hajlamok
- DIC
- Trombózis hajlam
- Májbetegségek diagnosztikája

Hemosztázis szűrőtesztjei

Vérzékenységnek celluláris, humorális, vagy vaszkuláris okai lehetnek => szűrőtesztek, majd részletes kivizsgálások

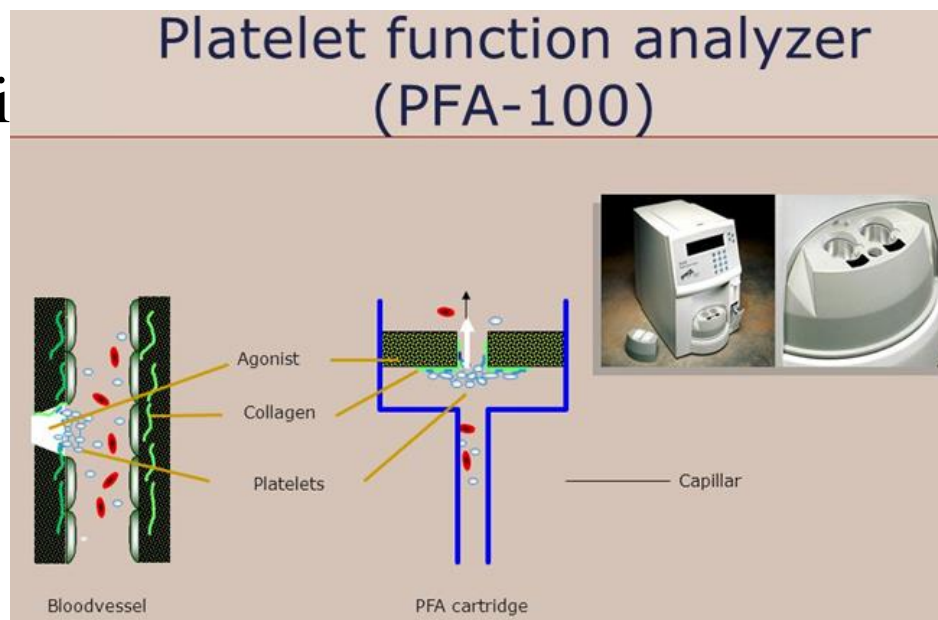
Celluláris: **Trombocita-szám,-funkciózavarok**; trombopátiák kivizsgálása

Vérzési idő: trombocitafunkciós zavarok alapvizsgálata

- Ivy módszer –

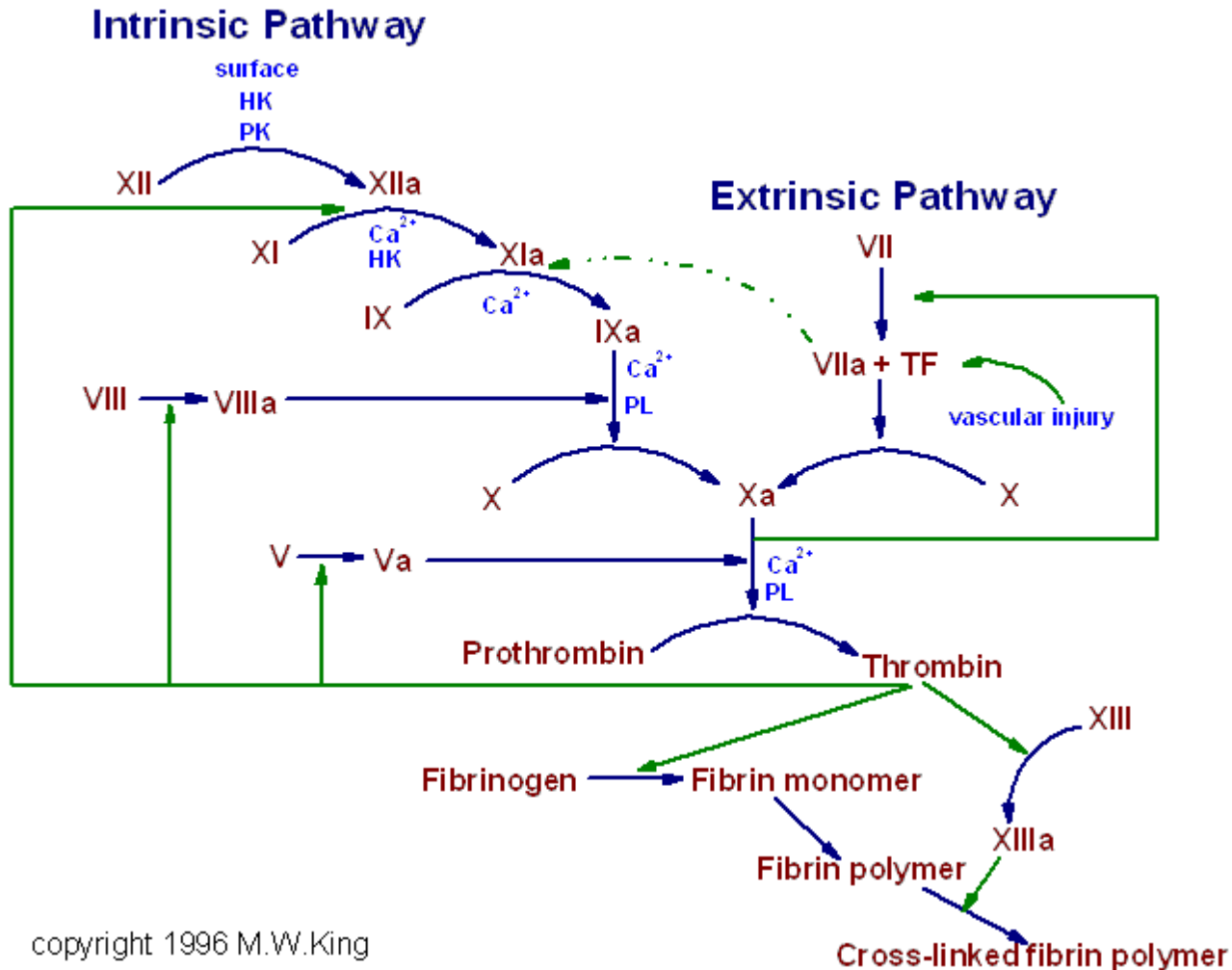
Referenciatartomány: 2,5- 9 perc

- PFA-100 „célkészülék”



- Enyhe funkciós zavarra a kollagén/adrenalin membrán záródás nyúlik meg
- Jelentős defektus esetén mindkét mérőcella esetén
- (THR <150 G/L ill. >500 G/L; 0,3 alatti Htk.nál ne!)

Koagulopátiák szűrőtesztjei



copyright 1996 M.W.King

- **Protrombin idő (PI)**
- **Aktivált parciális tromboplastin idő (APTI)**
- **Trombin idő (TI)**

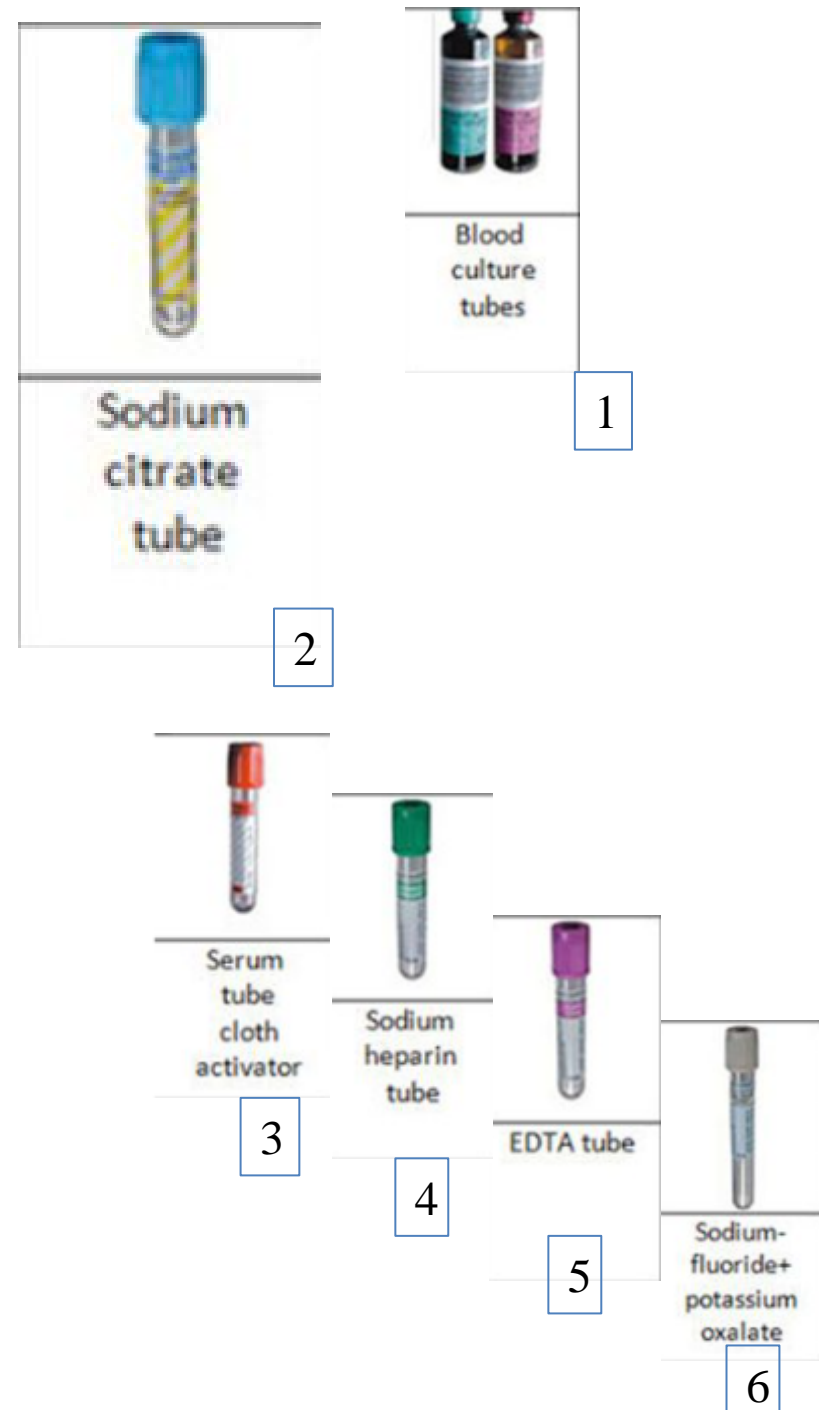
Preanalitika

VÉRVÉTELI CSŐ: világoskék kupakos műanyag cső

pufferolt trinátrium–citrátot tartalmaz (0,11 mol/l ~ 3,2 % vagy 0,13 mol/l ~ 3,8%).

A vér:citrát arány 9:1!

VÉRVÉTEL után csőfordítás 8-10-szer, óvatosan, azonnal.



Preanalitika

Mit lehet elrontani?

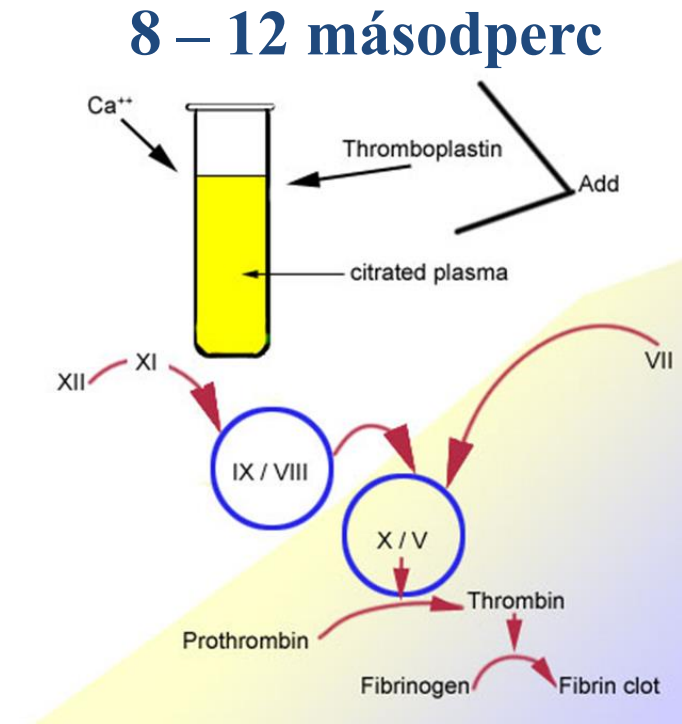
- a gyors aspirációs technika a koaguláció aktiválódásához, haemolysishez vezet
- VÉR/CITRÁT ARÁNY ELTOLÓDÁSA
 - citrát túlsúly => a túlzott kalcium ion megkötés miatt az alvadási idő megnyúlik
 - Kifejezett hemo-koncentráció v. polycythaemia: a plazma arányának csökkenése miatt - relatív citrát túlsúly!
- STABILITÁS: legfeljebb 2 h szobahőn
- HAEMOLYSIS, LIPAEMIA: módszertől függően zavarhat

Laborban: Mintavételt követően centrifugálás: 10 perc 2500g, trombocytaszegény plazma nyerése céljából

- a plazma stabil 18-25 °C-on
 - PI 8h,
 - APTI 4h –heparin terápia esetén 2h,
 - D-Dimer 8h....

Protrombin idő (PI)

- A módszert Quick és mtsai 1935-ben dolgozták ki.
- A szöveti tromboplastinnak a vizsgálandó vérplazmához adása és az alvadék kialakulása között mért idő **másodpercben**.
- Az extrinsic és a közös út vizsgálata.
- A szöveti tromboplastin (fehérjerész és foszfolipidet tartalmaz), a FVII aktivátora, majd a FVIIa az extrinsic alvadásban részt vevő egyéb faktorok (X, V, II) aktiválásán keresztül vezet a fibrinogénből → a fibrin alvadék kialakulásához.



Reagens/mérőkészülék-függés miatt egészségesek értékeihez viszonyítás:

- Quick-százalék, protrombin-aktivitás (80-120%)
- Protrombin-ráta (PR):Beteg/normál (0,85-1,15)

INR (international normalized ratio)

- A protrombin idő olyan kifejezési formája, ami standardizálja a különböző tromboplastinok eltérő kumarin érzékenységéből adódó különbségeket a stabilan beállított antikoagulált betegek esetén.
- **INR = (Beteg PI / Kontroll PI) ^{ISI}**
 - ISI = International Sensitivity Index
 - a reagensen kötelezően feltüntetendő érzékenységi mutatószám, amely a tromboplastin reagens-érzékenysége a WHO referencia készítményhez viszonyítva
- Pl.
 - Beteg PI:18,6 sec; standard plazma PI:12,0 sec => PR:18,6/12=1,55
 - Teszt ISI:1,25 => INR:1,73

Referenciatartomány: 0,9-1,1

Keveréses vizsgálat

Szélsőségesen megnyúlt alvadási idő

Oka:

- alvadási tényező hiánya
- vagy inhibitor jelenléte

Módszer: normál plazma + beteg plazma 1:1 arányú keverése

Normalizálódik => Faktorhiány esetén (FII, FV, FVII, FX)

⇒ Egyedi faktormeghatározások indokoltak

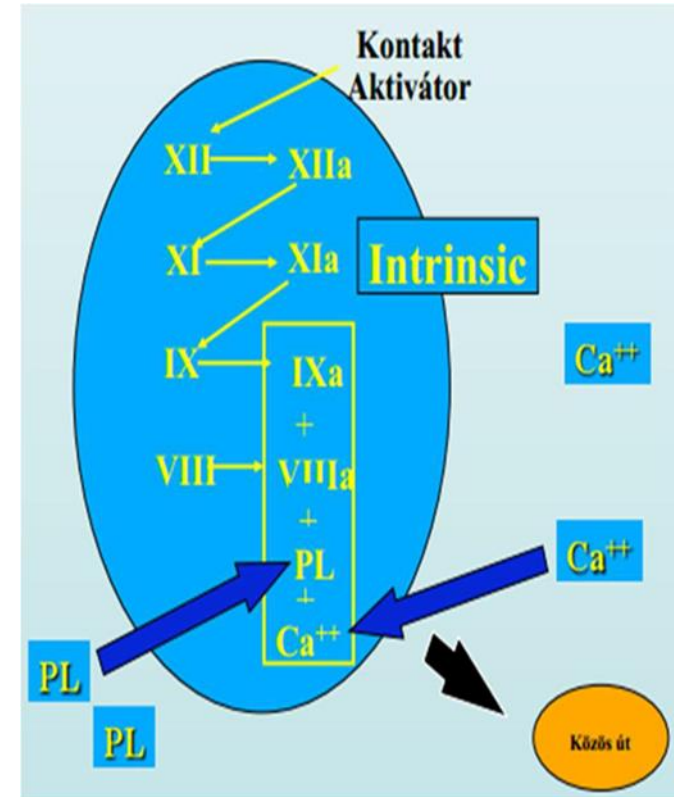
Nem normalizálódik (pl. Ha a normál plazma és a beteg plazma keverése (1:1) csak az ellenanyag 1:2 hígítását eredményezi)

Ellenanyag jelenlétében

- Lupus antikoaguláns
- heparin
- Specifikus faktorelles gátlótestek
- induló Syncumar kezelés
- Fibrin/fibrinogén degradációs termékek

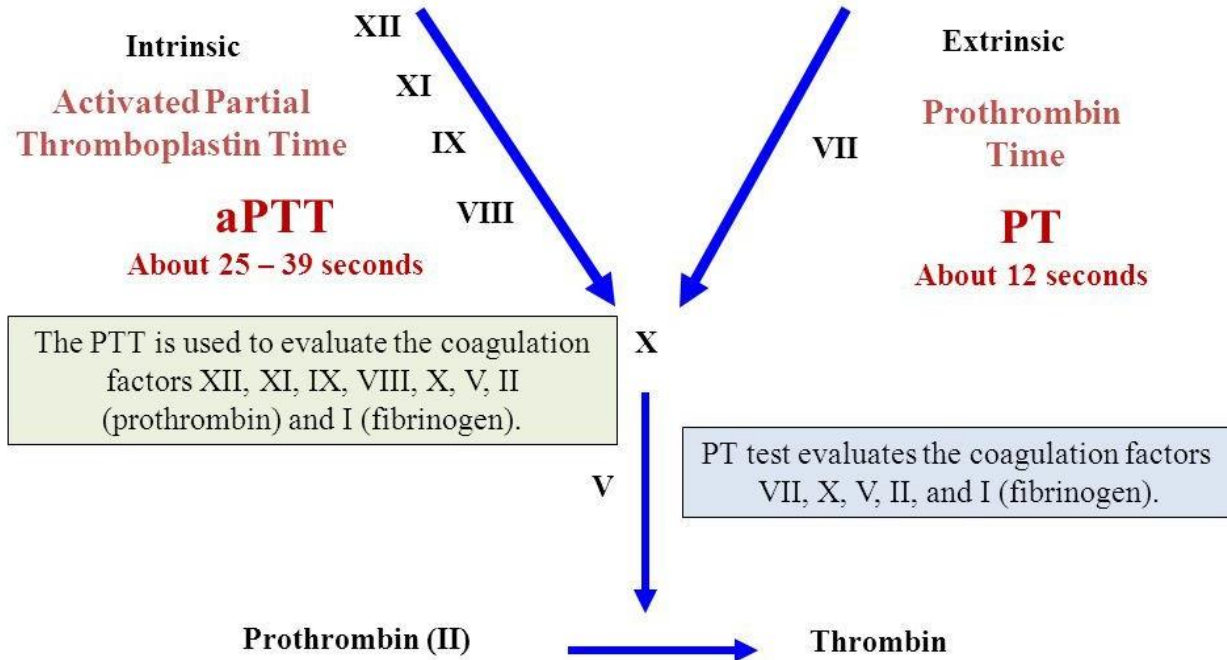
Aktivált parciális tromboplastin idő (APTI)

- „Aktivált” => a véralvadás aktiválódásának gyorsítása
 - Aktivátorok negatív felszíni töltést adnak pl. szilika, kaolin, zeolit (partikulált), ellagsav (folyékony)
 - Az előinkubáció (2-3perc) alatt aktiválódik a FXII és a FXI
- „Parciális tromboplastin”:
 - Van az aktivált trombociták membránját helyettesítő foszfolipid
 - Nincs szöveti faktor
 - tromboplastin hiányában a foszfolipid és a Ca^{2+} -ion hatására is bekövetkezik in vitro a véralvadás, csak lassabban



Aktivált parciális tromboplastin idő (APTI)- Referenciatartomány: 25- 40 másodperc (reagens-függő)

Tests of Clotting Pathway



- Az APTI a negatív felszíni töltést biztosító kontakt aktivátor, valamint a foszfolipid és a vizsgálandó plazma együttes inkubálása után a Ca^{2+} -ion hozzáadásától az alvadék megjelenéséig mért idő secundumban.
- **Az intrinsic és a közös út vizsgálata** (HMWK, PK, FXII, FXI, FX, FIX, FVIII, FV, FII, fibrinogén).

Aktivált parciális tromboplastin idő (APTI)-

Mikor informatív:

- Hagyományos (nem frakcionált, nagy molekulatömegű) heparinterápia nyomonkövetése
- Klasszikus hemofiliák
- Diszfibrinogénémia
- Kongenitális hipofibrinogénémia
- DIC
- Alvadási faktorok ellen termelt autoantitestek diagnózisa

„Megnyúlt”: kontrollhoz képest 8-10 másodperccel hosszabb

⇒Keveréses teszt

⇒Ha korrigált érték=> faktorhiány (FVIII, FIX)

⇒Ha nem, akkor inhibitor (heparin, LA)

•

Trombin idő (TI)

Referenciatartomány: 14-18 másodperc (reagensfüggő)



- A trombin hozzáadása és annak hatására a vizsgálandó plazmában keletkező fibrinalvadék megjelenése között eltelt idő sec.-ban.
- A fibrinogén → fibrin átalakulás sebességét tükrözi.
- **„Kóros” érték:**
 - Elhasználódás pl. DIC
 - Diszfibrinogénémia
 - Csökkent fibrinogénszintézis (pl. májbet.)
 - Trombolitikus kezelés

„Keveréses” vizsgálat:

- korrigálható=> alacsony fibrinogénszint
- Nem korrigálható
 - => heparin, hirudin (reptiláz-idő norm.)
 - => fibrindegradációs termékek, egyéb gátlóanyagok (reptiláz-idő is megnyúlt)

„Reptiláz-idő”: kígyóméreggel (batroxobin) trombinidő mérése

- Más helyen hasítja a fibrinogént, így heparin és hirudin esetén norm. lesz

A PI, APTI és TI alaptersztek értékelési sémája

PI	APTI	TI	lehetséges, gyakori ok
megnyúlt	norm	norm	kumarinterápia kezdete
			FVII hiány
norm	megnyúlt	norm	FVIII-, FIX-, FXI-, FXII-hiány, Lupus anticoagulans, LMW-heparin kezelés
norm	norm	megnyúlt	alacsony fibrinogénszint, mérsékelt heparinszennyeződés
megnyúlt	megnyúlt	norm	Szerzett koagulopátia, K-vitamin hiány, FII-, FV-, FX-hiány vagy gátlás
norm	megnyúlt	megnyúlt	Hagyományos heparin terápia
megnyúlt	megnyúlt	megnyúlt	DIC, súlyos májbetegség, heparinnal levett vérminta

Antikoaguláns terápia követésére használt tesztek

- **Orális antikoaguláns terápia (Syncumar, warfarin): INR (célérték: 2-3, mechanikus műbillentyű esetén:3-4.)**
 - Először hetente, majd havonta
- **Konvencionális heparin terápia: APTI (célérték: 1,5-2,5 –szeres megnyúlás)**
 - 1 órával az infúzió elindítását követően
 - Subcutan adagolás esetén 4-6 h múlva
 - ! Heparin indukálta trombocitopénia lehetősége miatt 2-3 naponta THR szám ellenőrzés
- **Kis molekulatömegű (frakcionált) heparin terápia: anti-FXa (X faktor gátlási teszt)**
 - Ált. nem szükséges kontrollálni
 - Váratlan vérzésnél
 - Veseelégtelen betegnél a kezelés kezdetekor
 - Mélyvénás trombózis kezelésekor az aluldozírozás elkerülésére
 - !THR szám ellenőrzés
- **Heparinról warfarinra való átállás: PI, APTI** mérése 36-48 órával az első dózis beadása után, majd két naponta, amíg a PI nem kerül a terápiás tartományba

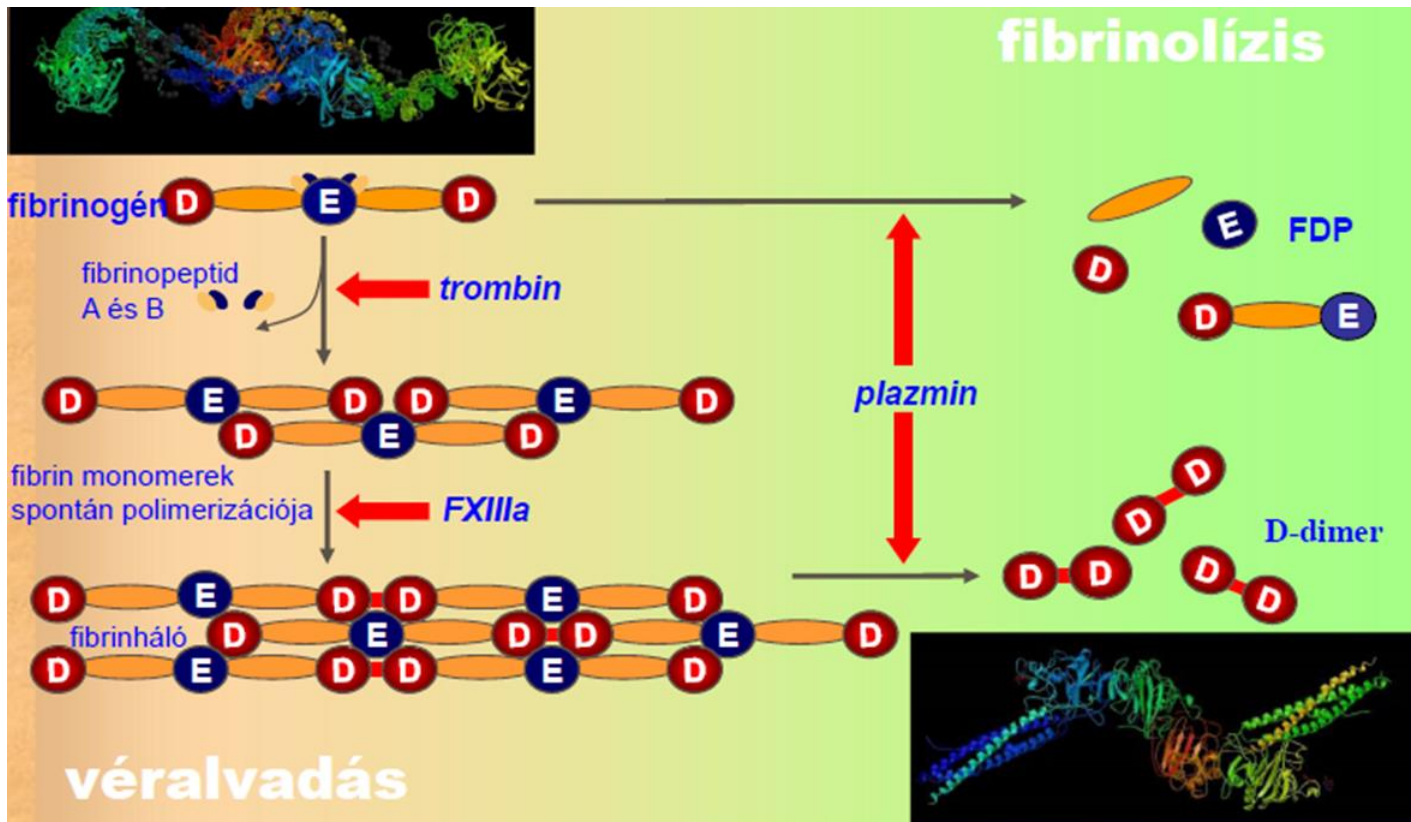
Fibrinolitikus terápia ellenőrzése

Terápia előtti szűrőtesztek! (lítikus állapot megítélése TI)

AMI bolus terápiát követő rövid infúziós trombolízisben a heparin akkor indul, ha a fibrinogén mérhetővé válik

Fibrinogén

- Komplex, szimmetrikus, 340 kD glikoprotein
- Három pár láncból áll ($A\alpha$, $B\beta$, γ), amelyeket diszulfid hidak kötnek össze.
- Trombin hatására alakul át fibrinné.



Fibrinogén

Referenciatartomány: 1,5-4 g/L

Meghatározás a Clauss módszer szerint:

- Módosított trombin idő mérés: magas trombin koncentráció esetén hígított plazmában az alvadási idő csak a fibrinogén koncentrációtól függ
- a vizsgálandó plazma 1:9 arányú hígítása következtében a fiziológiásan jelenlévő alvadási inhibitorok hatása elhanyagolható.
- Indirekt módon a fibrinogén funkcióképességéről is ad felvilágosítást

Csökkenet:

- Csökkent képzés (pl. májcirrhosis)
- Fokozott felhasználás:
 - Sokk
 - Primer és szekunder fibrinolízis
 - DIC

Vérzés: <0,5 g/L

Emelkedett: ilyenkor

akutfázis-fehérje!

- súlyos infekció
- trombózis
- AMI

Hiperviskozitást okoz,
növelve az okkluzív artériás
betegségek rizikóját!

D-dimer

Referenciatartomány: < 0,5 mg/L

A D-dimer a keresztkötött fibrin degradációs produktuma (2 db keresztkötött D - fragmentum)

Mérése: kvantitatív módszerrel - immunturbidimetria

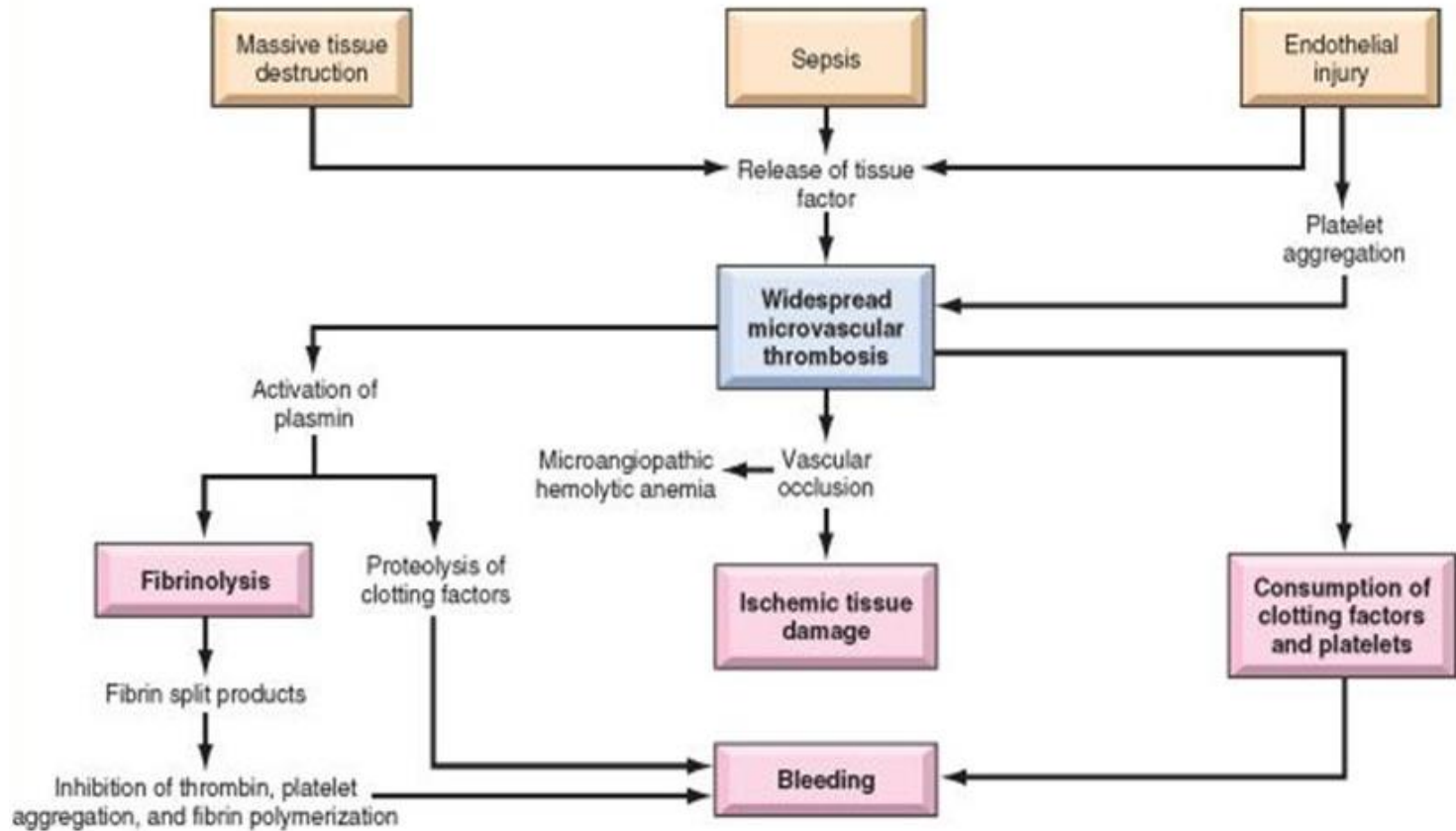
Fokozott D-dimer képződéssel járó állapotok:

- Fiziológiás: életkor (70 év felett), terhesség
- Patológiás: DIC, AMI, MVT, PE, artériás trombózis, májbetegség, műtét, súlyos fertőzés, malignus tumor, haematoma ...esetén
- Terápiás: thrombolysis
- Álpozitív: > 50 IU/ml rheumatoid faktor jelenlétekor
- Álnegatív: erősen lipaemias plazma esetén

Negatív prediktív értéke jó!

Mélyvénás trombózis és pulmonalis trombózis 0,5 mg/L alatt nagy biztonsággal kizárható

DIC panel



Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed.

Fertőzések, daganatok, szerzett vagy veleszületett vaszkuláris rendellenességek, szülészeti komplikációk, transzfúziós reakciók, trauma, kígyóméreg...

DIC panel

Trombocitaszám

PI (főleg FV)

APTI (FVIII, FV)

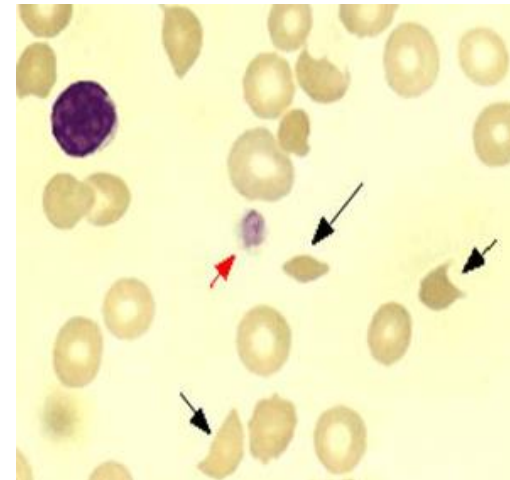
TI (FDP, fibrinogén ↓)

Fibrin monomer teszt (latex v. immunológiai teszt)

Fibrinogén/fibrin degradációs termékek kimutatása
(FDP-teszt, D-dimer teszt)

Vérkenet: fragmentociták

Naponta többször!



Speciális hemosztázis vizsgálatok – alvadási faktorok

Aktivitás meghatározás egyfázisú alvadási teszttel

- a plazmát a vizsgálandó faktorra nézve hiányplazmával (amely a vizsgált faktort nem tartalmazza, a többi alvadási faktor cc-ja 100%) hígítjuk.
- az alvadási idő a mintában lévő vizsgálandó alvadási faktor aktivitásától függ.
- az aktivitást normál plazma hígításával nyert kalibrációs görbe alapján értékeljük.
- APTI alapú: FVIII, FIX, FX, FXI, FXII
- PI alapú: FVII
- APTI/PI: FII, FV, FX



Severe systemic cytomegalovirus infection in an immunocompetent patient outside the intensive care unit: a case report

[Giovanni Carpani](#)¹ [Sergio Foresti](#)² [Raffaella Dell'Oro](#)¹ [Guido Grassi](#)¹ and [Michele Bombelli](#)¹

Anamnézis:

83 éves férfi

Krónikus ischaemiás szívbetegség, 2001-ben mitrális műbillentyű

Pitvar fibrillációk, artériás hipertenzió, krónikus cerebrovascularis betegség, lábakban perifériás arteriosclerosis, COPD, krónikus vesebetegség, gyomorfekély miatt rezekció, cholecystectomy 2009-ben, benignus prostata hiperplázia, pár hónapja bakteriális tüdőgyulladás

Orális antikoaguláns terápia rutin ellenőrzése:

Protrombin idő: 22,48 sec => belgyógyászatra utalják

Severe systemic cytomegalovirus infection in an immunocompetent patient outside the intensive care unit: a case report

Giovanni Carpani,¹ Sergio Foresti,² Raffaella Dell'Oro,¹ Guido Grassi,¹ and Michele Bombelli¹

Protrombin idő: 22,48

Májfunkció rendben

CRP: 12,54 mg/dl (nálunk mg/L)

Normál leukocytaszám és normál neutrophil szám; mérsékelt lymphopenia (860/mm³) és monocytosis (1040/mm³)

Akut veseelégtelenség: creatinin 1.7 mg/dl (nálunk umol/L! ref. 60-120)

Laktát normális

Anamnézis kiegészítése: korábbi lázas állapotok (39 °C), hasmenés, hányás

Mikrobiológiai vizsgálatok indulnak

Dg. Gastroenteritis, dehidráció, orális antikoaguláns akkumuláció

Th: metronidazol+piperacillin-tazobactam, K vitamin

Severe systemic cytomegalovirus infection in an immunocompetent patient outside the intensive care unit: a case report

[Giovanni Carpani](#)^{✉1} [Sergio Foresti](#)² [Raffaella Dell'Oro](#)¹ [Guido Grassi](#)¹ and [Michele Bombelli](#)¹

Átmeneti javulás: láztalan, CRP 5,11 mg/dl

Székrekedésből hasmenés

Újra állapotromlás

Mikrobiológiai eredmények: minden negatív, kivéve

CMV DNS teszt pozitív: 57,679 kópia/ml

Dg.: HA pneumónia

Th.: ganciklovir

Meggyógyult

Routine coagulation test abnormalities caused by rivaroxaban

A case report

Zikai Song, PhD, Haidi Wu, MD, Hongyan Cao, MD, Shuo Yang, BA, Minglong Tang, BA, and Ling Qin, PhD*

Monitoring Editor: NA.

Esetismertetés

- 88 éves ff. beteg
- Kamrafibrillációs panaszok évek óta, jelenleg mellkas-fájdalom, egyre romló nehézlégzés

Results	On admission	4th day after treatment	7th day after treatment	2th day after discontinuation	Reference range
Heart rate, beats/min	124	90	92	98	–
eGFR, mL/min	46.7	46.1	45.4	44.0	–
D-Dimer, pg/mL	>20	3.55	2.83	–	<0.50
NT-proBNP, pg/mL	6223.00	–	6491.00	6104.00	<450.00
PaO ₂ , mmHg	53.1	50.5	61.1	62.0	80.0–100.0

eGFR=estimated glomerular filtration rate, NT-proBNP=N-terminal pro-brain natriuretic peptide, PaO₂=partial pressure of oxygen.

- Nem volt eltérés: THR, PI, APTI, elektrolitok, májfunkció, kardiális troponin-T
 - Képkötő: mélyvénás trombózis + tüdőembólia
- ⇒ Per os rivaroxaban 20mg/nap

Rivaroxaban

- Nem K vitamin antagonistá orális antikoaguláns (Xa faktor inhibitor) (Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant (NOAC))
- Stroke prevencióra ajánlás:
 - Pitvarfibrilláció (nem billentyű eredetű)
- Vénás tromboembólia prevenció és terápia
- Mélyvénás trombózis prevencióra térd-, csípőízületi műtét után

Rutin monitorozása nem szükséges

Gyorsabb hatás, kevesebb mellékhatás, gyógyszerinterakció, mint a K vitamin antagonistáknak

Európai Kardiológiai Társaság ajánlásában elsőként választandó

Routine coagulation test abnormalities caused by rivaroxaban

A case report

Zikai Song, PhD, Haidi Wu, MD, Hongyan Cao, MD, Shuo Yang, BA, Minglong Tang, BA, and Ling Qin, PhD*

Monitoring Editor: NA.

Results	On admission	4th day after treatment	7th day after treatment	2th day after discontinuation	Reference range
Heart rate, beats/min	124	90	92	98	–
eGFR, mL/min	46.7	46.1	45.4	44.0	–
D-Dimer, pg/mL	>20	3.55	2.83	–	<0.50
NT-proBNP, pg/mL	6223.00	–	6491.00	6104.00	<450.00
PaO ₂ , mmHg	53.1	50.5	61.1	62.0	80.0–100.0

eGFR = estimated glomerular filtration rate, NT-proBNP = N-terminal pro-brain natriuretic peptide, PaO₂ = partial pressure of oxygen.

Table 2

Serial coagulation studies.

	PT, second	aPTT, second
Reference range	11.0–15.0	28.0–42.5
On admission	14.8	37.6
4th day after treatment	16.2	40.2
7th day after treatment	>120	174.0
8th day after treatment	>120	178.8
9th day after treatment	>120	176.5

aPTT = activated partial thromboplastin time, PT = prothrombin time.

- 7. napon véres széklet!
- Leállították a szert, vért kapott, Hgb sikerült kontrollálni
- De a koagulációs értékeket nem
- 10. napon szívelégtelenségben hirtelen elhunyt

Interference of M-protein on prothrombin time test – case report

Sandra Margetić¹, Ivana Čelap*¹, Lora Dukić¹, Ines Vukasović¹, Lucija Virović-Jukić²

¹Clinical Institute of Chemistry, Medical School University Hospital Sestre milosrdnice, Zagreb, Croatia

²University Department of Internal Medicine, Medical School University Hospital Sestre milosrdnice, Zagreb, Croatia

Biochemia Medica 2016;26(2):248–54

88 éves ff. SBO-ra érkezik

Panaszai: általános gyengeség, elmúlt 10 napban orrfújáskor vérzés

Gyógyszerei: magas vérnyomás miatt ramipril/hydrochlorotiazide

Nem szed semmilyen antikoagulánst!

Laboratóriumi vizsgálatok:

Szérumból: Nem tudták mérni, mert ismételt cf. után is magas viszkozitás (“aspiration error”)

Koagulációs teszt: mérhetetlenül megnyúlt PI (<7%); APTI norm. (24 s, ratio 0,8)

???

- Túlzott K-vitamin antagonistá antikoaguláns
- Hibás mintavétel
- Endogén interferencia: Hemolízis, hiperbilirubinémia, lipémia
- Monoklonális proteinek (M-protein)
 - Magas viszkozitás, reagensekkel való összecsapódás...

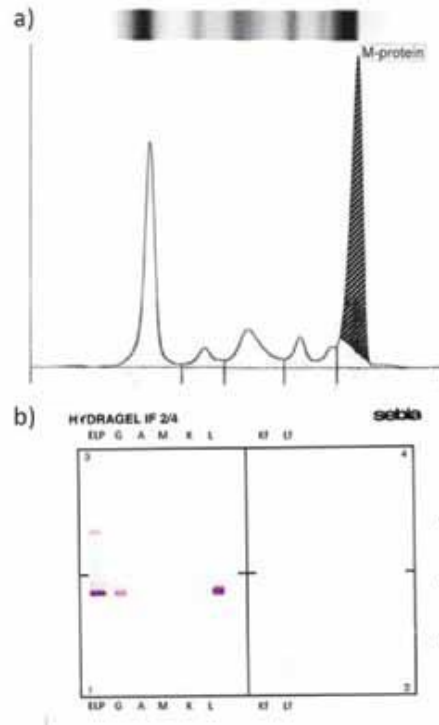
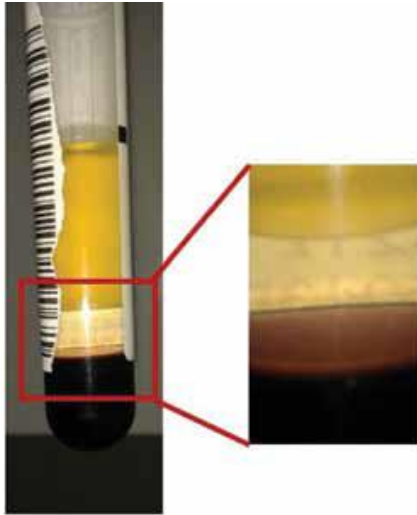
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 3*	Sample 4	Sample 5	Reference range
Sampling date and time	June 2 nd at 15 pm	June 2 nd at 16 pm	June 2 nd at 23 pm after intravenous vitamin K administration	June 2 nd at 23 pm and stored at 4 °C overnight	June 3 rd at 06:30 am	June 3 rd at 06:30 am and incubated at 37 °C for 30 minutes	
Prothrombin time (PT) (%)	< 7	< 7	< 7	55	< 7	< 7	≥ 70
PT mix test with normal plasma (1+1) (%)	NP	NP	NP	NP	67	NP	NA
APTT (s, ratio)	24 (0.8)	25 (0.90)	27 (1.0)	25 (0.90)	29 (1.0)	25 (0.9)	23–32 (0.8–1.2)
Fibrinogen (g/L)	NP	< 0.8	NP	3.1	< 0.8	< 0.8	1.8–3.5
TT (s)	NP	107	NP	56.3	97.4	112	14–21
FII (%)	NP	NP	NP	139	118	NP	70–120
FV (%)	NP	NP	NP	154	129	NP	70–140
FVII (%)	NP	NP	NP	148	151	NP	70–120
FX (%)	NP	NP	NP	185	210	NP	70–120

Sample 3* represents sample 3 which was refrigerated until next morning when PT, aPTT, fibrinogen, TT and FII, FV, FVII and FX activities were performed in plasma layer separated from visible precipitate. The results obtained in sample 3* were not reported to the clinician due to unmet pre-analytical requirements for coagulation testing.

APTT – activated partial thromboplastin time, TT – thrombin time, NP - not performed, NA – not applicable.

K-vitamin adása, majd ismételt vérvétel..

Mérhetetlen PI, fibrinogén, megnyúlt TI



Total proteins	123 g/l (66 - 81)		A/G: 0,46 (0,80 - 2,00)	
	%	Ref. int. %	g/L	Ref. int. g/L
Albumin	31,4	55,8 - 66,1	38,6	40,2 - 47,6
Alpha 1	4,0	2,9 - 4,9	4,9	2,1 - 3,5
Alpha 2	11,6	7,1 - 11,8	14,3	5,1 - 8,5
Beta	8,1	8,4 - 13,1	10,0	6,0 - 9,4
Gamma	44,9	11,1 - 18,8	55,2	8,0 - 13,5
M-protein	38,3		47,1	

IgG- λ M-protein jelenléte

⇒ Monoclonalis gammopatia

- Csökkent Ig szekréció, sérült vérképzés, anémia, alvadászavarok, osteolitikus csontléziók, hiperkalcémia, vesekárosodás
- Hemosztázis zavara: trombotikus vagy hemorrágiás
 - Faktor deficiencia amyloid adszorpció miatt
 - M protein gátolja a koagulációs faktorokat
 - **Fibrin monomerek polimerizációja sérül**
 - Vérzés fellépése függ az M-protein cc.tól (nincs mindig)
- PI, APTI, TI kóros lehet