

TRADICIONÁLIS LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKA



DR. ÓNODY RITA
SZTE ÁOK LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET

2013.09.20.

A hemosztázis vizsgálata

Összetett, több lépcsős folyamat:

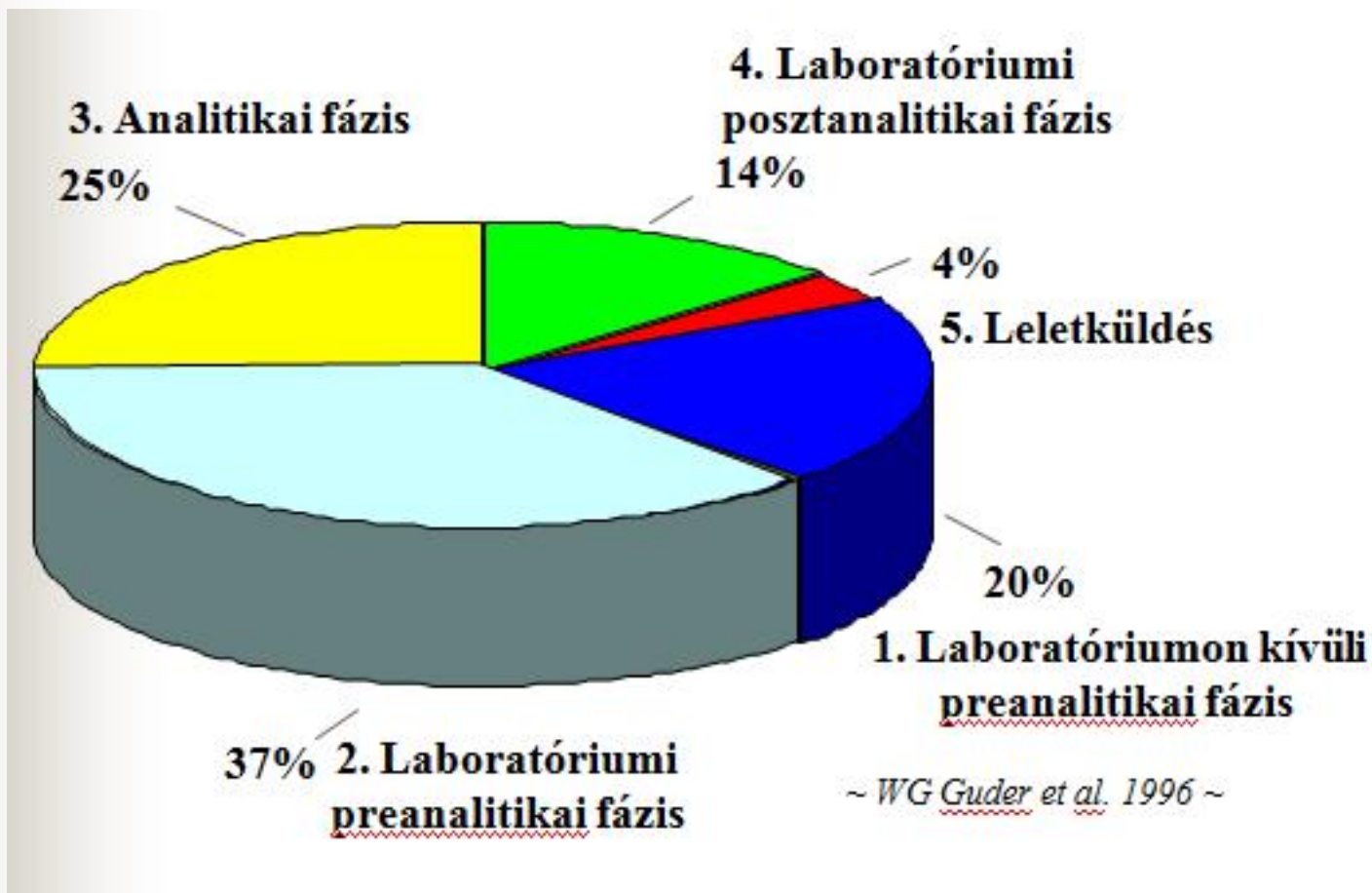
- Anamnézis (egyéni és családi anamnézis, örökletes defektus kiderítése, hemosztázisra ható gyógyszerek ismerete)
- Fizikális vizsgálat
- Vérerek állapotának vizsgálata
- Laboratóriumi vizsgálatok

A hemosztázis vizsgálata

Indikációi:

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

Diagnosztikai folyamatok



Preanalitika

A véralvadási vizsgálatokat befolyásoló tényezők

VÉRVÉTELI CSŐ: világoskék kupakos műanyag v. szilikonizált üveg kémcső, pufferolt trinátrium–citrátot tartalmaz (0,11 mol/l ~ 3,2 % vagy 0,13 mol/l ~ 3,8%). A vér:citrát arány 9:1!

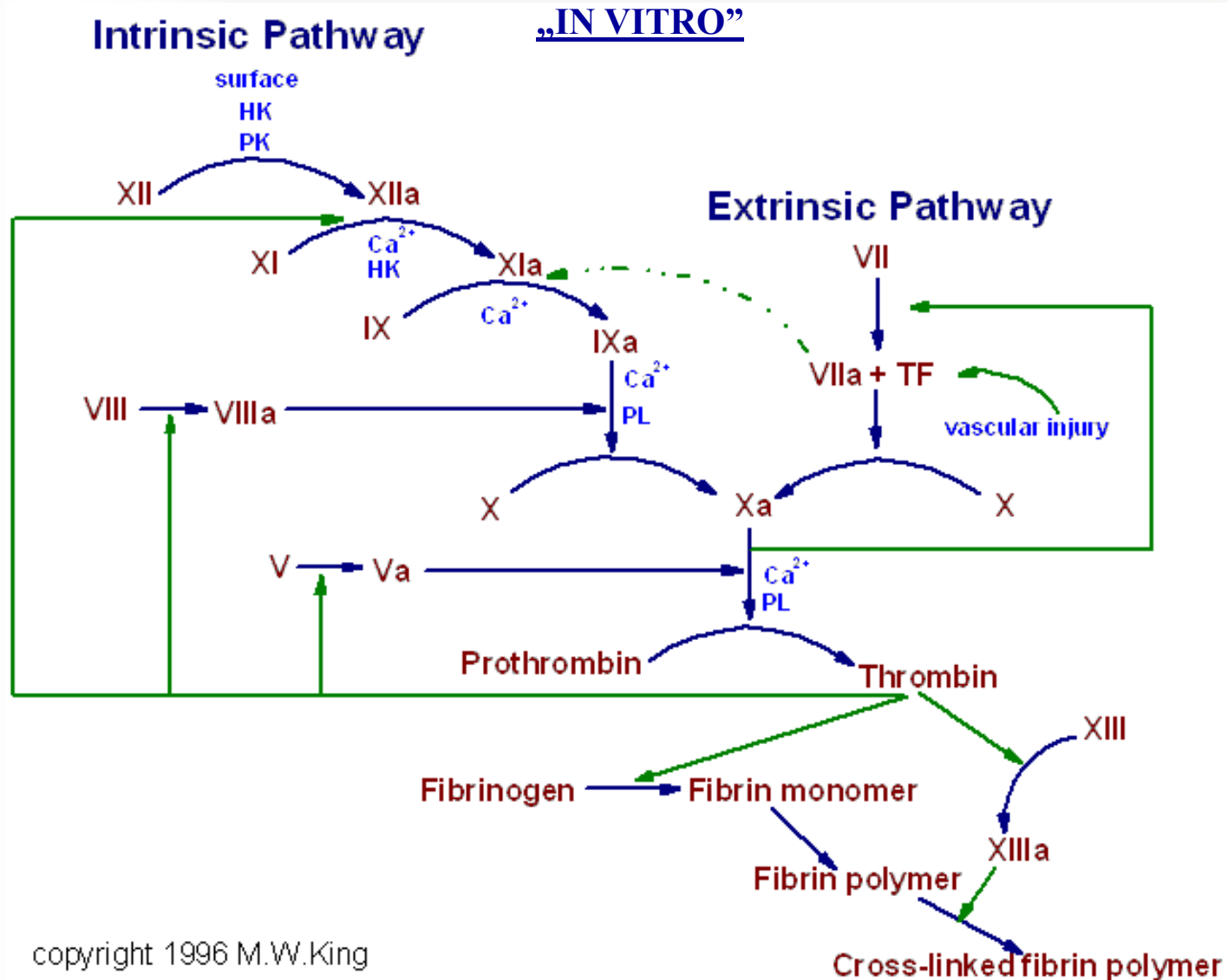
VÉRVÉTEL MÓDJA: a gyors aspirációs technika a koaguláció aktiválódásához, haemolysishez vezet. Csőfordítás 8-10-szer, óvatosan, azonnal a mintavétel után.

VÉR/CITRÁT ARÁNY ELTOLÓDÁSA: citrát túlsúly: a túlzott kalciumion megkötés miatt az alvadási idő megnyúlik. A kifejezett hemokoncentráció v. polycytaemia: a plazma arányának csökkenése miatt - relatív citrát túlsúly.

HAEMOLYSIS, LIPAEMIA: módszertől függően zavar.

STABILITÁS: a mintavételt követően centrifugálás, 10 perc 2500g, trombocita szegény plazma nyérése céljából: a plazma stabil 18-25 °C-on PI 8h, APTI 4h – heparin terápia esetén 2h, QD-Dimer 8h....

A véralvadási kaszkád



copyright 1996 M.W.King

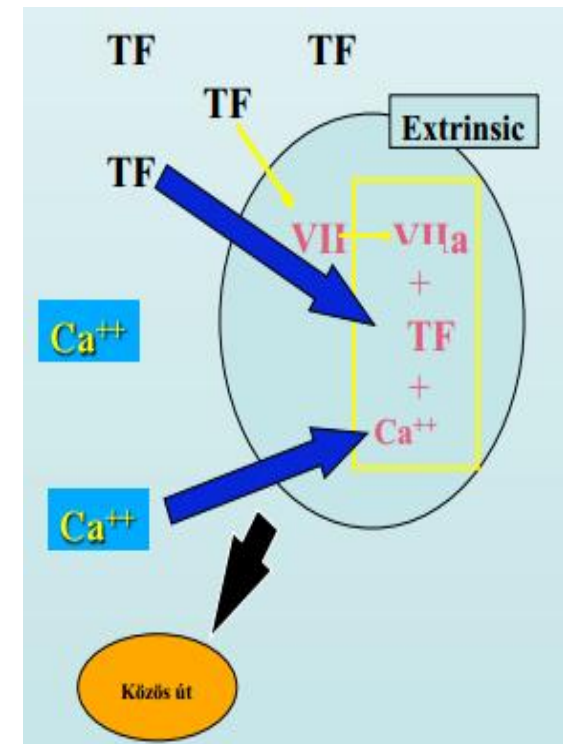
PK: prekallikrein PL: phospholipids HK: HMW Kininogen

Koagulopátiák szűrőtesztjei

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

Protrombin idő (PI)

- A módszert Quick és mtsai 1935-ben dolgozták ki.
- A PI a szöveti tromboplasztin vizsgálándó vérplazmához adása és az alvadék kialakulása között mért idő sec.-ban.
- Az extrinsic és a közös út vizsgálata.
- A szöveti tromboplasztin, amely fehérjerészt 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.



Protrombin idő kifejezési formái

1. Másodperc

2. INR = International Normalized Ratio

Mi az INR?

■ A protrombin idő olyan kifejezési formája, ami standardizálja a különböző tromboplasztinok eltérő kumarin érzékenységből adódó különbségeket a stabilan beállított antikoagulált betegek esetén.

$$\text{INR} = (\text{Beteg PI} / \text{Kontroll PI})^{\text{ISI}}$$

ISI = International Sensitivity Index

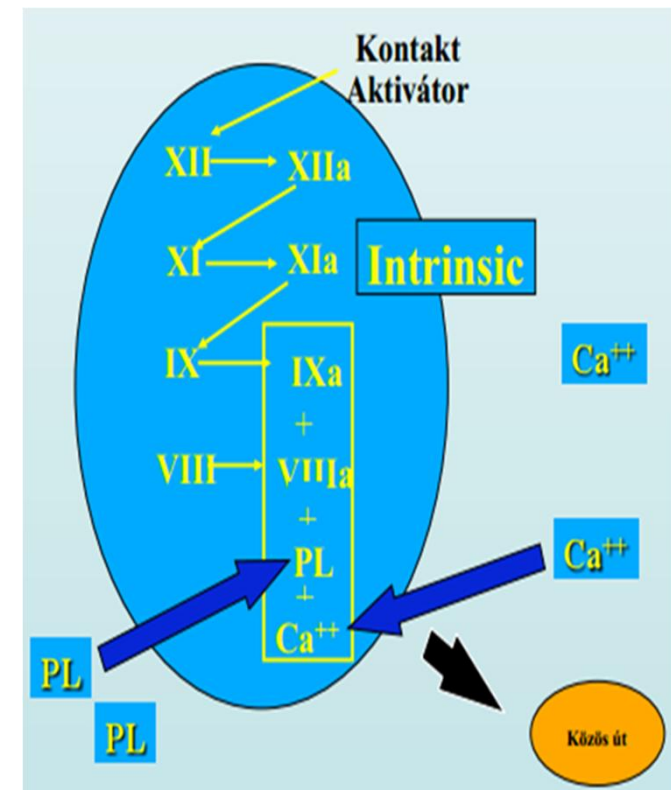
■ ISI : egy a reagensen kötelezően feltüntetendő érzékenységi mutatószám, amely a tromboplasztin reagens-érzékenysége a WHO referencia készítményhez viszonyítva.

Aktivált parciális tromboplastin idő (APTI)

- „Aktivált” : a véralvadás aktiválódásának gyorsítása
 - Aktivátorok: szilika, kaolin, zeolit (partikulált), ellagsav (folyékony)
 - Az APTI mérés során az előinkubáció (2-3perc) alatt aktiválódik a FXII és a FXI az aktivátor hatására.
- „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)

- 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 sec.-ban.
- Az intrinsic és a közös út vizsgálata (HMWK, PK, FXII, FXI, FX, FIX, FVIII, FV, FII, fibrinogén).



Keveréses vizsgálat

- Annak eldöntésére, hogy az adott alvadási idő megnyúlást alvadási tényező hiánya, vagy inhibitor jelenléte okozza.
- Módszer: normál plazma + beteg plazma 1:1 arányú keverése

■ Faktor deficiencia

- Ha a normál plazma és a beteg plazma keverése (1:1) korrigálja a faktor hiányt.
- Pl.: 100% + 1% faktor VIII → 50,5% faktor VIII.
- ~ **normál APTI/ PI**

■ Ellenanyag jelenlét (LA vagy faktor inhibitor)

- Ha a normál plazma és a beteg plazma keverése (1:1) csak az ellenanyag 1:2 hígítását eredményezi.
- **abnormál APTI/ PI**

Trombin idő (TI)

- A TI a trombin hozzáadása és annak hatására a vizsgálandó plazmában keletkező fibrinalvadék megjelenése között eltelt idő sec.-ban.
- A fibrinogén → fibrin átalakulás sebességét tükrözi.



A PI, APTI és TI tesztek értékelési sémája

Laboratóriumi eredmény	Lehetséges, gyakori okok
PI megnyúlt, APTI és TI normál	Kumarin terápia kezdete, FVII-hiány
APTI megnyúlt, PI és TI normál	FVIII-, FIX-, FXI-, FXII-hiány, Lupus anticoagulans, LMW-heparin kezelés
TI megnyúlt, PI és APTI normál	Alacsony fibrinogén szint, mérsékelt heparin szennyeződés
PI és APTI megnyúlt, TI normál	Szerzett koagulopátia, K-vitamin hiány FII-, FV-, FX-hiány vagy gátlás
APTI és TI megnyúlt, PI normál	Hagyományos heparin terápia
PI, APTI és TI megnyúlt	DIC, súlyos májbetegség, heparinnal levett vérminta

- 
- Ritka koagulopatia, ami nem okoz megnyúlást az alaptesztekben, de súlyos vérzéssel járhat:
 - FXIII hiány
 - α_2 - antiplazmin hiány
 - A FXII kivételével valamennyi faktor hiánya vérzékenységgel jár.
 - A FXII hiánya nem okoz vérzékenységet!

Véralvadási faktorok osztályozása

- Zimogén típusú faktorok:
Proteolitikus enzimek proenzimeit:
FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII
Protranszglutamináz: FXIII
- Kofaktorok:
Prokofaktor: FV, FVIII
Aktív kofaktor: szöveti faktor
- Alvadó fehérje: fibrinogén

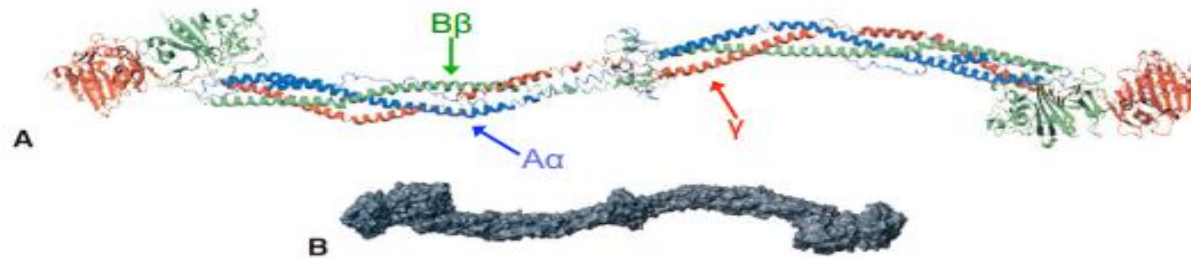


Alvadási faktorok

- 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

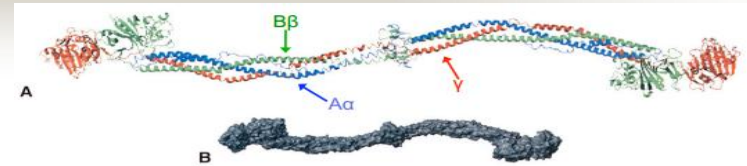


Fibrinogén



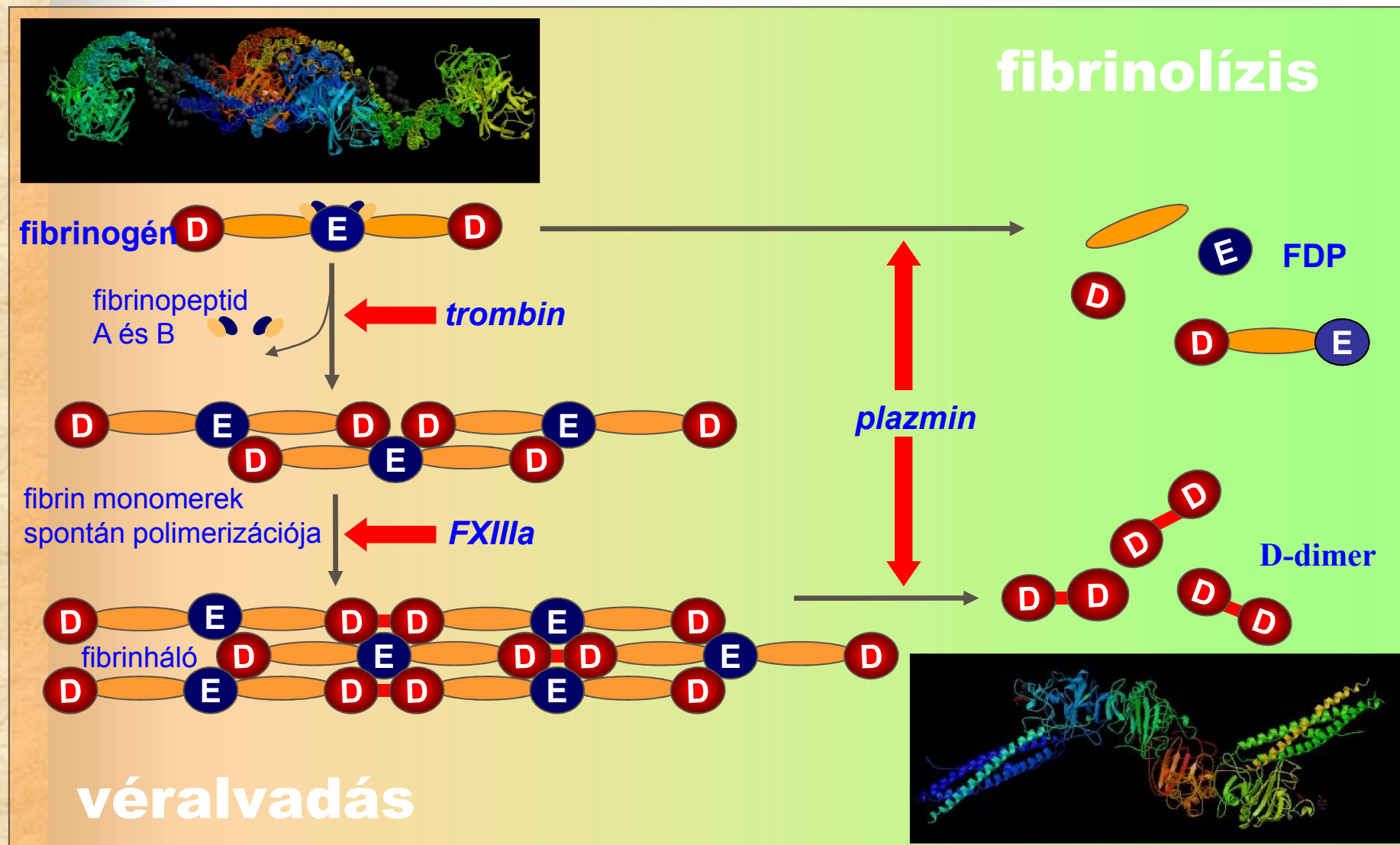
- Komplex, szimmetrikus, 340 kD glikoprotein
- Három pár láncból áll ($A\alpha$, $B\beta$, γ), amelyeket diszulfid hidak kötnek össze.
- Trombin hatására alakul át fibrinné.

Fibrinogén



- A leggyakrabban használt fibrinogén meghatározás a Clauss módszer:
 - 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.

A fibrinogén degradációja



D-dimer

- A D-dimer a keresztkötött fibrin degradációs produktuma.
(2 db keresztkötött D - fragmentum)
 - Fokozott D-dimer képződéssel járó állapotok:
 - **Fiziológiás:** életkor (70 év felett), terhesség
 - **Patológias:** DIC, AMI, MVT, PE, arteriális thrombosis, májbetegség, műtét, súlyos fertőzés, malignus tumor, haematoma ...esetén
 - **Terápiás:** thrombolysis
 - **Álpozitív:** > 50 IU/ml rheumatoid faktor jelenlétekor
 - **Álnegatív:** erősen lipaemias plazma esetén
 - Meghatározása: kvantitatív módszerrel - immunturbidimetria
- FDP teszt:***
- *Primer és secunder hyperfibrinolysisben is pozitív.*
 - *Fibrinogén és fibrin degradációs produktumok egyidejű jelenléte.*



A D-dimer diagnosztikai értéke

**NEGATÍV
PREDIKTÍV
ÉRTÉK**

Negatív prediktív érték (NPV)

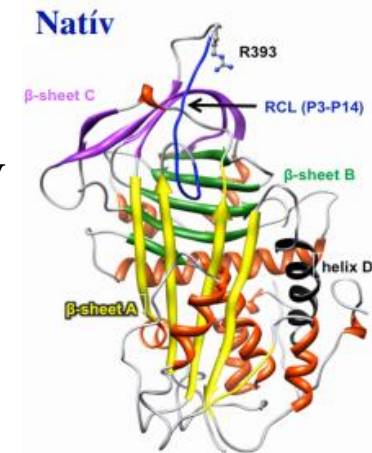
Azon **negatív** **teszt** **eredménnyel** rendelkező egyének aránya, akik **nem** **szenvednek** **betegségben**.

NPV = valódi negatív / álnegatív + valódi negatív

$$\text{NPV} = \frac{\text{VN}}{\text{ÁN} + \text{VN}}$$

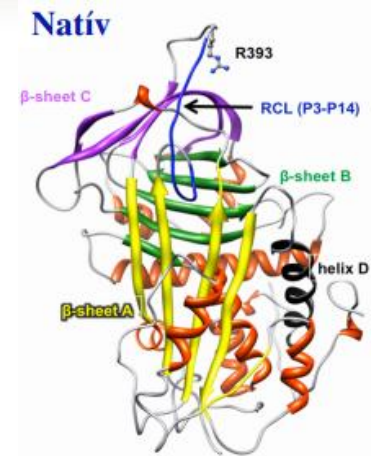
Antitrombin III

- 58 kD glikoprotein
- Serpin, a koaguláció legfontosabb, progresszív (lassú) inhibítora, kofaktora a heparin
- Gátolja:
 - Trombint
 - FXa-t
 - Gyengébben a FIXa-t, FXIa-t, FXIIa-t, a TF-FVIIa komplexet (extrinsic tenáz) és a kallikreint
- Az aktivációs komplexben a thrombocyták felszínén lévő FXa-t vagy a fibrinhez kötött trombint még heparin jelenlétében sem gátolja, az alvadékból kikerülő szabad trombint/FXa-t viszont hatékonyan gátolja ("scavenger funkció").



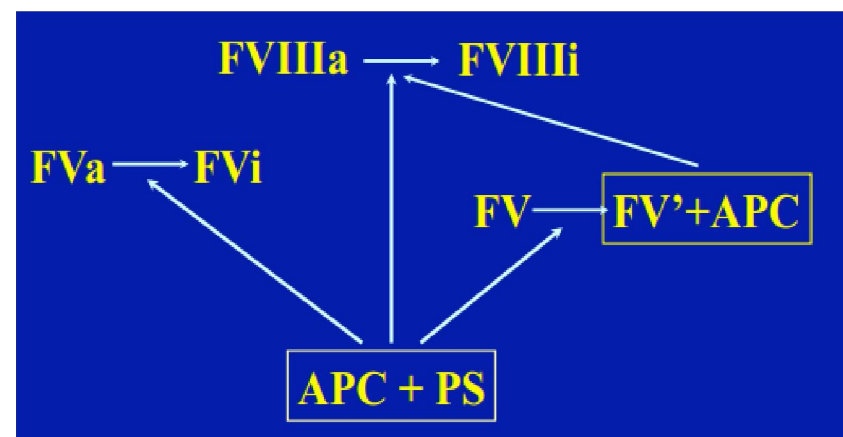
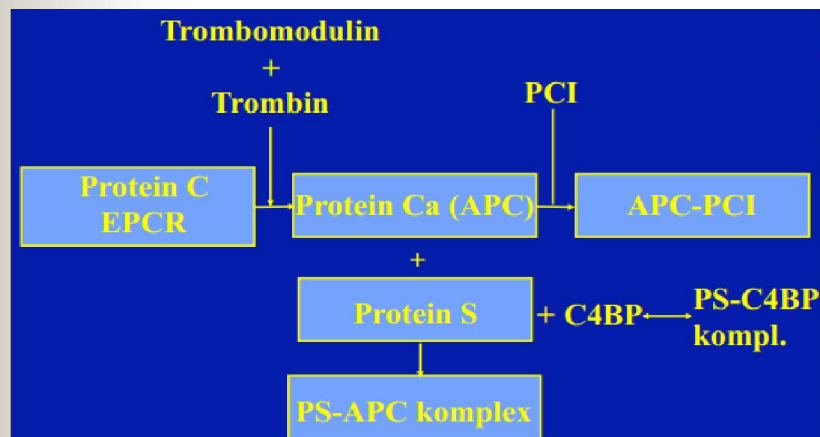
Antitrombin III

- Funkcionális szűrőteszt: kromogén szubsztát használatával aktivitás meghatározás.
- A vizsgálandó plazmát ismert mennyiségű feleslegben adott IIa vagy Xa faktorra inkubáljuk heparin jelenlétében.
- A reakcióelegyben lévő reziduális trombint vagy Xa faktort kromogén szubsztát segítségével mérjük.



A Protein C (PC), Protein S (PS) rendszer

- K vitamin függő alvadási inhibitorok, glikoproteinek, inaktív prekursor (proenzim) formában a májban szintetizálódnak.
- Trombin, Ca^{2+} -ion és foszfolipid hatására, a PC trombomodulin jelenlétében enzimatikusan aktív formává alakul át $\rightarrow$ APC.
- Az APC antikoaguláns szerepe a FVa és az FVIIIa inaktiválása a PS, mint kofaktor segítségével.



A Protein C (PC), Protein S (PS) rendszer

- Meghatározás: funkcionális szűrőteszttel
 - PC: 1, alvadási vizsgálat, a PC-t különbözőképpen aktiválják, az alvadási idő hosszából lehet következtetni az aktivitásra.

2, kromogén teszt, kígyóméreg aktivátort (Protac) használnak, majd az APC mennyiségét mérik kromogén szubsztrát segítségével.
 - PS: a plazma PS aktivitásától függően az APC antikoaguláns hatása fokozódik, melyet az APTI megnyúlása jelez.

A tradicionális koagulációs tesztek diagnosztikai korlátai a perioperatív időszakban

Figyelmet igénylő tények:

- Nem szolgálnak információval:
 - a thrombocyta felszínén lejátszódó interakciókról,
 - a fibrin polimerizációról, az alvadék erősségéről és a fibrinolysisről.
 - A beteg aktuális hypothermiáját nem tudják figyelembe venni.

Központi laboratórium vs. POCT vizsgálat

Központi laboratórium:

- nagy kapacitású automaták
- nagyobb mintatérfogat
- nagy számú minta
- költségtakarékos
- sok preanalitikai hiba
- TAT (turn around time, leletkiadási idő) hosszabb
- a minőségbiztosítás megoldott

POCT:

- egyszerű kivitelezés
- kis mintamennyiség
- egyedi mérési igény
- nagyobb költség/vizsgálat
- preanalitikai hiba csökkenthető
- rövid TAT, gyors döntési lehetőség, könnyen ismételhető
- a minőségbiztosítás részben megoldott

Köszönöm a
figyelmet!

