

# **Laboratorní testy k diagnostice poruch hemostázy + Monitorování antikoagulační terapie**

**Petr Dulíček**

**IV. Interní hematologická klinika, FN a LF v HK**

# HEMOSTÁZA

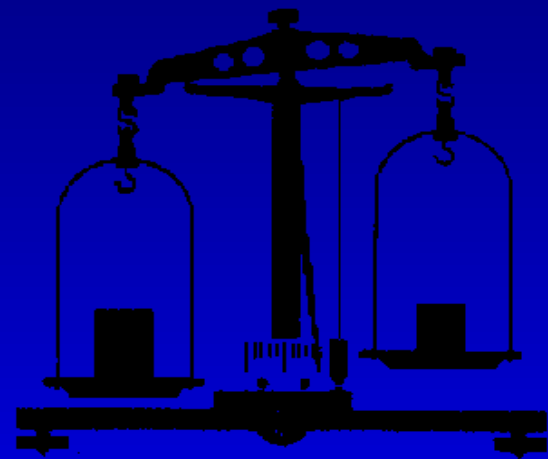
Dokonale vyvážený KF, jejich inhibitorů, trombocytů  
+ fibrinolytického systému

Slouží:

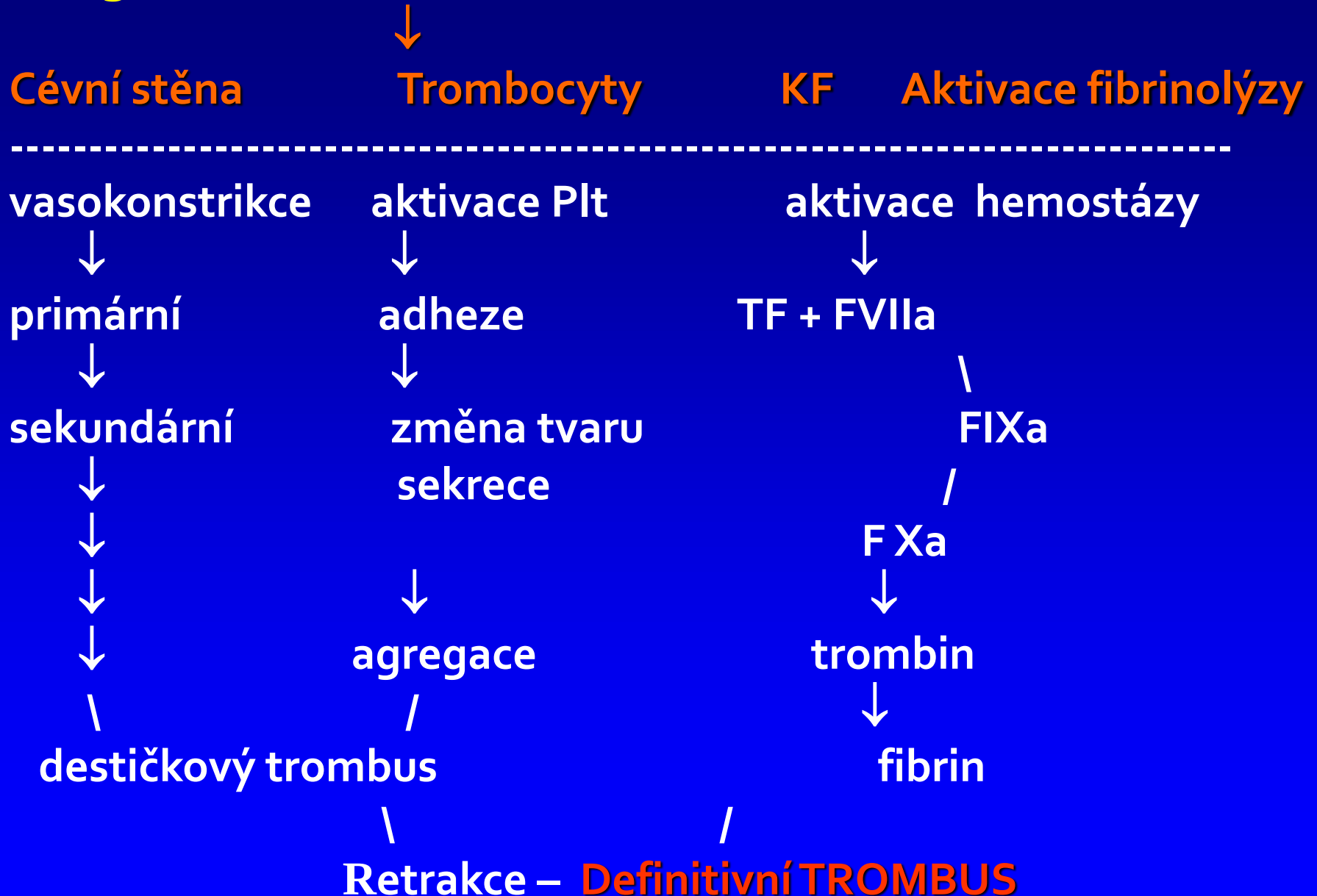
- spontánnímu krvácení
- k adekvátnímu krvácení po poranění

**Vrozené krvácivé stavy →**

Hemostatické mechanismy jsou díky vrozeným faktorům porušeny ( vychýleny ) směrem ke krvácení a tito jedinci mají větší riziko výskytu spontánního krvácení či krvácení po intervenčním zákroku



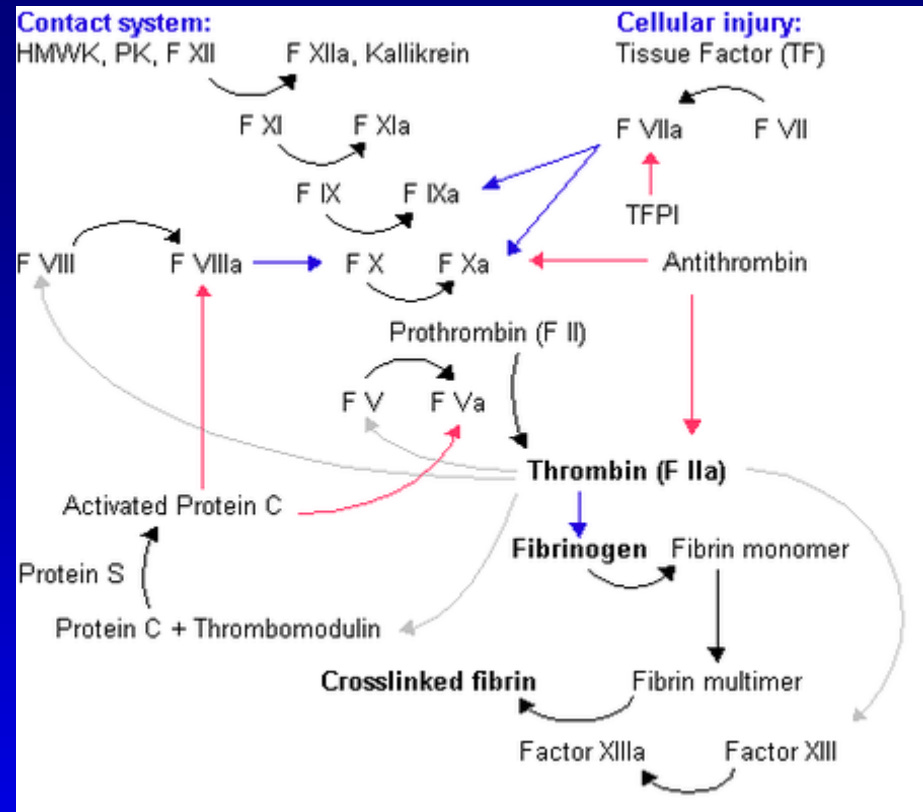
# Koagulace - subendotel



**Iniciace →**

**Amplifikace →**

**Propagace →**



# Iniciace

(TF) a FVIIa. Malé množství f. VIIa je stále přítomno v krvi a vyčkává na setkání s TF, jenž je uvolněn při poranění, zánětu atd.

|

FVIIa autoaktivuje FVII na f. VIIa

|

Komplex TF-VIIa

|

následně aktivuje faktory IX a X.

Faktor Xa aktivuje další molekuly FVII

generuje vznik malého množství trombinu

|

Toto množství není sice dostatečné pro tvorbu fibrinového koagula ale je schopno převzít vedení koagulace

# Amplifikace

Působením trombinu k aktivaci FV, FVIII a FXI.

FXIa aktivuje molekuly FIX na FIXa - součást  
**tzv. vnitřního tenázového komplexu**

Trombinem souběžně vyvolaná aktivace Plt a Leu - exprese negativně nabitých fosfolipidů na povrchu Plt – umožní vazbu FIXa, FVIIIa a FVa

**Trombin aktivuje** – endotelie -do prokoagulačního stavu (intaktní endotel produkuje řadu látek působících proti hemostáze – např. prostacyklin, NO a trombomodulin).

**Výsledek fáze amplifikace- vznik většího množství trombinu**  
- vytvoření reakčních povrchů s navázanými molekulami aktivovaných faktorů pro komplementaci komplexů

## Defekt primární hemostázy

*trombocytopenie, patie, vaskulopatie  
von Willebrandova choroba*

## Koagulopatie

*hemofilie, deficiency KF*

**Typ krvácení** slizniční, epistaxe, GIT,  
petechie, meno-metroragie

hematomy, krvácení  
do kloubů

**Čas vzniku**

časný

pozdní









# Laboratorní vyšetření hemostázy

Diagnosticke vrozených a získaných poruch hemostázy  
a to jak stavů krvácivých  
tak trombofilních

Stejně důležitým krokem je správná znalost jak rodinné, tak osobní anamnézy

## Laboratorní testy :

- různá senzitivita a specificita
- abnormální výsledek vždy neznamená problém klinický.

Laboratorní testy slouží také k **monitorování terapie antikoagulační**

K získání správných hodnot při laboratorním vyšetřování je nutno dodržovat zásady správné laboratorní praxe.

### **Zásady se týkají:**

- 1/ správného odběru krve (atraumaticky)
- 2/ použití správných zkumavek a antikoagulačního roztoku (zejména doporučeného poměru odebrané krve a antikoagulačního roztoku)
- 3/ včasného dodání vzorku do laboratoře.

Více než 90% nesprávných výsledků je způsobeno chybou v této „preanalytické“ fázi, nikoliv při vlastním stanovení.

# Dělení testů

## 1. z hlediska vyšetřovaného systému

- a, primární hemostáza
- b, plazmatická část koagulace
- c, vyšetření inhibitorů krevního srážení
- d, fibrinolytický systém

## 2. dle specifity vyšetření

- a, globální, nespecifické testy
- b, specifické, cílené vyšetření vyšetření

1. **Testy neselektivní**, - *globální*, tj. postihující buď jeden celek (euglobulinová fibrinolýza) nebo více systémů (srážlivost)  
- *skupinové* – screeningové

(záchytné), které umožňují rozlišení např. poruch ve vnitřní či zevní cestě krevního srážení apod.

2. **Testy selektivní**, které vyšetřují jednotlivé složky systémů koag.f

Při vyšetření hemostázy neselektivními skupinovými testy si musíme uvědomit následující:

→ Výsledky „in vitro“ vždycky nemusí odrážet stavu in „vivo“.

jejich prodloužení nemusí vždy znamenat sklon ke krvácení, ale naopak sklon k trombóze

® Normální hodnoty nevylučují krvácivý stav

**Obecně platí, že snadnější a přesnější je dostupnými testy vyšetření plazmatické části koagulace než vyšetření primární hemostázy.**

# 1. Vyšetření primární hemostázy

## **Vyšetření cévní stěny**

*Vyšetření rezistence kapilár* (Rumpelův – Leede test). Hodnotí se počet petechií, které se vytvoří na ploše 16 m<sup>2</sup> (na předloktí) po 10 minutové kompresi manžetou tonometru při tlaku 80 mm Hg.

Jako pozitivní se hodnotí nález 10 petechií.

Je pozitivní u trombocytopenií, trombocytopatií, některých vaskulopatií či von Willebrandově nemoci.

## **Vyšetření rezistence kapilár petechiometrem (orientační)**

Klobouček vývěvy přiložíme na předloktí, vytvoříme podtlak 300 mm Hg na dobu 45 sec. a provedeme odečtení petechií pod kloboučkem. Normální výsledek: Počet petechií < 10.

Test je pozitivní: u cévních purpur a u trombocytopenií a trombocytopatií. Test může být pozitivní i když doba krvácivosti je normální.

## Doba krvácivosti

- různém způsobu
- Vzhledem k nevyhovující standardizaci klasické metody dle Duka se postupně objevily i další metody.

### Metoda podle Dukeho:

Sleduje se doba nutná k zástavě krvácení po standardním vpichu do ušního lalůčku nebo do patičky u kojence. Metoda je méně přesná, dnes již používáme zřídka.

Normální hodnota: 2 – 5 min.

Prodloužená doba je u trombocytopenií, trombocytopatií

- funkčních poruch destiček, u von Willebrandovy choroby, při podávání léků s protideštičkovým účinkem.

*Metoda s použitím standardní incize na předloktí  
(standardized template method)- Simplate*

Předloktí na volární straně otřeme desinfekčním roztokem.

Na paži přiložíme manžetu tonometru a nafoukneme na 40 mm Hg a při tomto tlaku udržujeme po celou dobu trvání testu. V místě bez patrných povrchových žil pevně přiložíme template se skalpelovým ostřím uzpůsobeným tak, že způsobí standardní incizi délky 9 mm a hloubky 1 mm.

Krev z lineární ranky odsáváme v pravidelných 15-ti sekundových intervalech až do zástavy krvácení. Bohužel někdy zůstávají na předloktí drobné jizvy.

Normální hodnota: 3 – 9 min. Prodloužení trombocytopenie, trombocytopatie, von Willebrandova choroba, vaskulopatie, afibrinogenémie, antiagregační terapie

## Agregace destiček

Princip metody tkví v tom, že se fotometricky měří a graficky zaznamenává intenzita světla procházejícího destičkami bohatou citrátovou plazmou po přidání příslušného induktoru



(ADP, kolagen, adrenalin, trombin, Ristocetin) nebo léku.



Při agregaci destiček se plazma vyčerežuje a intenzita procházejícího světla se zvyšuje.

## **Vyšetření funkce trombocytů pomocí systému PFA-100**

(platelet function analyser)

Dnes nejrozšířenější zachytný test pro vyšetření destičkových funkcí, zejména na interakci s vWF.

velmi senzitivní na adhezi a agregaci trombocytů závislou na vWF, GI Ib, GI IIb/III.

Vzorek krve je aspirován do 2 kartridží, potažených kolagenem/adrenalinem (primárně zachytné) resp. kolagenem a ADP (adenosin 5'-diphosfátem, kterou lze identifikovat užití látek obsahující kysel. acetylosalicylovou).

Je snahou napodobit situaci in vivo (smykové tření) a změřit čas do vytvoření krevní zátky.

Normální rozmezí je 78 – 199s u kartridže s kolagenem/adrenalinem  
55 – 137s u kartridže s kolagenem a ADP. 1.

PFA-100 má vysokou negativně prediktivní hodnotu , při normálním nálezu až na malé výjimky (primární defekt sekrece, mírná forma von Willebrandovy choroby typ I) není porucha primární hemostázy a další vyšetření v tomto směru není nutné.

## 2. Vyšetření plazmatické části koagulace

- tj.vnitřního či zevního systému, společné cesty koagulace)

### **Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)**

Slouží k vyšetření poruch vnitřního systému aktivace tromboplastinu.

**Princip:** Vyšetřujeme koagulaci citrátové plazmy po přidání kalcia, fosfolipidu (kefalinu) a látky umožňující aktivaci faktoru XII kontaktem (kaolin, celit, kys. ellagová).

Pohybuje se mezi 35 – 45 s podle druhu reagens.

Za patologické se pokládá prodloužení o více než 10 sekund ve srovnání s kontrolní hodnotou.

Jinou možností je vyjadřovat výsledky jako poměr časů R (ratio), tj. času testované plazmy/ času kontrolní plazmy. Za normálních podmínek se R pohybuje v rozmezí 0,8 – 1,2.

## aPTT je prodlouženo:

- Při nedostatku faktorů vnitřního srážecího systému (XII, XI, IX, VIII).
- k monitorování antikoagulační léčby heparinem. UFH jednoznačně prodlužuje aPTT
- aPTT se používá rovněž jako skrínigového testu na lupus antikoagulans (antifosfolipidové protilátky).
- Při terapii DOAC – dabigatranem

## **Tromboplastinový čas (protrombinový čas, Quickův test, PT).**

Tento test byl poprvé popsán Quickem v r. 1935, proto se dodnes používá termín Quickův čas.

Princip: Měří se doba srážení citrátové plazmy po přidání tromboplastinu (tkáňového faktoru) a kalcia.

Normální hodnota : 14 – 15 sekund.

Při vyjádření pomocí INR: < 1,2

INR : (International Normalized Ratio), ISI:  
(International Sensitivity Index)

$$\text{INR} = \frac{\text{protrombinový čas testované plazmy}^{\text{ISI}}}{\text{protrombinový čas kontrolní plazmy}}$$

## **Protrombinový čas je prodloužen:**

- Izolovaně při deficitu F VII, po zahájení antikoagulační terapie kumarinem, iniciační fázi
- DIC či jaterní lézi, velmi individuálně (dle použité reagensie) při terapii rivaroxabanem
- Kombinovaně (s aPTT) při snížení koncentrace FII, FV, FX, při nízké hladině fibrinogenu, při léčbě kumarinem, při deficitu vitamínu K při kombinovaném deficitu F V a F VIII diluční koagulopatii (masivní transfúze)

Protrombinový čas se v klinické praxi má udávat v :  
sekundách  
v poměru časů pacient/normálu, nikoliv jako INR.  
To slouží k monitorování antioagulační terapie warfarinem.

### **Historicky se monitorování**

antikoagulační terapie warfarinem vyjadřovalo:

- : jako poměr časů – R (testovaná plazma/k)
- : v % normální koagulační aktivity (dříve)

- PT + některý další test: hepatopatie, DIC, LA, def. , malabsorpční  
-syndrom

## **Trombinový čas**

Princip: Měříme dobu srážení citrátové plazmy po přidání trombinu, t.j. čas nutný k přeměně fibrinogenu na fibrin.

Normální hodnota je 10 – 15 sekund.

### **Trombinový čas je prodloužen při:**

- a, snížené hladině fibrinogenu (hypo či afibrinogenémii)
- b, dysfibrinogenemii
- c, léčbě heparinem (neměřitelné hodnoty), ale i LMWH (měřitelné hodnoty)
- d, léčbě dabigatranem (neměřitelné hodnoty)
- e, při fibrinolytické terapii (kdysi se využíval při monitorování léčby streptokinásou)
- f, při přítomnosti FDP (fibrin/fibrinogen degradačních produktů)
- g, může být při přítomnosti paraproteinu
- h, při přítomnosti protilátky „heparin-like antikoagulans“, např. při malignitách, mnohočetném myelomu

## **Stanovení fibrinogenu**

Koagulační metoda podle Clausse: Princip: Doba koagulace zředěné citrátové plazmy po podání trombinu je závislá a nepřímo umírněná koncentraci fibrinogenu: Hodnotu fibrinogenu odečteme z kalibrační křivky. Normální hodnota: 2 – 5 g/l.

# **Antikoagulační terapie**

slouží k prevenci VTE

terapii venózního tromboembolizmu (VTE)

Prevence embolizace při FIS

## **Léky**

- hepariny: UFH, LMWH
- kumariny
- DOACs (direct oral anticoagulation drug)

Hepariny se používají v terapii akutní VTE – brání další generaci trombinu – apozici trombu

Kumariny se používají v sekundární prevenci VTE – v prevenci rekurence VTE

## Hepariny

- nefrakcinovaný heparin – UFH
- frakcionovaný heparin – nízkomolekulární – LMWH

## V terapii a v prevenci VTE

### Terapie VTE pomocí UFH

**UFH** – Antitrombin – inhibitor serinových proteáz – F X, F II  
F XII, F XI, FIX

- TFPI

- mnoho desítek let terapie volby akutní VTE – DVT a PE  
terapii nutno monitorovat – **aPTT**

**Normální hodnoty aPTT** – dle typu reagencie – poměr  
času vyšetřovaného / normálu  
aPTT je testem pro – záchyt deficitu faktorů vnitřní cesty  
F XII, FXI, FIX, FVIII  
- záchyt protilátky typu LA  
( lupus antikoagulans )  
- k monitorování terapie UFH

Poměr aPTT plasmy nemocného léčeného UFH / normálu  
-závisí na typu reagencie – citlivosti k Heparinu – dříve  
**-Poměr:** 1,5 – 2, dnes většinou 2-4

-Při monitorování je nutno zachovat určitá pravidla –  
- odběr ze žíly a atraumaticky, vyšetření do 2 h po odběru  
- úprava dávky UFH dle výsledků – první den terapie 4x  
dále stačí 2x denně

## Nevýhody monitorování terapie UFH

- interference UFH s řadou bílkovin plazmy
- nelze při deficitu AT III

Pokaždé neodpovídá hodnota APTT hladině UFH v plasmě

## LMWH – nízkomolekulární hepariny

- chemickou či enzymatickou depolymerizací UFH –
  - **poměr F Xa/ FIIa** – antitrombotický / antikoagulační  
dnes jsou na I. místě v terapii a v prevenci VTE
  - mají několik výhod – delší biologický poločas
    - větší biologickou dostupnost
    - předvídatelnější efekt
    - nižší riziko krvácení a HIT
    - terapii není nutno monitorovat
- ( pouze u malých dětí a jedinců s nedostatečností ledvin )

**Pokud je nutné terapii monitorovat – pomocí stanovení antiXa  
rozmezí antiXa – dle typu LMWH – 0,5 –1,1 : v intervalu  
3 – 4 h po s.c. aplikaci**

## **Terapie kumarinem**

**Interference s K1 vitamin dependentními faktory  
F II, F VII, F IX, F X - porušená funkce - karboxylace  
Dnes se u nás používá Warfarin**

**Monitorování perorální antikoagulační terapie  
Protrombinový čas: od 80. let INR**

## INR ( International Normalized Ratio )

**INR** -  $\frac{\text{poměr času vyšetřované plazmy}}{\text{čas normálu}}$  <sup>ISI</sup>

ISI: Index senzitivity - International Sensitivity Index

Citlivost tromboplastinu k tromboplastinu WHO

- **umožní porovnávat výsledky antikoagulační terapie - srovnatelné výsledky kdekoliv na světě !**

INR - mezi 2-3, zřídka více INR mezi 3 - 4

Po nastavení antikoagulační terapie - kontroly v 1 měsíčních intervalech

- interference Warfarinu s řadou léků, příjmem vitaminu K

## DOAC

rutinně se nemonitorují

Pokud ano /krvácení, urgentní výkon/:

Dabigatran: Pradaxa:

Hemoclot /dilutovaný trombinový čas/ lineární závislost, orientačně aPTT

Xabany: aniXa nakalibrované na příslušný léky

| Vlastnosti               | Rivaroxaban<br>Xarelto            | Dabigatran<br>Pradaxa       | Apixaban<br>Eliquis       | Edoxaban<br>Lixiana       |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Působení                 | Přímý inhibitor<br>antiXa         | Přímý inhibitor<br>trombinu | Přímý inhibitor<br>antiXa | Přímý inhibitor<br>antiXa |
| Podávání                 | Per os                            | Per os                      | Per os                    | Per os                    |
| Dávkování                | 1x nebo 2xd.                      | 2x denně                    | 2x denně                  | 1x denně                  |
| Nástup plného<br>účinku  | 2-4 h                             | 3 h                         | 2 h                       | 2 h                       |
| Biologická<br>dostupnost | 66% nalačno 80%<br>-100% s jídlem | 6%                          | 50%                       | 62%                       |
| Biologický<br>poločas    | 5-13 h                            | 12-17 h                     | 9-14 h                    | 10-14 h                   |
| Antidotum                | Ne                                | Praxbind                    | Ne                        | Ne                        |
| Místo vyučování          | 35% ledvinami<br>65% játry        | 80% ledvinami               | 27% ledvinami             | 50% ledvinami             |
| Monitorování             | antiXa                            | Hemoclot                    | antiXa                    | antiXa                    |

## **XARELTO**

**PT** – není test vhodný k monitorování

- hodnota záleží na reagentii (citlivý Neoplastin, necitlivý Innovin)
- normální hodnota nevylučuje terapeutickou hladinu léku

## **INR - NE**

**antiXa** (kalibrace na rivaroxaban)

**Terapeutická rozmezí : Dávkování 20 mg 1x d.**

za 2-4 hod.                      22-535 ng/ml

za 24 hod.                        6-239 ng/ml



## DABIGATRAN

### aPTT

Může být užitečné: ↑ antikoagulační aktivity  
**≥ 80 s před další dávkou – riziko krvácení**

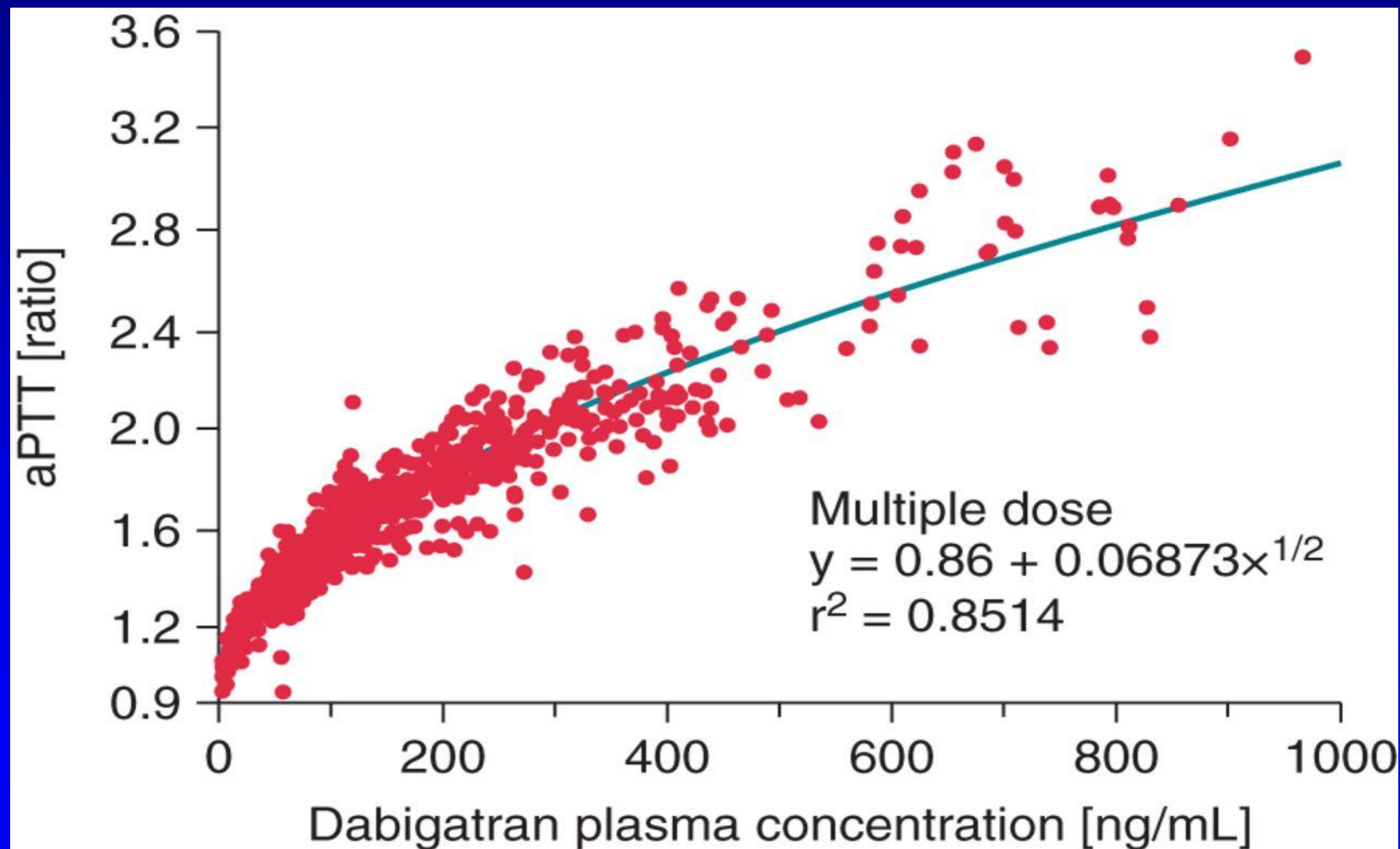
Záleží na reagentii a koagulometru

- v rutinní praxi : ↑ ↑ ↑ neměřitelný

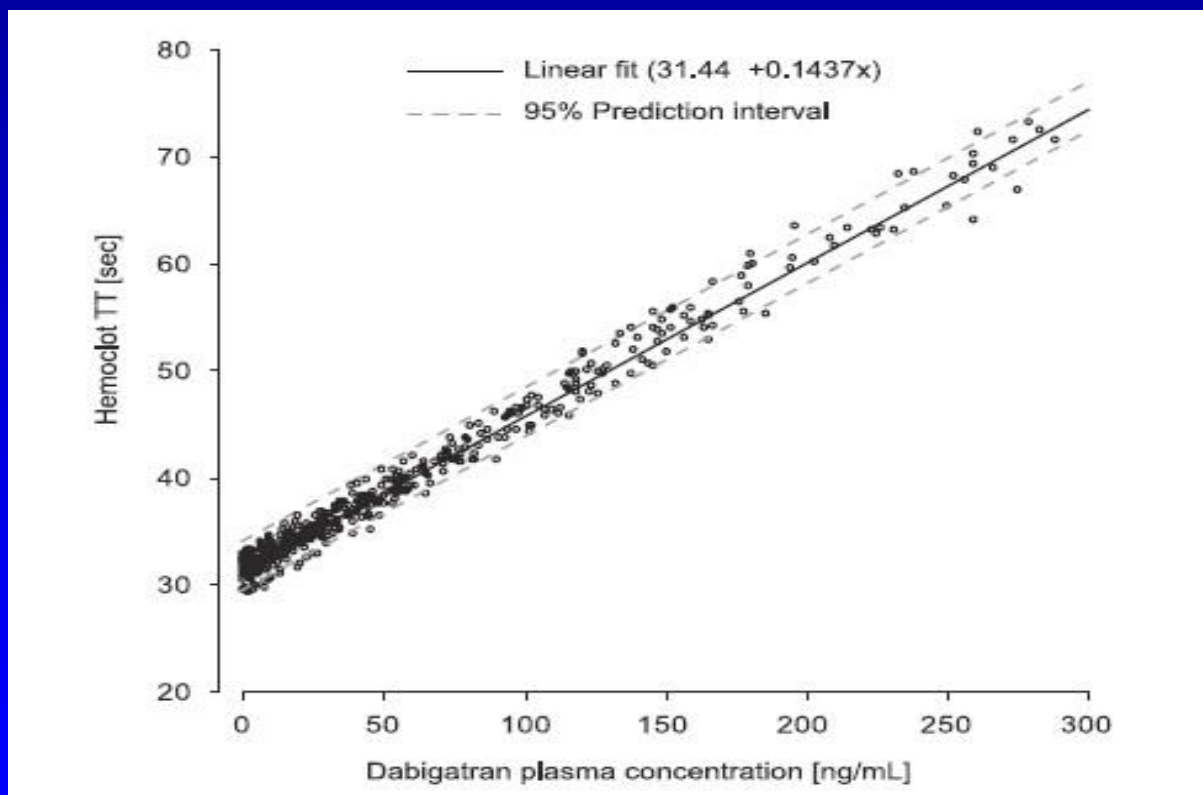
- normální hodnoty: Vylučují přítomnost léku



Proto – jednoznačně Hemoclot



# HEMOCLLOT – lineární závislost



## APIXABAN

**PT** – není test vhodný k monitorování

**INR - NE**

**antiXa** (kalibrace na apixaban)

| <b>Dávkování</b>  | <b>3-4 h po podání</b> | <b>12 h po podání</b> |
|-------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>2 x 2,5 mg</b> | <b>30-153 ng/ml</b>    | <b>11-90</b>          |
| <b>2 x 5 mg</b>   | <b>59-302</b>          | <b>22-172</b>         |
| <b>2 x 10 mg</b>  | <b>111-572</b>         | <b>41-335</b>         |

## Postup při krvácení

Zjistit dobu požití léku, kontrola hemodynamiky (TK, P), hemogramu a koagulačních testů

Přerušit léčbu NOAC

Lehké krvácení

- Odložit následující dávku nebo dle situace léčbu přerušit

Střední/závažné krvácení

- Symptomatická léčba
- Mechanická komprese
- Chirurgická zástava
- Náhrada cirkulujícího objemu a hemodynamická podpora
- Krevní transfúze /plasma/ převody krevních destiček při  $< 60 \times 10^9/l$
- Udržovat diurézu
- (Tranexamová kyselina 1 g i.v.)
- Eliminace dabigatranu hemodialýzou
- Při nekontrolovatelném závažném krvácení rychlá inhibice dabigatranu idarucizimabem (Praxbind\*) 5 g i.v.

Život ohrožující krvácení<sup>s</sup>

- Začít ihned s podáváním :  
PCC (25 IU/kg)  
nebo
- aPCC (FEIBA) 50 IU/kg  
(rFVIIa 90  $\mu$ g /kg )
- (Při ztrátě cirkulujícího objemu krve 50 %  
během 3 hod. podat i.v. 3-4 g fibrinogenu)
- **V případě dabigatranu** antidotum  
idarucizimab (Praxbind\*) 5g i.v.

| CrCl (ml/min)                   | Risk of bleeding | Rivaroxaban | Apixaban | Dabigatran    |
|---------------------------------|------------------|-------------|----------|---------------|
| ≥ 80                            | Low              | ≥ 24        | ≥ 24     | ≥ 24          |
|                                 | High             | ≥ 48        | ≥ 48     | ≥ 48          |
| 50–79                           | Low              | ≥ 24        | ≥ 24     | ≥ 36          |
|                                 | High             | ≥ 48        | ≥ 48     | ≥ 72          |
| 30–49                           | Low              | ≥ 24        | ≥ 24     | ≥ 48          |
|                                 | High             | ≥ 48        | ≥ 48     | ≥ 96          |
| 15–29                           | Low              | ≥ 36        | ≥ 36     | Not indicated |
|                                 | High             | ≥ 48        | ≥ 48     | Not indicated |
| <15 No indication for any agent |                  |             |          |               |

## Extrakce zubu

- 1 / nekomplikované extrakce zubu lze při nepřerušované antikoagulační terapii
- Warfarinem – INR: 2-3
  - DOAC (lépe vzít večer, než 2 h před extrakcí)
  - LMWH (ne 2 h před extrakcí), to jen při dávce profylaktické



**Nepřevádět na LMWH !**

**Nedoporučovat bez znalosti indikace léčby její vysazení !**

2/ Lze využít lokální formy zástavy krvácení, včetně fibrin-glue

# Antiagregační terapie

Různý význam, síla indikace

- 1/ primární prevence
- 2/ sekundární prevence
- 3/ stent (DAPT)

1/ Inhibitory cyklooxygenázy: Aspirin, Anopyrin, Godasal

2/ Inhibitory ADP receptorů: Clopidogrel, Trombex, Plavix  
nové: Prasugrel (Efient), Ticagrelor (Brilique)

3 Inhibitory I<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> – Reopro (Integrillin)

## Extrakce zubu

1/ lze při antiagregační terapii, pouze zvážit při DAPT

2/ u primární prevence lze na 4-5 dnů vysadit

3/ U trombocytopenií

> 50 .  $10^9/l$  bez obav

20-50 – riziko zvýšeného krvácení: lokální opatření

< 20 – nutná příprava koncentrátem PLt

## Extrakce zubu

### HEMOFILIE

- 1/ Nutná příprava koncentrátem F VIII
- 2/ prakticky vždy lze ambulantně, kromě vícečetných, sekvenčně prováděných extrakcí u těžké formy hemofilie A či B
- 3/ Lze využít i antifibrinolytika
- 4/ z praktických důvodů: objednání na 10 h a dále, ohledně přípravy

| CrCl         | Dabigatran                                                                                                                                                          |               | Apixaban - Edoxaban - Rivaroxaban |               |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|
|              | Pokud není jiné důležité riziko krvácení a/nebo nemožná lokální hemostáza:<br>přerušení provést při nejnižší hladině NOAC (např. ≥12 h nebo 24 h po poslední dávce) |               |                                   |               |
|              | Nízké riziko                                                                                                                                                        | Vysoké riziko | Nízké riziko                      | Vysoké riziko |
| ≥80 ml/min   | ≥24 h                                                                                                                                                               | ≥48 h         | ≥24 h                             | ≥48 h         |
| 50-80 ml/min | ≥36 h                                                                                                                                                               | ≥72 h         | ≥24 h                             | ≥48 h         |
| 30-50 ml/min | ≥48 h                                                                                                                                                               | ≥96 h         | ≥24 h                             | ≥48 h         |
| 15-30 ml/min | není indikován                                                                                                                                                      |               | ≥36 h                             | ≥48 h         |
| <15 mL/min   | není oficiální indikace pro použití                                                                                                                                 |               |                                   |               |