

Seminar Hämostaseologie

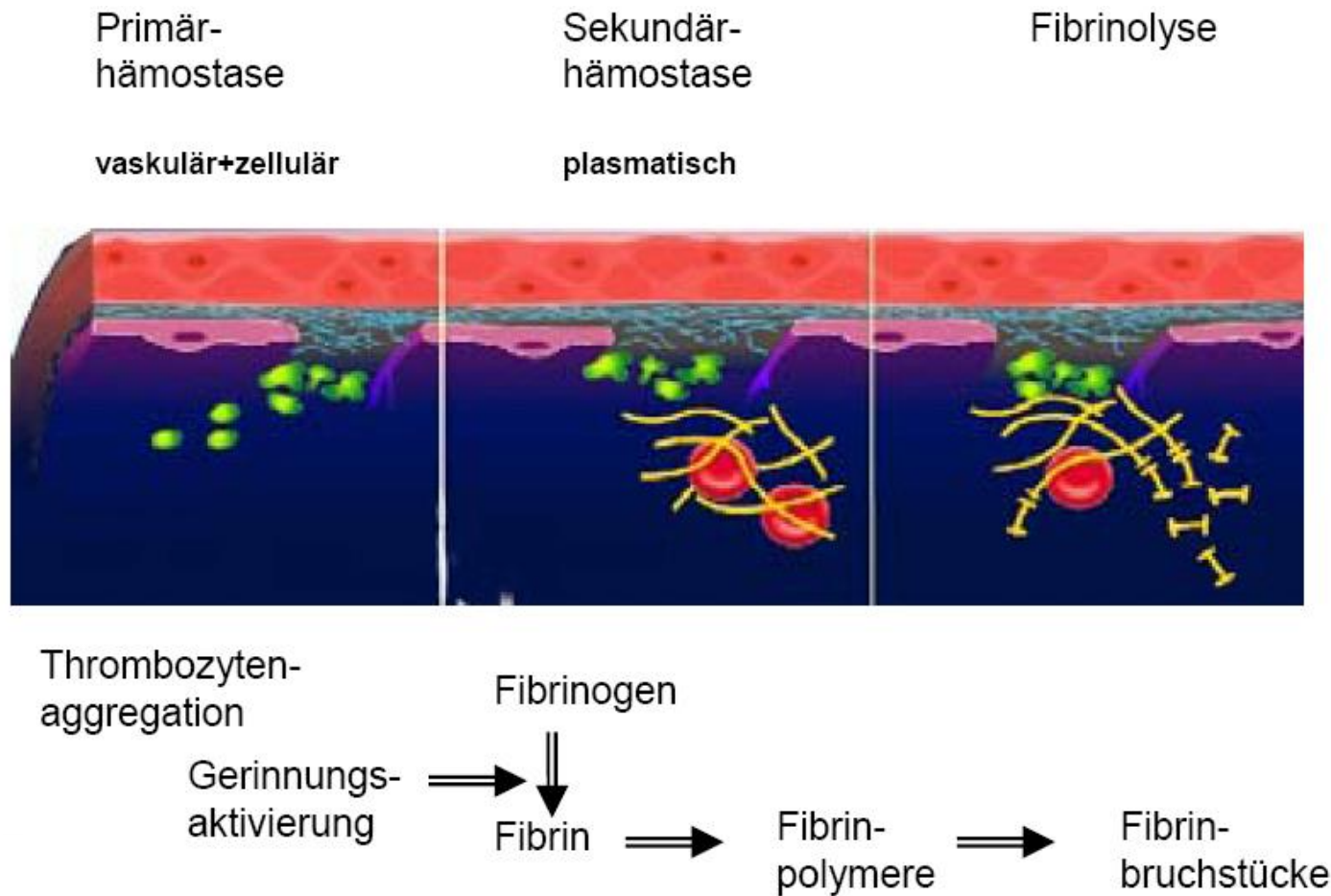
Einführung in die hämostaseologische Diagnostik
aus labormedizinischer Sicht

Teil 1 (hämorrhagische Diathese)

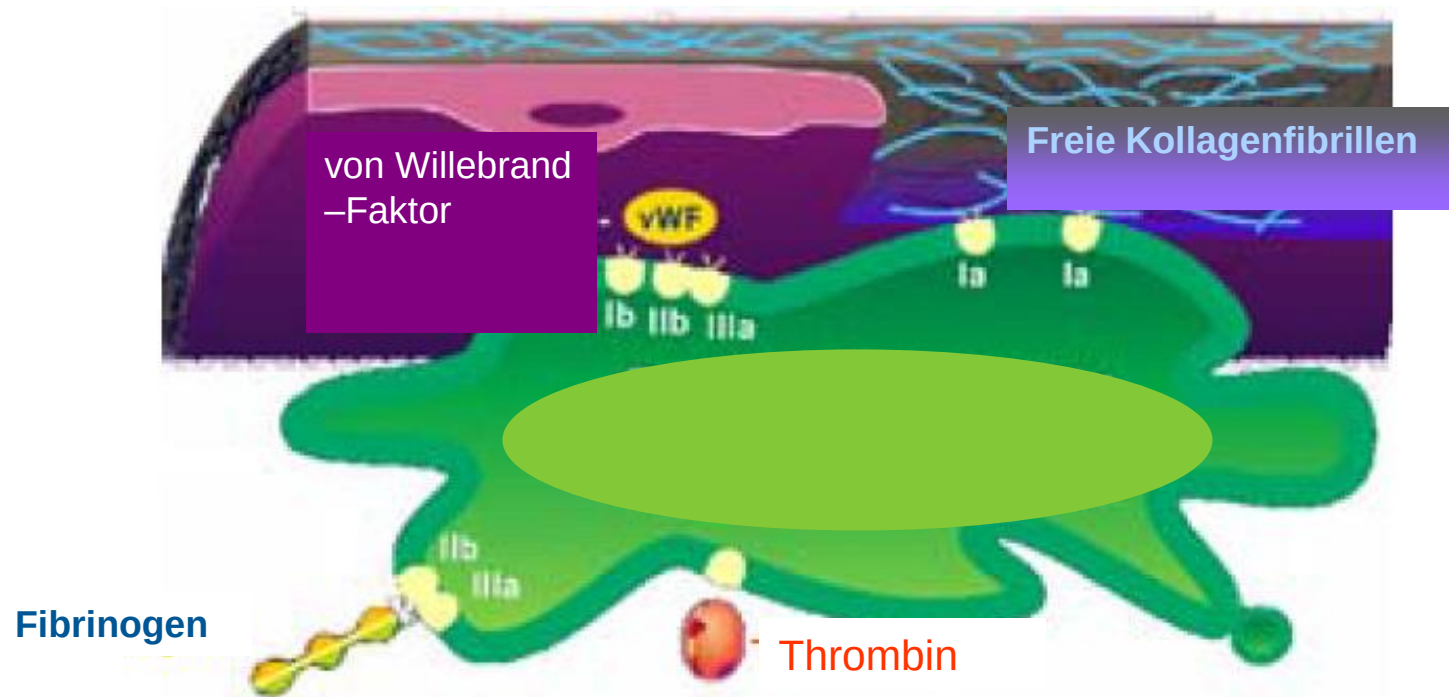
Dr. med. Derik Hermsen, OA Zentrallabor, Hämostaseologe



Übersicht: Hämostase



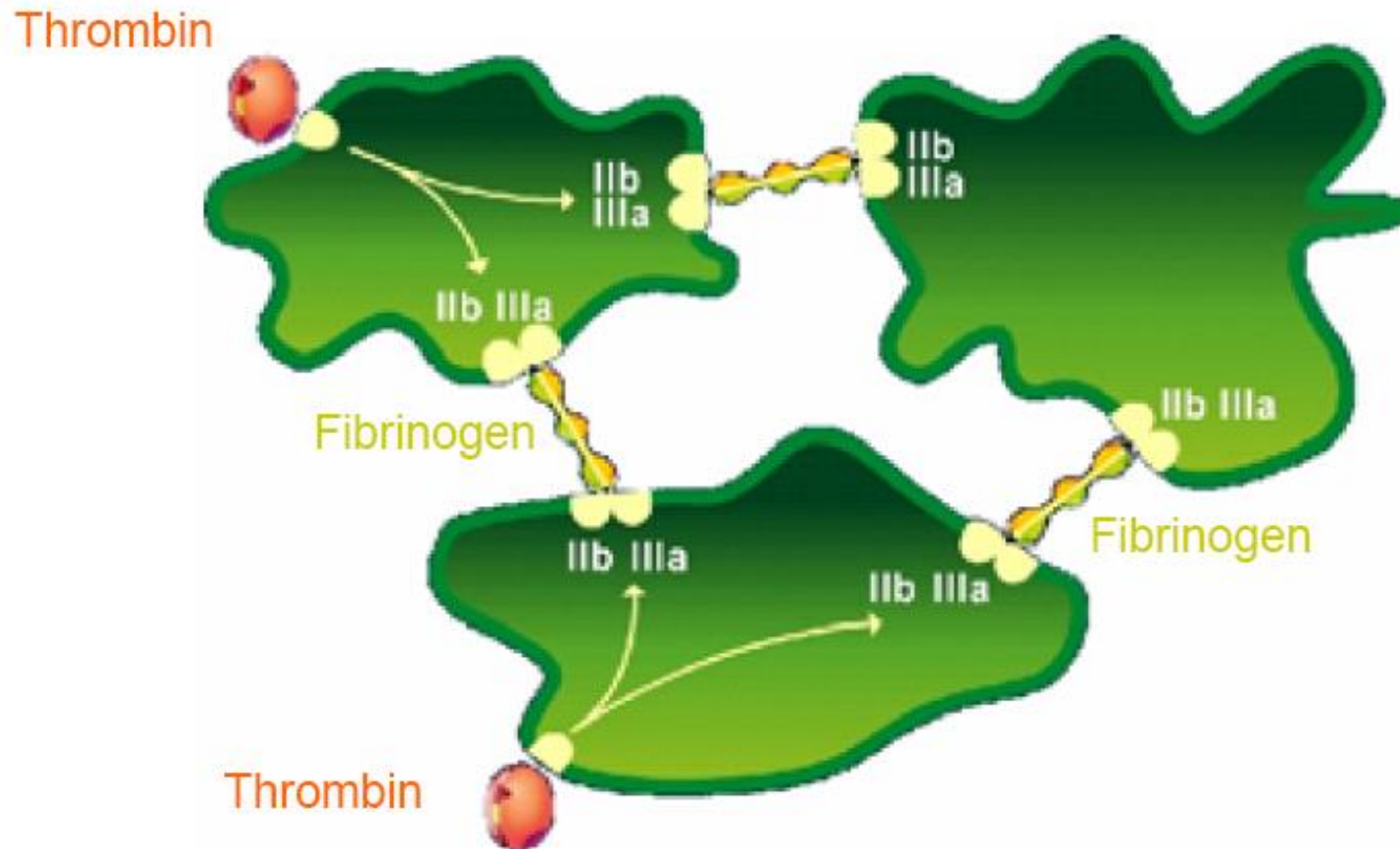
Primäre Hämostase: Thrombozytenadhäsion und die Folgen



- Thrombozytenadhäsion (vWF/GPIb, Kollagen/GP Ia,)
- Thrombozyten-Transformation
- Freisetzung von Faktoren (Thromboxan A₂, Thrombin u.a.)
- Exprimieren von Oberflächenrez. für Gerinnungsproteine
- Thrombozyten-Aggregation (GP IIb/IIIa)



Primäre Hämostase Thrombozytenaggregation



Labormarker der prim. Hämostase: Thrombozytenzahl

Indikation

- Überprüfung der primären Hämostase

Probenmaterial

- Venenblut (**EDTA** bei **kl. BB**; altern. Citrat, Verdünnung!)
- (Kapillarblut)

Referenzbereiche

Neugeborene: $100 - 250 \times 10^3/\mu\text{l}$

Erwachsene: $150 - 350 \times 10^3/\mu\text{l}$

diagnostische Wertigkeit

- $< 100.000 \mu\text{l}$: **Thrombozytopenie**
- $< 30.000 \mu\text{l}$: Spontanblutungen möglich
- $< 10.000 \mu\text{l}$: Gefahr lebensbedrohlicher Blutungen



Thrombozytopenie: Ursachen

Bildungsstörung durch gestörte Knochenmarksfunktion u.a. bei

- (seltenen) angeborenen Störungen
- Erkrankungen mit Beeinträchtigung des KM (Leukosen, Myelome, Karzinommetastasen)
- medikamentöse bzw. toxische Schädigung

Umsatzstörungen u.a.

- immunologisch bedingt
 - akute oder chron. Immunthrombozytopenie (ITP)
 - HIT Typ II
- mechanisch bedingt
- Sepsis, Verbrauchskoagulopathie



Screening Test: Funktion der primären Hämostase: Blutungszeit

Indikation

- **Suchtest** zur Erkennung von Störungen der **primären** Hämostase, insbesondere:
 - V. a. von Willebrand-Jürgens-Syndrom
 - V. a. Thrombozytopathie, (Thrombozytopenie)
 - (Kontrolle der Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern)



Messgröße: Blutungszeit n. Ivy



- ca. 1 mm tiefe Wunde gesetzt,
- alle 15 Sekunden werden die austretenden Blutropfen ohne Berührung des Wundrandes abgesaugt
- Zeitmessung bis zum Ende des Blutaustritts
- Referenzbereich: 3 min bis ca. 8 min

Nachteile :

- Untersucherabhängig
- Nicht gut „standardisiert“
- Grosse Streubreite
- Nicht beliebig oft wiederholbar
- Infektions- und Blutungsgefahr
- Sensitivität relativ niedrig, d.h. leichte Störungen der Thrombozytenfunktion können übersehen werden.



Messgröße: Blutungszeit

medizinische Beurteilung

- Referenzbereich: 3 min. bis ca. 8 min.
- diagnostische Wertigkeit:
 - Verlängerung bei Thrombozyten $< 100.000 \mu/l$
 - Verlängerung bei Thrombozytopathien
 - Verlängert bei von Willebrand-Jürgens-S, je nach Schweregrad
 - bei Therapie mit Thrombozyten-Aggregationshemmern (z.B. ASS)



Messgröße: in vitro Blutungszeit

Screening-Test: PFA-100®



- Vollbluttest
- Plättchenadhäsion und -aggregation
- Hohe Scherkräfte



Kollagen
Adrenalin



Kollagen
ADP

Verschlusszeit abhängig von

- Thrombozytenzahl (nicht messbar $<100.000 /\mu\text{L}$)
- Thrombozytopathie
- VWF
- Hämatokrit ($<30\%$)
- Plättcheninhibierende Substanzent (z.B. Aspirin)



Thrombozytopathie: Ursachen

Hereditär u.a.:

- Störungen der Adhäsion (Bernard-Soulier, Gp Ib/V/IX)
- Störung der Aggregation (Glanzmann, Gp IIb/IIIa)
- Störung der Sekretion (Storage-Pool-Disease)

Erworben u.a.:

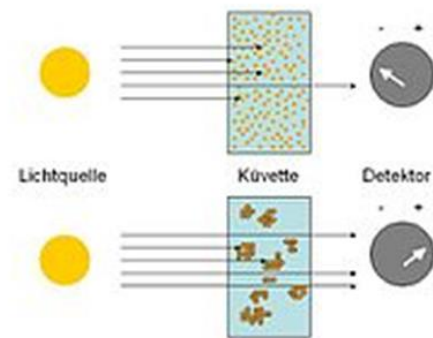
- Medikamente (ASS/NSAR, Clopidogrel/Ticagrelor, Gp IIb/IIIa-Antagonisten)
- extrakorporale Zirkulation
- chronische Niereninsuffizienz
- hämatologische Erkrankungen



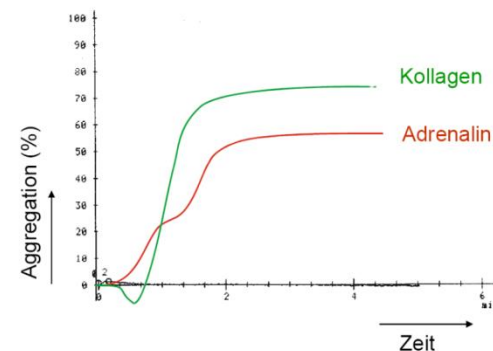
Messgröße: Thrombozytenfunktion, Aggregometrie

Thrombozyten-Aggregation nach BORN (LTA)

- Plättchenzahl $> 120.000/\mu\text{L}$, PRP
- Zugabe aktivierender/aggregierender Substanzen u.a.
 - Kollagen $10 \mu\text{g/mL}$
 - Epinephrin $5 \mu\text{M}$
 - ADP $5 \mu\text{M}$
 - Arachidonsäure $0,5 \text{ mM}$
- Aggregation erhöht Lichtdurchlässigkeit in der Messküvette



Thrombozyten-Aggregation nach BORN

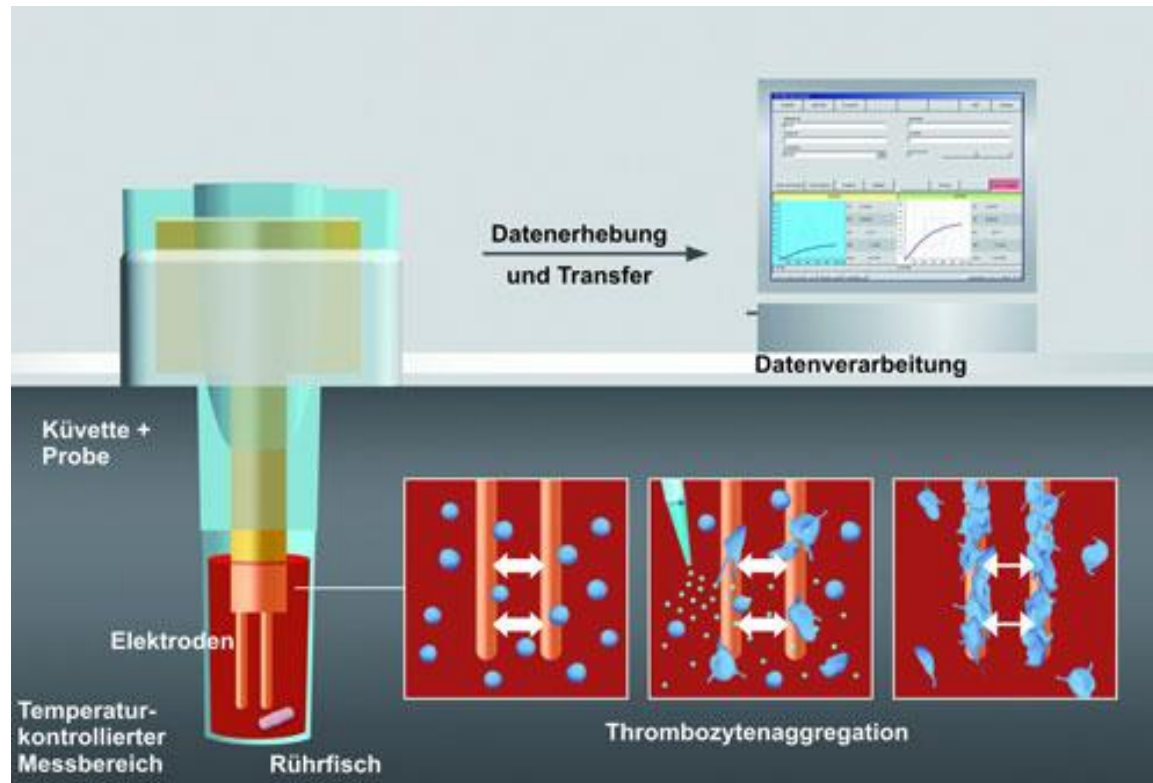


Quelle: Prof. Dr. A.
Tiede; Hämostase
Zentrum, Medizinische
Hochschule Hannover



Impedanzaggregometrie

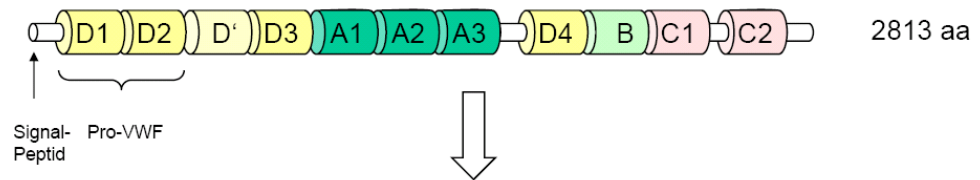
Detektion der Widerstandsänderung zwischen den Elektroden durch Aggregation aktivierter Thrombozyten.



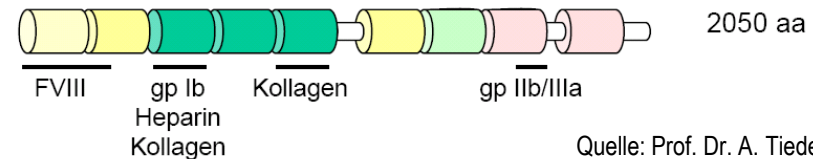
Indikation: Überwachung der Thrombozytenfunktionshemmer: ASS/NSAR, ADP Rezeptor Inhibitoren

von Willebrand Antigen

Struktur:



Bindungsstellen:



Quelle: Prof. Dr. A. Tiede;
Hämophilie Zentrum,
Medizinische Hochschule
Hannover

Synthese

- Endothel

■ Funktion

- Primäre Hämostase

Thrombozytenadhäsion und –aggregation unter hohen Scherkräften

- Sekundäre Hämostase

Träger- und Schutzprotein für FVIII



Von Willebrand Syndrom (vWS)

Klassifikation	Typ 1	Typ 2	Typ 3
Häufigkeit	70-80 %	10-20 %	ca. 10 %
Defekt	Quantitativ (<50 %)	Qualitativ (MM-Struktur, Funktion)	Quantitativ (<1 %)
Vererbung	Autosomal- dominant	Variabel	Autosomal- rezessiv



Screening:

- Blutungszeit/PFA100
- Thrombozytenzahl
- (Thrombozytenfunktion)
- aPTT

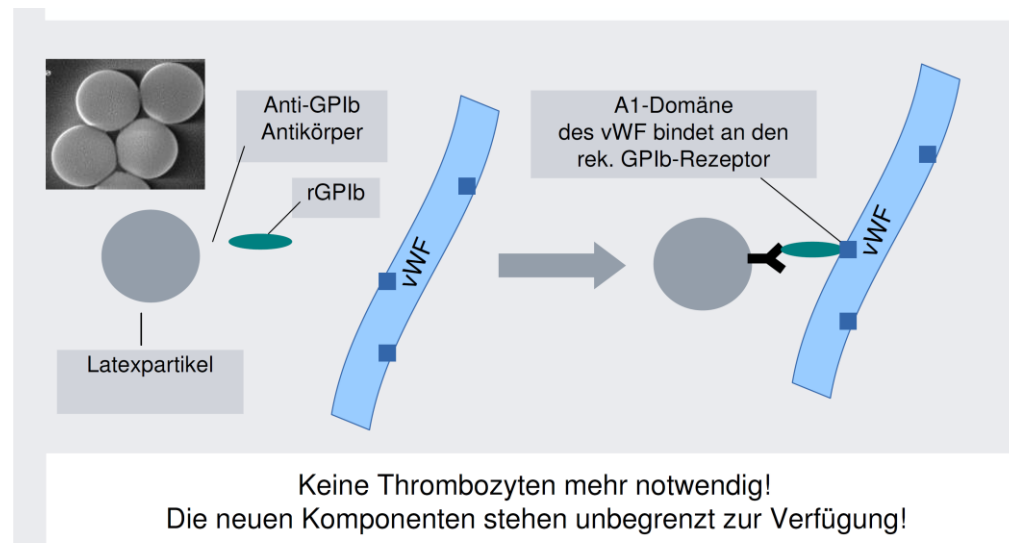
Tests:

- **vWF:Ag (ELISA)**
- **vWF:RCo (GPIb Aktivität)**
- **FVIII:C**
- vWF:CB
- vWF:FVIII

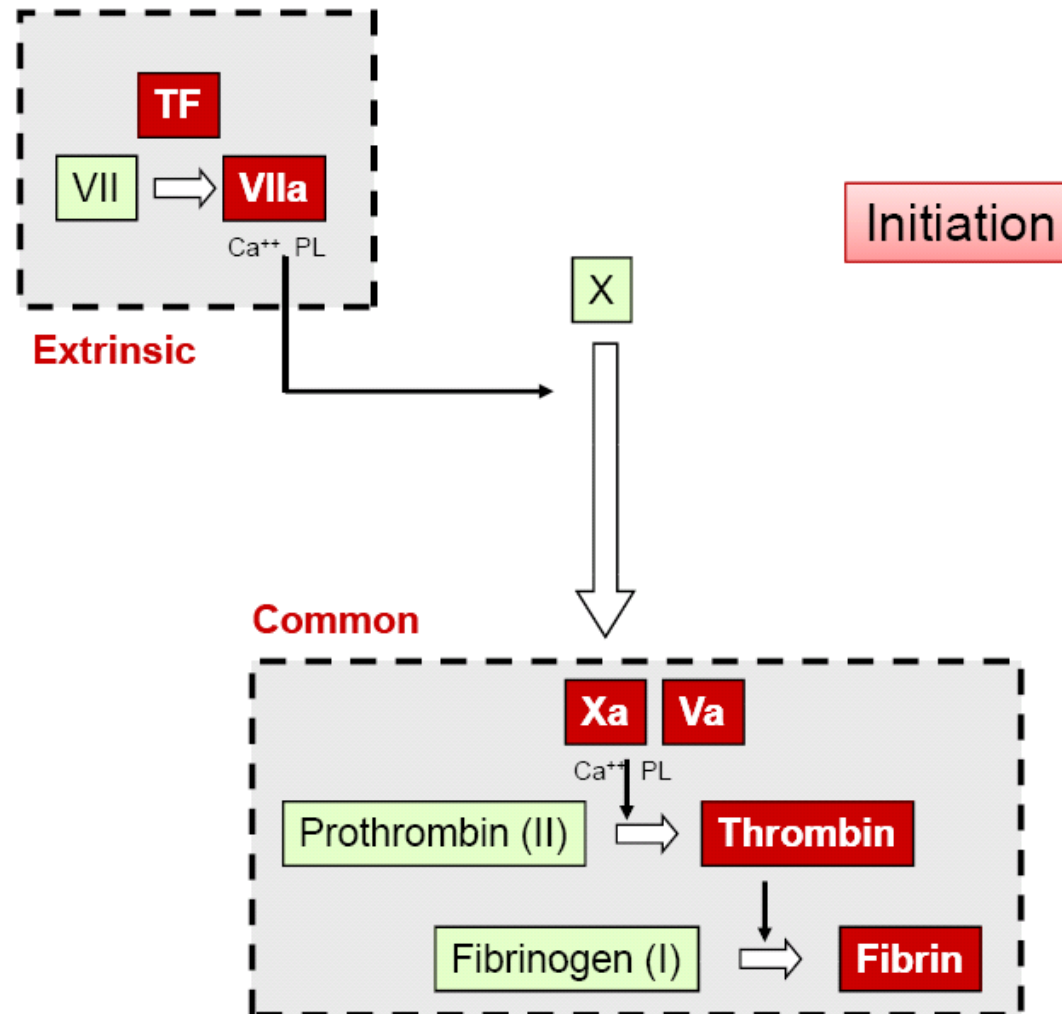
Spezialtests:

- Multimeranalyse
- Gendiagnostik

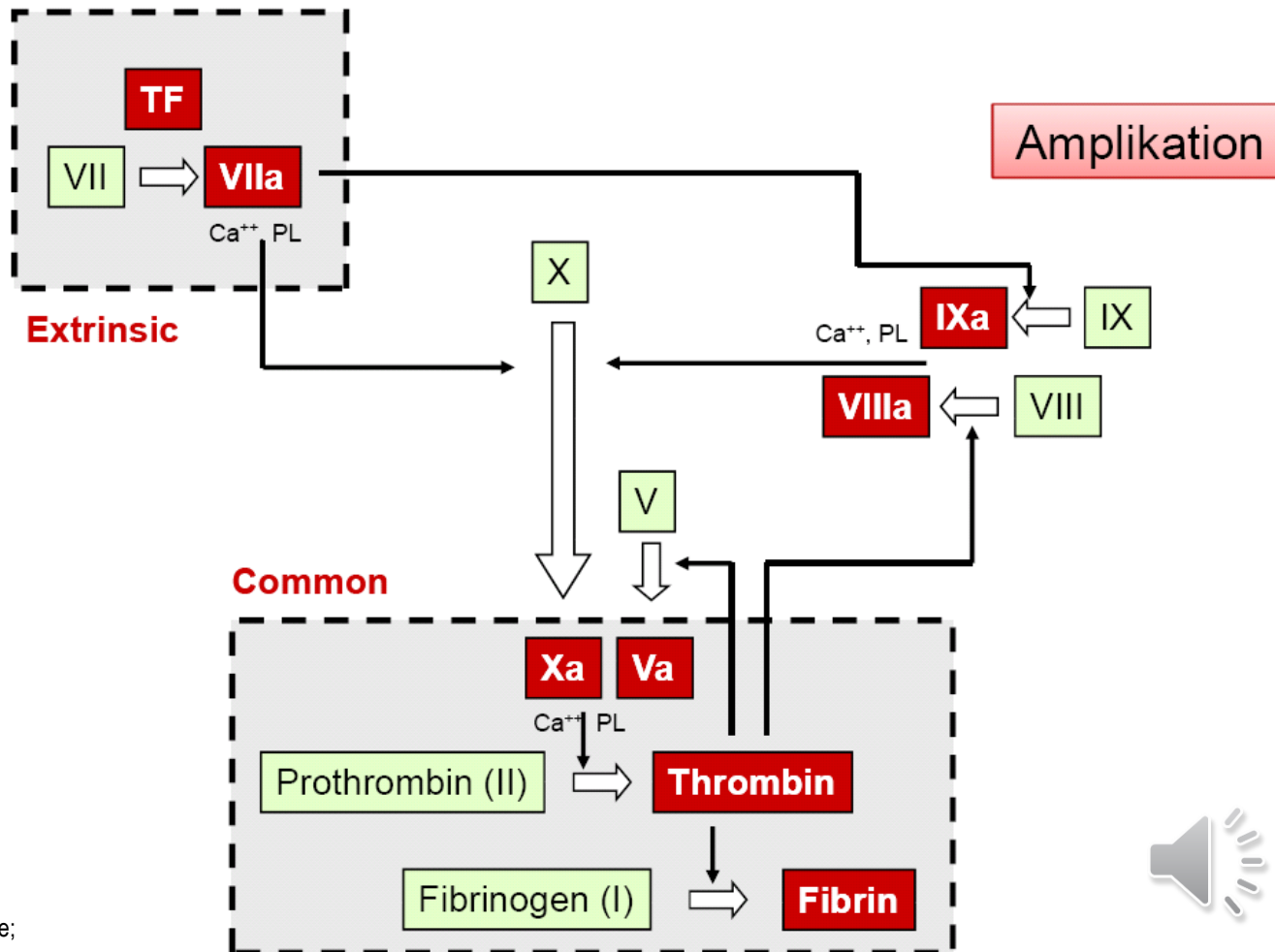
Ristocetin-Cofaktor



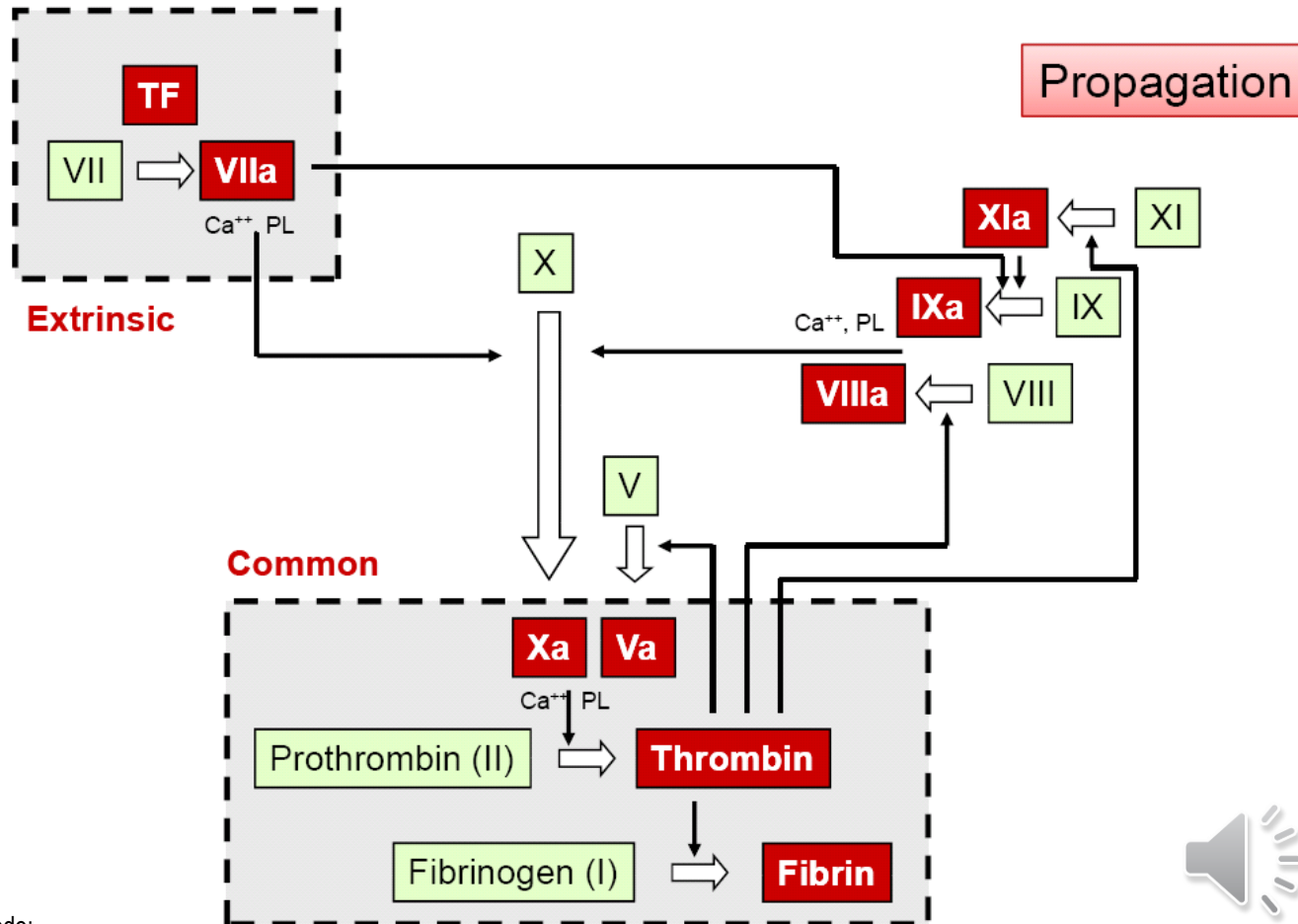
Plasmatische Gerinnung: “Gerinnungskaskade”



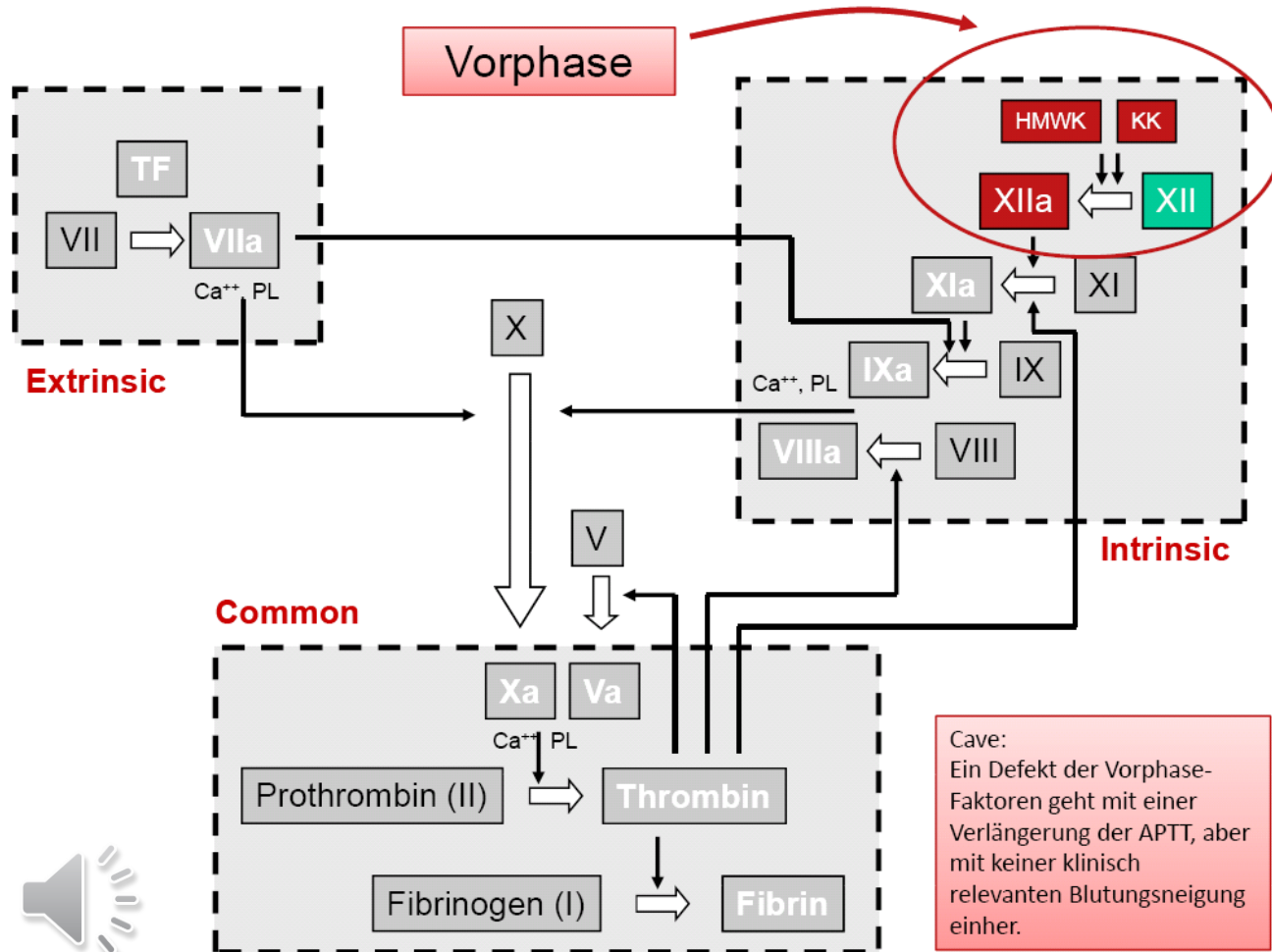
Plasmatische Gerinnung: “Gerinnungskaskade”



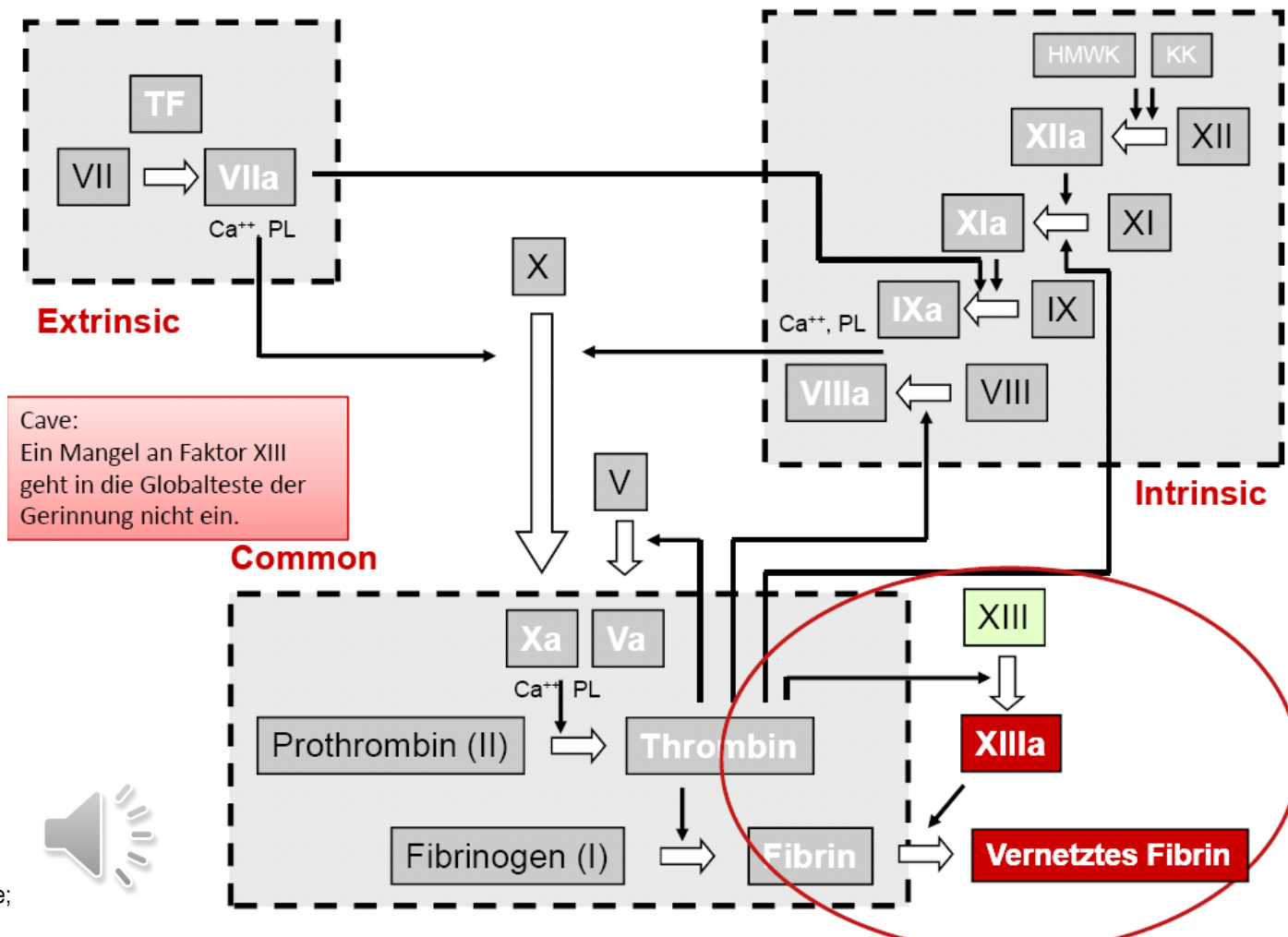
Plasmatische Gerinnung: “Gerinnungskaskade”



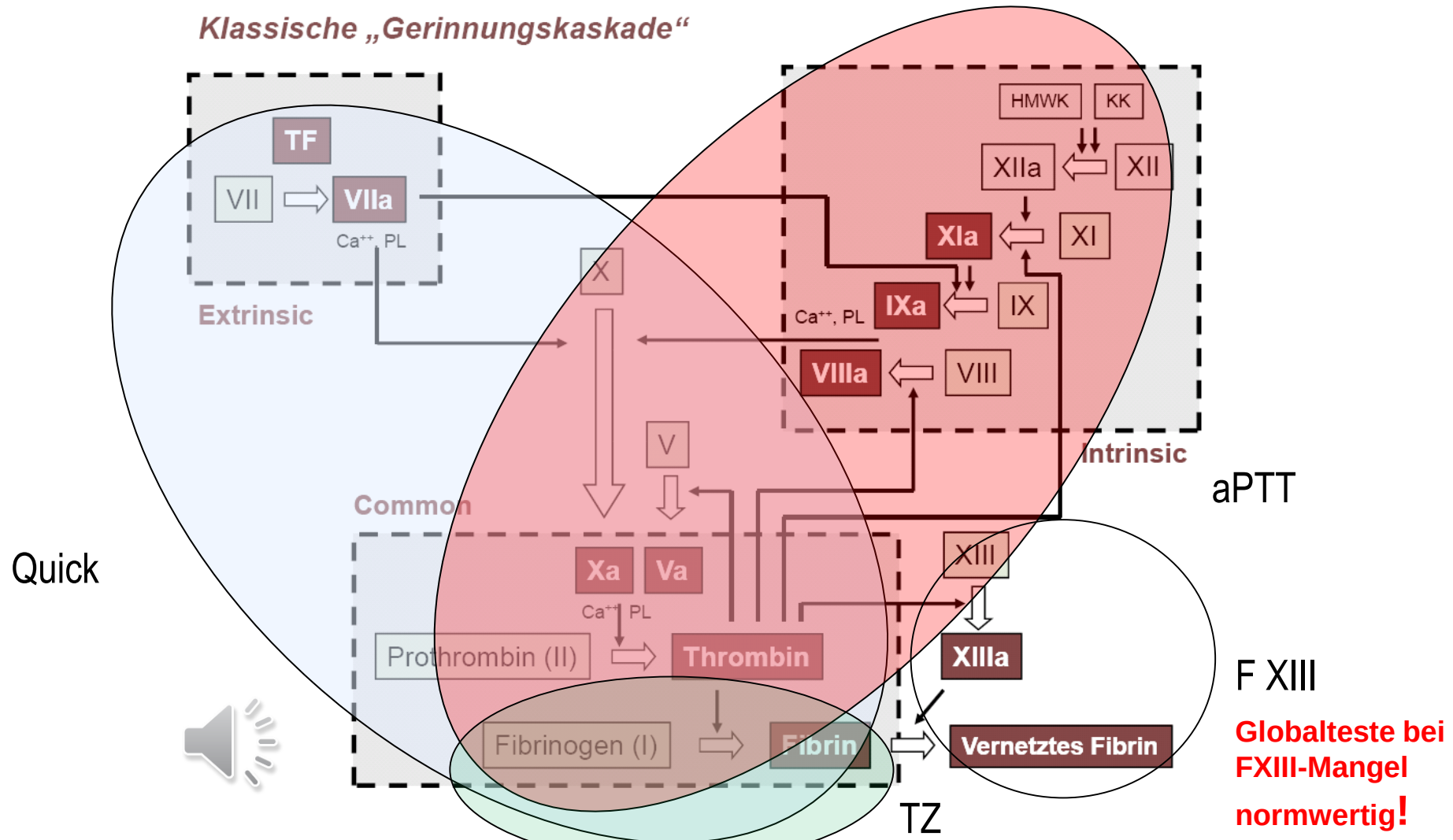
Plasmatische Gerinnung: “Gerinnungskaskade”



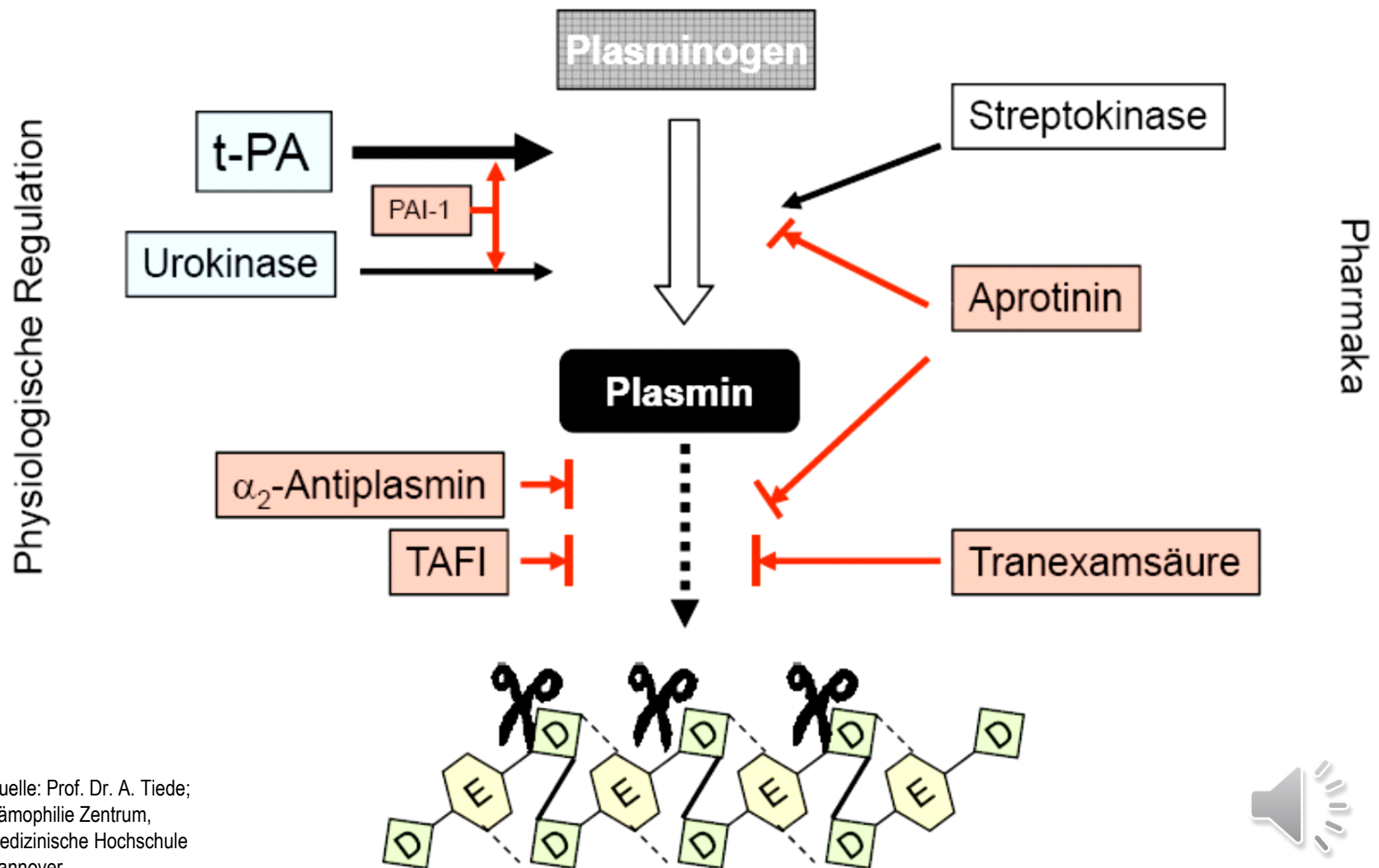
Plasmatische Gerinnung: “Gerinnungskaskade”



Plasmatische Gerinnung: Globalteste, Quick/INR, aPTT, TZ



Fibrinolyse, D-Dimere



Diagnosegang: Hämorrhagische Diathese

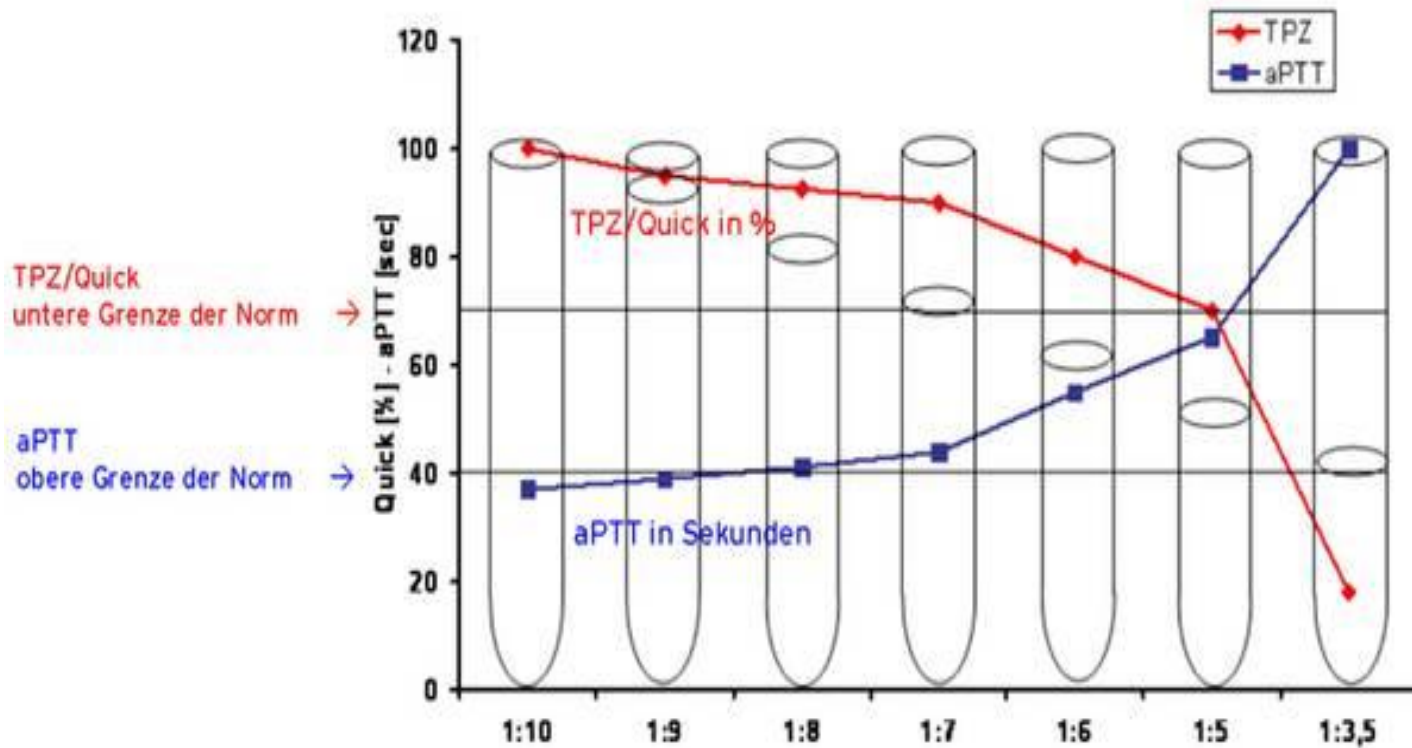
Hämostaseologische Labordiagnostik (**Stufendiagnostik**)

- **Basisdiagnostik** zur Erfassung von Störungen:
 - **primäre Hämostase**
 - Thrombozytenzahl ✓
 - Blutungszeit ✓
 - **sekundäre Hämostase**
 - Phasentests (Globaltest)
- **Quick-Test** erfasst die Faktoren **VII, X, V, II, I**
- **aPTT** erfasst die Faktoren (**XII**), **XI**, **IX, VIII**, **X, (V)**, **II, I**
- **TZ** erfasst die **Fibrinbildung**

Weiterführende Diagnostik ist abhängig von Leitbefunden aus der Basisdiagnostik und der klinischen Fragestellung.



Diagnostik: Präanalytik



Töpfer et al. Präanalyt. Probleme b. Gerinnungsuntersuchungen im venösen Citratbl., Katheterbl. und Kapillarbl. JLabMed 2000;24:514-20



Messgröße: Thromboplastinzeit, (Quick-Wert)

Synonyme: Thromboplastinzeit (TPZ-Sek), Quick (%)

■ Indikation

- **Globaler Suchtest** bei hämorrhagischen Diathesen zur Abklärung des exogenen Aktivierungsweges
- Überwachung der **oralen Antikoagulantientherapie (Cumarinderivate)**
- V.a. Vitamin K-Mangel
- Kontrolle der Leber-Biosynthesefunktion

■ Prinzip:

- Fibrinbildung ausgelöst durch Zugabe von Gewebs-Thromboplastin (=TF+PL) und Calcium (im Überschuss) zu Citrat-Plasma, Zeitmessung

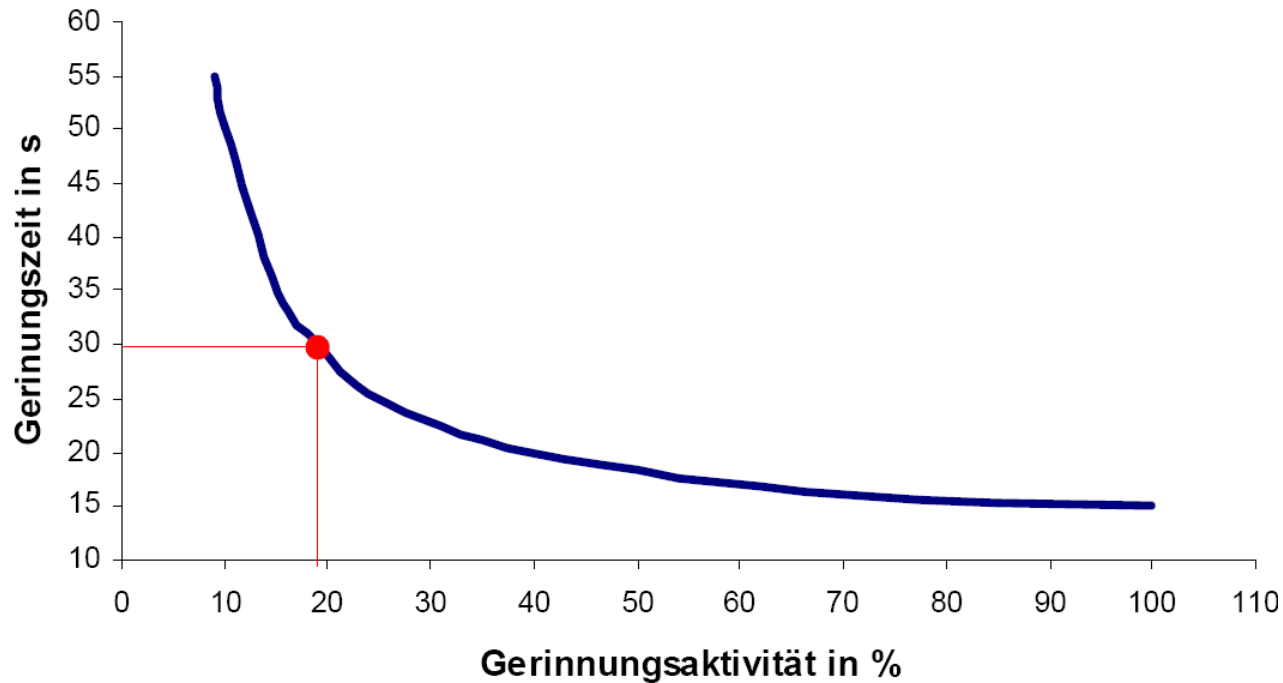
■ Referenzbereiche

reife Neugeborene: 40 %

ab 3. Lebenswoche und Erwachsene: 70 – 130 %



Thromboplastinzeit, (TPZ, Quick-Wert): Standardisierung



100%=Gerinnungszeit aus Pool von Normalspendern (Normplasma)



Vergleichbarkeit der Werte über die **INR**

Kontrolle der Therapie mit Vitamin K-Antagonisten

INR

- Angabe des Messergebnisses als INR (d.h. normiert auf offizielle WHO-Standard-Methode)
- Berechnung der INR (International Normalised Ratio) über Hersteller-spezifische Korrekturfaktoren (ISI = International Sensitivity Index) zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Methoden, ISI des 1.WHO-Standards = 1,0
- **Verwendung der INR nur für Patienten unter stabiler Cumarintherapie!!**
- ISI ist reagenz**chargen-** und **geräteabhängig!**

$$INR = \left(\frac{PT_{probe}}{PT_{poolplasma}} \right)^{ISI}$$



Messgröße: aPTT, aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Prinzip

- Fibrinbildung ausgelöst durch Zugabe von **partiellem Thromboplastin** (Phospholipid ohne Protein-Anteil (TF)), Oberflächen-Aktivatoren (z.B. Kaolin, Celit, Dextransulfat → aPTT) und **Calcium** (im Überschuss) zu Citrat-Plasma

Indikation

- Globaler Suchtest bei hämorrhagischen Diathesen zur Erfassung von Störungen des endogenen Aktivierungsweges und der gemeinsamen Endstrecke
- präoperatives Screening
- Überwachung der **Antikoagulation mit u.a. Heparin, Argatroban**

Auswertung

- Messzeit in Sekunden (25 – 36 sek.), Reagenz- und Geräte-abhängig)



Messgröße: aPTT

Klinische Beurteilung

diagnostische Wertigkeit

- Erfassung einer signifikanten Verminderung der Faktoren **XII, XI, IX, X, VIII, (V), II** und Fibrinogen (sowie von Prekallikrein und HMW Kininogen)
- Erkennung einer **Hämophilie A oder B** (Methoden-abhängig)
- Verlängerung möglich bei **vW-Syndrom** (Faktor VIII Verminderung)
- verlängert bei **Leberfunktionsstörungen** und **Vitamin K-Mangel** und **Cumarinderivat-Therapie**; jedoch nicht geeignet zur Therapiekontrolle
- Verlängert in Abhängigkeit von der **Anwesenheit von Heparin** (unfraktioniertes Heparin, Therapiekontrolle) (Methoden-abhängig)
- Erfassung von **Lupusantikoagulantien**
- aPTT ist **nicht** geeignet zur Therapiekontrolle mit LMWH.



Messgröße: Thrombinzeit, TZ

Methodik: Bestimmung der Gerinnungszeit von Citratplasma nach Zugabe von Thrombin (Rinderthrombin, ohne Calcium).

Indikation:

- Heparintherapie (Steuerung einer Heparintherapie mittels der TZ ist dann zu empfehlen, wenn die aPTT durch zusätzlich Einflüsse nicht mehr eindeutig interpretierbar ist)
- Hypo/Dysfibrinogenämie
- Hyperfibrinolyse
- unklare aPTT Befunde
- Abschätzung eines Dabigratan-Talspiegels??

Referenzbereich

- 16 bis 22 Sekunden



Messgröße: Fibrinogen

Methode nach Clauss: Bestimmung der Gerinnungszeit nach Zugabe von Thrombin in hoher Konzentration. Dadurch erreicht man eine Abhängigkeit von der Fibrinogenkonzentration.

Indikation

- fortgeschrittener hepatogener Koagulopathie,
- Therapie mit Fibrinolytika
- DIC (Verbrauchskoagulopathie) mit begleitender Hyperfibrinolyse
- primärer Hyperfibrinolyse.
- angeborene Hypofibrinogenämie /Dysfibrinogenämie (Diskrepanz zwischen der Clauss-Methode und der immunologischen Fibrinogen-Konzentration)
- Akut Phase Reaktionen

Referenzbereich: 180 - 400 mg/dl.



Leitbefunde: Indikationen zur weiterführenden Gerinnungsdiagnostik

- aPTT und Quick auffällig (TZ und Fibrinogen normal):
 - Faktoren (X), II, (V)
- Quick erniedrigt, aPTT normal:
 - Faktor VII, (Cumarine), V, X
- aPTT verlängert, Quick normal:
 - Faktoren XII, XI, IX, VIII, XIV, XV
 - Heparin
 - Lupus-Antikoagulans
- **Leitbefund:** Blutungsneigung aber aPTT, Quick, TZ, Fibrinogen o.B.
 - **Faktor XIII**
 - Einzelfaktoren (Globaltests i.d.R. erst bei < 30% der Aktivität verändert)



Diagnosegang: Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese)

Basisdiagnostik

Primäre Hämostase

- Thrombozytenzahl
- Blutungszeit

Sekundäre Hämostase

- Quick/INR
- aPTT
- TZ
- Fibrinogen
- F XIII

Spezielle Diagnostik

- Thrombozytenfunktionstests
- vWS-Marker
- Einzelfaktorbestimmung
- Hemmkörper
- Fibrinogen/Fibrindegradationsprodukte



Befundkonstellationen: Hämorrhagische Diathese

Verdachtsdiagnose	Quick	PTT	Thrombo- zytenzahl	Blutungs- zeit
Vaskuläre hämorr. Diathese	normal	normal	normal	normal
Heparin-Therapie	normal	↑	normal	normal
Kumarin-Therapie; Vit.K-Mangel	↓	n - ↑	normal	normal
Leberschaden; Verbrauchs- koagulopathie (DIC)	↓	↑	↓	↑
Thrombozytopenie	normal	normal	↓	↑
Thrombozytopathie	normal	normal	normal	↑



Vorlesung Hämostaseologie

Teil 2 (Thrombophilie)

Dr. med. Derik Hermsen, OA Zentrallabor, Hämostaseologe



Geschätztes relatives venöses Thromboserisiko

Normalbevölkerung	1
Alter <50 Jahre	0,5
Alter >50 Jahre	3
Schwangerschaft	5
Wochenbett	20

■ positive Familienanamnese	3
■ Zustand nach Thrombose	30 ++
■ Immobilisation	20
■ Adipositas	3
■ Tumorerkrankung	2
■ Ovulationshemmer	4
■ Hormonsubstitution	3

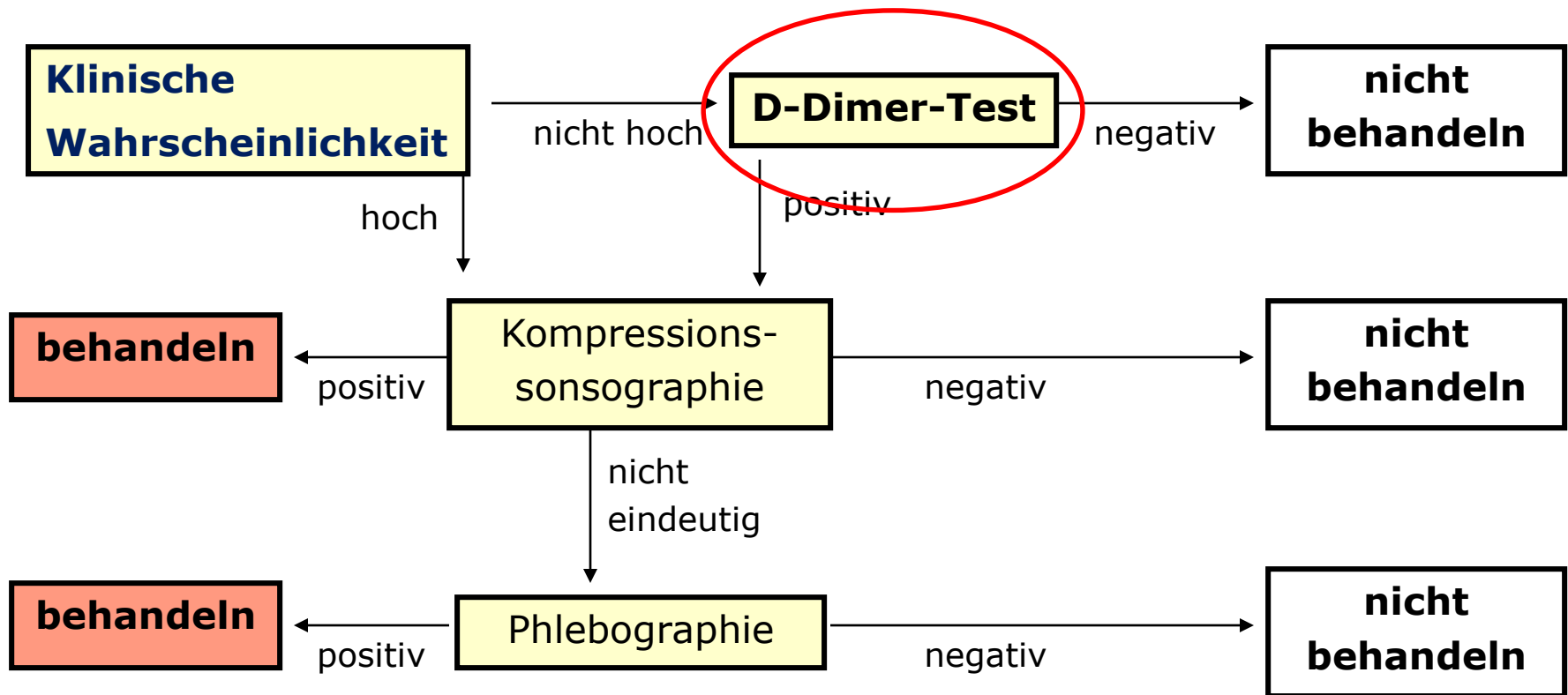


Bestimmung der klinischen Wahrscheinlichkeit einer Thrombose (Wells-Score)

<u>klinische Charakteristika</u>	<u>Score</u>
aktive Krebserkrankung	1,0
Lähmung o kürzl. Immobilisation der Beine	1,0
Bettruhe (>3 Tage): große Chirurgie (<12 Wochen)	1,0
Schmerz/Verhärtung entlang der tiefen Venen	1,0
Schwellung des ganzen Beins	1,0
US-Schwellung >3cm gegenüber Gegenseite	1,0
eindrückbares Ödem am symptomat. Bein	1,0
Kollateralvenen	1,0
frühere dokumentierte TVT	1,0
alternative Diagnose mindestens ebenso	-2,0
<u>wahrscheinlich wie tiefe Venenthrombose</u>	
TVT-Wahrscheinlichkeit	
hoch	$\geq 2,0$
nicht hoch	$< 2,0$



Algorithmus bei V.a. Venenthrombose, D-Dimere



■ Algorithmus bei V.a. Venenthrombose aus DGA 2005, Vorgehensweise hat sich als sicher erwiesen (Wells et al. 2003)

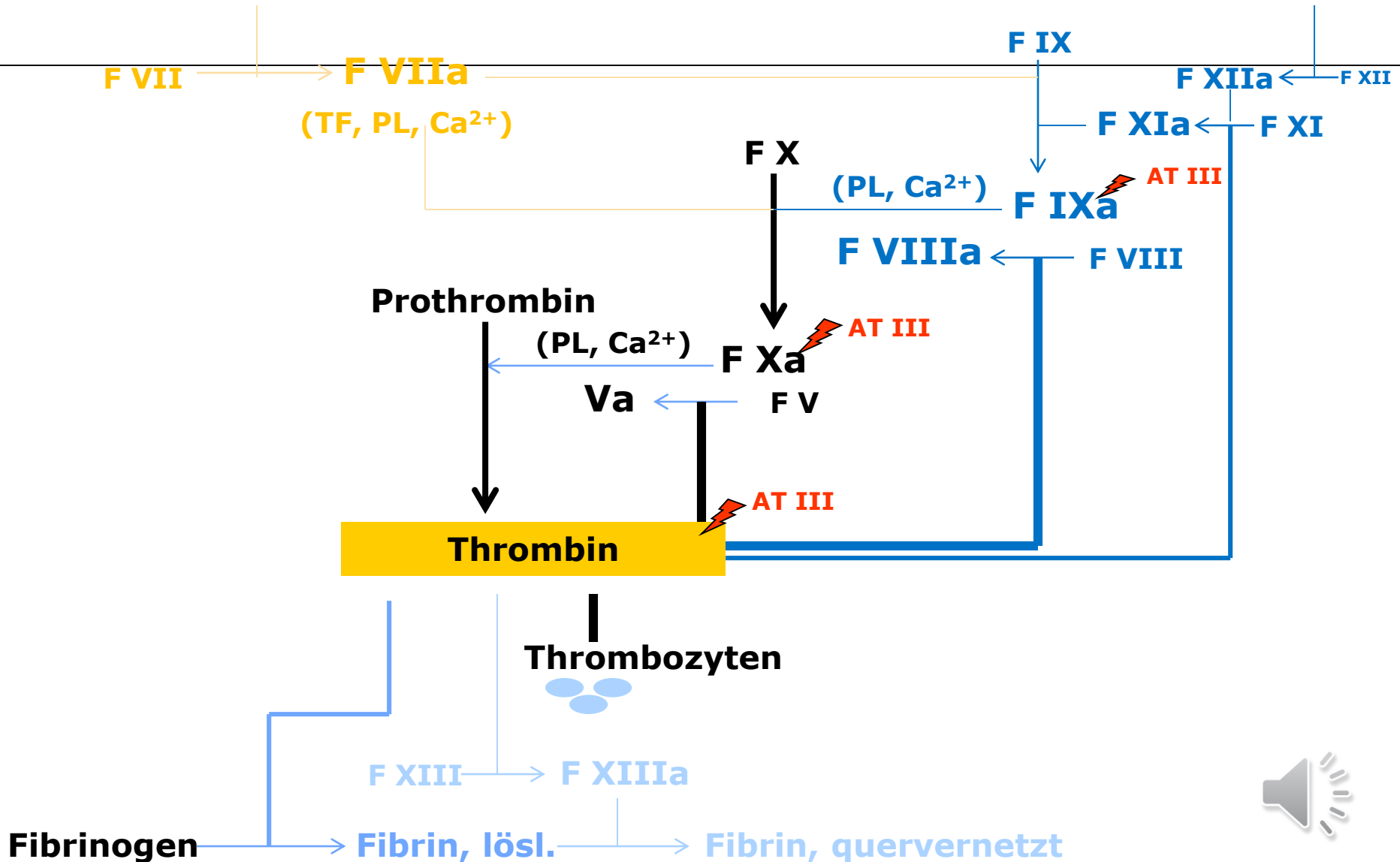


Gerinnungskaskade, Antithrombin AT III

Extrinsisches System

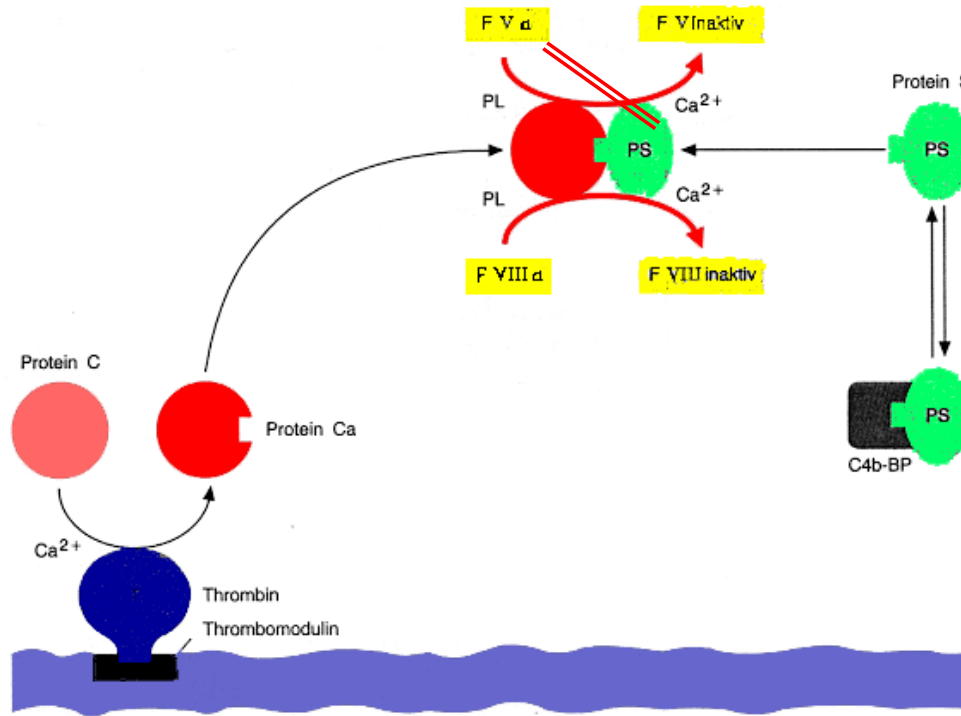
Gewebe-Faktor (TF)

Negativ geladene Oberfläche





APC-Resistenz, Faktor V Leiden



APC-Resistenz: Aktiviertes Protein C (APC) kann aktivierte Faktoren nicht spalten

Faktor V Leiden: Faktor V ist an der Spaltungsstelle des APC mutiert.

Sehr häufig: 6% - 8% der Mitteleuropäer sind Merkmalsträger

Risiko Heterozygote: 5x bis 10x

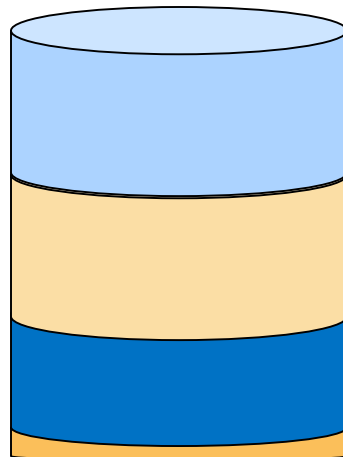
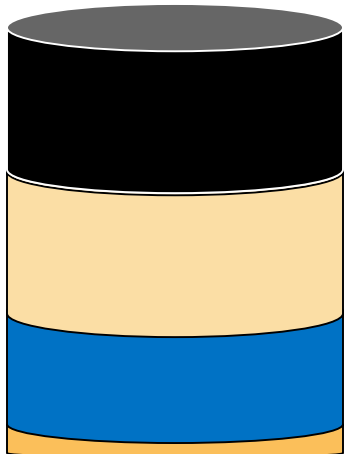
Risiko Homozygote: 80x bis 100x



APC-Ratio

Bestimmung mittels zweier modifizierter APTT

$$APC - Ratio = \frac{APTT \text{ mit APC}}{APTT \text{ ohne APC}}$$



50 µl CaCl₂ mit/ohne APC

50 µl APTT-Reagenz

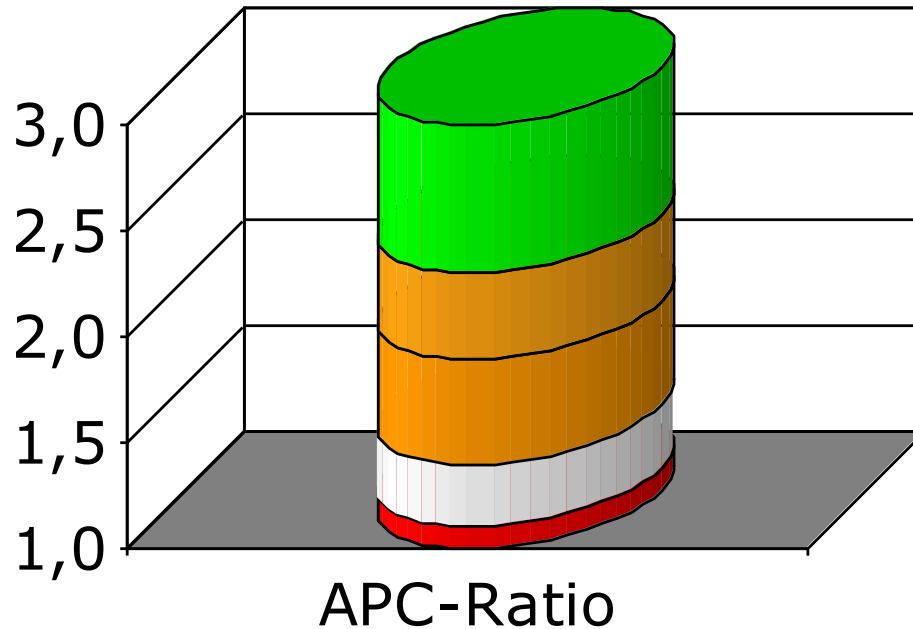
40 µl Faktor V Mangelplasma

10 µl Patientenplasma



APC-Ratio

Diagnostische Bereiche

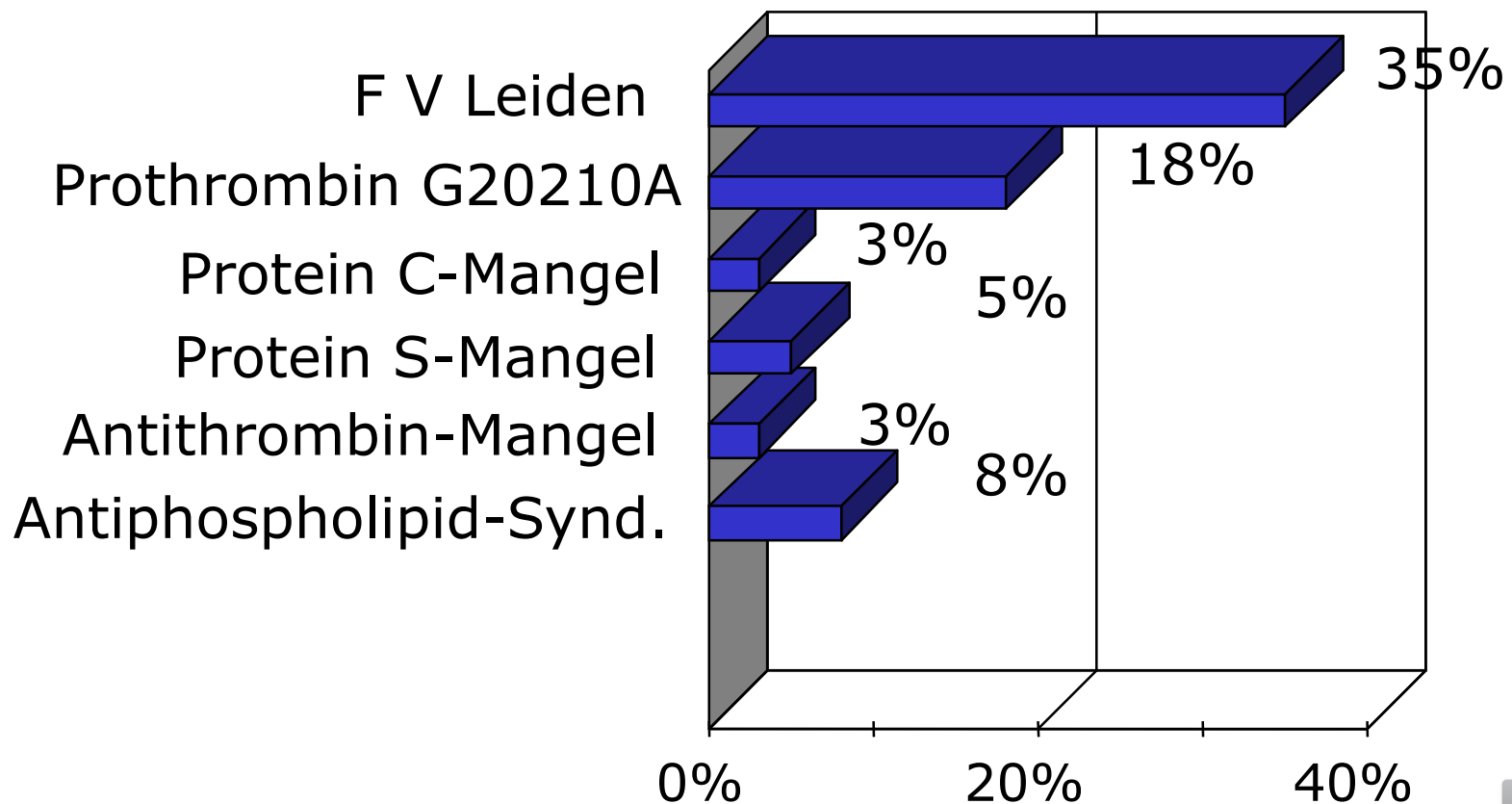


- >2,3 Wildtyp
- 2,0-2,3 Graubereich
- 1,4-1,9 Heterozygot
- 1,0-1,1 Homozygot

Die Bestätigung des **Faktor V Leiden** erfolgt mittels PCR.



Häufigkeitsverteilung bei Patienten mit Thrombose/Embolien



Prothrombinmutation im untranslatierten 3'-Bereich

Prothrombin wird verstärkt gebildet, Thromboseneigung

Risiko Heterozygote: 3x bis 5x

Häufig: 2% der mitteleuropäischen Bevölkerung sind Merkmalsträger

Thrombophiliescreening Parameter der 1. Wahl

Bestimmung nur mittels PCR möglich



Protein C-Mangel

Bestimmung: Aktivität und Antigen

Typ 1: echter Mangel

Aktivität und Antigen vermindert

Typ 2: Dysproteinämie

Aktivität vermindert und Antigen normal

Selten im Vergleich zu anderen Ursachen einer Thrombophilie

Bestimmung nur möglich, wenn der Patient noch kein Marcumar® erhält



Protein S Mangel

Bestimmung: Aktivität, gesamtes und freies Antigen

Typ 1: echter Mangel
Aktivität und Antigene vermindert

Typ 2: Dysproteinämie
Aktivität vermindert und Antigene normal

Typ 3: vermehrte Bindung an das C4b-BP
Aktivität und freies Ag vermindert, gesamtes Ag normal

Ebenfalls selten im Vergleich zu anderen Ursachen einer Thrombophilie

Bestimmung nur möglich, wenn der Patient noch kein Marcumar® erhält



Antiphospholipid-Syndrom (APS)

Erworbene Autoimmunerkrankung mit Antikörpern gegen Phospholipide

Klinik: Thrombosen, Embolien (v. a. arteriell!) und Aborte

Häufig: 30% aller Aborte werden hierdurch verursacht

Diagnostik:

- **Nachweis von Anticardiolipin-Ak, β 2-GP-AK (ELISA)**
- **Nachweis von Lupus Antikoagulantien**
 - **APTT – Aktivierter partieller Thromboplastinzeit**
 - **dRVVT – diluted Russell's Viper Venom Time**



Diagnostisches Vorgehen

Thrombophilie marker 1. Wahl

- APC Resistenz - Faktor V Leiden
- Prothrombin G20210A
- Lupus Antikoagulantien
- Antithrombin
- Protein C und S

Thrombophilie marker spezielle Wahl

Aborte	→	Lupus Antikoagulantien
aPTT-Verlängerung	→	Lupus Antikoagulantien
arterielle Thromboemb	→	Lupus Antikoagulantien, (LP(a), Hcy)

Thrombophilie marker 2. Wahl

- Faktor VIII, Fibrinogen
- Plasminogen
- PAI, Antiplasmin?

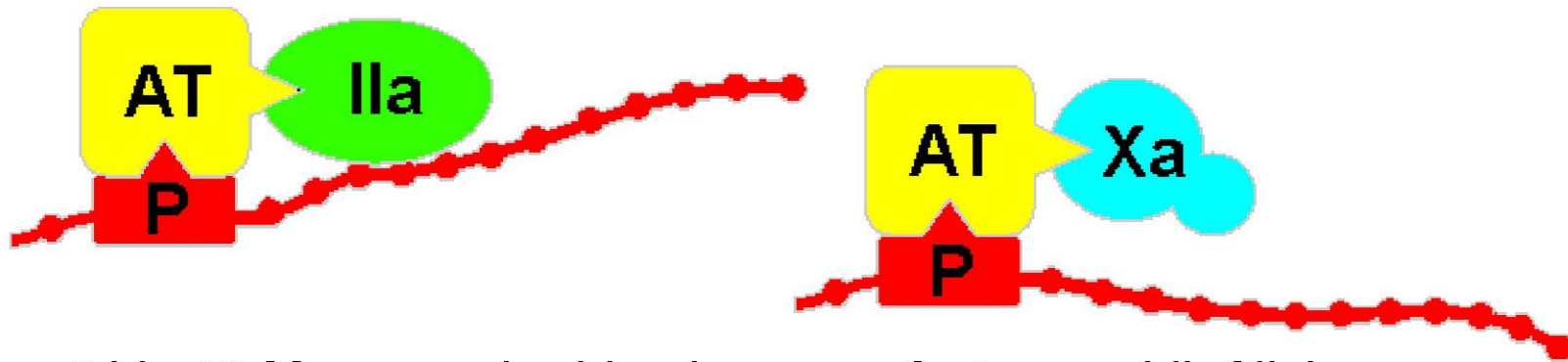




Wechselwirkung der LMWH mit Blutgerinnungsfaktoren

Heparinmoleküle mit

- mindestens 18 Monosacchariden hemmen Faktor IIa und Xa.

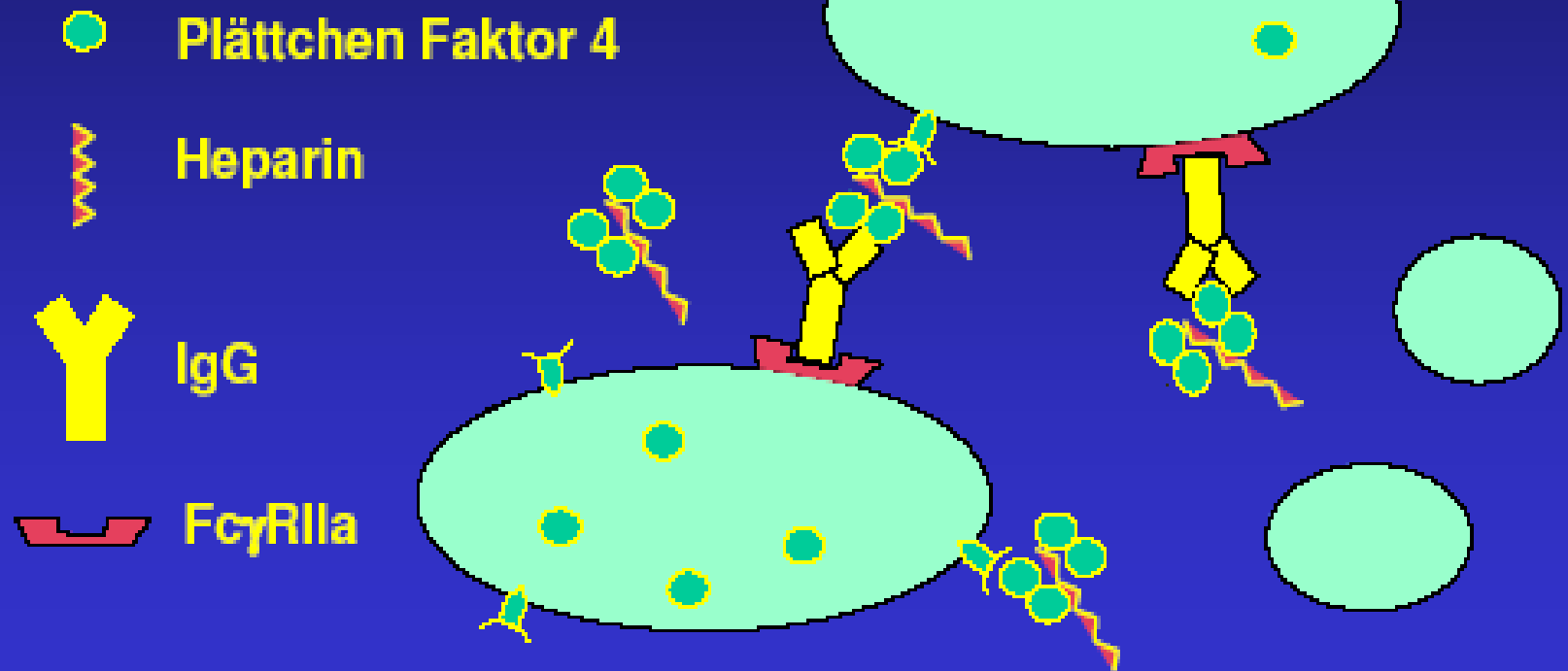


- 5 bis 18 Monosacchariden hemmen fast ausschließlich den Faktor Xa.



- weniger als 5 Monosacchariden haben fast keine gerinnungshemmende Wirkung (Holmer et al. 1986).

Heparin-induzierte Thrombozytopenie - Pathogenese -



Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)

4-T-Score (nach Lo GK et al; J Thromb Haemostas 2006, 4: 759 – 765)

Das Ausfüllen des 4-T-Scores erleichtert dem Labor die Auswahl von anderen diagnostischen Methoden, die bei Verdachtsdiagnostik von HIT angewendet werden können.

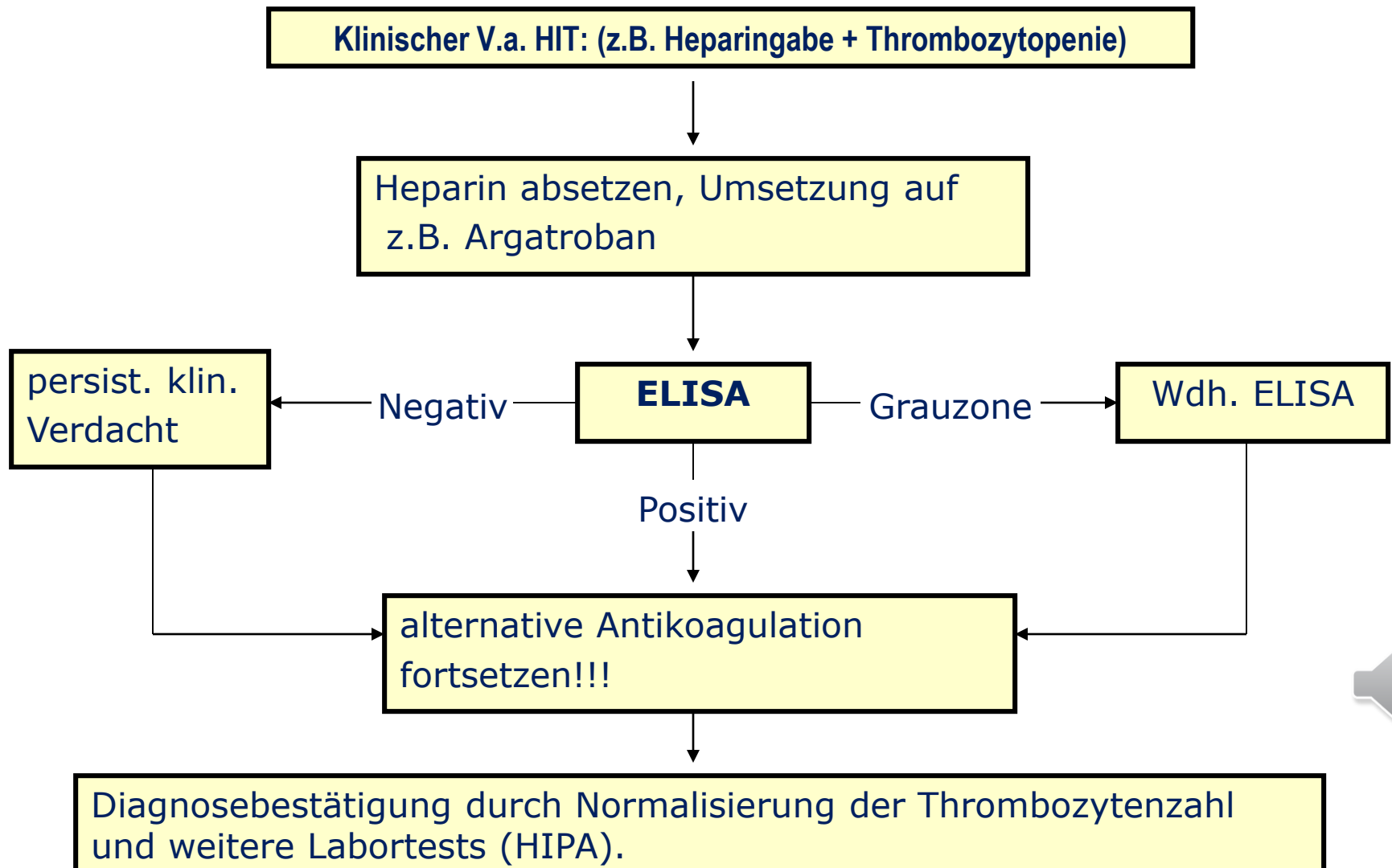
Bei einem Score < 4 ist eine HIT unwahrscheinlich. Eine Labordiagnostik sollte nur bei dringendem klinischen Verdacht erfolgen.

	Verdachtskriterien	Score	2	1	0
T1	Thrombozytopenie		niedrigster Wert ≥ 20 GPT und > 50% Abfall	niedrigster Wert 10 - 19 GPT oder 30 - 50% Abfall	Niedrigster Wert < 10 GPT oder < 30% Abfall
T2	Tag des Auftretens des Thrombozytenabfalls		Tag 5 - 10, oder < 1 bei früherer Heparintherapie (in den letzten 30 Tagen)	>10. Tag bzw. ≤ 1. Tag bei früherer Heparintherapie (innerhalb 30 - 90 Tage), oder unbekannt	Tag < 4 und keine frühere Heparintherapie
T3	Thrombosen oder andere Komplikationen		gesicherte neue Thrombose, Hautnekrosen, anaphylaktische Reaktionen (z.B. nach Heparinbolus)	fortschreitende oder rezidivierende Thrombose, Verdacht auf Thrombose (noch nicht bestätigt), oder nicht nekrotisierende Hautläsionen	keine Komplikationen
T4	Andere Gründe für Thrombozytenabfall		keine	denkbar	definitiv
	(=Summe T1-T4)		Wahrscheinlichkeits-Score		

HIT 4T Score beachten



HIT: therapeutischer Algorithmus



Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit !

