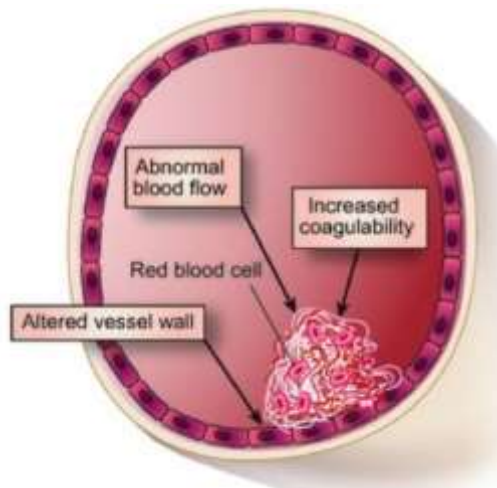


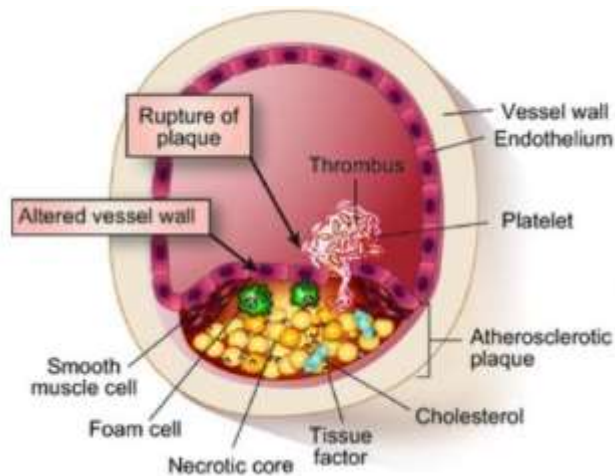
# Oralna antikoagulantna terapija – laboratorijski aspekti

Patricija Banković Radovanović  
spec. med. biokemije i lab. medicine  
OB Pula, Odjel za transfuzijsku medicinu

VENSKA  
TROMBOZA



ARTERIJSKA  
TROMBOZA



Antikoagulantna terapija

Antagonisti vitamina K ✓  
Indirektni inhibitori: trombina  
Fxa  
Direktni inhibitori: vanjskog puta,  
FVa i VIIIa,  
FXa ✓  
trombina ✓

Antitrombocitna terapija

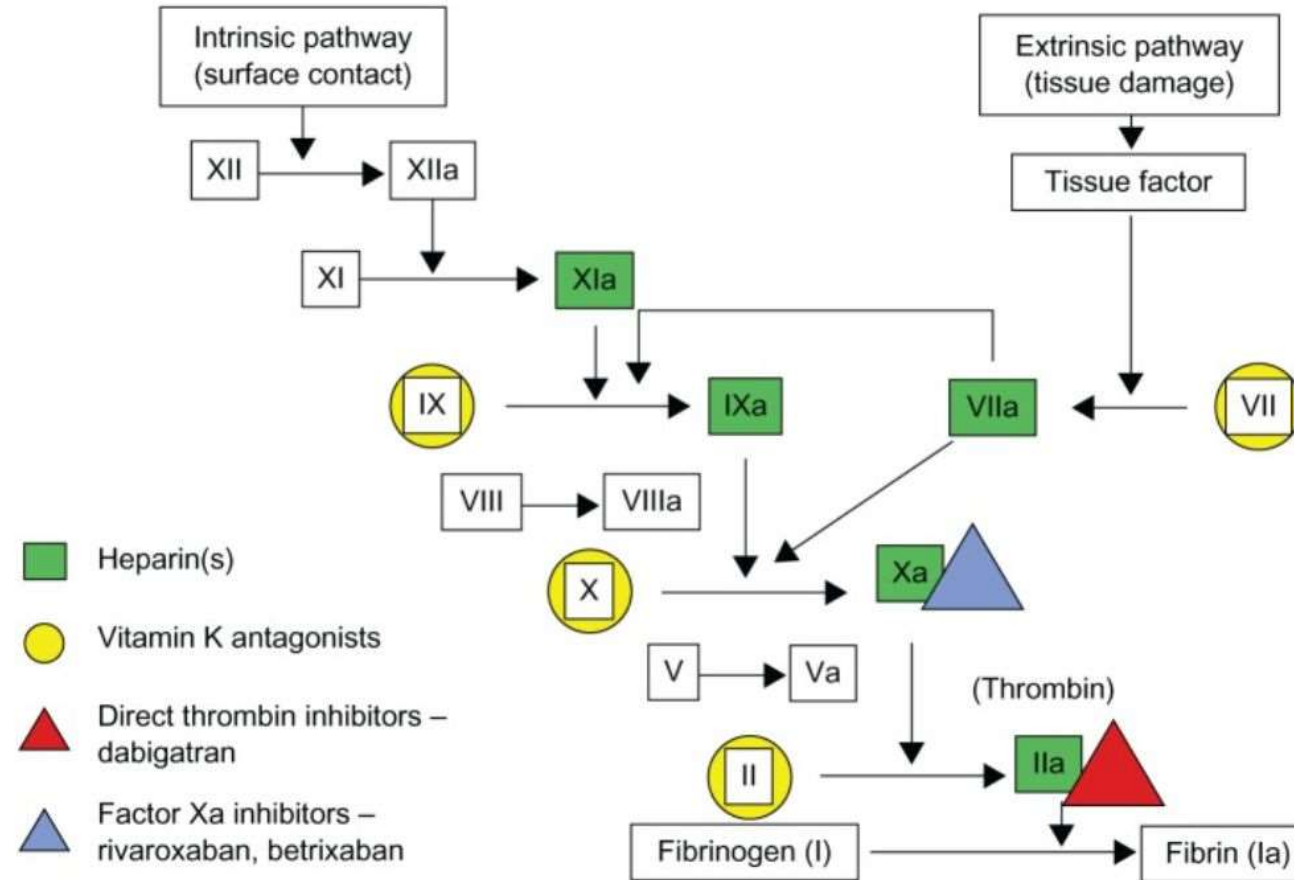
Inhibitori aktivacije trombocita  
Inhibitori agregacije trombocita

Fibrinolitička terapija

Urokinaza, streptokinaza, alteplaza

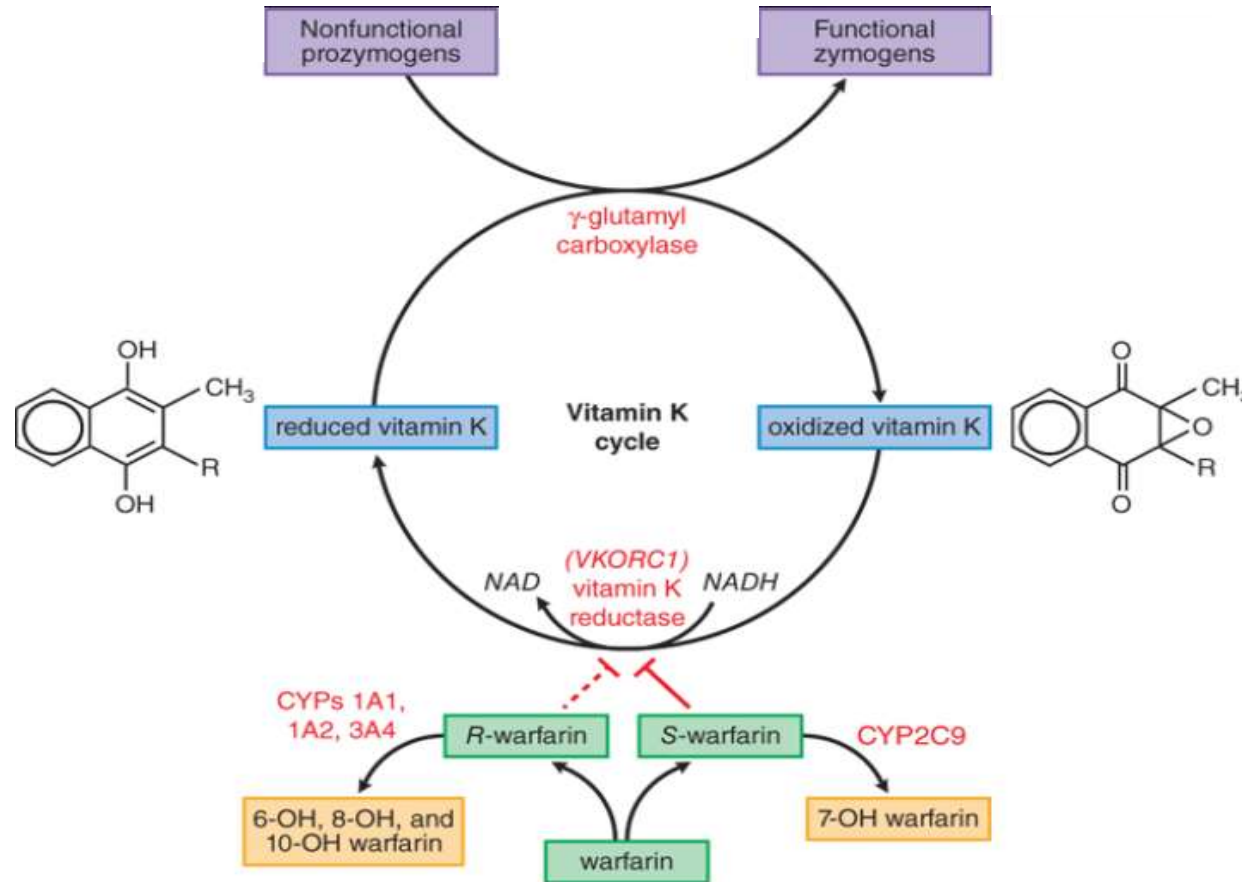
Atar D, Bode C, Stuerzenbacher A, Verheugt FWA. Anticoagulants for secondary prevention after acute myocardial infarction: lessons from the past decade. *Fundam Clin Pharmacol.* 2014;28:353-63.

# Mjesto djelovanja antikoagulansa u koagulacijskoj kaskadi



Ellis CR, Kaiser DW. The clinical efficacy of dabigatran etexilate for preventing stroke in atrial fibrillation patients. *Vasc Health Risk Manag.* 2013;9:341-52.

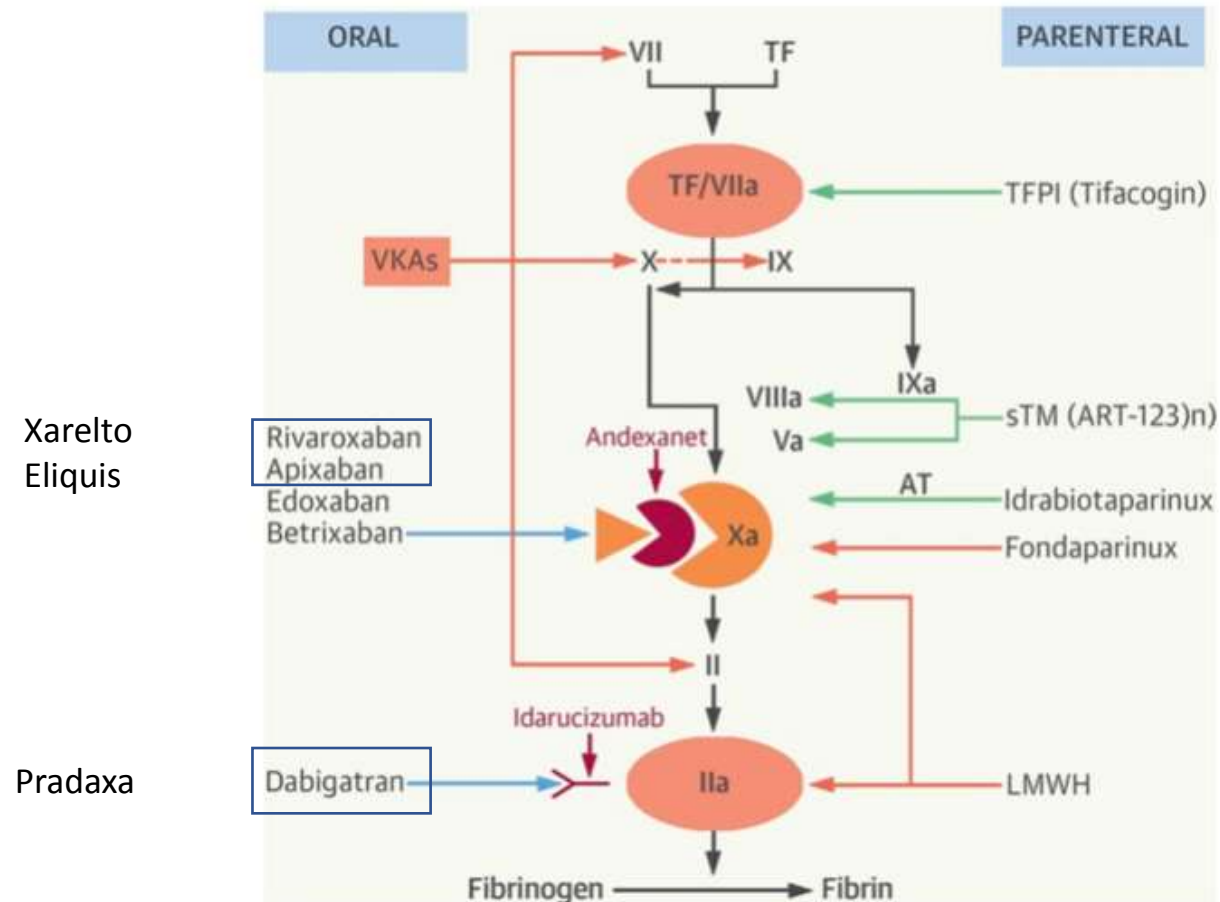
# Djelovanje antagonista vitamina K



Source: Laurence L. Brunton, Randa Hilal-Dandan, Björn C. Knollmann: Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Thirteenth Edition: Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

# Djelovanje novih oralnih antikoagulantnih lijekova

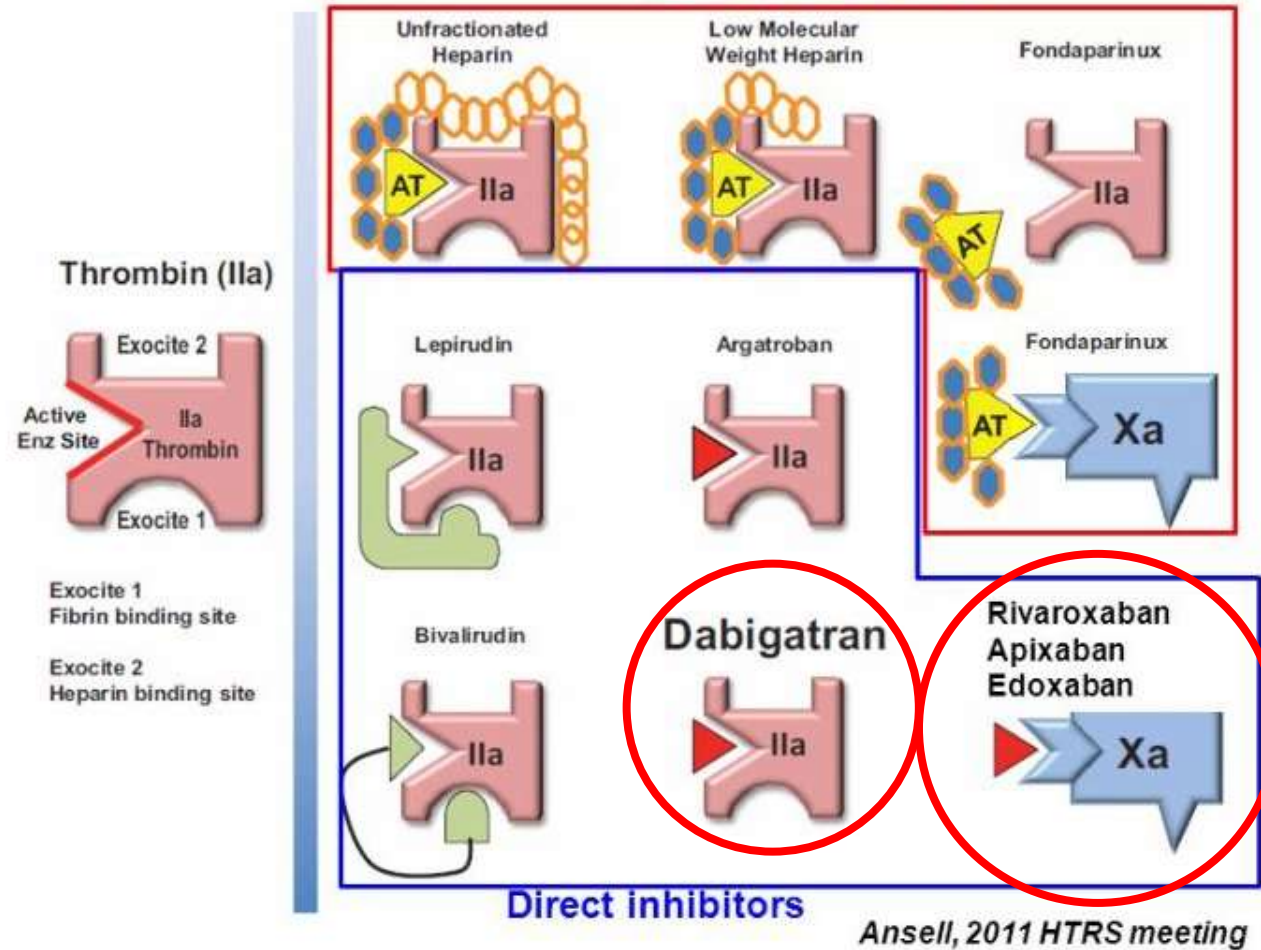
**CENTRAL ILLUSTRATION: New Anticoagulants for Venous Thromboembolism: Mechanisms of Action of Anticoagulant Agents and of Antidotes for New Oral Anticoagulant Agents**



Xarelto  
Eliquis

Pradaxa

## Indirect inhibitors



<http://slideplayer.com/slide/9162039/>

Pristupljeno 06.05.2018.

# Predanalitički čimbenici kontrole OAK Th

## Priprema bolesnika

Lagani obrok je dozvoljen  
(izbjeci postprandijalnu lipemiju)

Izbjegavati pušenje 30 min prije uzimanja krvi  
(izbjeci indukciju prokoagulantnog stanja)

Izbjegavati jače tjelesne aktivnosti 2 h prije uzimanja krvi (izbjeci aktivaciju koagulacije)

## Uzorkovanje

7 – 9 h ujutro

3,2% natrij citrat

Venska kompresija  
< 1 min

AK : krv = 1 : 10  
CLSI  $\pm 10\%$  od oznake

Potpuno, ali nježno miješanje

Dostava u laboratorij unutar 1 h

## Centrifugiranje

Pregled prije centrifugiranja (ugrušak, antikoagulans, omjer)

1500 g 15 min  
Sobna temp.

Pregled poslije centrifugiranja (hemoliza, lipemija, ugrušak)

## Čuvanje uzorka prije testiranja

Na sobnoj temp. s čepom  
(PV do 24 h, APTV do 4h)

Bez čepa < 30 min

Ne držati na hladnom  
(aktivacija FVII)

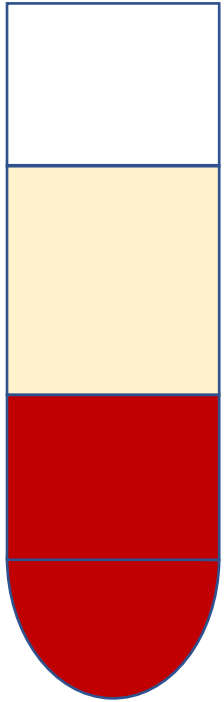
# Utjecaj predanalitičkih čimbenika na rezultat PV

Predanalitički čimbenik	Rezultat PV	Komentar
Uzimanje krvi u druge epruvete s antikoagulansom prije koagulacijske (npr. za KS, KG ili amonijak)	Lažno produžen	Kontaminacija s EDTA ili heparinom
Dugotrajno traženje venskog puta iglom	Lažno skraćen	Povećano otpuštanje tkivnog tromboplastina u epruvetu
Uzorak krvi ispod oznake	Lažno produžen	Omjer AK i krvi > 1:10
Nepotpuno miješanje uzorka	Lažno produžen	Stvaranje ugruška, potrošeni faktori
Prejako miješanje uzorka	Lažno skraćen	Hemoliza i oštećenje trombocita → otpuštanje komponenti stanica
Hemoliza	Lažno skraćen ili produžen	Odbaciti uzorak*
Neadekvatno vrijeme čuvanja	Lažno produžen	Potrošnja faktora
Neadekvatna temp. čuvanja	Lažno skraćen	Aktivacija FVII na hladnom

\* Hemoliza inače nema utjecaja na mehaničke metode, ali raspad stanica uključuje tkivni faktor koji može aktivirati koagulaciju → snižen Fbg i posljedično PV. Drugi mogući mehanizam: kompeticija hemolize s reagensom, kada su rezultati produženi.



# Korekcija HTC - AK



AK : krv = 1:10

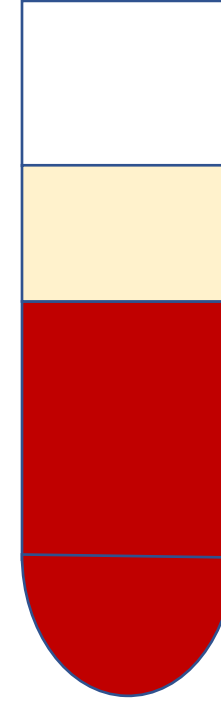


AK : krv < 1:10

Manjak citrata



lažno skraćen PV



AK : krv > 1:10

Višak citrata



lažno produžen PV

Jednadžba za korekciju:

$$C = (1,85 \times 10^{-3})(100 - H_{tc}) \times V_{krvi}$$

C = vol. citrata

## Primjer korekcije – visoki Htc

- Epruveta 4,5 ml (0,45 ml citrata + 4,05 ml krvi)
- Htc 0,600 (60%)
- $C = (1,85 \times 10^{-3})(100 - \text{Htc}) \times V_{\text{krvi}}$   
 $C = (1,85 \times 10^{-3})(100 - 60) \times 4,05$   
 $C = 0,30 \text{ ml}$
- Višak citrata =  $0,45 - 0,30 = 0,15 \text{ ml}$

**Pipetom odstraniti višak citrata iz epruvete. Ostatak citrata navući u špricu od 5 ml te uzeti 4 ml krvi. Tako dobivenu mješavinu krvi i citrata uliti u epruvetu.**

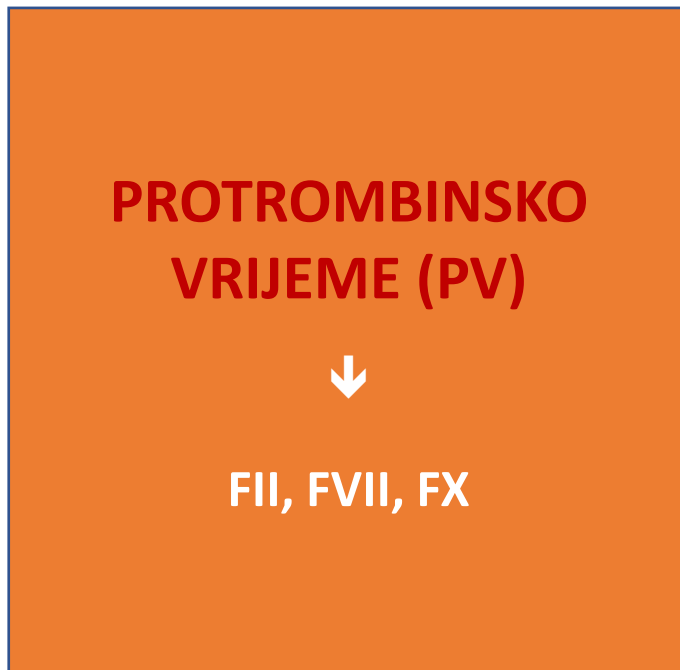
# Primjer korekcije – niski Htc

- Epruveta 4,5 ml (0,45 ml citrata + 4,05 ml krvi)
- Htc 0,180 (18%)
- $V_{krvi} = C / (1,85 \times 10^{-3})(100 - Htc)$   
 $V_{krvi} = 0,45 / (1,85 \times 10^{-3})(100 - 18)$   
 $V_{krvi} = 2,97 \text{ ml}$
- Višak krvi =  $4,05 - 2,97 = 1,08 \text{ ml}$

**U nedirnutu vakuumsku epruvetu izvaditi ~ 1 ml manje krvi**

# Analitički čimbenici kontrole OAK Th (1)

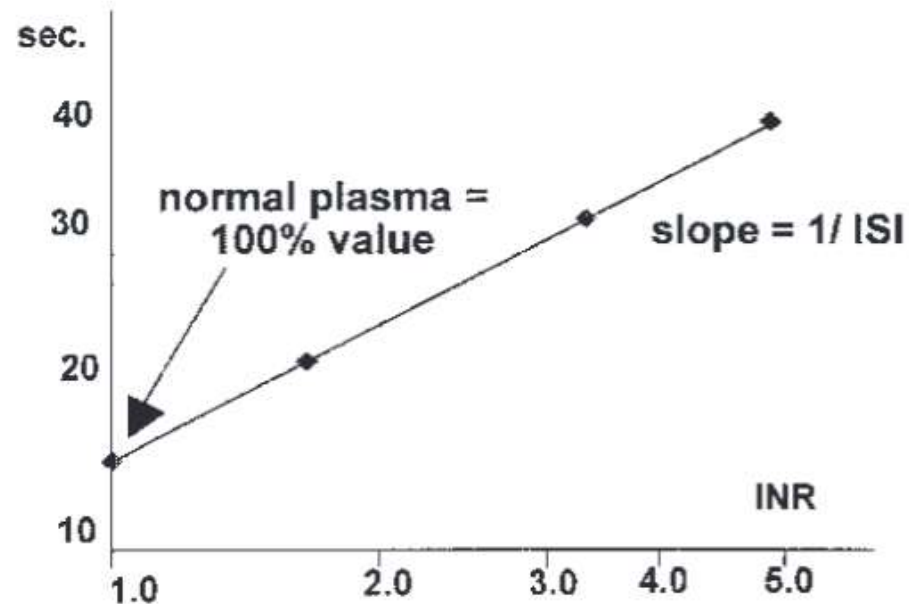
Antagonisti vit K → posredno inhibiraju aktivaciju FII, FVII, FIX, FX



**Antagonisti vitamina K mogu, osim PV produžiti i APTV**

# Analitički čimbenici kontrole OAK Th (2)

## INR kalibracijska krivulja



## INR matematički izračun

$$\text{INR} = \left[ \frac{\text{Patient PT}}{\text{Mean of Normal PT Range}} \right]^{\text{ISI}}$$

**ISI: International Sensitivity Index for thromboplastin, used for PT determination**

High ISI = Low sensitivity to factor deficiencies

Low ISI = High sensitivity to factor deficiencies

**Example:**

**INR = 3.0**

ISI = 2

ISI = 1

$$3.0 = \left[ \frac{17.3}{10} \right]^2$$

$$3.0 = \left[ \frac{30.0}{10} \right]^1$$

**PT = 17.3 seconds**

**PT = 30.0 seconds**

Moritz B, Lang Hartmut. Use of plasmas from donors under oral anticoagulant treatment for the expression of INR values. Haematologica. 1997;82:630-33.

<http://www.captodayonline.com/anticoags-work-means-labs/>

Pristupljeno 25.04.2018.

# INR kalkulacija vs kalibracija

- Nešto manja točnost INR dobivenog kalkulacijom (ovisi o točnosti određivanja MNPT).
- Kalibracijska krivulja ima ograničenu uporabu (iznad gornje granice kalibratora ne može se dobiti brojana vrijednost, pa se rezultat izražava npr. > 5,4)

Ali... klinički pristup je drukčiji:

(primjena navedene sheme uz rezultat INR-a ovisi i o tome da li pacijent krvari ili ne)

INR > 4 rizik za intrakranijalno krvarenje

INR 5-9 daje se 1-2,5 mg vit K

INR > 9 daje se 3-5 mg vit K

INR >20 daje se transfuzija SSP i 10 mg vit K



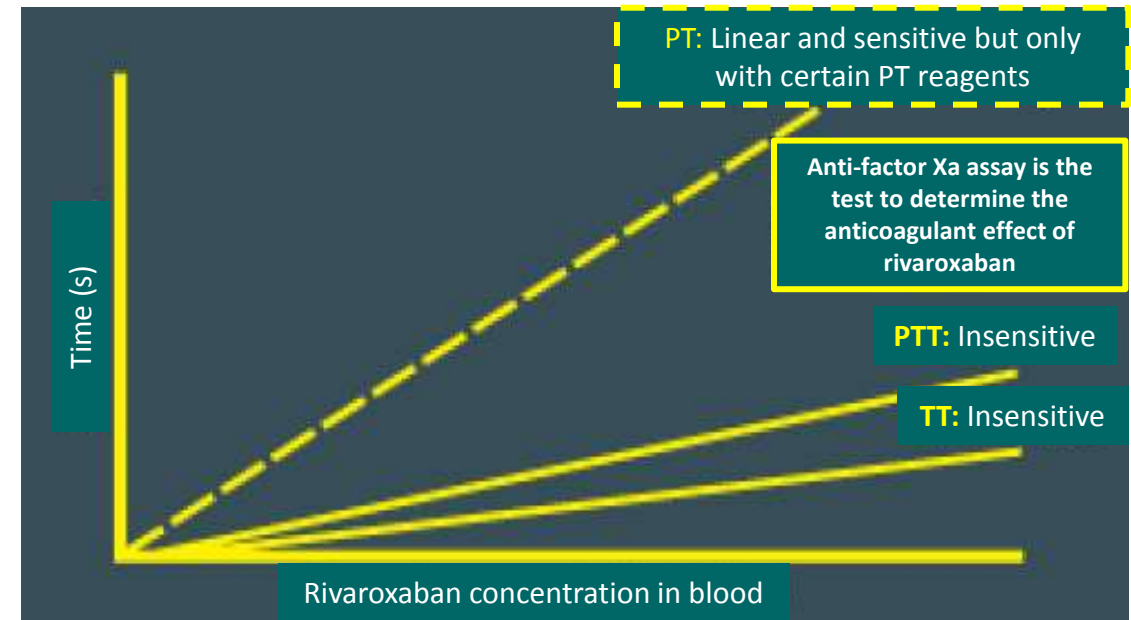
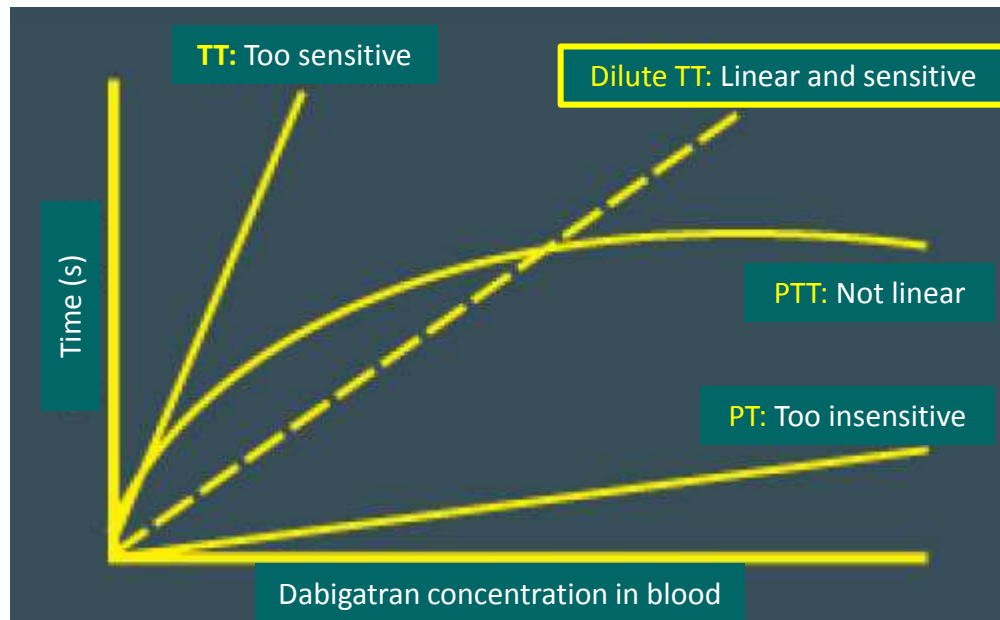
INR kalkulacija korisna

**INR > 5,4 kliničaru nije koristan podatak!**

# Analitički čimbenici kontrole OAK Th (3)

NOACs – novi oralni antikoagulantni lijekovi:

- Dabigatran (Pradaxa) – direktni inhibitor trombina (FIIa)
- Rivaroxaban (Xarelto), Apixaban (Eliquis) – direktni inhibitor FXa



<http://www.captodayonline.com/latest-anticoagulants-nuts-and-bolts-for-labs/>

Pristupljeno 25.04.2018. i prerađeno

# Interferencije - hemoliza

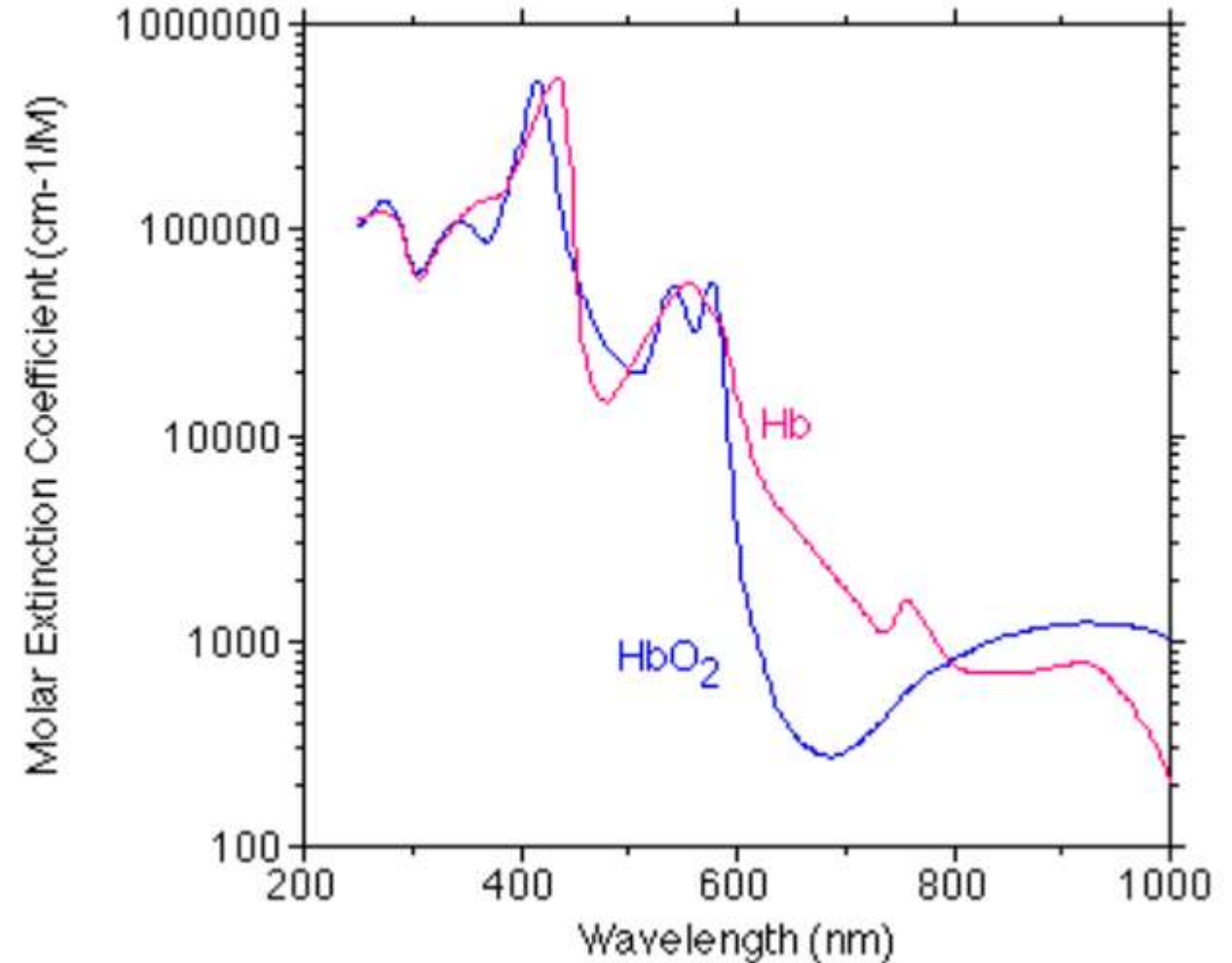
- CLSI: **ne testirati hemolitične uzorke.**

Razlog: izloženost negativno nabijenih membranskih fosfolipida uslijed raspada eritrocita ubrzava koagulacijski proces te dovodi do skraćenog PV.

S druge strane, hemoliza kompetira s reagensom, što dovodi do produženog PV

**Nikad ne znamo u kojem će nas smjeru odvesti hemolitični uzorak.**

- Kod optičke detekcije ugruška problem je i zbog blizine apsorpcijskog maksimuma Hgb (450 nm) u odnosu na valnu duljinu na kojoj se vrši mjerenje (405 nm). Povećano je očitavanje background-a, pa se kompromitira detekcija ugruška, što utječe na točnost rezultata.



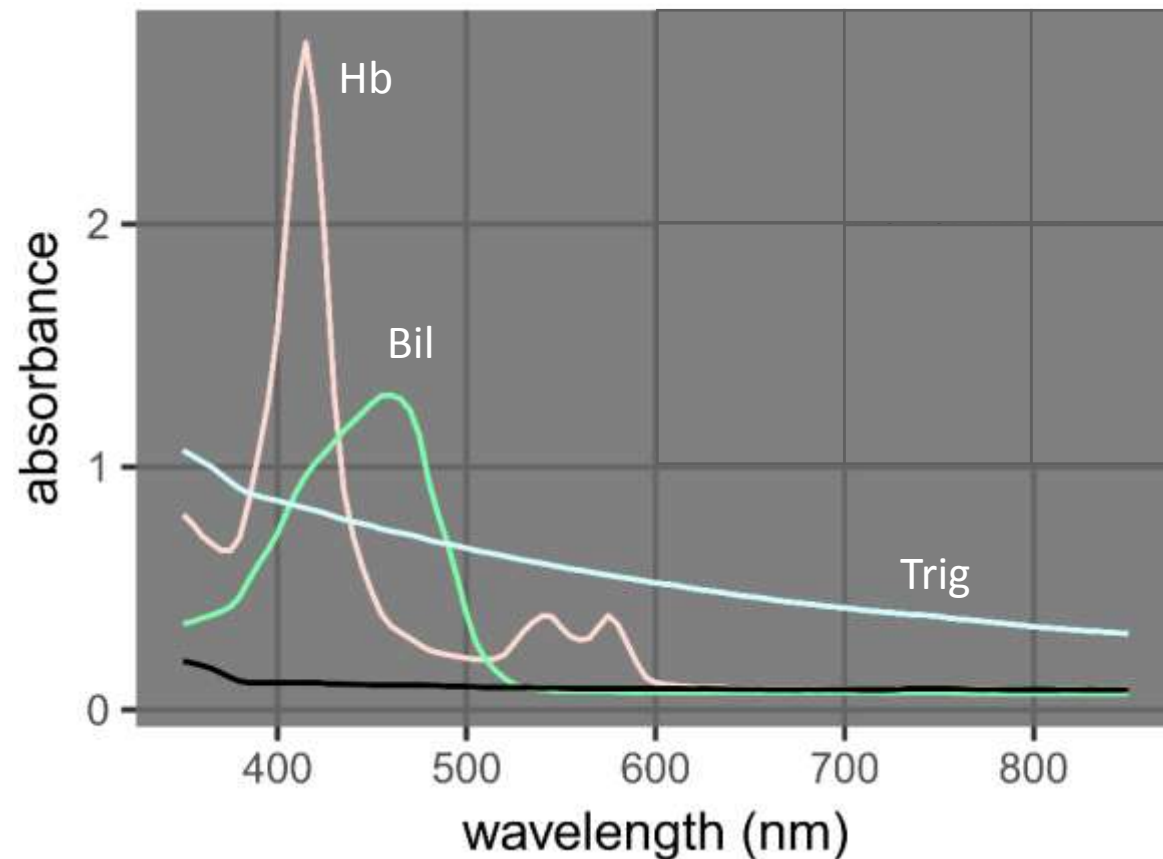
<https://omlc.org/spectra/hemoglobin/>

Pristupljeno 07.05.2018.



# Interferencije: lipemija

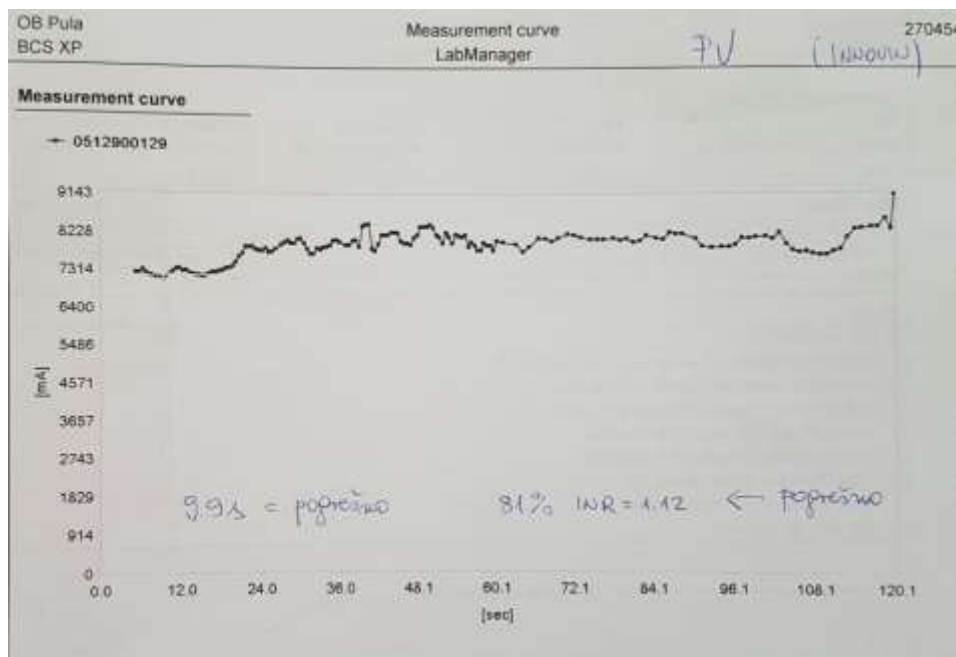
- Lipidne čestice povećavaju zamućenje uzorka te smanjuju intenzitet svjetlosti koja prolazi kroz uzorak. Otežano je određivanje završne točke mjerenja (samo kod optičke metode).
- Korekcija: mjerenje na 570 nm.
- Kod mehaničke detekcije ugruška lipemija ne smeta.



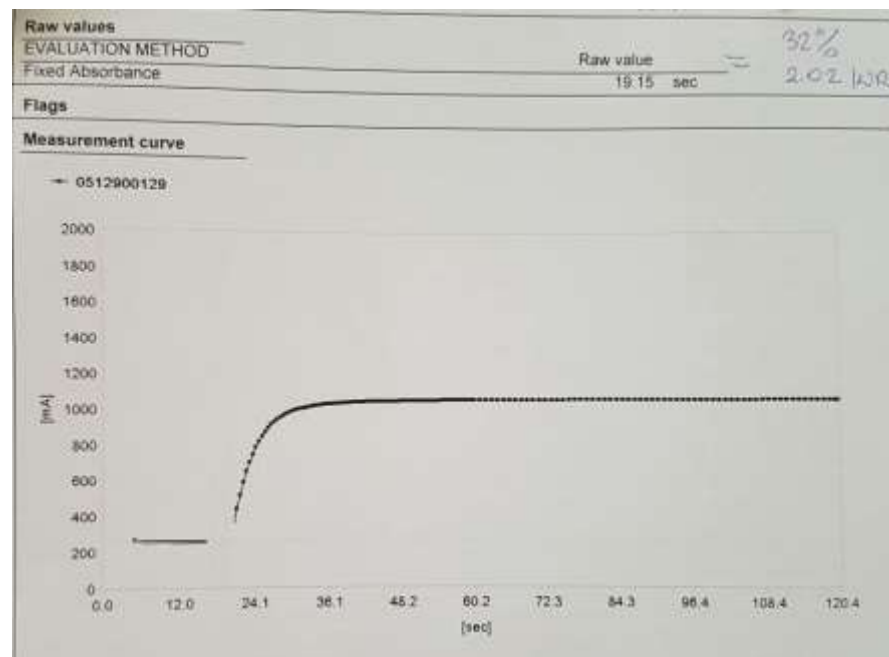
Huynh T, Lai M J, Liu Y L, Ly L, Gong X, Rommel KR et al. Spectral Analysis Methods Based on Background Subtraction and Curvature Calculation Used in the Detection or Quantification of Hemolysis and Icterus in Blood-derived Clinical Samples. *Cureus*. 2017; 9(12): e1965. doi:10.7759.

# Lipemičan uзорak

405 nm

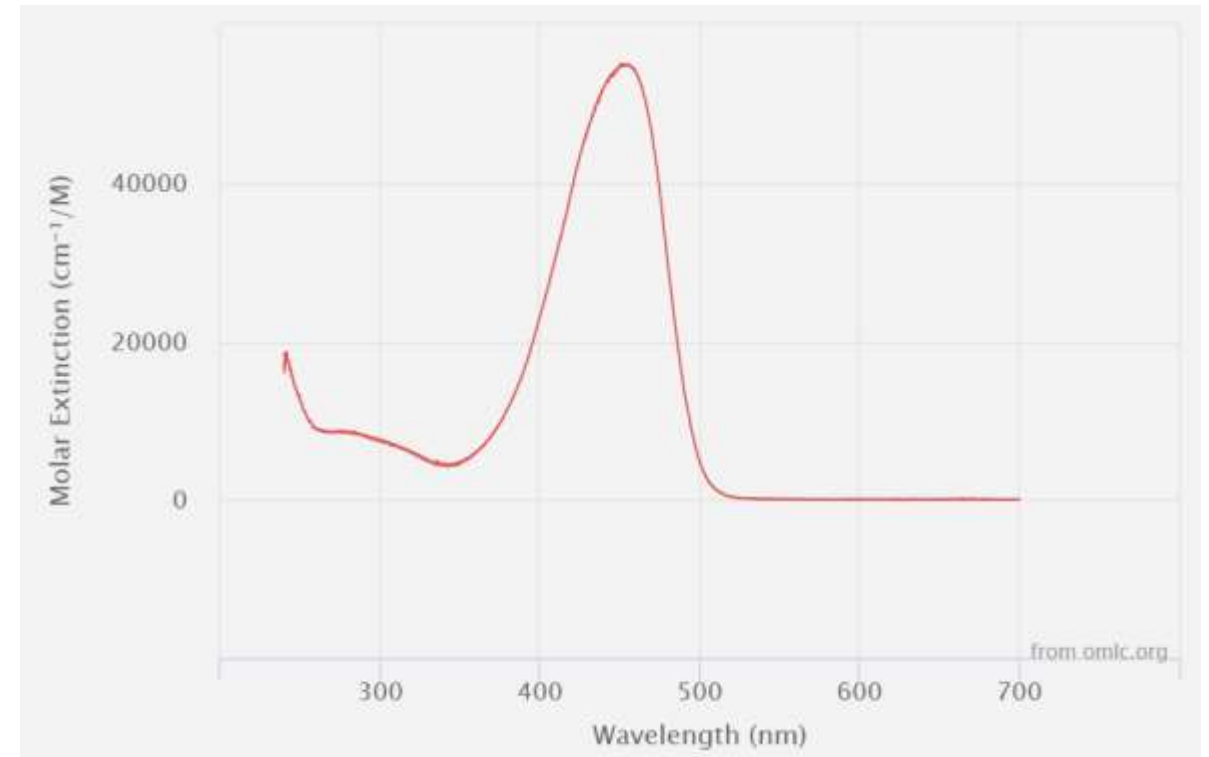


570 nm



# Interferencije: ikterija

- Konc. bilirubina  $> 40 \mu\text{mol/L}$
- Korekcija: mjerenje na 570 nm



<https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/119.html>

Pristupljeno 07.05.2018.

# Interferencija: heparin

- Tromboplastini iz različitih izvora (rekombinantni, zečji ili humani) različito su osjetljivi na prisustvo nefrakcioniranog heparina.
- Thromborel S (humani) je osjetljiviji od Innovina (rekombinantni)

OB Pula	Job list		
BCS XP	LabManager		
Sample ID:	1202900157	Last rack:	031905
Remarks:	---	Requested by:	---
Assay	Raw value	Result	Flag
aPTT.AFS	----	----	-
aPTT.AFS	----	----	-
aPTT.AFSR	----	----	-
PT....S.MC Thromborel S	53.92 sec	11.7 % d.N.	-
PT.I...S.MC	53.92 sec	5.59	+
PT.%In.MC Innovin	39.79 sec	15.9 % d.N.	-
PT.I...In.MC	39.79 sec	3.77	+
TT TCI 2	38.43 sec	38.4 sec	+
aPTT...S.Ex	36.47 sec	---	-
TTCI 2.ext	36.47 sec	36.5 sec	+

uFH u uzorku

# Interferencije: LA

- Lupus antikoagulans (LA) interferira s fosfolipidnom komponentom PV reagensa, naročito kod rekombinantnog tromboplastina i pročišćenog fosfolipida. → Poteškoće kod praćenja pacijenata na terapiji antagonistima vitamina K.
- Prolazna interferirajuća antitijela javljaju se u infekcijama i interferiraju na isti način kao i LA.
- Rezultati PV su lažno produženi.

# Usporedba karakteristika dvije vrste tromboplastina

Reagens	Thromborel S	Innovin
Izvor tromboplastina	humana placenta	rekombinantni humani tkivni faktor
Osjetljivost na manjak F VII	++	+++
Osjetljivost na inhibitor / LA	+	+++
Osjetljivost na niski Fbg	+	+++
Konc. UFH koja ne produžava PV	< 0,6 IJ/mL	< 2 IJ/mL

# Postanalitika

- Promptno obavještanje odjela o kritičnim vrijednostima INR > 5
- Pozivanje ambulantnih pacijenata s INR > 4
- Upis terapijskih intervala umjesto referentnih
- Napomena o kvaliteti uzorka
- Informacije o eventualnim daljnjim testiranjima

# Literatura

- Atar D, Bode C, Stuerzenbacher A, Verheugt FWA. Anticoagulants for secondary prevention after acute myocardial infarction: lessons from the past decade. *Fundam Clin Pharmacol*. 2014;28:353-63.
- Ellis CR, Kaiser DW. The clinical efficacy of dabigatran etexilate for preventing stroke in atrial fibrillation patients. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:341-52.
- <https://www.medlabme.com/magazine/en/diagnostic-articles/preanalytics-for-coagulation-testing.html>. Pristupljeno 25.04.2018.
- <http://www.clinipathpathology.com.au/media/85995/pre-analytical%20variables.pdf>. Pristupljeno 25.04.2018.
- Favaloro EJ, Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *LabMedicine*. 2012;43(2):1-10.
- [https://ww5.allinahealth.org/ahs/allinalabs.nsf/page/HctAnticoagulantAdjst.pdf/\\$FILE/HctAnticoagulantAdjst.pdf](https://ww5.allinahealth.org/ahs/allinalabs.nsf/page/HctAnticoagulantAdjst.pdf/$FILE/HctAnticoagulantAdjst.pdf). Pristupljeno 21.05.2018.
- <https://www.slideshare.net/nianbaring/pharmacology-oral-anticoagulants>. Pristupljeno 25.04.2018.
- Laga AC, Cheves TA, Sweenwy JD. The effect of specimen hemolysis on coagulation test results. *Am J Clin Pathol*. 2006;126:748-55.
- [http://www.captodayonline.com/Archives/q\\_and\\_a/qa\\_1202.html](http://www.captodayonline.com/Archives/q_and_a/qa_1202.html). Pristupljeno 07.05.2018.
- Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med*. 2014(1):57-67.
- <http://laboratory-manager.advanceweb.com/interference-of-hemolysis-icteric-lipemia-coagulation-testing/>. Pristupljeno 07.05.2018.
- Htet S, Hayes L, Leung T. Strong lupus anticoagulant (LA) as a cause for prolonged prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and abnormally low intrinsic factor (IF) levels. *Pathology*. 2015;47(S1):S90.