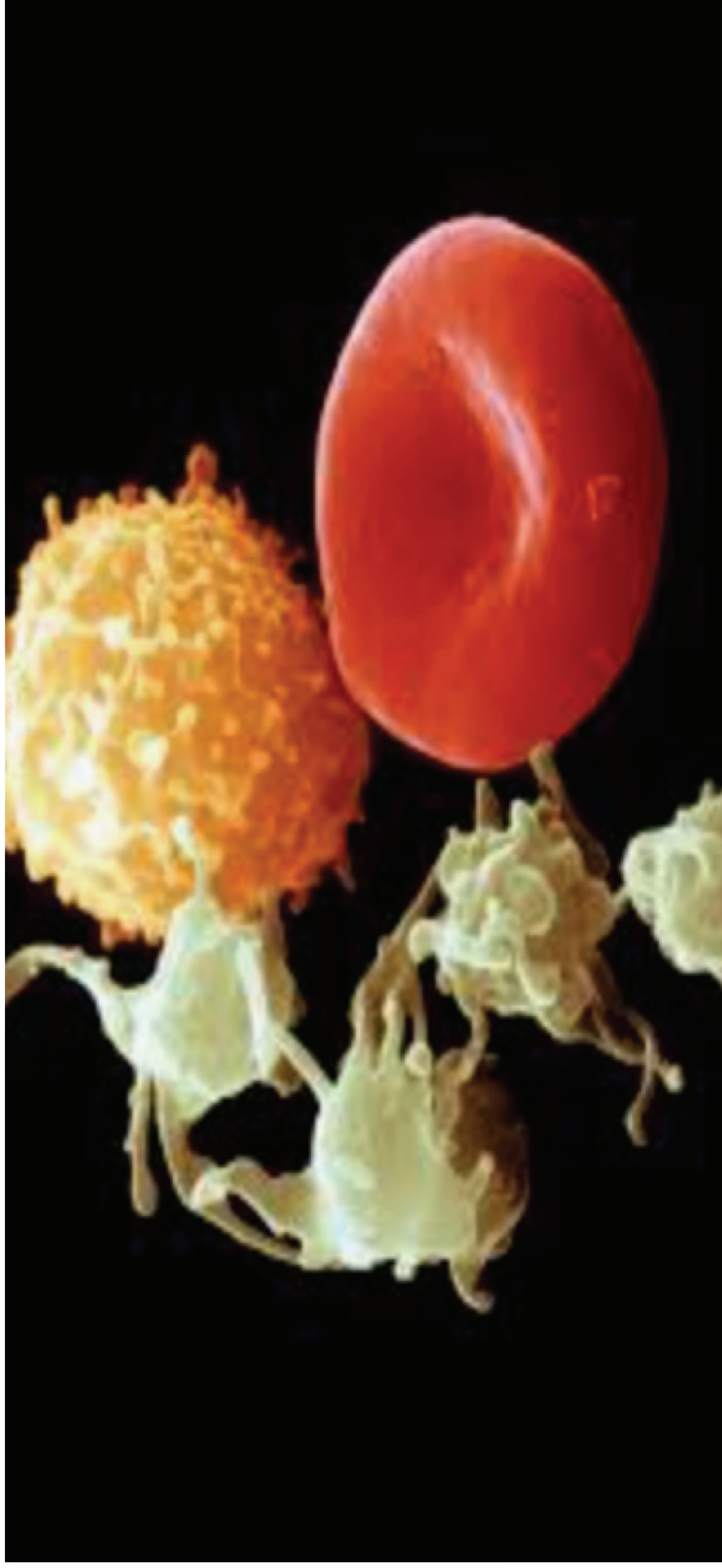


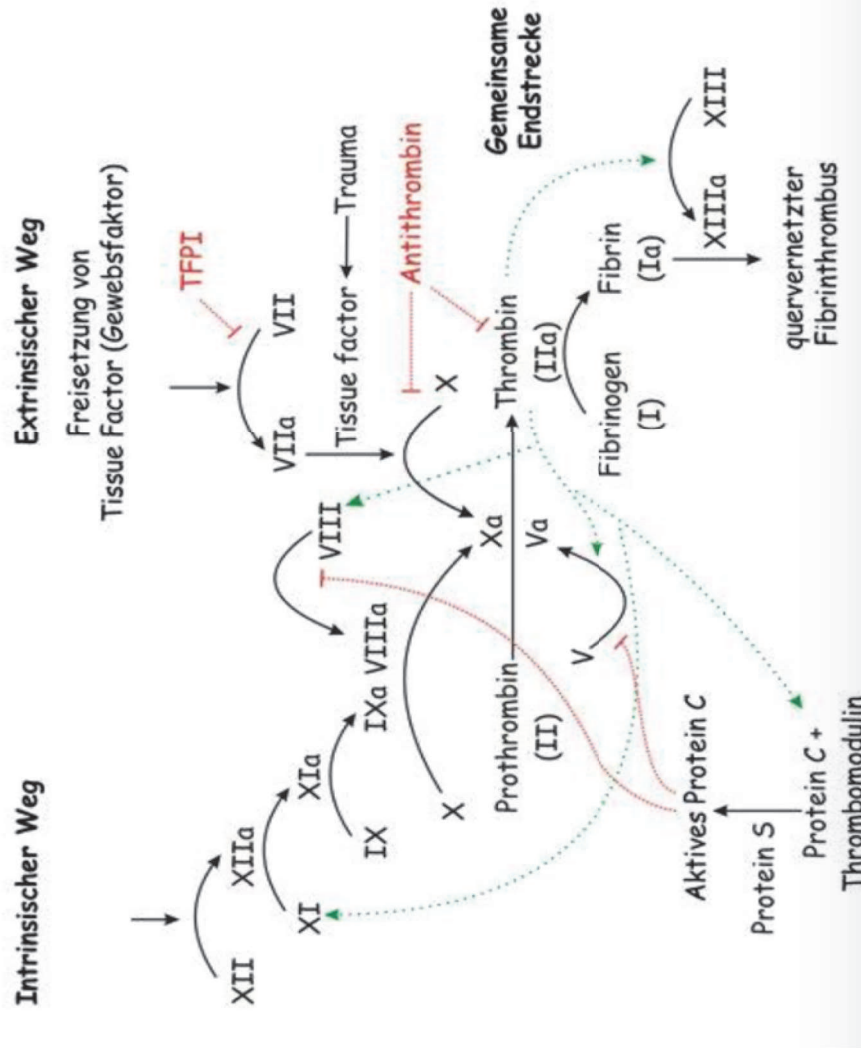
Coagulazione speciale dalla teoria ai casi clinici

Bellinzona, 11 giugno 2019

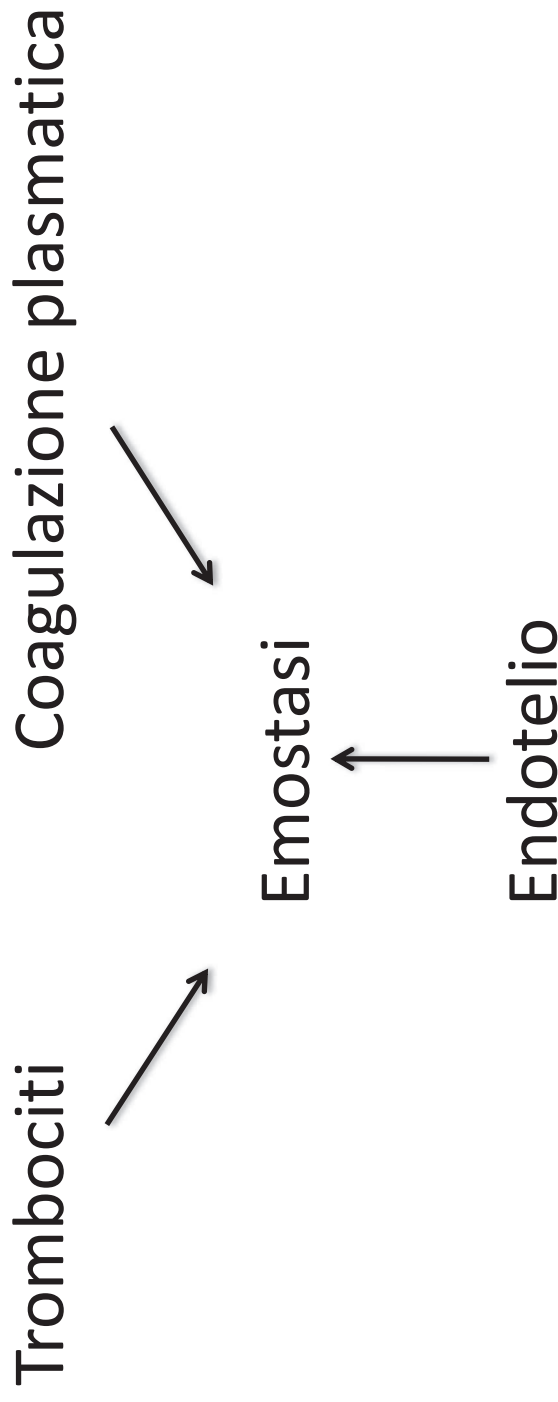


Coagulazione

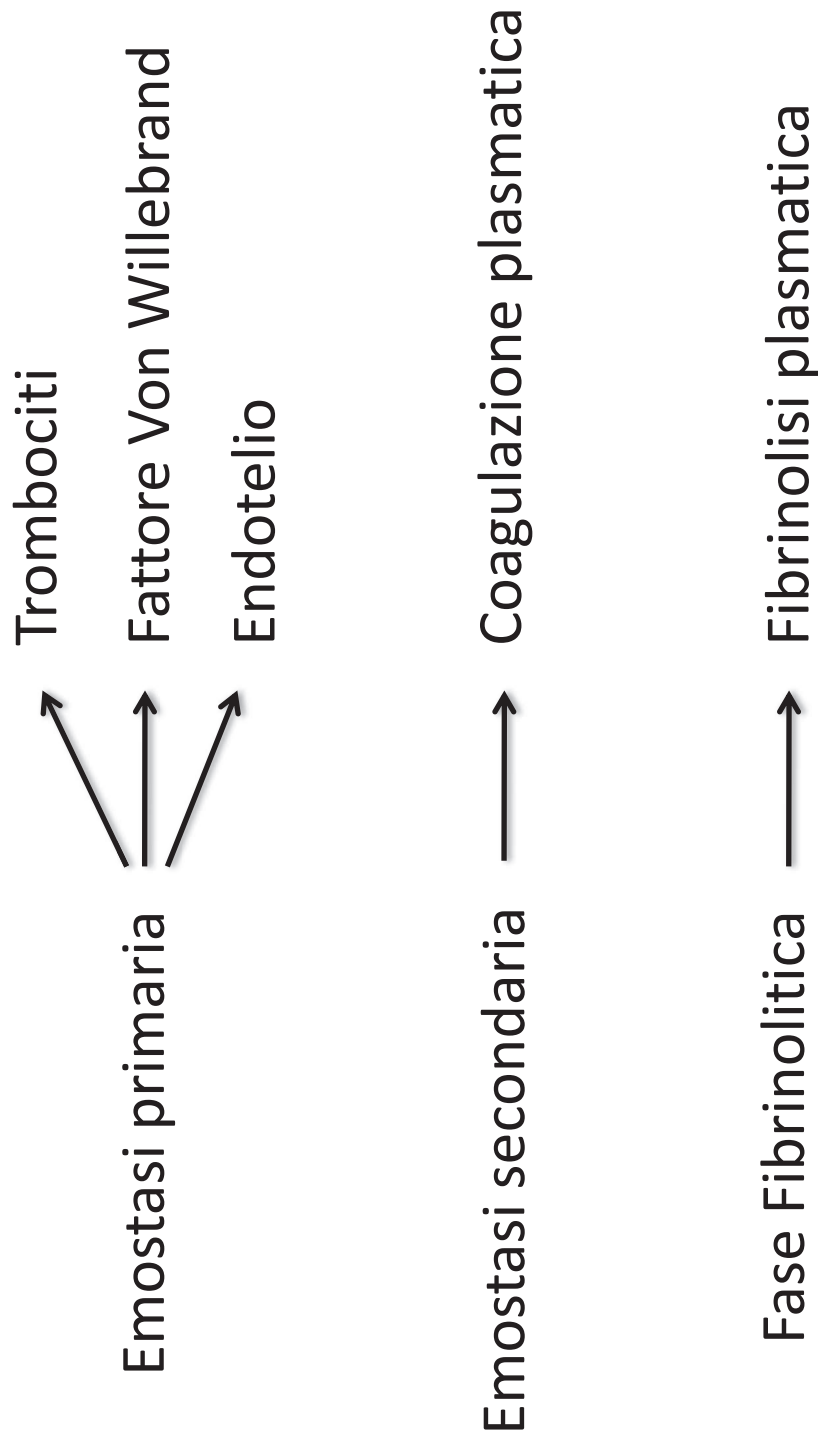
Una strada con diversi tornanti per arrivare alla meta



Emostasi = Equilibrio del flusso sanguigno



Equilibrio tra fattori procoagulanti e anticoagulanti



Emostasi primaria

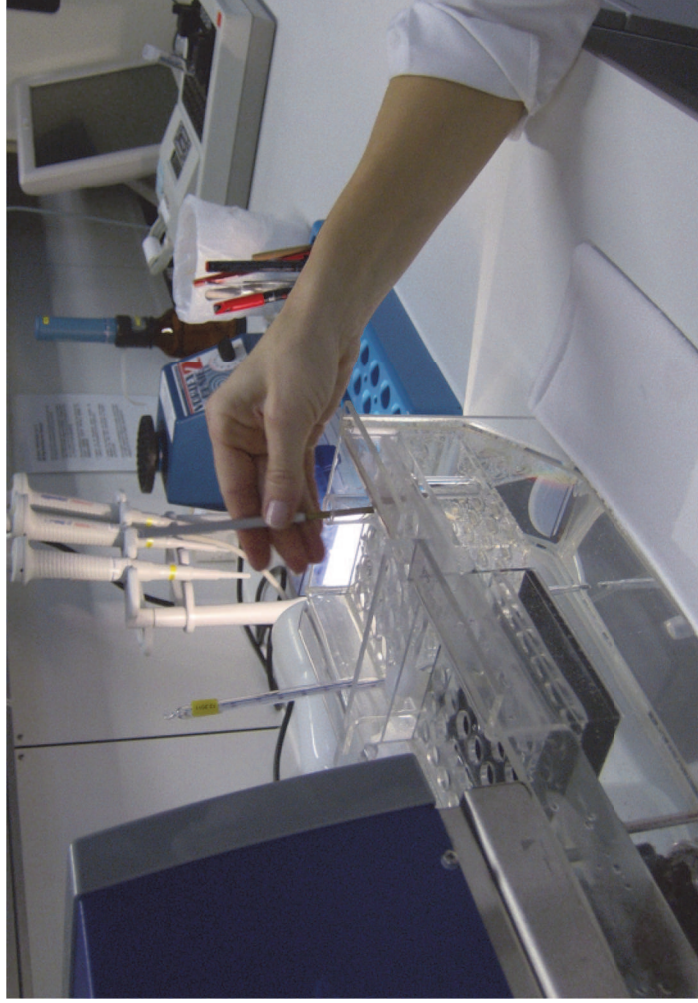
- **Trombociti:** conteggio, microscopia
 - PFA tempo di chiusura
 - Aggregometria piastrinica in PRP (platelets rich plasma)
 - Multiplate
 - Secrezione di ATP (Chronolog)
 - Citometria di flusso
- **Fattore Von Willebrand**

Emostasi secondaria

- **Test di screening (Routine)**
 - Quick, aPTT, Fibrinogeno, tempo di Trombina
- **Test approfonditi**
 - Fattori / parametri singoli per chiarimenti emorragici e trombofilici e disturbi fibrinolitici
 - Fase Fibrinolitica:
 - Monomeri della Fibrina, FXIII, D-dimeri, Prodotti di degradazione, Plasminogeno, α 2-Antiplasmina, PAI ...

Metodi analitici di coagulazione

Dai metodi manuali...



...semiautomatici



...capillare / Point of care



ROTEM

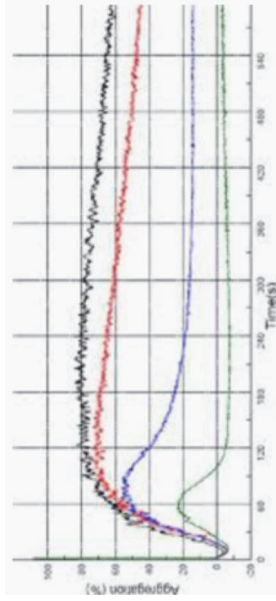
Rotations-Thromb-Elasto-Meter



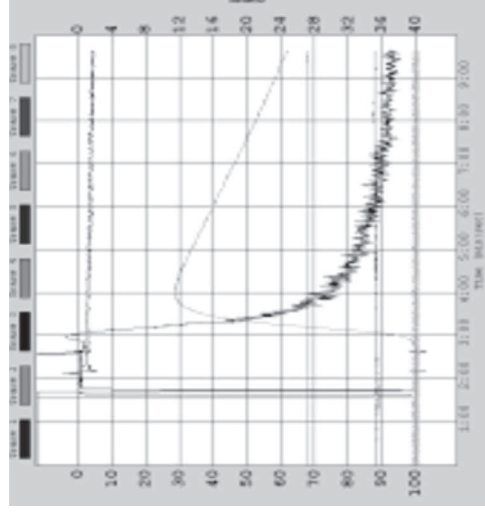
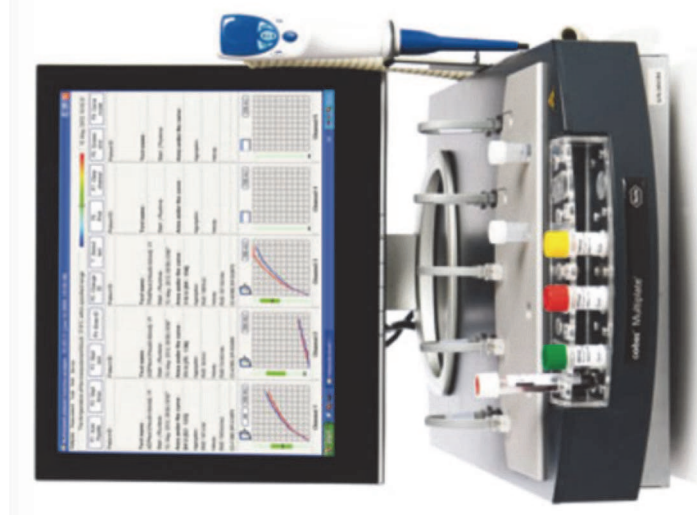
... ai metodi automatici



Funzionalità piastrinica



SIEMENS
Healthineers



Allora da dove cominciamo ?



Vediamo un po': VII... X... XII... II... XI...
Proteina C Antitrombina.....



Cascata della
coagulazione



Importanza della Preatnalitica

Provetta giusta → Tri-Sodio-Citrato 0.105 M (1+9)

- Corretto riempimento
- Miscelazione delicata
- Centrifugazione standardizzata
- Stabilità

(2008 Schattauer Thromb Haemost 2008;
99: 416 426)



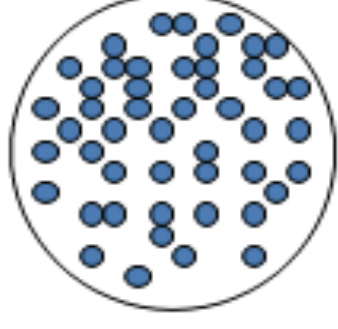
Prelievo corretto

Lieve stasi → importante per la coagulazione speciale e aggregometria
Mai battere sulla vena
Evitare prelievi da port-a cat oppure risciacquare il tubo tre volte con la NaCl fisiologica
Mai pungere al braccio di un'infusione
Non pungere 2 volte lo stesso braccio
Scelta dell'ago giusto

→ importante per la coagulazione speciale e aggregometria (21“G”)

Diametro dell'ago 21 “G”

Cosa significa “G” (Gauche)?



Importanza dell'ematocrito

Un ematocrito alto (≥ 0.58) ha lo stesso effetto di una provetta riempita male. Il plasma è troppo diluito quindi i tempi di misurazione sono prolungati.

Bisogna correggere la parte di citrato, eseguibile solo con il sistema Sarstedt:

$$\text{Formula: } VC_{\text{optimale}} = VC_{\text{normale}} \times (1 - Hk) / 0.55$$

Provette riempite male → effetto sul Quick normale

zu wenig gefülltes Röhrchen					korrekt gefülltes Röhrchen		
Plasma säule mm	mm unter Füllstrich	Quick %	INR		Plasma säule mm	Quick %	INR
32	9	88.5	1.1		33	100.6	1.0
33	24	87.1	1.1		46	106.9	1.0
34	10	75.6	1.2		45	82.5	1.1
31	19	77.3	1.2		44	90.2	1.1
43	10	79.7	1.1		49	90.0	1.08
40	13	55.7	1.4		51	65	1.26
36	13	96.1	1.0		42	118.2	0.9
38	20	71.8	1.2		50	84.2	1.1
32	20	67	1.2		40	87.7	1.1
32	21	86.8	1.1		44	102.7	1.0

... e sul Quick in terapia con antagonisti della Vit K

zu wenig gefülltes Röhrchen					korrekt gefülltes Röhrchen		
Plasma säule mm	mm unter Füllstrich	Quick %	INR		Plasma säule mm	Quick %	INR
19	10	47.9	1.5		25	55	1.57
30	16	<9.0	>5.3		35	11.1	4.8
31	10	27.2	2.4		38	29.3	2.3
35	16	39.3	1.7		43.5	45	1.54
22	10	36.5	1.8		45	39	1.68
36	15	10.4	4.9		43	14.1	4.2
30	20	21.4	2.9		40	34	1.98
37	17	37.8	1.7		44	41	1.62
33	25	43	1.6		27	56.8	1.3
36	10	17.5	3.4		39	27.1	2.5
27	30	16.5	3.6		22	31.9	2.1
22	28	22.3	2.8		41	26.8	2.36

Cos'è successo qui?



Al laboratorio non si nasconde **NIENTE** !

Coagulazione plasmatica

Test di Screening / Routine

- Quick (PT)
- aPTT
- Fibrinogeno
- Tempo di Trombina

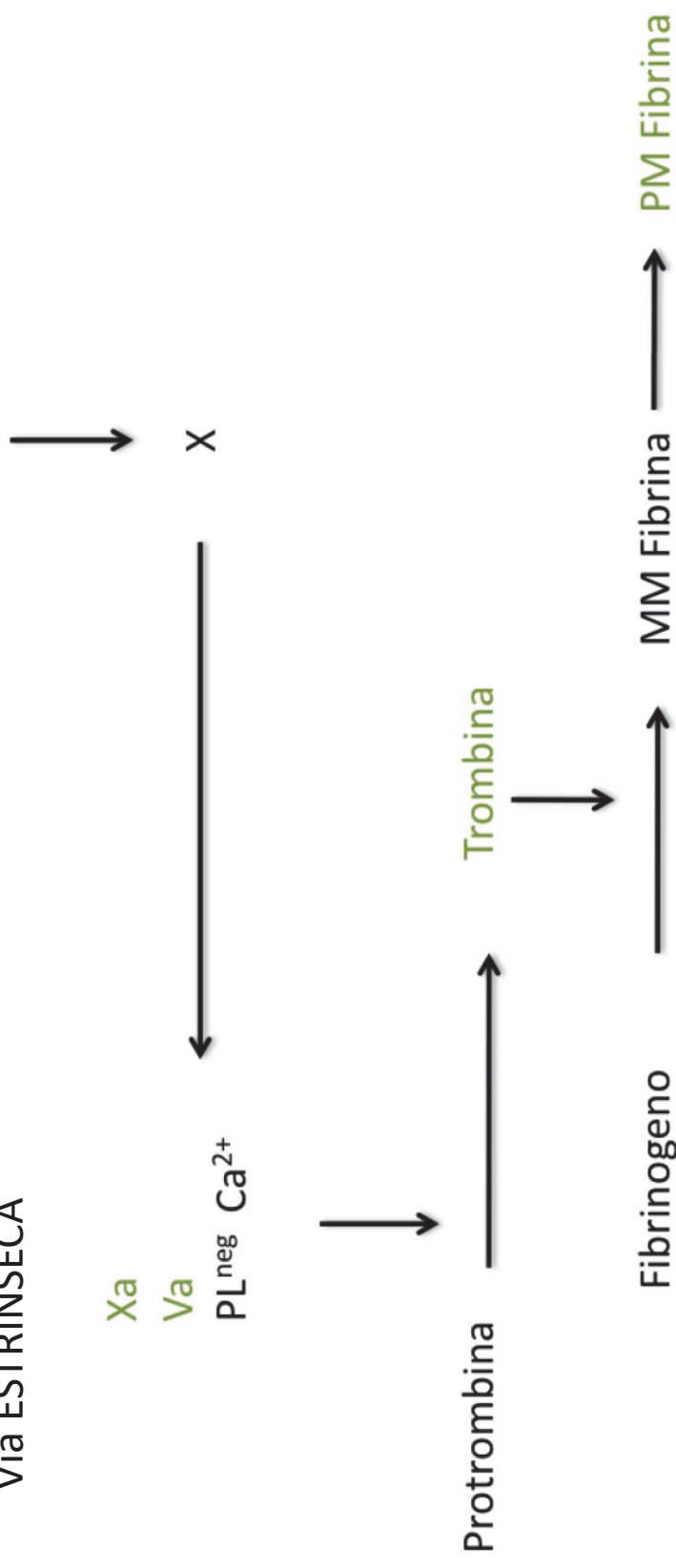
Quick (tempo di Prothrombina, tempo di Tromboplastina)

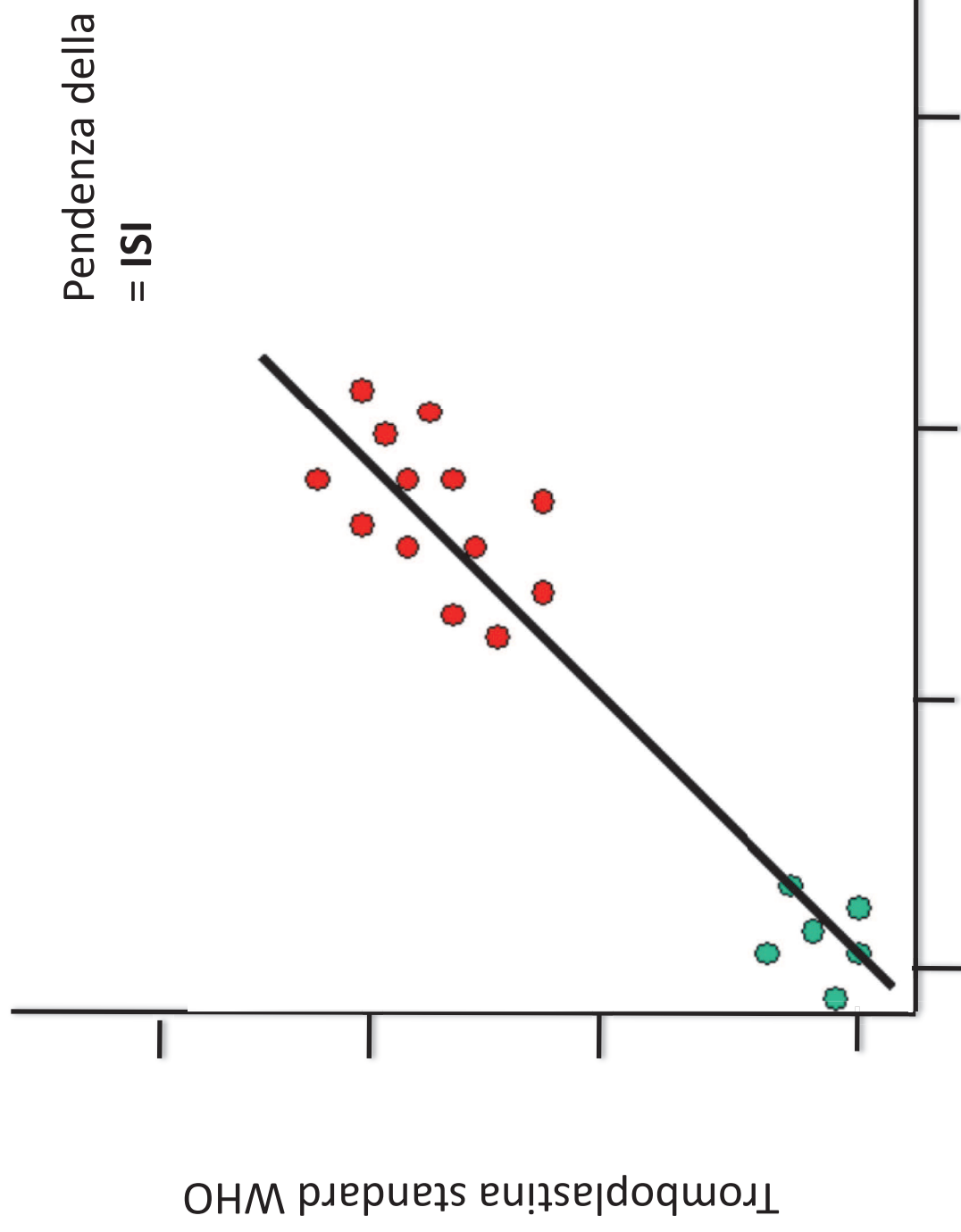
Metodo:

Plasma + Tromboplastina → misura il tempo fino alla coagulazione

Tissue factor **VIIa**
PL^{neg} Ca²⁺

Via ESTRINSECA





Pendenza della linea di regressione
= **ISI**

Tromboplastina da calibrare

aPTT (activated Partial Thromboplastin-Time) (tempo parziale di tromboplastina attivata)

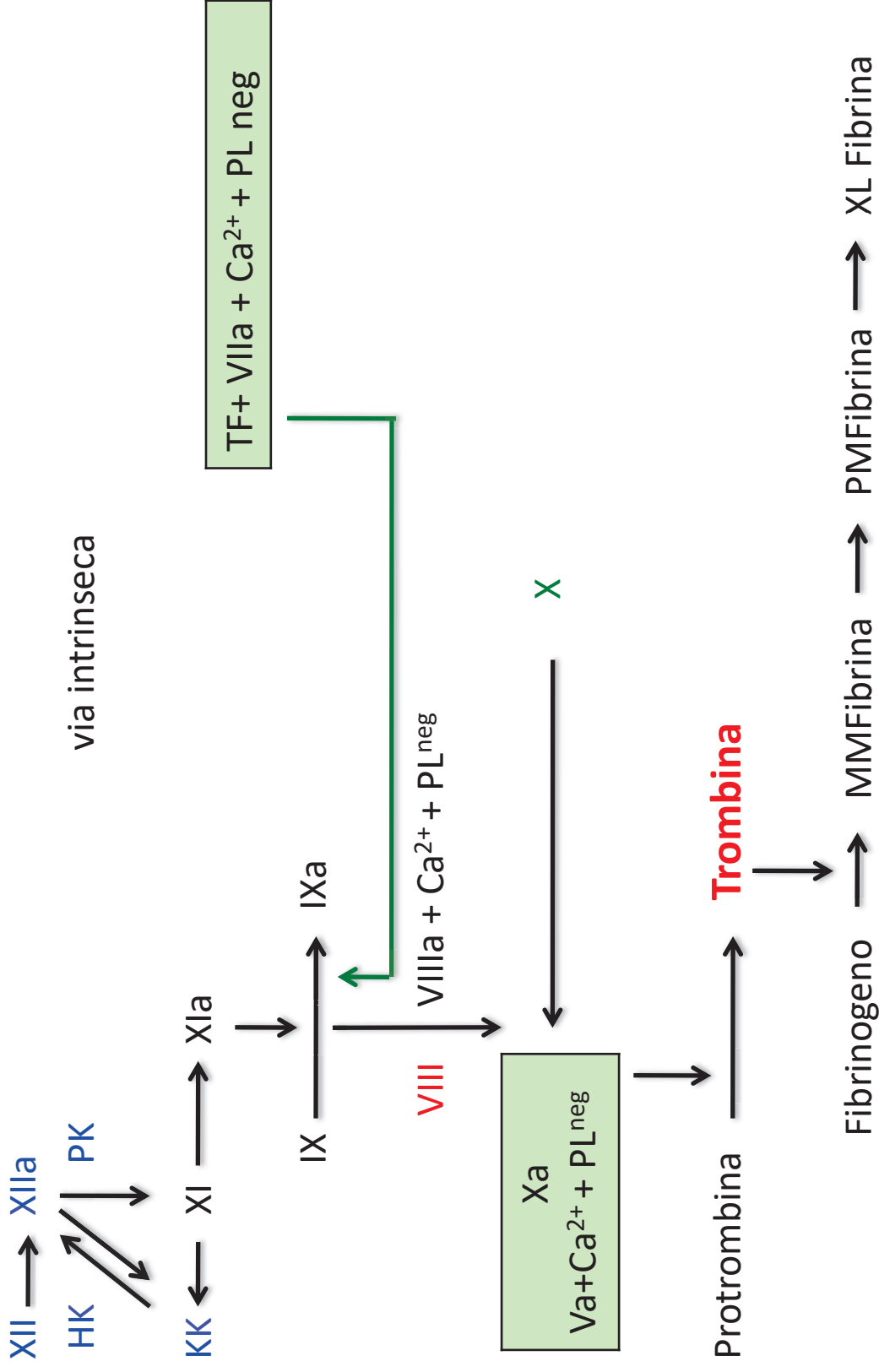
La via INTRINSECA + la via COMUNE

Metodo:

Plasma + Attivatore (reagente) → + CaCl

Criteri per la scelta del reagente:

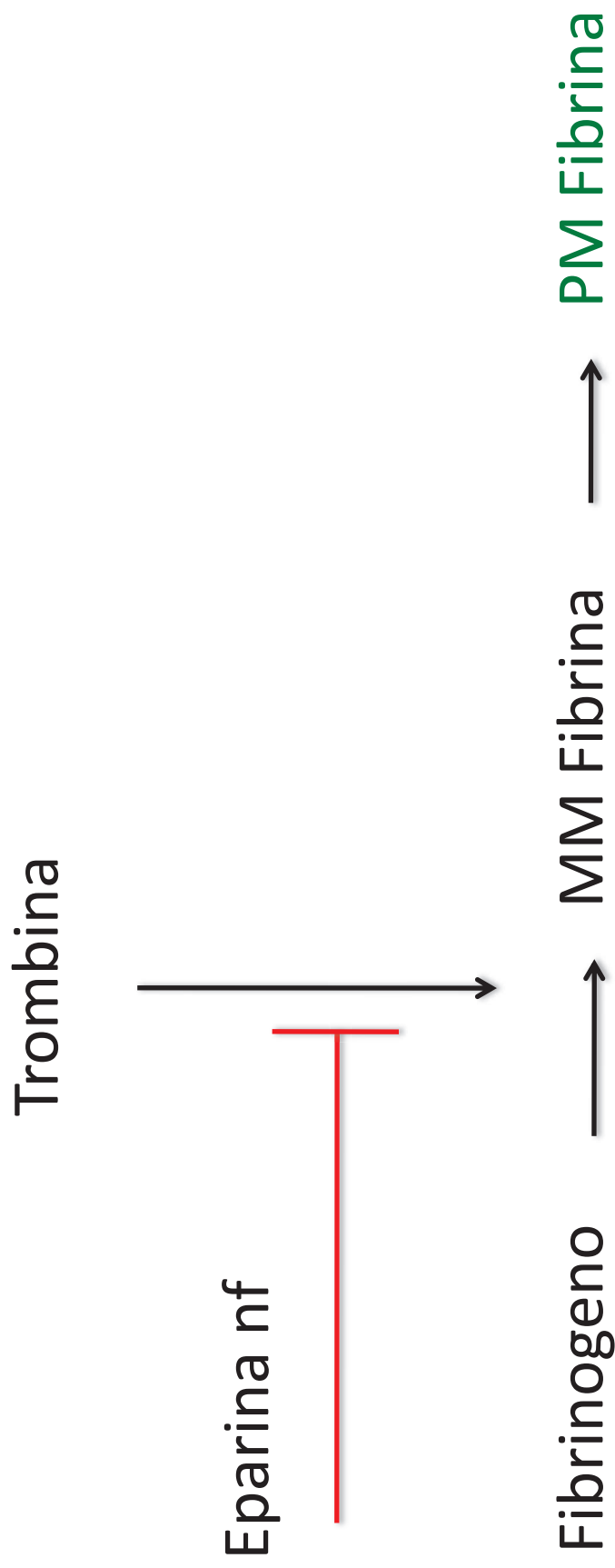
- sensibilità ai fattori
- sensibilità al Lupus anticoagulans
- sensibilità all'eparina



Fibrinogeno



Tempo di Trombina



	<u>Tempo di</u>	
	<u>Trombina</u>	<u>Reptilasi</u>
Ipfibrinogenemia	↑	↑
Disfibrinogenemia	↑	↑
Prodotti di Degrad.	↑	↑
Paraproteina	↑	↑
Eparina	↑	normale

Interpretazione dei risultati di test di routine

Quick patologico	aPTT patologico	Fibrinogeno patologico
• precedente ? • aPTT ? • medicinali ? • fibrinogeno ? • tempo di trombina ? → Ulteriori test • test di miscela • fattori singoli	• Quick ? • medicinali ? • fibrinogeno ? • tempo di trombina ? → Ulteriori test • test di miscela • fattori singoli	• Quick ? • aPTT ? • tempo di trombina ? • tempo di reptilasi ? • D-Dimeri ? → Ulteriori test • Fibrinogeno di Schulz • Fibrinogeno antigene

Alcuni risultati da interpretare

Quick: **25 % / INR: 2.5**
aPTT: **39.5 sec**
Fibrinogeno: 3.0 g/l

ACO con antagonisti della Vit K
quindi carenza di fattori?

Quick: 92%
aPTT: **50.6 sec**
Fibrinogeno: 3.5 g/l
T. Trombina: **no clot**
T. di Reptilasi : 15 sec
Eparina non frazionato

Quick: **68 %**
aPTT: 36.0 sec
Fibrinogeno: **0.8 g/l**
T.Trombina: **25 sec**

Effetto in vitro: Fibrinogeno basso!

Quick: 85 %
aPTT: **38.7 sec**
Fibrinogeno: **6.8 g/l**
T.Trombina: 17 sec

Infiammazione;
consumo di fattori intrinseci /
fase di contatto

Quick: 60 % INR : 1.3
aPTT: 36,5 sec
Fibrinogeno: 3.0 g/l
T.Trombina: 15 sec

Xarelto !

Quick: 21 %
aPTT: 56.5 sec
Fibrinogeno: 0.2 g/l
T.Trombina: 60.2 sec
T.Reptilasi : no clot
DIC ! FV:C 50 %

Quick: no clot INR : ----
aPTT : no clot
Fibrinogeno : 0,5 g/l
T.Trombina: no clot

Campione coagulato ☹

Non abbiamo ancora finito

Test speciali

Test di miscela

Quick

aPTT

Ogni singolo fattore

Fattori singoli

Estrinseci: FII – FV - FVII - FX

Intrinseci: FVIII - FIX – FXI - FXII

Fattore Von Willebrand

Parametri screening trombofilia

Lupus anticoagulans

Antitrombina

Proteina C / Proteina S / (*Proteina Z*)

resistenza alla Proteina C attivata (APCr)

anticorpi anti-Fosfolipidici /- β 2-Glicoproteine /

anti-Fosfatidilserine

Fibrinolisi

FXIII / D-Dimeri / Plasminogeno / Antiplasmina / PAI-1

Test di miscela (MIX)

Principio

Miscela = plasma paziente + plasma normale (Plasma Pool oppure controllo normale)

Una miscela viene misurata con il test di scelta sia immediatamente che dopo 1h di incubazione a 37°C a bagnomaria, in caso di dubbio ancora dopo 2h

Interpretazione:

Normalizzazione immediata e dopo 1h

→ carenza di un fattore

Prolungamento immediato e dopo 1h

→ inibitore veloce

Normalizzazione immediata e prolungamento dopo 1h → inibitore lento

Paziente 1

• Quick	25 %
• aPTT	30.5 sec
• Fibrinogeno	2.8 g/l
• Tempo di Trombina	15.5 sec
• Fattore II	75 %
• Fattore V	80 %
• Fattore VII	70 %
• Fattore X	73 %

Alcuni esempi di test di miscela

Miscela del Quick

Miscela	immediata	dopo 1h@37°
Plasma paziente	25 %	27 %
1+1 Mix	46 %	49 %
1+3 Mix	75 %	77 %
Plasma normale	115 %	113 %

Interpretazione?

Lupus anticoagulans → Quick-attivo

aPTT prolungato caso 1

Quick	98 %
aPTT	43.5 sec
Fibrinogeno	2.7 g/l
Tempo di Trombina	16 sec

Nessuna anticoagulazione!

Prossimo passo?

aPTT-miscela

Miscela	immediata	dopo 1h@37°
Plasma paziente	43.8 sec	44.5 sec
1+1 Mix	43.2 sec	44.9 sec
1+3 Mix	43.0 sec	44.5 sec
Plasma normale	32.3 sec	32.5 sec
Interpretazione	Lupus anticoagulans	

aPTT prolungato caso 2

Quick	104 %
aPTT	50.8 sec
Fibrinogeno	3.1 g/l
Tempo di Trombina	17 sec

Miscela caso 2

Miscela	immediata	dopo 1h@37°
Plasma paziente	51.8 sec	53.1 sec
1+1 Mix	37.5 sec	37.2 sec
1+3 Mix	33.4 sec	33.8 sec
Plasma normale	30.3 sec	31.0 sec
Interpretazione?	Carenza di un fattore intrinseco	Fattore VIII:C 5 %

aPTT prolungato caso 3

Quick	85 %
aPTT	>300 sec
Fibrinogeno	2.0 g/l
Tempo di Trombina	18 sec

Miscela caso 3

Miscela	immediata	dopo 1h@37°
Plasma paziente	>300 sec	>300 sec
1+1 Mix	40.4 sec	37.8 sec
1+3 Mix	38.8 sec	37.1 sec
Plasma normale	29.9 sec	29.5 sec
Interpretazione	Carenza di un fattore della fase di contatto	FXII <1%

aPTT prolungato caso 4

Quick	120 %
aPTT	48.7 sec
Fibrinogeno	4.0 g/l
Tempo di Trombina	14 sec

Miscela caso 4

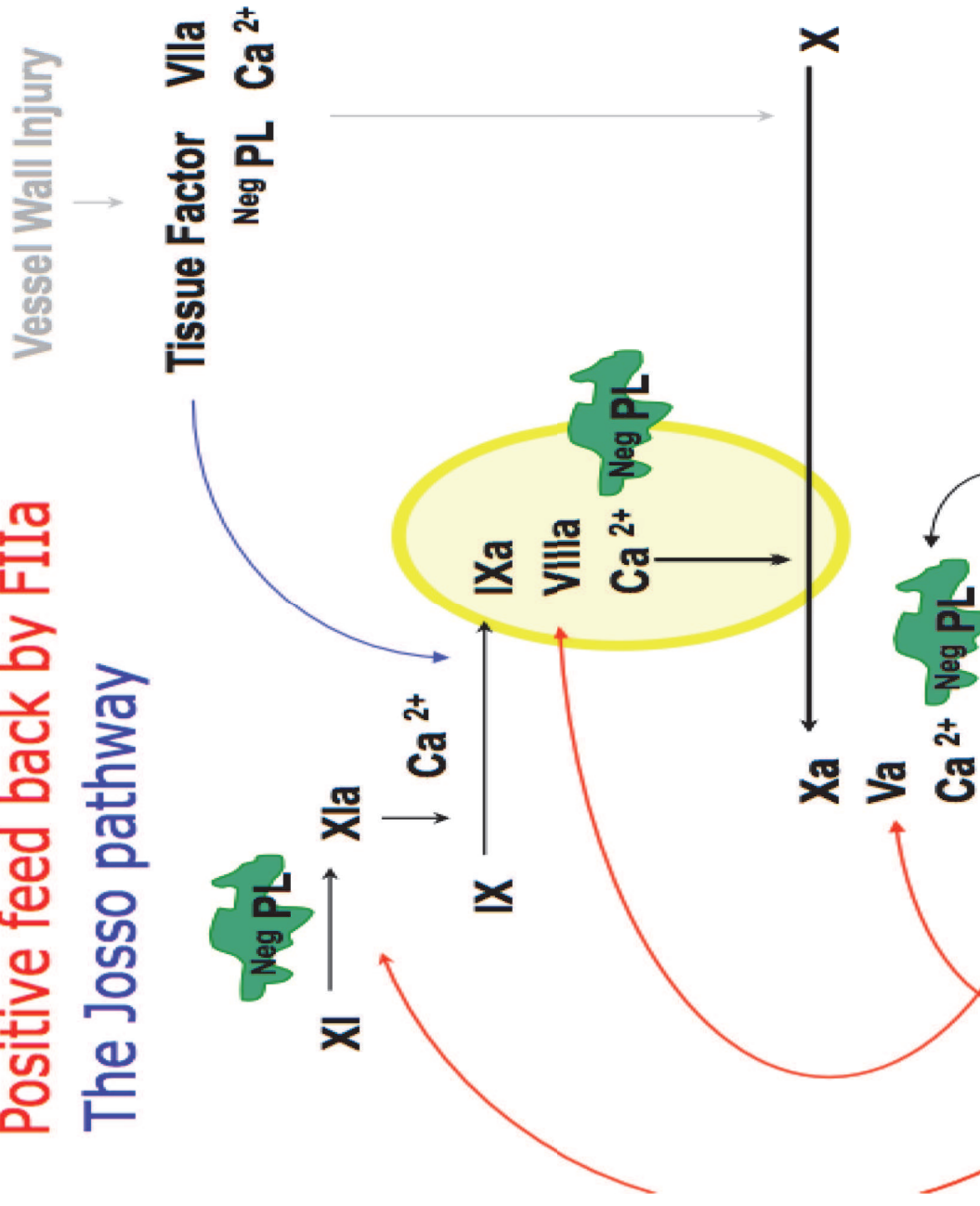
Miscela	immediata	1h@37°C	2h@37°C
Plasma paziente	47.6 sec	48.9 sec	49.6 sec
1+1 Mix	33.5 sec	36.0 sec	39.8 sec
1+3 Mix	32.9 sec	36.5 sec	40.7 sec
Plasma normale	31.3 sec	31.0 sec	33.8 sec

Interpretazione **Inibitore lento !** **FVIII:C <1% Unità Bethesda:10**

Ricordiamoci sempre dove ci muoviamo

Positive feed back by FIIa

The Jasso pathway



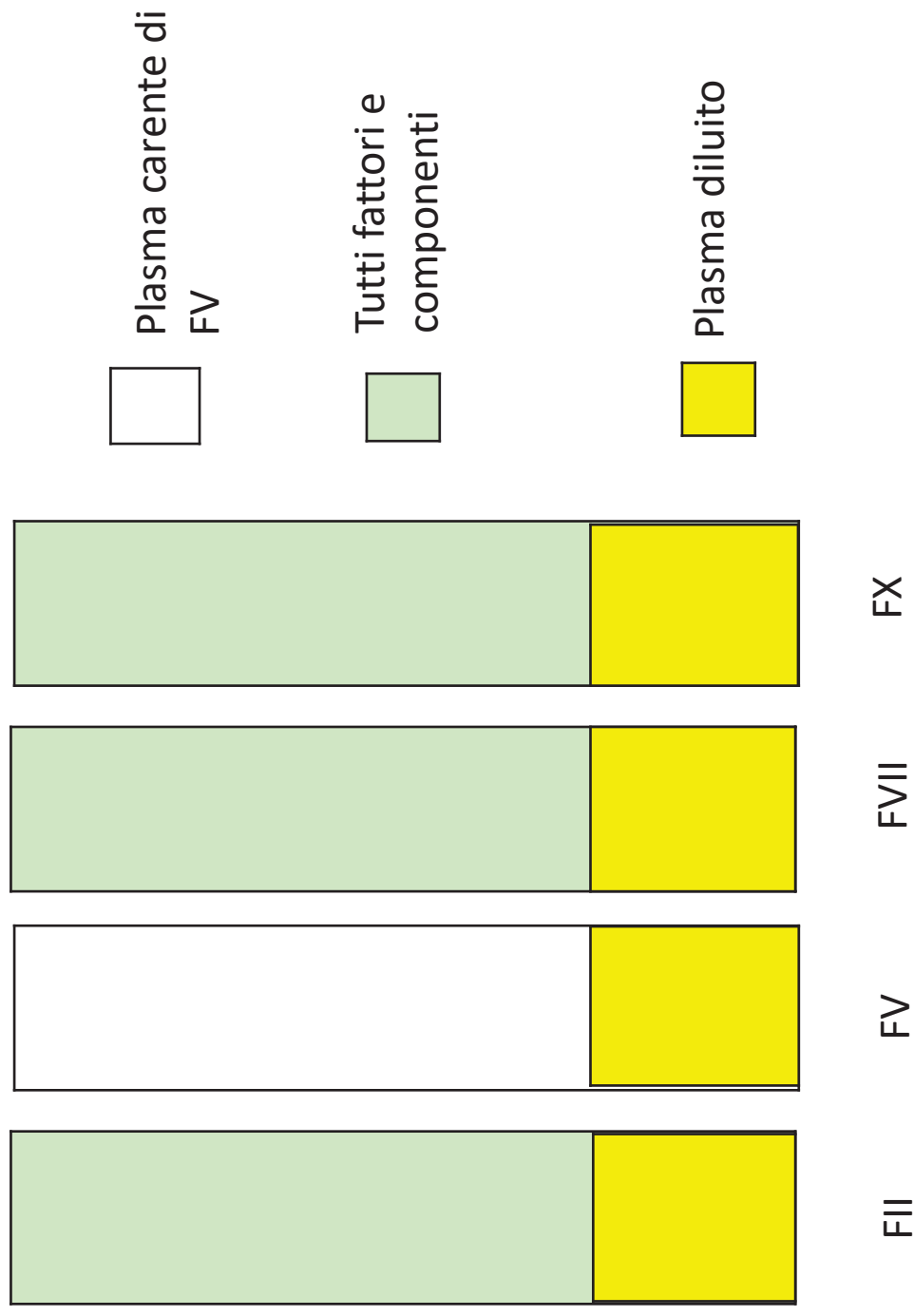
Prof.L.Alberio

Vari metodi per determinare fattori singoli e i parametri di trombofilia

Coagulometrico	Cromogenico	Test immunologico Test a lattice	Elisa
FII-FX	FVIII, FIX	FVW	FVW
FVIII-FXII	FXIII		
	Anti-FXa	D-Dimeri	D-Dimeri
Proteina C clot	Antitrombina		
Proteina S funz	Proteina C	Proteina S Ag	Antifosfolipidici
APCr	Plasminogeno Antiplasmina		

Principio della misurazione dei fattori estrinseci e intrinseci

Metodo coagulometrico



Fattore Von Willebrand



L'analitica per il dosaggio è delicata !?

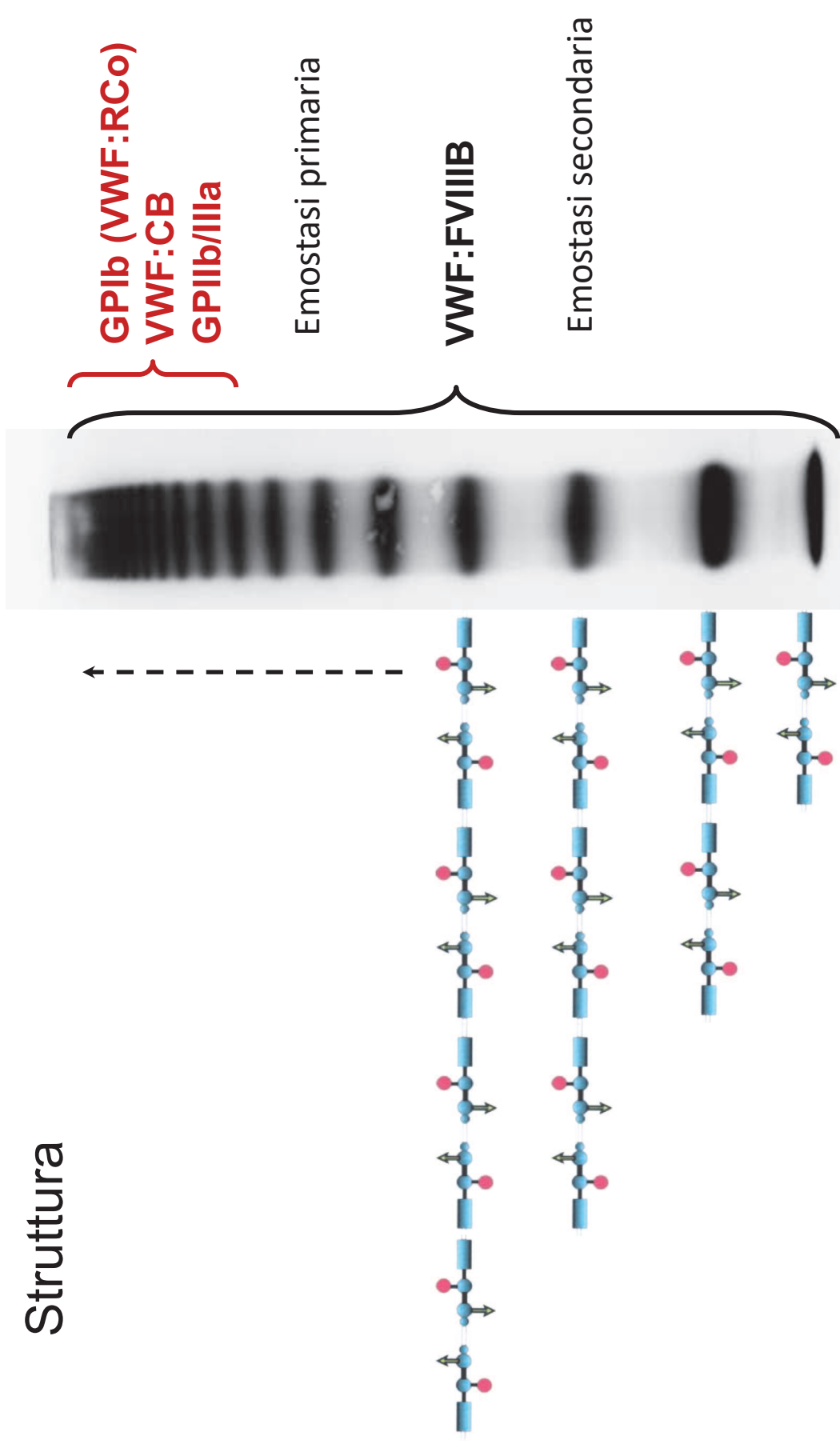
- Scegliere i test ottimali
- Risultati sia del test funzionale che del antigene plausibili e attendibili
- Valori alti → **diluizioni !!!!**
- Sempre insieme al FVIII

Ulteriori analisi per la diagnosi VWD

- Aggregazione piastrinica in PRP con Ristocetina (RIPA-Test)
- VW- Collagen-Binding-test (VW:CB)
- VW- FVIII-Binding test (VW:FVIII B)
- VW- Multimeri
- VW- Propeptide*

Fattore Von Willebrand

Struttura



Sintesi del fattore Von Willebrand

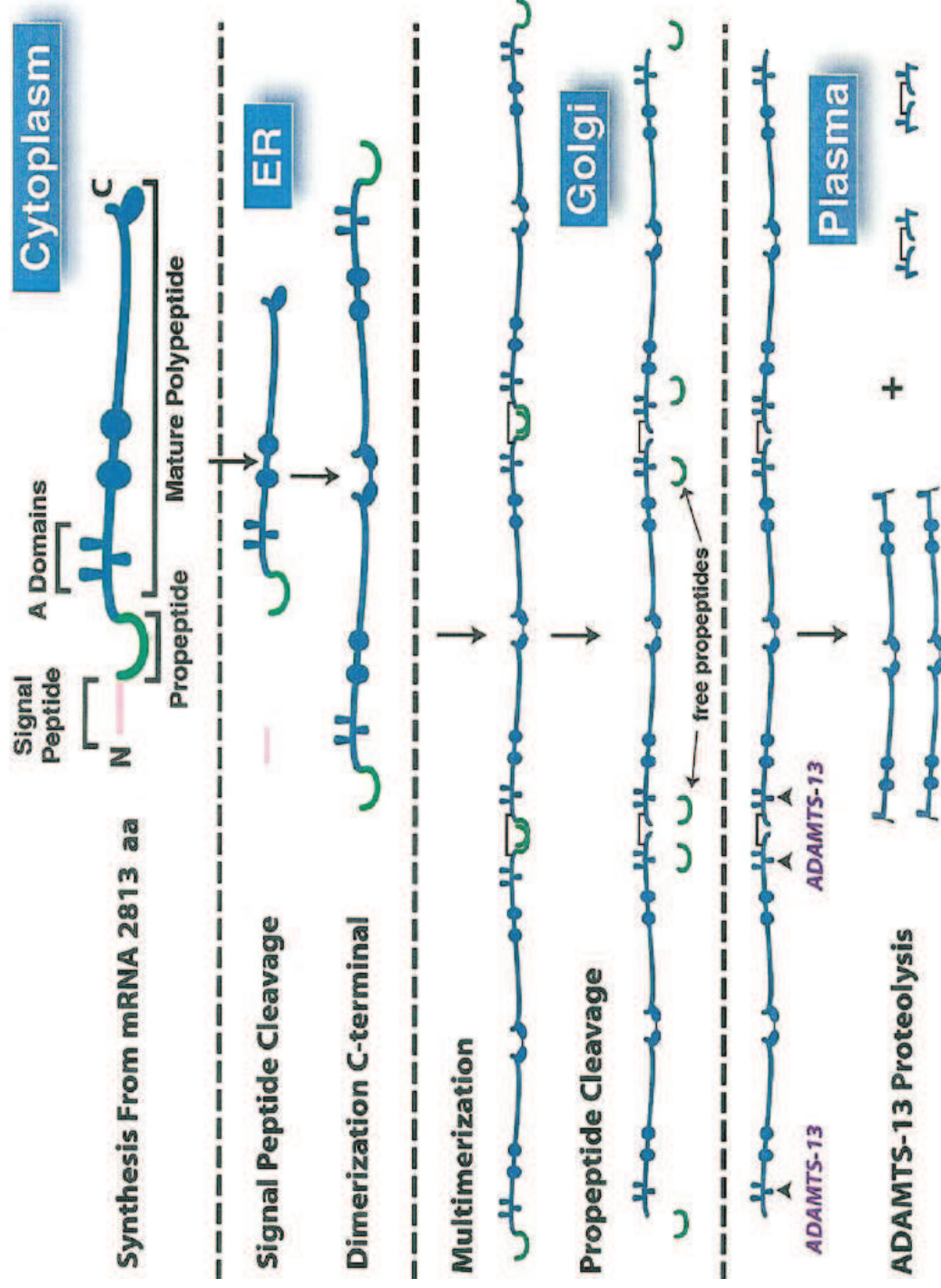


Figure 1. Depiction of VWF synthesis and processing. See text for details.

Il Fattore Von Willebrand in circolazione:

<u>Fase</u> _____ :	<u>Analisi</u> :
Sintesi	VWF:Ag
Struttura	VWF:Ag, VWF:MM
Stoccaggio	DAVP-test (Minirin-test)
Secrezione	DDAVP-test
Funzione	VW:RCo, VWF:CBA, VWF:FVIIIIB
Clearance	DDAVP-test
Shear-stress	VWF:MM
Degradazione	VWF:MM

Differenziare tra Emofilia A e Malattia del Von Willebrand

FVIII:C	: 24 %	FVIII:C	: 30 %
FVW:Rco (attività)	: 84 %	FVW:Rco (attività)	: 23 %
FVW:Ag	: 90 %	FVW:Ag	: 25 %

Lieve Emofilia A

Lieve malattia Von Willebrand

Sospetto di malattia von Willebrand → Test di Laboratorio

Laboratorio: Conteggio e morfologia dei Trombociti

PFA 100/200

aPTT

FVIII

FVW antigene e attività

ulteriori analisi a secondo l'esito

Medico:

Anamnesi personale e familiare, bleedingscore

(z. B. J Thromb Haemost 2005;3:2619)

Fattore Von Willebrand

Differenziazione tra i diversi tipi di VWD

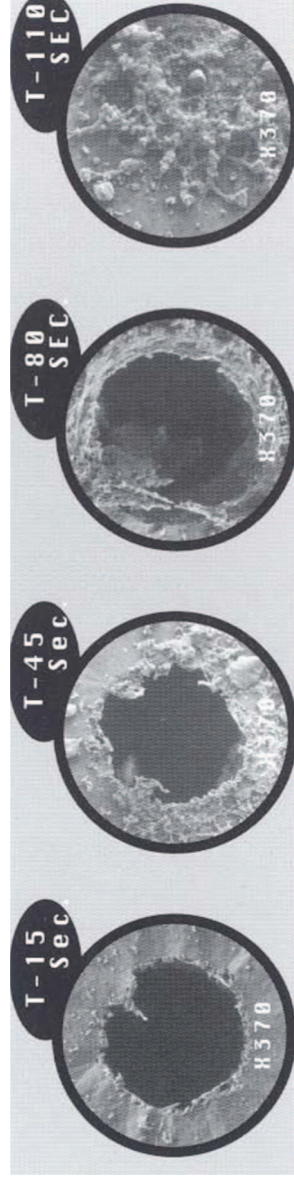
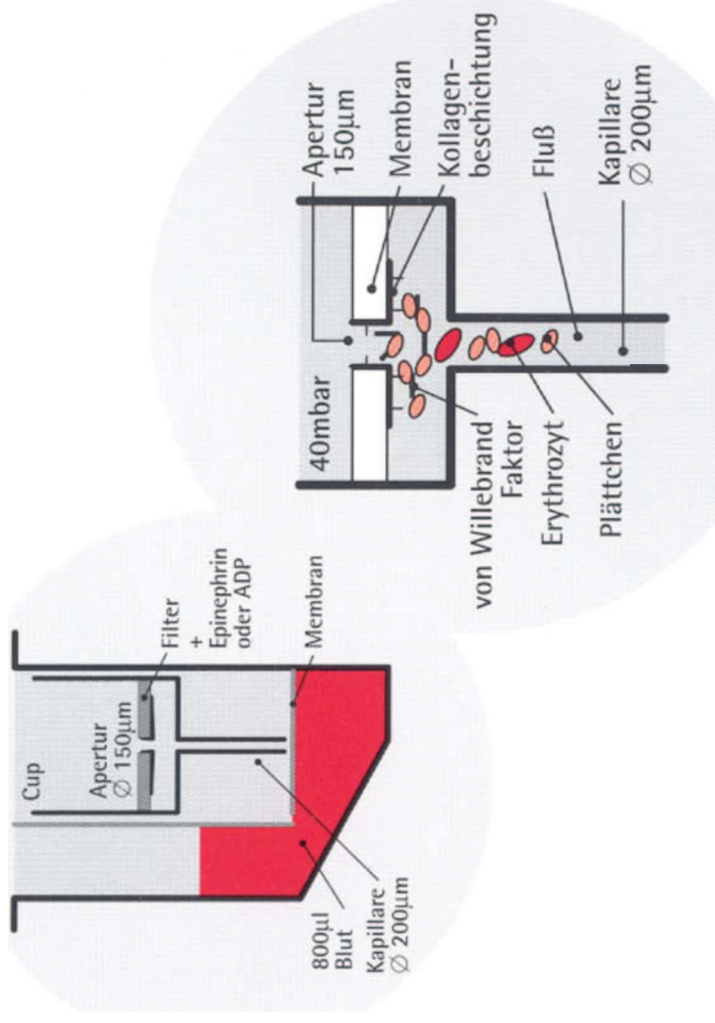
VW Tipo 1: sintesi insufficiente

VW tipo 2: disfunzionale

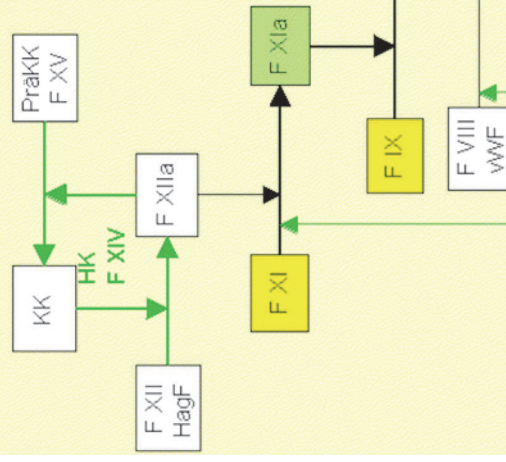
- 2A: mancanza di multimeri ad alto peso
- 2B: adesione insufficiente al recettore della Ristocetina
- 2M: funzione piastrinica insufficiente
- 2N: adesione insufficiente al FVIII

VW tipo 3: carenza totale

Principio del PFA

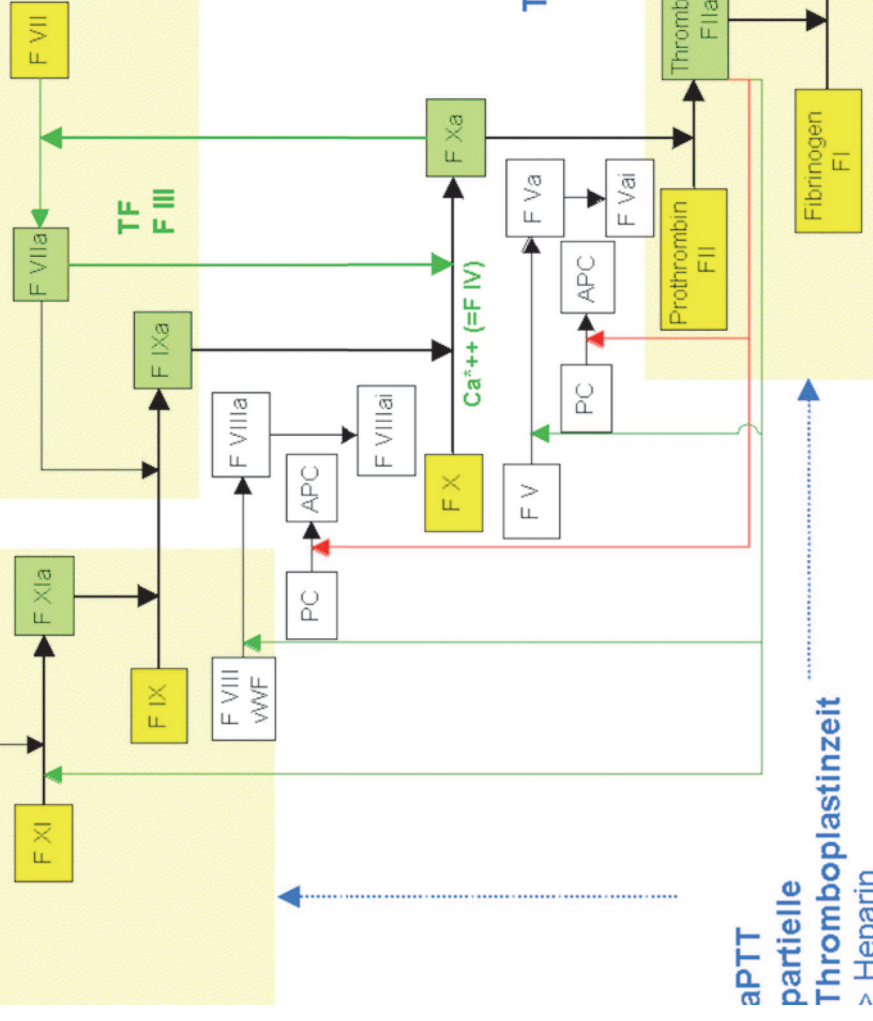


Intrinsischer Weg (Minuten)



Gerinnungskaskade (Plasmatische Gerinnung) - Aktivierung -

Extrinsischer Weg (Sekunden)



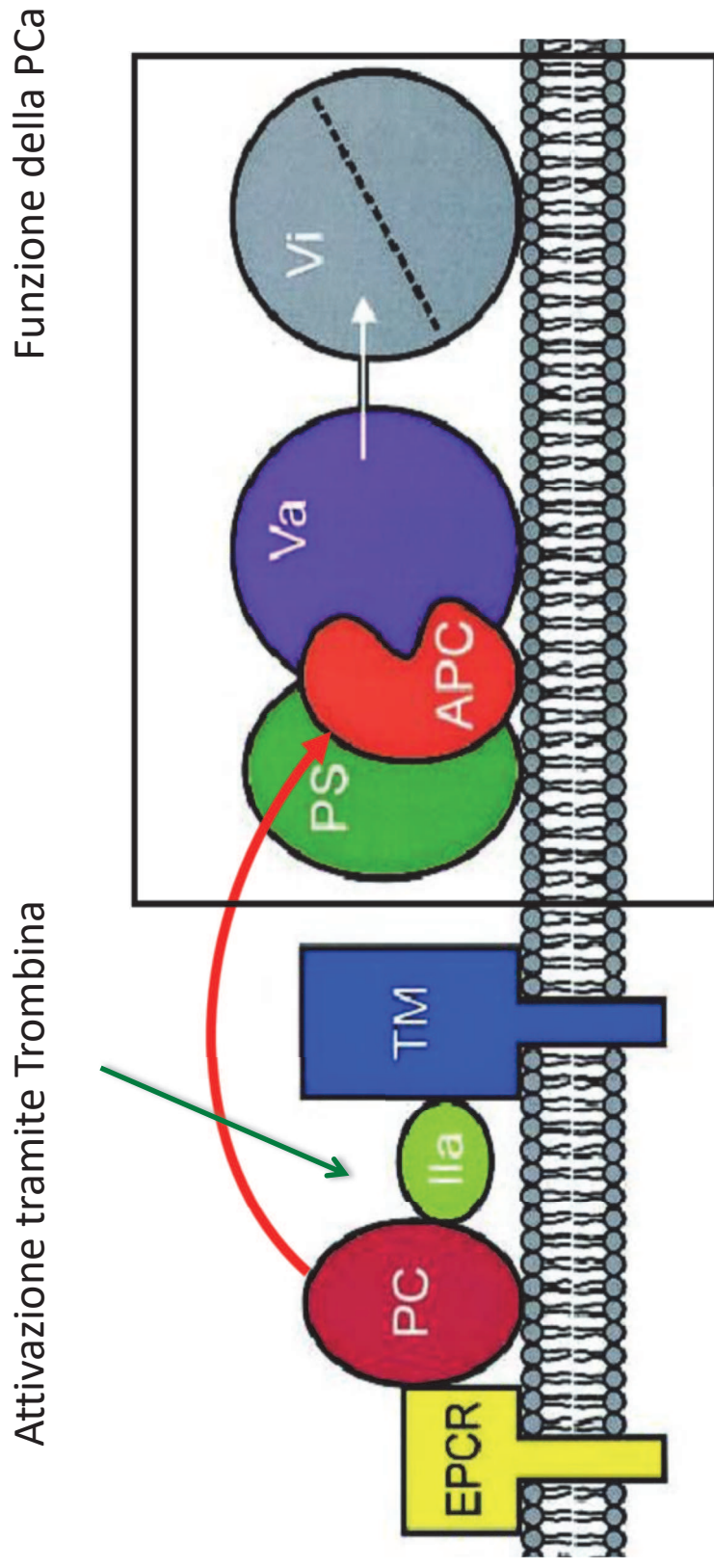
Quick
(=Thromboplastinzeit)
(=Prothrombinzeit)
> Marcumar

Thrombinzeit

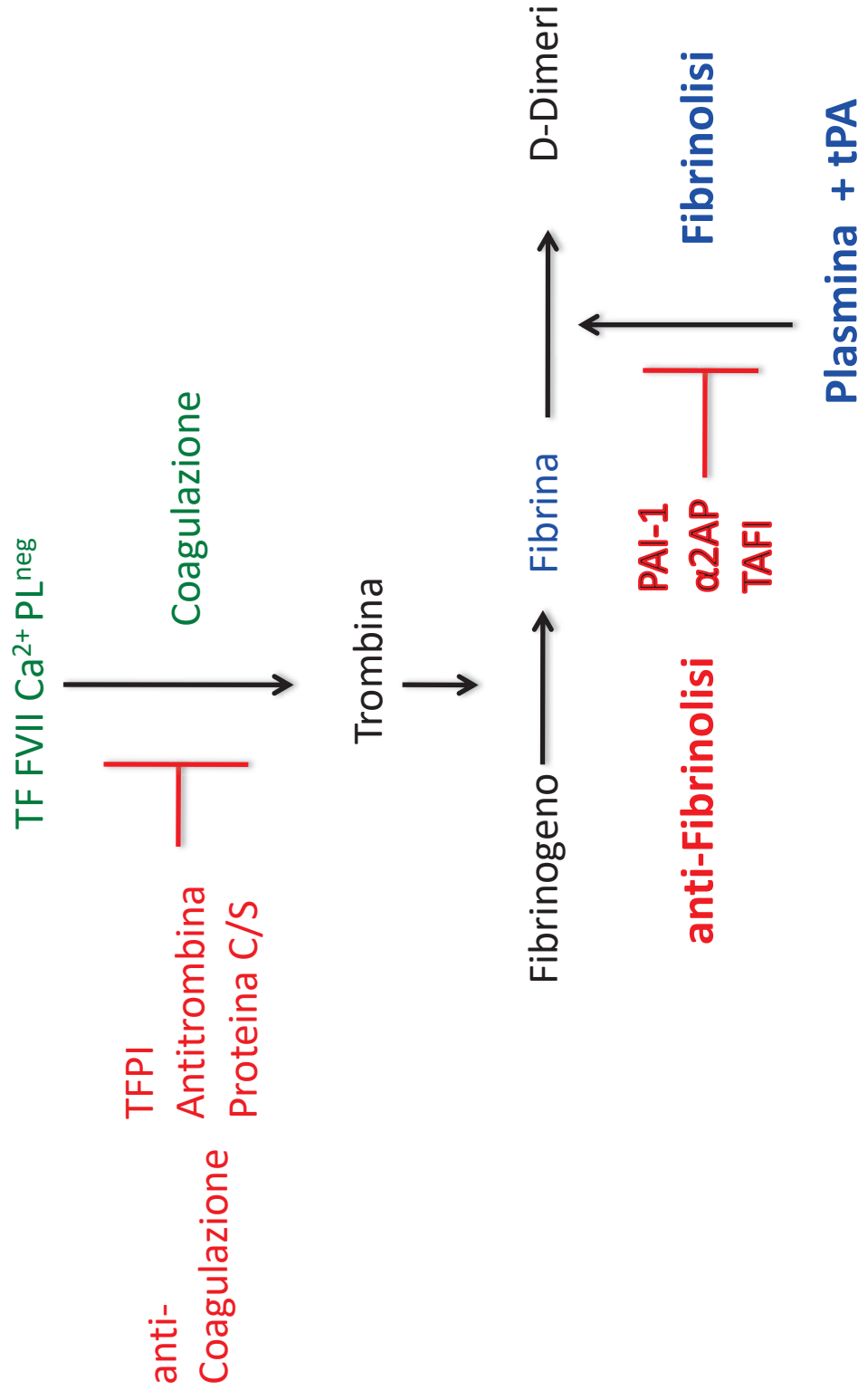
aPTT
partielle
Thromboplastinzeit
> Heparin

Parametri della trombofilia

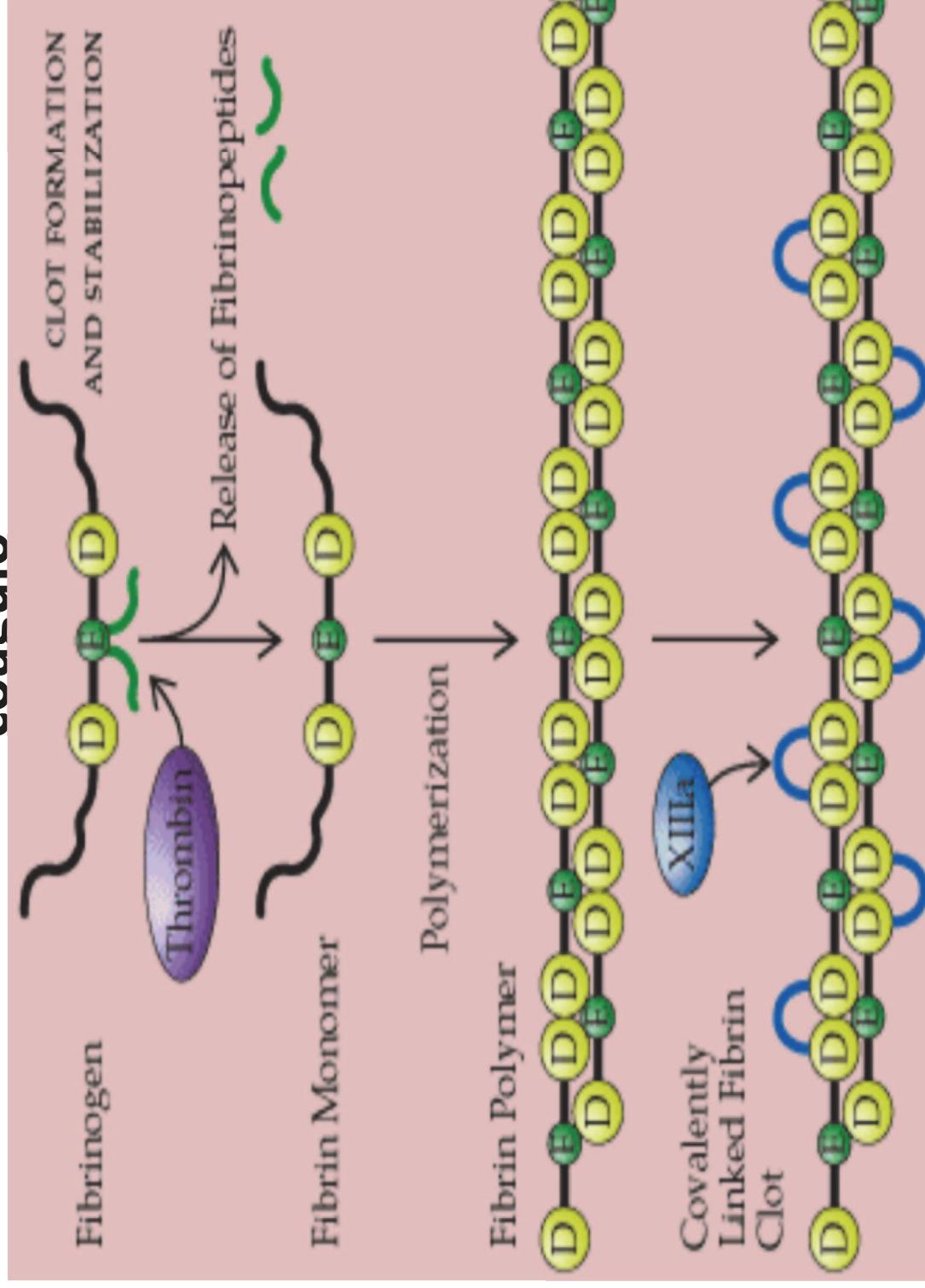
Anticoagulanti naturali: Antitrombina, Proteina C/S



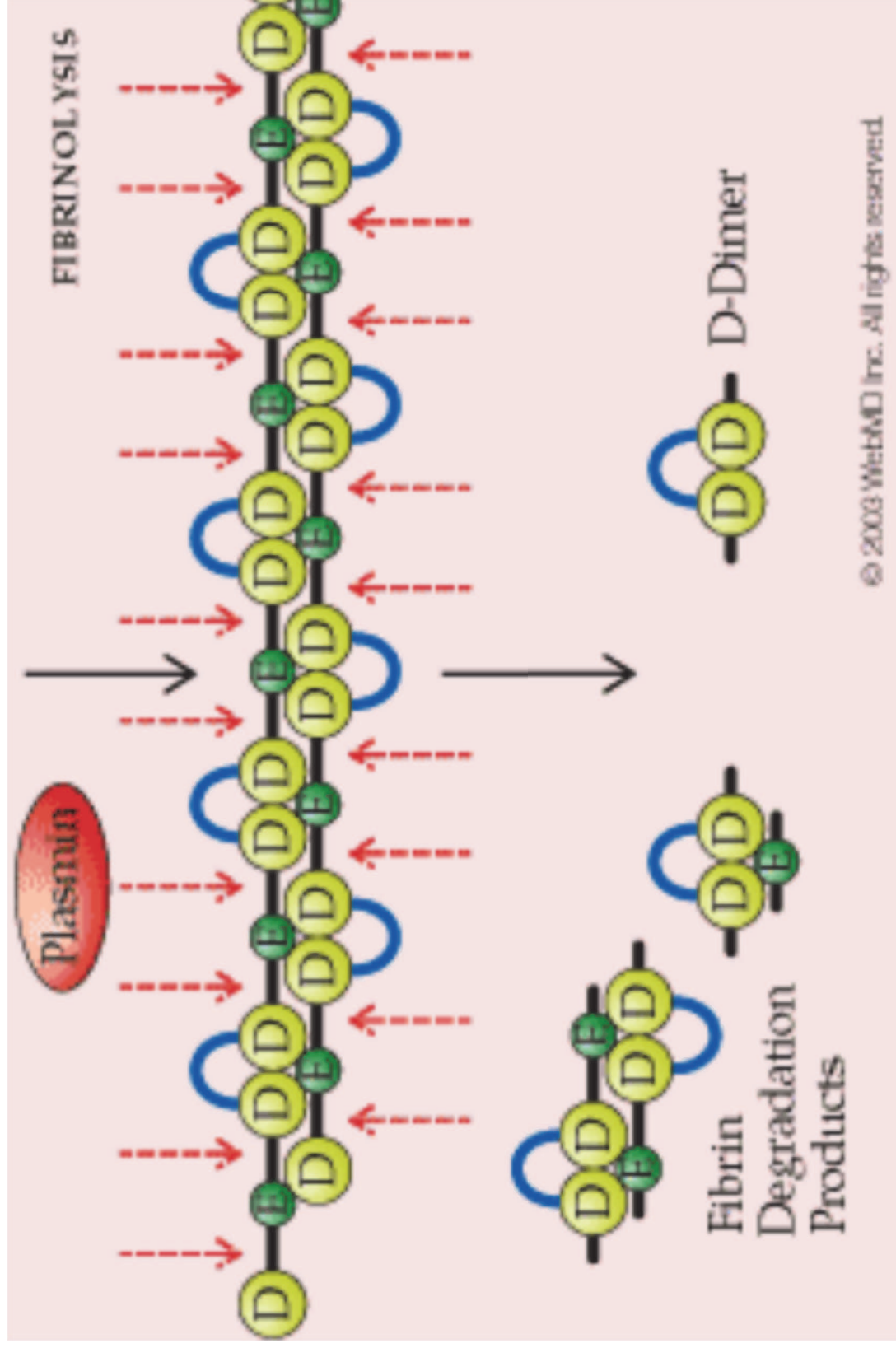
Fase fibrinolitica



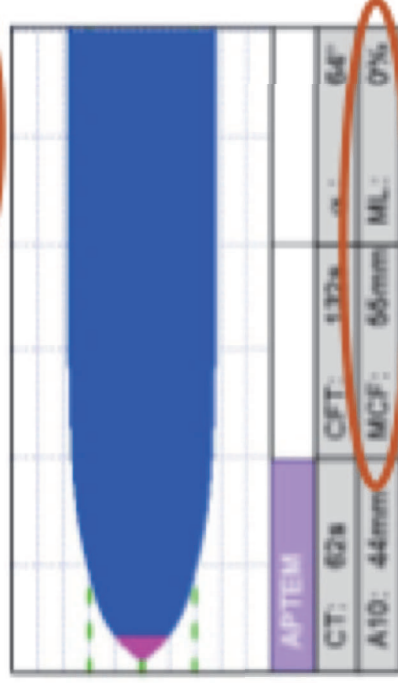
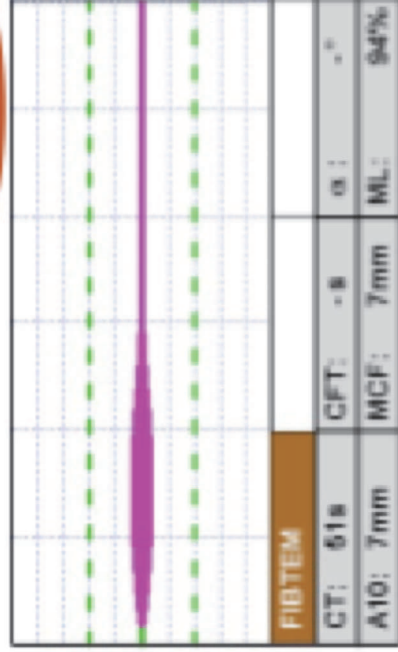
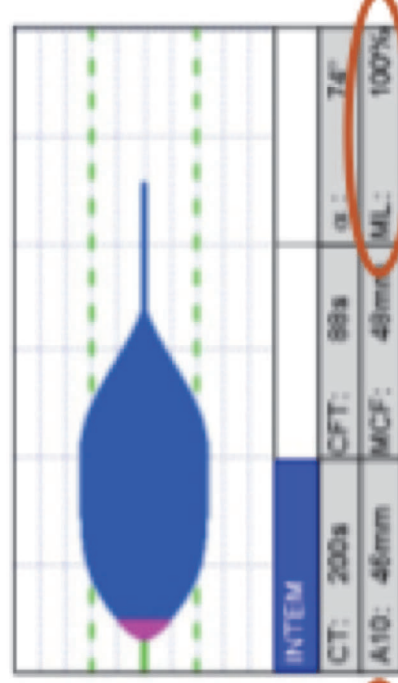
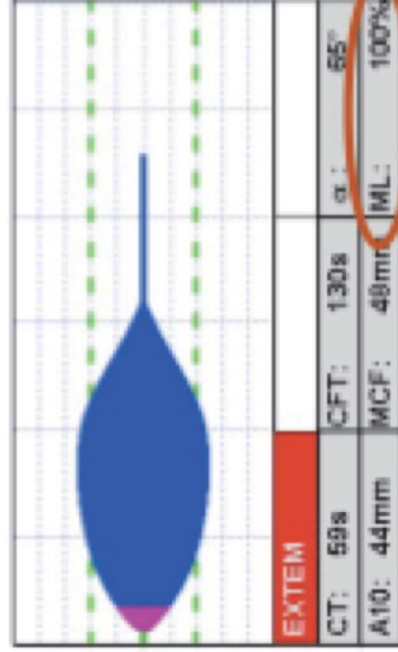
Deposizione di Fibrina e formazione del coagulo

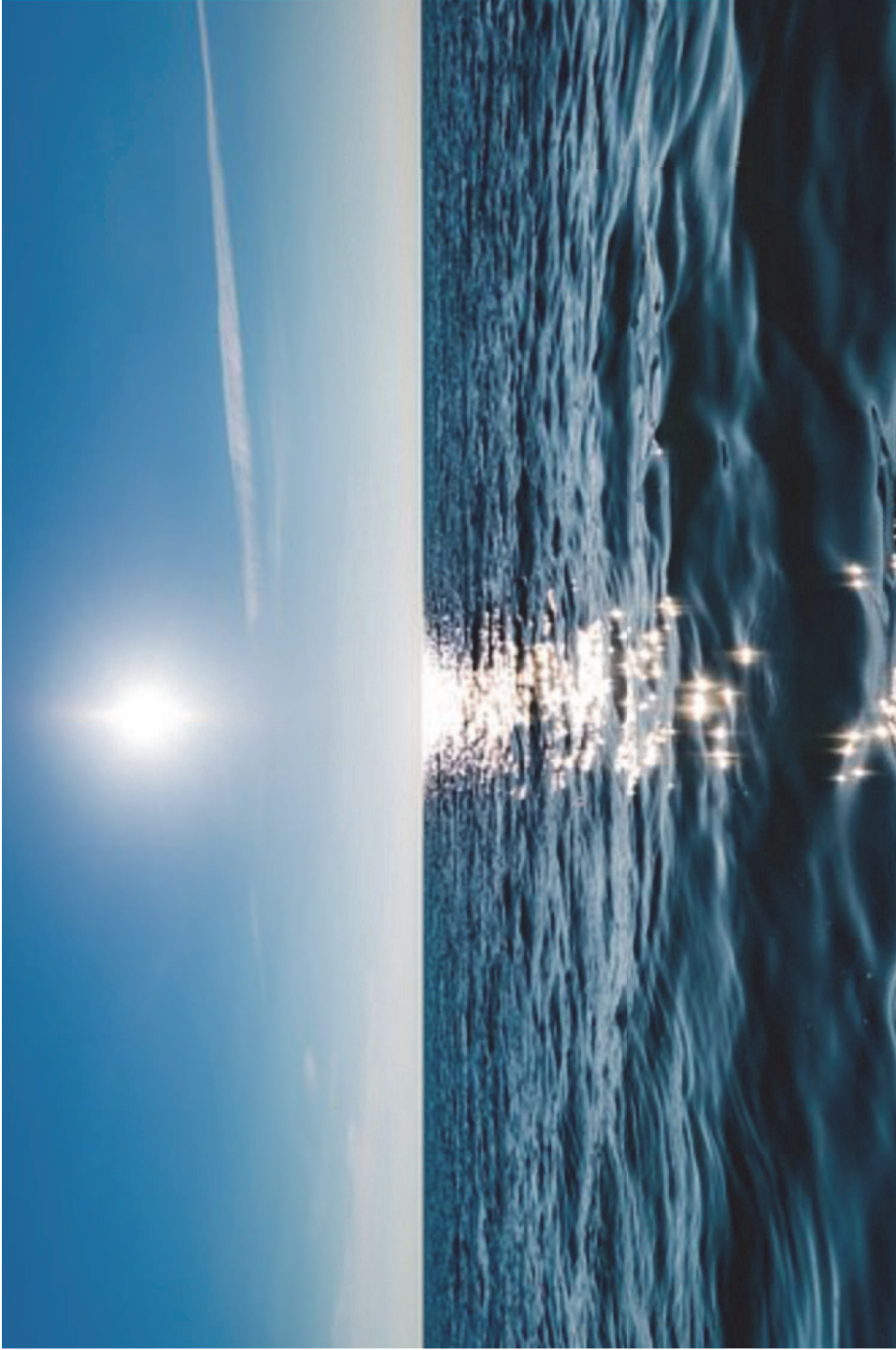


Risolvimento del coagulo



Unico modo di visualizzare una iper-fibrinolisi





Medicamenti della coagulazione

Anti-Coagulanti

Antagonisti della Vit K:
Marcoumar / Sintrom

Eparine / anti-FXa:
LMWH

Fraxiparina, Clexane, Fragmina

DOAC/ACOD anti-FXa

Rivaroxaban

Apixaban

Edoxaban

DOAC/ACOD anti-FIIa:

Dabigatran

Argatroban

Bivalirudin

anti-Aggreganti

Aspirina / Aspirina cardio
Plavix

Prasugrel
Clopidogrel

Metodi di dosaggio

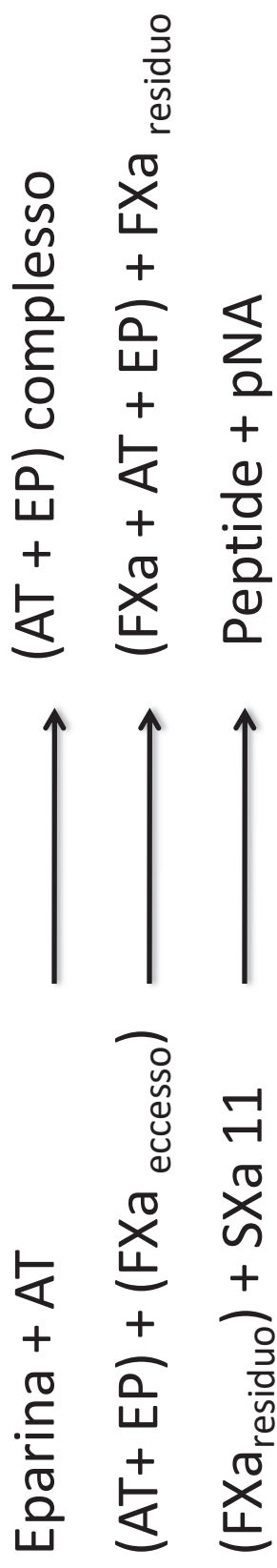
Antagonisti della Vit K: effetto → **inibizione della reduttasi epossidico della Vit K**

Metodo: coagulometrico

Comprende: fattori dipendenti dalla Vit K: FII - FVII - FX (Quick), FIX, Proteina C/S

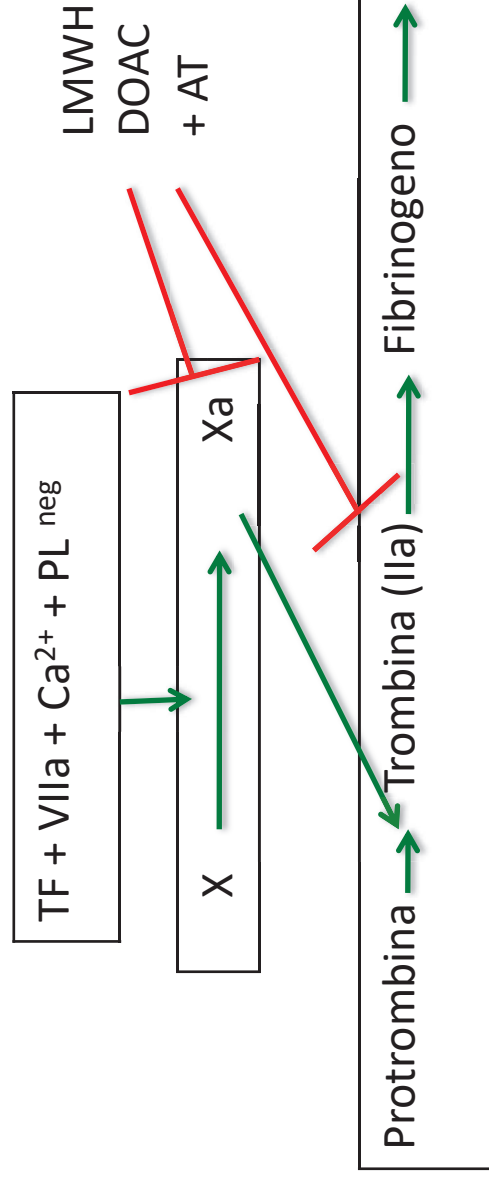
anti-FXa

Principio del test



Il test anti-FXa funziona per tutti medicinali a base di inibizione del FXa /FIIa

Importante Antitrombina che lega sia alla Trombina (IIa) che al Xa



Il dosaggio degli DOAC necessita un calibratore che contiene il medicamento

Correlazione tra quantità di FXa-residuo e quantità di medicamento

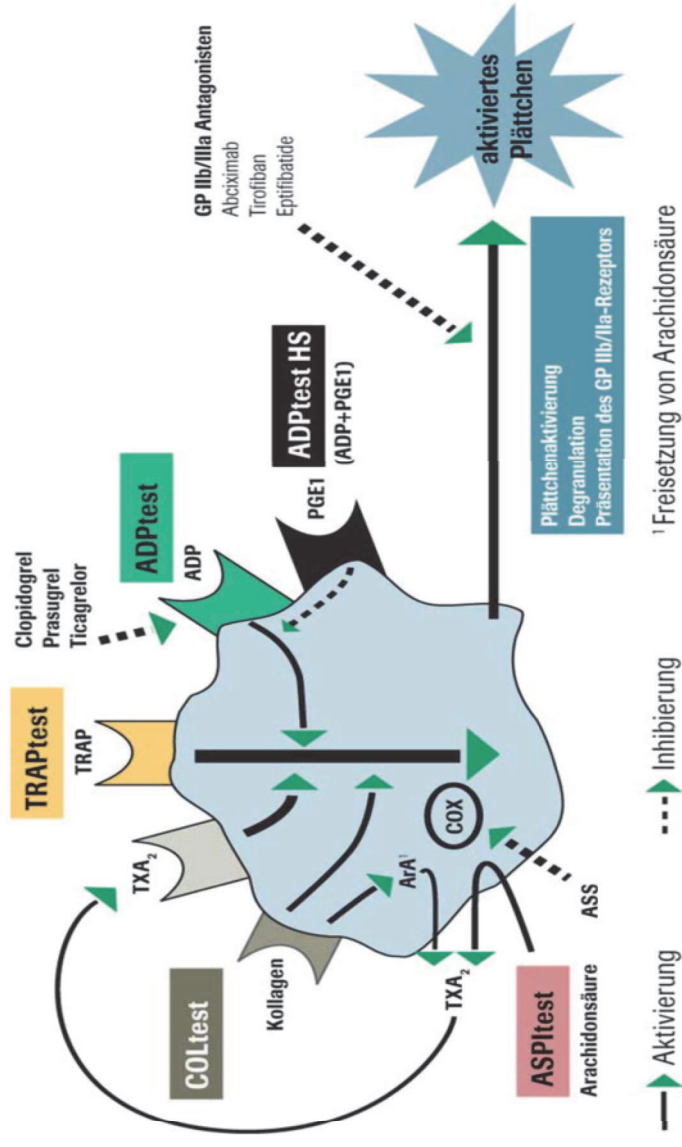
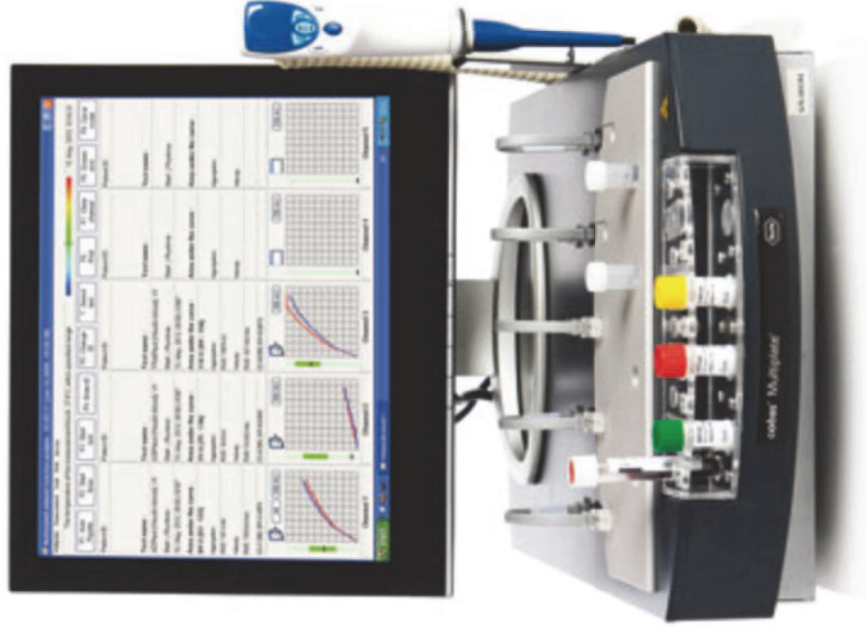
Medicamenti influenzano il dosaggio dei fattori e altri parametri

Possibilità di eliminare la sostanza attiva del medicamento tramite DOAC remove



Anti-Aggreganti

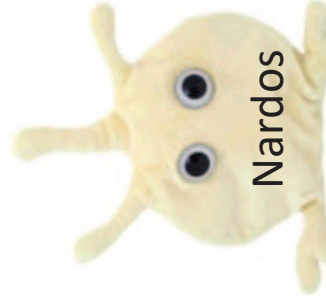
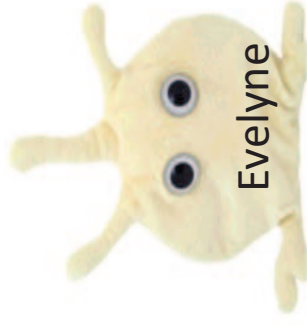
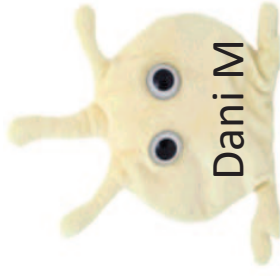
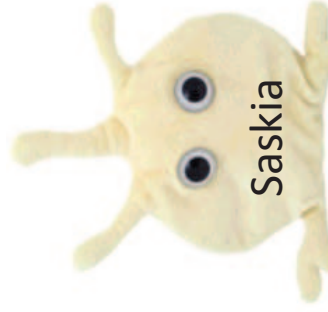
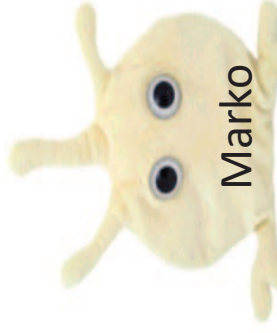
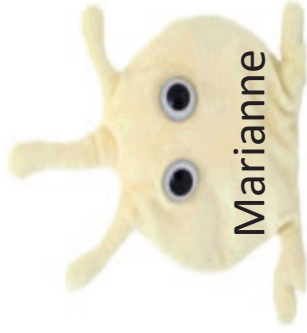
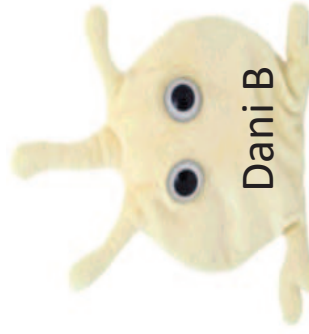
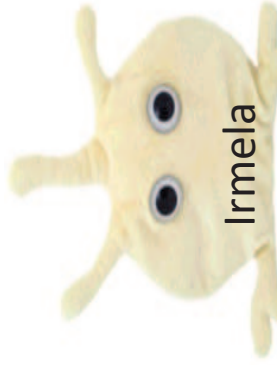
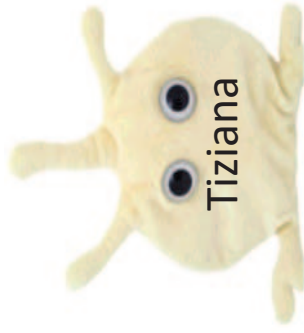
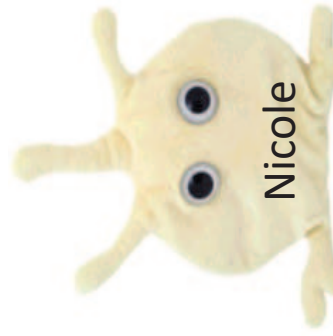
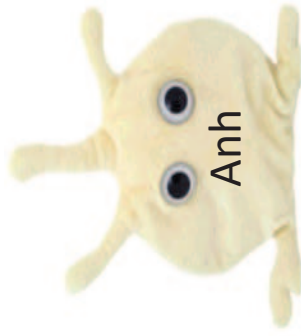
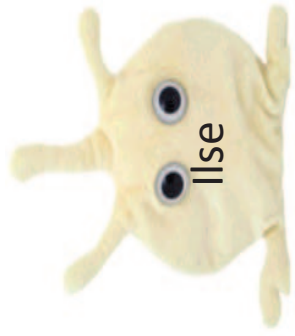
Metodo: Multiplate → Aggregazione piastrinica in sangue intero ad impedenza

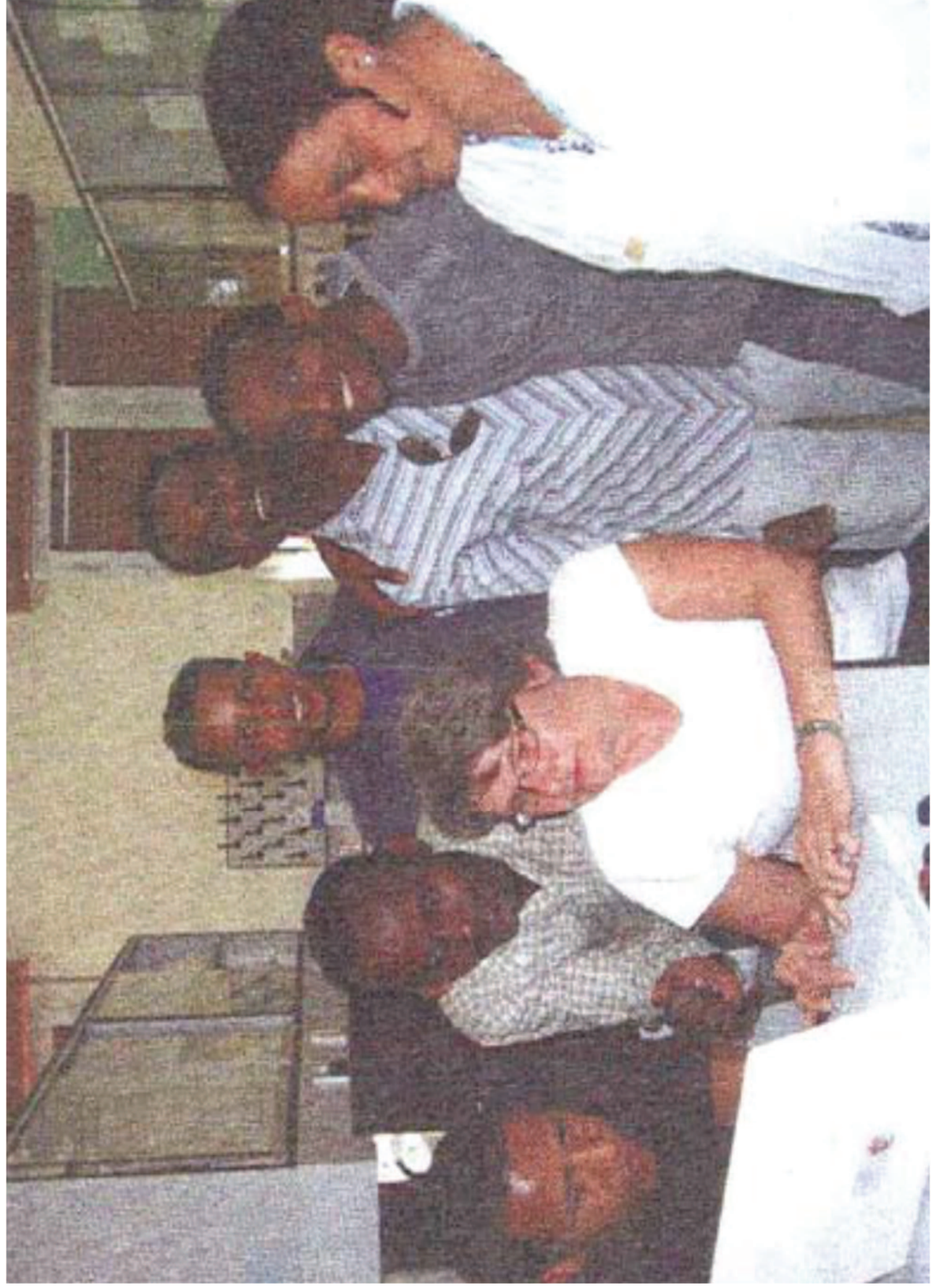


Grazie per la vostra gentile attenzione

Buon divertimento con la coagulazione

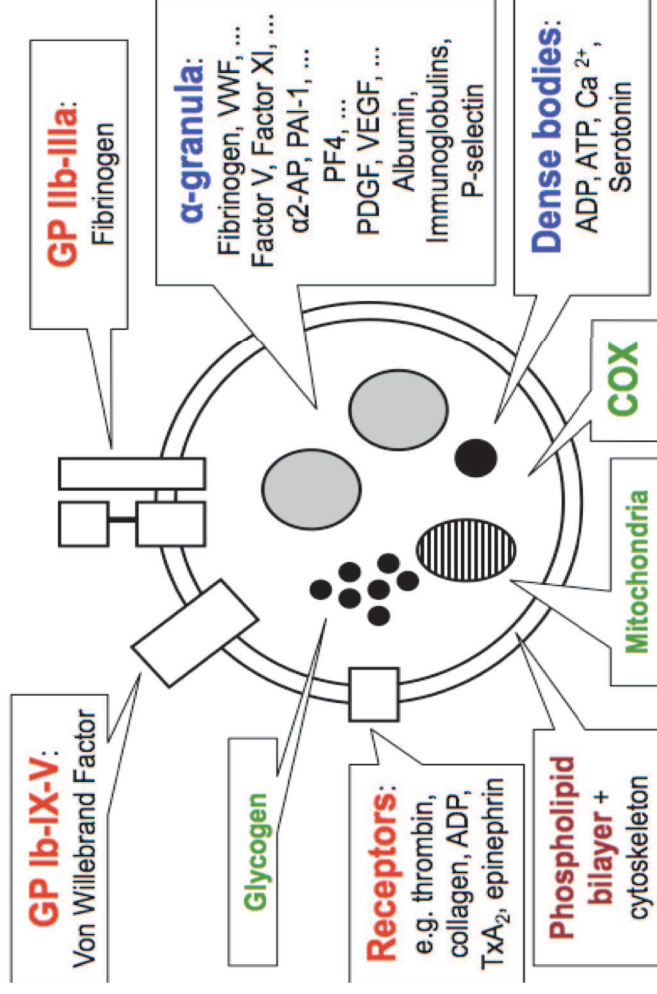




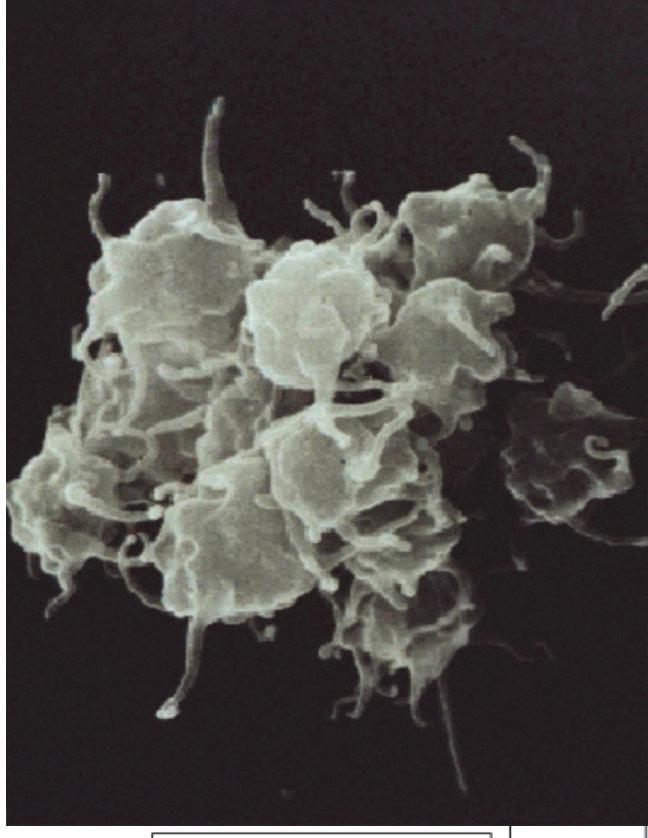


Trombociti

Ruolo nell'emostasi primaria



Trombocita a riposo



Trombociti attivati

Trombociti

Attivazione del trombocita

- 1. Adesione:**
 - tramite il FVW rilasciato dalle Weibel-Palade-bodies dell'endotelio che si lega al ricettore Glicoproteina Ib/IX/V
 - tramite il contatto con il ricettore Glicoproteina Ia/IIa con le fibrille del collagene subendoteliale e altri fattori come la Trombina, ADP, PAF e Adrenalina
- 2. Shape change:**
 - in questa fase il trombocita si trasforma in una pallina rotonda e dovuto alla contrazione di microfilamenti intracellulari si formano delle pseudopodi che permettono l'aggregazione
- 3. Aggregazione:**
 - I trombociti attivati si aggregano tra di loro e grazie al ricettore Glicoproteina IIb/IIIa che si lega al Fibrinogeno nella fase di attivazione, si forma il "coagulo"
- 4. Secrezione:**
 - stimola e aumenta la coagulazione plasmatica dovuta alla secrezione delle sostanze rilasciate dal citoplasma e dalla granula dei trombociti (α -granula e δ -granula)

Trombociti

α -granula contiene:

Fibrinogeno,
FVW,
P-Selectin,
Fattore V,
FP4

procoagulante

δ -granula contiene:

ADP, ATP,
 Ca^{2+} ,
Serotonina

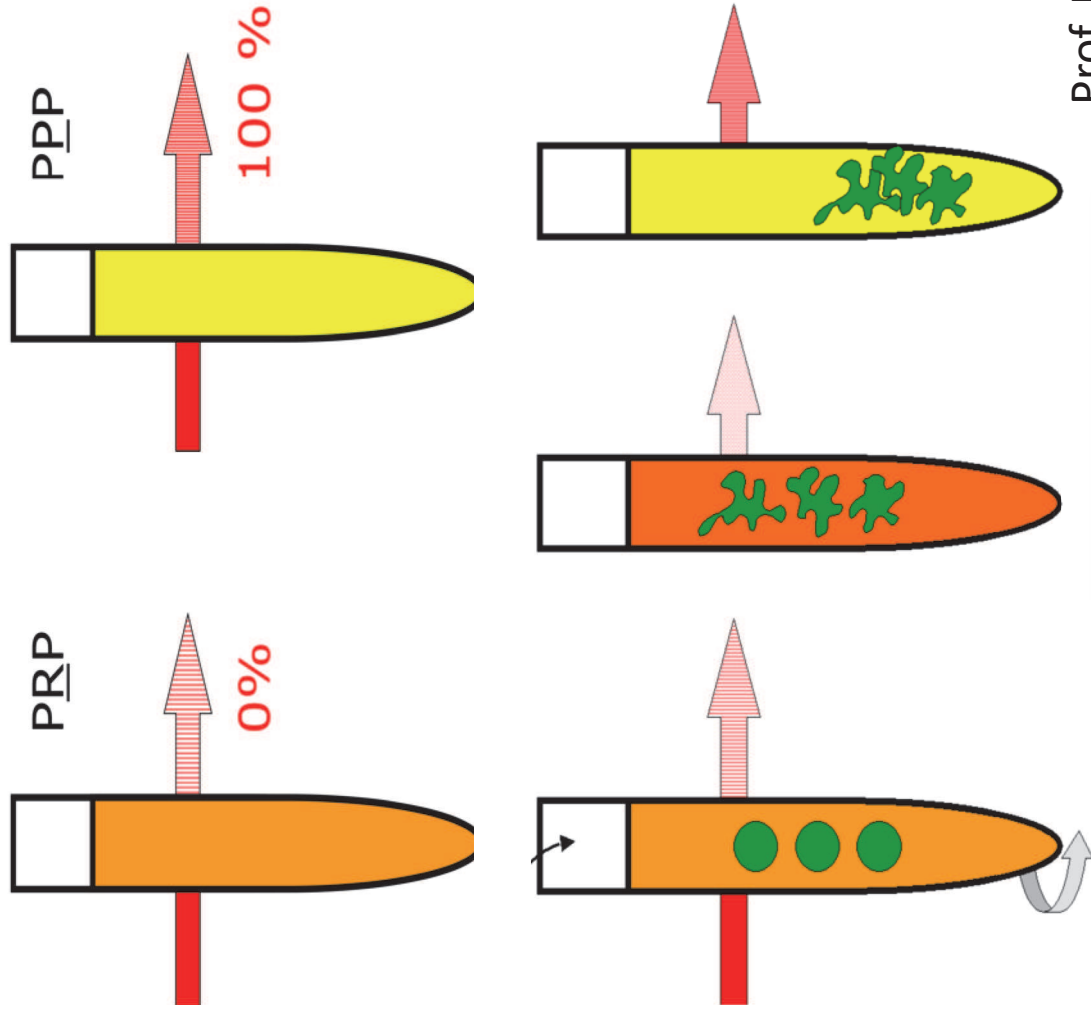
Aggregazione piastrinica

Aggregometro



Aggregometria piastrinica in PRP

Metodo



Curve di aggregazione con diversi agonisti e concentrazioni (secondo il protocollo ISTH)

ADP	TRAP-6 (Thrombin-Rezeptor Activator Peptide-6)
Collagene	Ristocetina
Epinefrina	U46619 (Trombossano A ₂ analoga)
Acido Arachidonico	

