

Hemofilinin Tanı ve İzleminde Klinik Laboratuvarların Rolü

The Role of Clinical Laboratories in the Diagnosis and Monitoring of Hemophilia

Belkız Öngen İpek 

Prof Dr Cemil Taşçoğlu Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, İstanbul, Türkiye

Received / Başvuru Tarihi: 07 Kasım 2024

Accepted / Kabul Tarihi: 24 Aralık 2024

ÖZET

Hemofili A ve B, sırasıyla faktör VIII ve faktör IX genlerindeki mutasyonların neden olduğu pıhtılaşmanın yokluğu veya azalmış aktivitesi ile karakterize X'e bağlı kanama bozukluklarıdır. Hemofili tanısı, hemofilinin klinik özelliklerini ve semptomlarını anlama, kanamanın potansiyel nedenini belirlemeye yönelik testler olan protrombin zamanı, aktive kısmi tromboplastin zamanı, trombosit sayısı ve fonksiyonu gibi tarama testlerinin kullanılması ve yorumlanması ile faktör analizleri ve uygun yöntemlerle tanının doğrulanması gibi spesifik araştırmalara dayanır. Bu derlemede Hemofili tanı ve takibinde kullanılan biyokimyasal testler, kullanım algoritmaları ile karışım testleri, faktör ve faktör inhibitör testleri hakkında ayrıntılı bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Hemofili, Bedhesta, Faktör, İnhibitör

ABSTRACT

Hemophilia A and B are X-linked bleeding disorders characterized by the absence or reduced activity of coagulation caused by mutations in the factor VIII and factor IX genes, respectively. Diagnosis of hemophilia is based on understanding the clinical features and symptoms of hemophilia, screening tests to determine the potential cause of bleeding such as prothrombin time, activated partial thromboplastin time, platelet count and function, and specific investigations such as factor analysis and confirmation of the diagnosis with appropriate methods. In this review, it is aimed to give detailed information about the biochemical tests used in the diagnosis and follow-up of Hemophilia, their usage algorithms, mixture tests, factor and factor inhibitor tests.

Keywords: Hemophilia, Bedhesta, Factor, Inhibitor

Yazışma adresi: Belkız Öngen İpek

Prof. Dr. Cemil Taşçoğlu hast, Tıbbi Biyokimya, İstanbul, Türkiye

e-posta: belkizongen@gmail.com

GİRİŞ

Hemofili, hemofili A ve B olarak adlandırılan pıhtılaşma faktörleri VIII (FVIII) ve IX (FIX)'un eksikliği ile karakterize edilen, X'e bağlı konjenital bir kanama bozukluğudur. Hemofili hastalarında yaralanma, diş çekimi ve cerrahi işlemler sonrasında uzun süreli kanama görülür (1,2). FVIII ve FIX, intrinsek yolda yer alan pıhtılaşma faktörleridir. Sonuç olarak, pıhtılaşma faktörlerindeki eksiklik, aktive kısmi tromboplastin zamanı (aPTZ) uzaması ile sonuçlanır (2,3). Laboratuvar bulguları tipik olarak normal protrombin zamanı (PZ), normal trombin zamanı, normal trombosit sayısı ve uzamış aPTZ'yi gösterir. Kanama ile başvuran hastalardaki tarama testleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Hemofili'de kanama ataklarının tanısı ve sıklığı eksik faktör aktivitesi ile ilişkilidir. Şiddetli hemofilide faktör aktivitesi düzeyleri 1 IU/dL'nin (%1) altında, orta hemofilide 1-5 IU/dL (%1-5) arasında, hafif hemofilide ise 5-40 IU/dL (%5-40) arasında saptanır (1,2). Şiddetli hemofili A'lı bireyler, genellikle yaşamın ilk iki yılında kanama veya bilinen bir aile hemofili öyküsü nedeniyle teşhis edilir. Profilaktik tedavi almayan bireylerde her ay ortalama iki ile beş arasında spontan kanama atağı görülebilir. Orta derecede hemofili A hastalarında, kişiden kişiye değişmekle birlikte nadiren spontan kanama görülür, küçük bir travmadan sonra uzamış veya gecikmiş kanamaları olur ve genellikle beş ile altı yaşından önce teşhis edilirler. Kanama ataklarının sıklığı genellikle ayda bir ile yılda bir arasında değişir. Hafif hemofili A hastalarında ise spontan kanama atakları görülmez ancak ameliyat öncesi ve sonrası tedavi uygulanmadığında anormal kanama meydana gelebilir. Kanama ataklarının sıklığı tipik olarak yılda bir ile on yılda bir arasında değişir. Hafif hemofili A'lı bireylere genellikle yaşamın ilerleyen zamanlarına kadar teşhis konulamaz (1).

Edinsel hemofili (EH) ise FVIII aktivitesini inhibe eden otoantikörlerin varlığı ile karakterize nadir bir hastalıktır. Ancak FV, VII, IX, X, XII ve XIII gibi diğer pıhtılaşma faktörlerini içeren vakalar da rapor edilmiştir.

Yeni başlayan kanama ve izole aPTZ uzaması ile başvuran hastalarda EH tanısı düşünülmelidir. Edinsel hemofili A (EHA) tanısı, FVIII aktivitesinin azalmasına ve inhibitör olarak da adlandırılan nötralize edici anti-faktör VIII antikörlerinin varlığına dayanır. EHA olgularının yaklaşık %50'sinde neden bilinmemektedir, geri kalan olgular ise sıklıkla altta yatan maligniteler, enfeksiyonlar, ilaç tedavileri veya romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarla ilişkilidir (1,4,5).

aPTZ, intrinsek ve ortak pıhtılaşma yollarının aktivitesini değerlendirmek için kullanılan pıhtı bazlı bir testtir. aPTZ kitinde intrinsek aktivitenin ölçülebilmesi amacıyla prokoagulan fosfolipid (doku faktörü içermeyen kısmi tromboplastin) ve aktivatör bulunur. Fosfolipidler, pıhtılaşma faktörlerinin etkileşimi için uygun bir yüzey ortamı sağlar (6). İnorganik veya organik aktivatörler (örneğin kaolin, mikronize silika, ellagik asit veya bitkisel fosfatidler) ile temas faktörlerinin (örneğin yüksek molekül ağırlıklı kininojen, prekallikrein ve faktör XII ve XI) aktivasyonu başlatılır. Uzamış aPTZ, muhtemelen faktör XII, XI, IX veya VIII'deki eksikliklere bağlı olarak intrinsek yoldaki yetersizliği gösterir. Ek olarak, uzamış aPTZ, ortak yoldaki eksiklikleri (faktör V, X, II veya fibrinojen) ve spesifik inhibitörlerin veya heparin gibi antikoagülan ilaçların varlığını gösterebilir (Tablo 2) (3,7).

aPTZ reaktifleri, pıhtılaşma faktörü eksikliklerini tespit etmek, lupus antikoagülanlarını tahmin etmek ve heparin hassasiyetlerini değerlendirmek için değişen hassasiyetler sergiler. aPTZ kitlerindeki faktör hassasiyeti; kullanılan aPTZ kit reaktifi yanı sıra reaktif hassasiyetini belirlemede kullanılan faktör eksik plazma ve normal plazma havuzu (NPP)'na da bağlıdır. aPTZ reaktiflerinde bulunan fosfolipid ve yağ asidi bileşimi standardize değildir. Fosfolipidler, hayvan plasenta veya beyinden köken alabildiği gibi bitkisel kökenli de olabilmektedir. Bu nedenle aPTZ kitlerindeki faktör ve lupus antikoagülanı hassasiyeti farklılıklar gösterir (8). Çoğu aPTZ reaktifi, orta veya şiddetli hemofili hastalarında düşük sonuçlar üretse

de tüm reaktifler hafif hemofiliyi doğru şekilde tanımlama yeteneğine sahip değildir. Bu nedenle, hafiften şiddetliye kadar tüm hemofili türlerini tespit edebilen bir aPTZ reaktifinin seçilmesi, doğru tanı için çok önemlidir (7).

FAKTÖR ANALİZLERİ

Faktör analizleri hemofilinin ciddiyetini belirlemek, ameliyattan önce pıhtılaşma durumunu değerlendirmek ve profilaktik tedaviyi optimize etmek için gereklidir. Tedavi sırasında faktör aktivitesinde bir azalma, inhibitörlerin gelişimini gösterebilir. Faktör analizleri tek aşamalı, iki aşamalı veya kromojenik yöntemler kullanılarak yapılabilir (7).

Doğru faktör aktivitesi sonuçları elde etmek için numunelerin uygun şekilde alınması, santrifüj edilmesi ve saklanması çok önemlidir. Numuneler %3,2 trisodyum sitrat dihidrat'lı tüpe alınmalı ve 1500 g'de en az 15 dakika oda ısısında santrifüj edilmelidir.

Örnekler, alım saatinden sonraki 4 saat içinde analiz edilmelidir. Santrifüj edilen veya tam kan halinde bulunan örneklerin 2-8 °C'de bekletilmesi önerilmez. Bekletildiği durumda FVII aktivasyonu ile FVIII ve von Willebrand faktör (vWf) aktivitesinde azalma görülür. Bu 4 saat süre içinde analiz edilemeyecek örnekler plazması ayrılarak -20°C'de 2 hafta veya -70°C'de 1 yıl dondurularak saklanmalıdır. Hemolizli örneklerden kaçınılmalıdır. Hemoliz durumunda açığa çıkan hücre içi maddeler ve fosfolipid gibi membran molekülleri faktör aktivasyonuna sebep olabilmektedir (9).

%3,2 trisodyum sitrat dihidrat'lı tüpe kan alımının hedef düzeye kıyasla en az %80 dolulukta olması gerekmektedir (2). İnflamasyon, stres, ağır egzersiz ve hamilelikte FVIII ve vWf düzeyleri artabileceği için tanı ve tedavi izleminde dikkatli olunmalıdır (10,11). Çalışmaya başlamadan önce dondurulmuş örnekler 4-5 dakika 37 °C su banyosunda bekletilerek hızlı bir şekilde çözülmelidir (2).

Tablo 1. Kanamada Tarama Testleri ve Yorumlanması

Table 1. Bleeding Screening Tests and Their Interpretations.

	PZ	aPTZ	Trombosit sayısı
Normal	Normal	Normal	Normal
Hemofili	Normal	Uzamış	Normal
vWH	Normal	Normal/ uzamış	Normal/ azalmış
Trombosit defekti	Normal	Normal	Normal/azalmış

PZ, protrombin zamanı; aPTZ, aktive kısmi tromboplastin zamanı; vWH, von Willebrand hastalığı

Tablo 2. İzole Uzamış aPTZ Sebepleri ve Eşlik Eden Bulgular

Table 2. Causes of Isolated Prolonged aPTT and Associated Findings.

İzole Uzamış aPTZ Sebepleri	Klinik/Eşlik Eden Bulgu
Hemofili A (FVIII eksikliği)	Kanamaya hikayesi var
Hemofili B (FIX eksikliği)	Kanamaya hikayesi var
F XI eksikliği	Kanamaya hikayesi var
F XII eksikliği	Kanamaya yok
Prekallikrein eksikliği	Kanamaya yok
Yüksek molekül ağırlıklı kininojen eksikliği	Kanamaya yok
Spesifik inhibitör (FVIII, IX, XI, XII)	Yeni başlayan kanama hikayesi
Lupus antikoagülanı varlığı	Tromboz
Antikoagülan kullanımı (Heparin, düşük molekül ağırlıklı Heparin ..)	İlaç kullanım hikayesi

aPTZ, aktive kısmi tromboplastin zamanı

FVIII aktivitesi azalmış tüm hastalarda von Willebrand hastalığı (vWh) dışlanmalıdır. Tip 2N vWh'da FVIII aktivitesi düşüklüğü yanında normal vWf antijen (vWf:Ag) düzeyi olması nedeniyle hastaların hafif hemofili A ile karıştırılmaması için ilk tanıda laboratuvar değerlendirilmesinin geniş ve tam olarak yapılması gereklidir (2).

1. Tek Aşamalı Yöntem (One Stage Assay)

Temel olarak aPTZ'ye dayanan tek aşamalı pıhtı bazlı test, klinik laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemdir. Tek aşamalı analizler, değerlendirilen spesifik faktöre bağlı olarak aPTZ veya PZ'ye dayanabilir. Bu testte, hasta plazmasının tampon çözelti ile dilüsyonları (1:10, 1:20, 1:40) hazırlanır. Her dilüsyon, faktör eksik plazma kit reaktifi ile 1:1 oranında karıştırılır ve ardından pıhtılaşma süreci başlatılır. Faktör eksik plazma kit reaktifinde yalnızca ölçülecek spesifik faktör bulunmaz ancak diğer tüm pıhtılaşma faktörleri yaklaşık 100 IU/dL kadar bulunur. Böylece sonuçlar sadece hasta plazmasındaki ölçülmek istenen faktörün düzeyine bağlı olur. Hastanın dilüsyonlu plazmalarından elde edilen sonuçların kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılmasıyla test sonucu elde edilir. En az 3 dilüsyon yapılması ve eğrinin kalibrasyon eğrisine paralel olması istenir. Eğer hasta sonuçlarındaki eğri kalibrasyon eğrisine paralel değil ise hasta örneğinde inhibitör olabileceği düşünülmeli ve ek dilüsyonlar ile eğri paralel hale getirilmeye çalışılmalıdır. Elde edilen sonuç dilüsyon faktörü ile çarpılarak hasta sonucu elde edilir (12).

Tek aşamalı aPTZ'ye dayanan faktör testlerinde ölçüm, lupus antikoagülanı, antikoagülan kullanımı ve spesifik faktör inhibitörlerin varlığı ile interferans gösterebilir. aPTZ temelli tek aşamalı analizler, intrinsek faktörlerin aktivitesini değerlendirmek için kullanılırken, PZ temelli analizler öncelikle FVII'yi ve ortak pıhtılaşma yolunda yer alan faktörleri değerlendirmek için kullanılır (12).

Faktör eksik ticari plazmalar konjenital eksikliği bulunan hastalardan ya da sağlıklı

hasta plazmalarının immunodepresyonu veya kimyasal ön işlem ile elde edilebilir (8). Faktör FVIII eksik plazma kit reaktiflerinin <1 IU/dL FVIII içermesi ve diğer tüm faktörleri normal düzeyde içermesi zorunlu kılınmıştır. Faktör IX ölçümleri için de aynı geçerlidir (2).

2. İki Aşamalı Yöntem (Two Stage Assay)

İki aşamalı analiz, faktör aktivitesini değerlendirmek için kullanılan diğer bir yöntemdir. İlk aşamada, FVIII ölçümü için hastanın plazmasına kalsiyum, fosfolipid, saflaştırılmış aktive FIX (FIXa) ve FX eklenerek aktive faktör X (FXa) oluşması sağlanır. İkinci aşamada ise, bu karışıma NPP eklenir ve ilk aşamada oluşan FXa'dan fibrin oluşturulur. Pıhtılaşma zamanı ilk reaksiyonda oluşan FXa miktarına bağlıdır. İki aşamalı test, heparin veya doğrudan trombin inhibitör ilaç kullanımından tek aşamalı teste göre daha az etkilenir. Ancak FXa inhibitörlerinin varlığı sonuçları etkileyebilir (12).

3. Kromojenik Yöntem

İki aşamalı ölçümle benzer prensipte çalışır. İlk aşamada, FVIII ölçümü için hastanın plazmasına kalsiyum, fosfolipid, saflaştırılmış FIXa ve FX eklenerek FXa oluşması sağlanır. İkinci aşamada ise FXa'dan enzimatik olarak salınan ve kromojenik bir substrat olan p-nitroaniline'nin absorbansı 405 nm'de ölçülür. İkinci aşamaya, kromojenik substratın azalmasını engellemek için trombin inhibitörü sıklıkla eklenir (13).

Kromojenik yöntem, tek aşamalı yöntemden sonra FVIII analizlerinde en sık kullanılan ikinci yöntemdir. FIX ölçümleri için de kromojenik yöntem kullanılmaya başlanmıştır (14-18). Kihlberg ve ark. kromojenik yöntemle ölçülen FIX sonuçlarının tek aşamalı yöntemle göre klinik ile daha uyumlu olduğunu göstermişlerdir (17). Kromojenik FVIII analizleri genellikle tek aşamalı pıhtı temelli FVIII aktivite analizlerinden daha pahalıdır (19). İki aşamalı ve kromojenik yöntemin tek aşamalı yöntemle göre lupus antikoagülanlarına daha az duyarlı olduğu bazı araştırmalarda gösterilmiştir (12).

Genetik olarak doğrulanmış bazı hafif hemofili A olgularında tanı için tek aşamalı test kullanıldığında FVIII aktivitesinin normal seviyede, ancak kromojenik veya iki aşamalı yöntem kullanıldığında ise azalmış düzeyde olduğu gösterilmiştir (20-24). Bazı çalışmalarda ise bu durumun tam tersi bulunmuştur. (Tablo 3) (25,26).

Dünya Hemofili Federasyonu (WFH), hemofili A'nın tüm hastalık tiplerinin saptanması için ilk tanıda tek aşamalı ve kromojenik yöntemin beraber kullanılması gerektiğini bildirmiştir. Testlerden biri normal FVIII aktivitesi gösterse dahi diğer yöntemde de ölçüm yapılmalıdır. WFH, hemofili B'nin ilk tanı aşamasında ise tek aşamalı yöntemin kullanılmasını önerir. Kromojenik yöntemin kullanılması için ise henüz yeterli çalışma bulunmadığı belirtilmiştir. Tek aşamalı veya kromojenik yöntem ile FVIII veya FIX çalışıldığında kalibrasyon için kullanılan referans materyal veya standart plazmaların Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartları tarafından izlenebilir olması gerekmektedir. Referans plazma olarak NPP kullanıldığında hasta sonuçları yüzde olarak verilebilmektedir. Ancak bu durum WHO standartları

uygun olmaması sebebiyle önerilmez. WFH, FVIII ve FIX sonuçlarının IU/dL veya IU/mL olarak verilmesini tavsiye eder (2).

İNHİBİTÖRLER

Pıhtılaşma faktörü inhibitörleri faktör etkisini etkisiz hale getiren (Tip 1) ve etkisiz hale getirmeyen (Tip 2) olarak 2 tipte görülür. Etkisiz hale getiren antikolar faktör inaktivasyonu ile sonuçlanır. Etkisiz hale getirmeyen antikolar ise fonksiyonu olmayan epitoplara hedef alırlar. Her iki tipte de alloantikör ve otoantikörler bulunabilir. Alloantikörler faktör aktivitesinde tam bir inhibisyon yaratabilir. Otoantikörler ise EHA, hamilelik ve yaşlılık gibi durumlarda görülebilen sınırlı faktör inhibisyonuna sebep olan antikörlerdir (8).

Hemofilideki inhibitörler, infüze edilen ekzojen pıhtılaşma faktörü konsantrelerine karşı gelişen FVIII veya FIX' u nötralize eden IgG tipinde alloantikörlerdir. Pıhtılaşma faktörü konsantreleri replasman tedavisine yanıt veren ancak artık yanıt alınamayan her hemofili hastasında yeni bir inhibitörün varlığından şüphelenilmelidir (2)

Tablo 3. Faktör VIII Aktivitesinin Ölçümünde Tek Aşamalı Yöntem ile Kromojenik Yöntemin Karşılaştırılması
Table 3. Comparison of One-Stage Method and Chromogenic Method for Measuring Factor VIII Activity.

	Tek Aşamalı Yöntem	Kromojenik Yöntem
Avantajları	<ol style="list-style-type: none">1. Basit, hızlı ve ucuz2. Klinik izlem için en yaygın kullanılan yöntem	<ol style="list-style-type: none">1. Ölçümde FVIII aktivasyonu olmaz2. FVIII eksik plazma gerekli değildir3. Tüm FVIII düzeylerinin ölçümü için uygundur4. LA'ya karşı duyarlı5. Laboratuvarlar arası değişkenlik daha az
Sınırlılıkları	<ol style="list-style-type: none">1. Faktör aktivasyonuna duyarlı2. FVIII eksik plazma gerekli3. Yüksek Laboratuvarlar arası değişkenlik4. LA, heparin, direkt oral antikoagülan ilaçlarına duyarlı5. Bazı hafif hemofili A fenotiplerinde FVIII aktivitesi yüksek ölçülebilir	<ol style="list-style-type: none">1. Tek aşamalı yöntem'den daha pahalı2. Tek aşamalı yöntem kadar yaygın kullanılmaz3. Teknik olarak daha karışık4. Direkt oral antikoagülan ilaçlarına duyarlı5. Bazı hafif hemofili A fenotiplerinde FVIII aktivitesi yüksek ölçülebilir

FVIII, Faktör VIII; LA, Lupus Antikoagulanı

Orta veya hafif hemofili hastalarına göre şiddetli hemofili hastalarında ve hemofili B hastalarına kıyasla hemofili A hastalarında inhibitörlere daha sık rastlanır. Siyah ve Hispanik etnik kökene sahip hemofili hastalarında inhibitörün prevalansı daha yüksek gözlenmektedir. Şiddetli hemofili A hastalarında, yirmi adet FVIII replasman tedavisi sonrası %30 oranda FVIII'e karşı alloimmün inhibitörler gelişir (1,4).

İnhibitörlü hemofili hastalarında, inhibitörü olmayanlara göre kanamanın kontrol edilmesi daha büyük bir zorluktur. Bunun yanında inhibitörü olan hemofili hastalarında kas-iskelet sistemi komplikasyonları, ağrı ve yaşam kalitesinin düşmesi gibi sorunlar da görülmektedir. (2).

Lupus antikoagülanı (LA) gibi nonspesifik inhibitörler in vitro fosfolipid bağımlı faktör testlerinde interferansa sebep olabilir. Bu antikolar protein ve fosfolipid komplekslerine karşı oluşur ve pıhtılaşma faktörlerini inhibe etmezler. Antikoagulanlar da nonspesifik inhibitör şeklinde tanımlanabilirler (8).

Karışım (Mixing) Çalışmaları

Uzamış aPTZ sonucunun sebeplerini araştırmadan önce örneğin heparin ile kontaminasyonu araştırılmalıdır. Hastada trombolitik ajan, vitamin K antagonisti ile trombin inhibitörü kullanımı sorgulanmalıdır. Ayrıca örnek içeriği kontrol edilmeli pıhtı, hemoliz, ikter, lipemi varlığına bakılmalıdır. Tüp doluluk miktarı kontrol edilmeli ve hematokrit düzeyi >%55 olan örneklerde tüpteki sitrat miktarı hesaplanmalı ve bu sitrat miktarıyla alınmış yeni örnek ile aPTZ çalışılmalıdır (6).

Altta yatan nedeni belirlemek için, uzamış aPTZ sergileyen numuneler üzerinde bir karışım çalışması yapılmalıdır. Bu çalışma, hastanın plazmasının 1:1 hacim/hacim oranında NPP ile karıştırılmasını içerir. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) kurallarına göre NPP'ler en az 20 sağlıklı kişiden hazırlanmalı veya ticari bir kuruluştan temin edilmelidir. NPP, tüm faktörleri yaklaşık %100 oranında içermeli, aPTZ

sonucu referans ortalamasına yakın ve taze dondurulmuş olmalıdır (6).

Karışım işlemi sonrasında aPTZ yeniden ölçüldüğünde, sonuç referans aralığına yaklaşır ise zamana bağımlı olarak etki eden sıklıkla FVIII inhibitörleri ve LA'ları (%15'i zamana bağımlı) atlamamak için yeni hazırlanacak numuneler 37° C'de 1-2 saat süreyle inkübe edilmelidir. Bu işlem, Hasta-NPP karışımı (1:1), hasta plazması ve NPP olmak üzere 3 örnek şeklinde hazırlanır ve kapakları kapalı bir şekilde 37 °C'de 1-2 saat inkübe edilir. İnkübasyon periyodu sonrası inkübe edilmiş NPP ile inkübe edilmiş hasta plazması 1:1 oranında karıştırılarak yeni bir karışım elde edilir. Bu kontrol tüpü sayesinde inkübasyon periyodu süresinde gelişebilecek FV ve FVIII kaybı ekarte edilmiş olur. İnkübe Hasta-NPP karışımı ile yeni kontrol karışımında aPTZ ölçülür. Eğer inkübe karışım örneği ile kontrol karışım örneği aPTZ sonuçları eşit ve aPTZ referans aralığına yaklaşır ise faktör eksikliği düşünülür. Eğer inkübasyonlu karışım aPTZ sonucu kontrol karışım örneğinden uzun ise zaman bağımlı inhibitör varlığından şüphelenilmelidir. Hastanın klinik hikayesinin bilinmesi LA veya spesifik inhibitörlerin taranması gibi daha ileri tetkikler için yol gösterici olacaktır (6).

Karışım testlerinin yorumlanmasında Rosner indeksi ve Yüzde Düzeltme formülü de kullanılabilir (27,28). (Şekil 1). Ayrıca inkübasyonlu karışım tüpü aPTZ sonucu ile kontrol tüpü aPTZ arasındaki fark %10'dan fazla ise zamana bağımlı inhibitör pozitif lehine değerlendirilebilir (12).

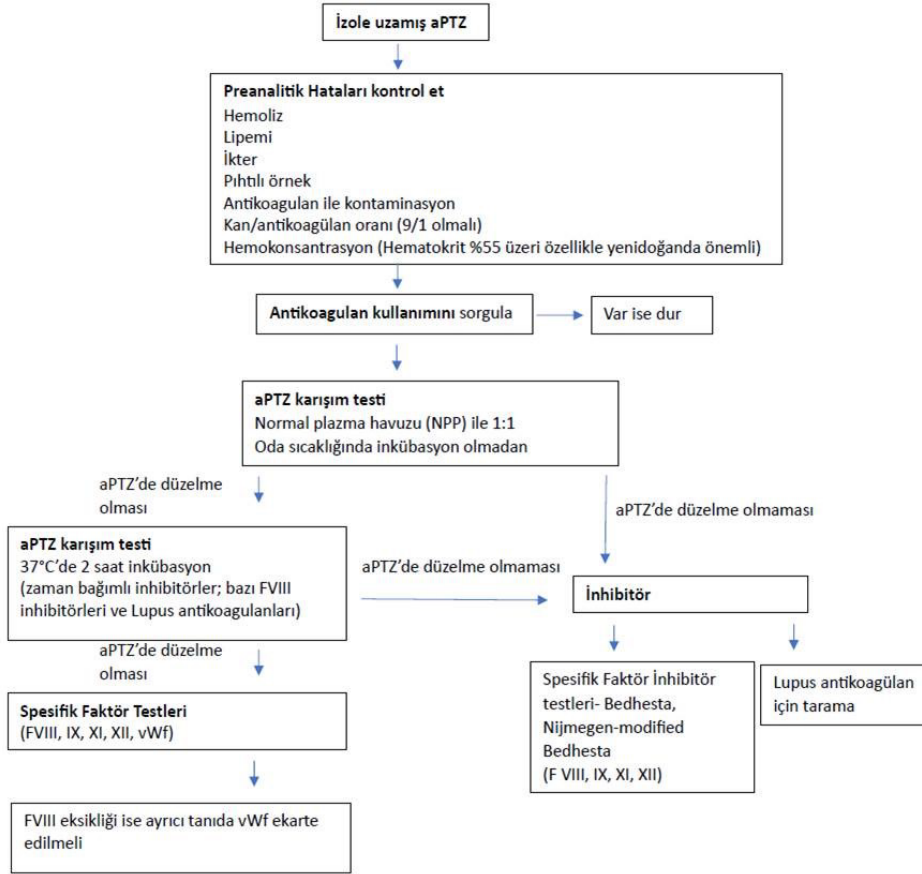
Bazı çalışmalar, 4:1 (hasta plazması: NPP) karışımındaki yüzde düzelmenin, antikoagülan ve faktör eksikliklerini tanımlamak için 1:1 karışıma göre daha iyi duyarlılık ve özgüllük sağladığını göstermiştir (28).

Spesifik faktör inhibitör testleri

Spesifik faktör inhibitörlerin tespiti ve miktarının belirlenmesi, ELISA gibi antijen-antikör analizleri veya Nijmegen ve Bedhesda analizleri gibi fonksiyonel ve pıhtılaşma temelli yöntemler kullanılarak gerçekleştirile-

bilir. İnhibitör seviyeleri Bethesda birimleri (BU) cinsinden ifade edilir; bir BU, 37°C'de 2 saatlik inkübasyonun ardından plazmadaki FVIII aktivitesinin %50'sini nötralize etmek

için gerekli olan FVIII inhibitörünün miktarını temsil eder. Pozitif sonuç, FVIII için >0.6 BU, FIX için ise >0.3 BU'tir. İnhibitör testi için endikasyonlar Tablo 4'te belirtilmiştir.



Şekil 1. İzole uzamış aPTZ'de karışım testi algoritması
Figure 1. Mixing Test Algorithm in Isolated Prolonged aPTT.

Tablo 4. İnhibitör Testi için Endikasyonlar

Table 4. Indications for Inhibitor Test.

İnhibitör Testi İsteminde Endikasyonlar

Başlangıç faktör replasman tedavisi sonrası

Yoğun faktör replasman tedavisi sonrası; 5 günden fazla her gün tedavi alımı ...

Yeterli faktör replasman tedavisine rağmen tekrarlayan kanama veya eklem içi kanama

Faktör replasman tedavisine yanıt alınmaması

Faktör replasman tedavisi sonrası beklenenden daha düşük yarılanma ömrü

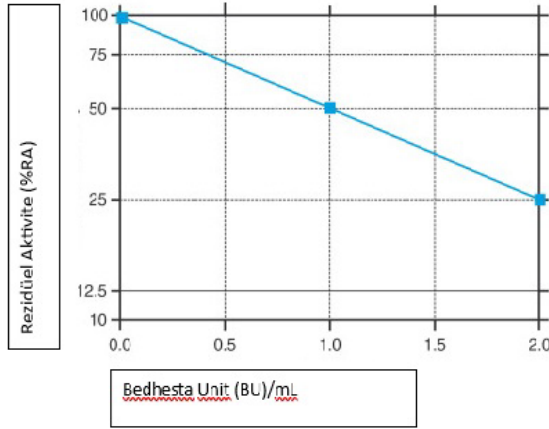
Faktör replasman tedavisi sonrası optimal olmayan klinik veya laboratuvar yanıt

Faktör replasman tedavisine ameliyat sonrası istenen yanıtın alınmaması

Ameliyat öncesi

Bedhesda Testi

Hasta plazması imidazol tamponlu NPP ile bir seri dilüe edilir. Kontrol olarak, imidazol tamponlu NPP, faktör eksik plazma ile 1:1 dilüe edilir. 2 saat 37°C inkübasyondan sonra (FIX için inkübasyona gerek yok) dilüe karışımlardaki faktör aktiviteleri ölçülür ve kontrol reaksiyonununkine göre (%) hesaplanır. Rezidüel aktivite (RA) hesabı =hasta karışımı faktör aktivitesi/kontrol karışımın faktör aktivitesi*100 olarak hesaplanır. Geçerli RA'ların tanımlanmış aralığı %75'ten %25'e kadar sınırlıdır, bu nedenle %50'ye en yakın RA seçilir (12,29). RA sonucunu Bedhesda birimiyle ilişkilendiren grafik inşa edilmiştir (Şekil 2). Bu grafikten BU/mL bulunur ve nihayi sonuç dilüsyon oranı ile çarpılarak elde edilir. Örneğin RA sonucu 60 olan bir örneğin grafikten 0.74 BU/mL olduğu bilinmektedir. Eğer RA değeri 1/8 dilüsyondan elde edildi ise sonuç $0,74*8=5.92$ BU/mL olarak verilecektir.



Şekil 2. Rezidüel Aktivite (RA) sonucu ile Bedhesda birimi ilişkisi

Figure 2. Relationship Between Residual Activity (RA) Result and Bethesda Unit.

İnhibitörlerin laboratuvar testlerindeki etkileri aynı değildir. Çoğu inhibitör (Tip 1) artan dilüsyonlarla rezidü FVIII aktivitesinde artış gösterirken bazı inhibitörler ise bu artışı göstermez (Tip 2). Tip 2 inhibitörlerinin kalibrasyon eğrisine paralelliği yoktur bu nedenle titre edilmesi zor olabilir. Bunun yanında bazı FVIII inhibitörleri, FVIII klirensini

arttırıp FVIII aktivitesini etkilemez. Bu nötrleştirici olmayan FVIII inhibitörleri karışım testleri ile tespit edilemez ve Bedhesda testlerinde saptanamaz. ELISA testleri bu tür nötrleştirici olmayan FVIII inhibitörlerini saptamada kullanılabilir (12).

Nijmegen Modifiye Bedhesda Testi

Nijmegen modifiye bedhesda testi, analitik tespit sınırına yakın sonucu olan örneklerde özgülüğü arttırır. Nijmegen modifikasyonları, dilüsyonda kullanılan imidazole tamponunun faktör eksik plazma ile değiştirilmesi ve NPP'nın 7.4'e tamponlanması ile gerçekleştirilir. Bu değişiklikler sayesinde FVIII'in inkübasyon sırasında kaybının azalması önlenmiş olur. NPP tamponlanması sayesinde pH artışı önlenir ve faktör eksik plazma ile dilüsyonların yapılması örneklerin içindeki diğer protein konsantrasyonlarının azalmasını önler (12). Böylece Nijmegen modifikasyonu, normal plazmayı tamponlayarak ve seyreltici tamponu FVIII'den yoksun plazmayla değiştirerek testin duyarlılığı ve özgülüğünü arttırmış olur (4). WFH Hemofili hastalarında inhibitör izleminde Nijmegen modifiye bedhesda testinin çalışmasını önerir (2).

SONUÇ

Farklı kanama bozuklukları çok benzer semptomlara sahip olabilir; bu nedenle, hastanın uygun tedaviyi almasını sağlamak için doğru tanı şarttır. Hemofili hastalarında doğru tanı ancak kapsamlı ve güvenilir laboratuvar hizmeti ve uzman desteği ile yapılabilir. Bu durum laboratuvarında uygun protokol ve prosedürleri takip ederek, pıhtılaşma laboratuvar testlerinde bilgi ve uzmanlık sahibi olunarak, doğru ekipman ve reaktiflerin kullanılması ve kalite güvencesi ile sağlanabilir. Hemofili hastalarında uygun tanı ve izleminin uygulanabilmesi laboratuvar uzmanı ile klinisyenin sürekli iletişim halinde olması ile gerçekleştirilebilir.

Conflict of Interest: None

KAYNAKLAR

1. Konkle BA, Nakaya Fletcher S. Hemophilia A. 2000 [Updated 2023 Jul 27]
2. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et. al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia panelists and co-authors. WFH guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*, 2020;26:1-158.
3. Santoro RC, Molinari AC, Leotta M, Martini T. Isolated prolongation of activated partial thromboplastin time: not just bleeding risk!. *Medicina*, 2023;59(6):1169.
4. Tiede A, Sonja W, Rüdiger E.S. "Laboratory diagnosis of acquired hemophilia A: limitations, consequences, and challenges." *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2014;40(07):803-811.
5. Cirik S, Erkurt MA, Kuku İ, Kaya E, Berber İ, Hidayet, E. et al. Concurrent congenital hemophilia B and acquired hemophilia A: a unique case report. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2024;35(5):282-285.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. "H47-A2 One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline." 2008.
7. Peyvandi F, Kenet G, Pekrul I, Pruthi RK, Ramge P, Spannagl M. Laboratory testing in hemophilia: impact of factor and non-factor replacement therapy on coagulation assays. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2020;18(6):1242-1255.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. "H48 Determination of Coagulation Factor Activities Using the One-Stage Clotting Assay, 2nd Edition. 2020.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. "H21 Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays", 6th Edition. 2008.
10. Venema CL, Schutgens REG, Fischer K. Pathophysiological mechanisms of endogenous FVIII release following strenuous exercise in non-severe haemophilia: a review. *Thromb Haemost*. 2017;117(12):2237-2242 .
11. Austin AW, Wirtz PH, Patterson SM, Stutz M, von Kanel R. Stress-induced alterations in coagulation: assessment of a new hemocoagulation correction technique. *Psychosom Med*. 2012;74(3):288-295.
12. Rifai N, eds. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics-E-Book: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics-E-Book. Elsevier Health Sciences, 2023.
13. Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. "A critical appraisal of one stage and chromogenic assays of factor VIII activity." *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2016;14(2):248-261.
14. Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, Shinohara S, Arai N, Kikuchi R et al. Performance evaluation of Revohem™ FVIII chromogenic and Revohem™ FIX chromogenic in the CS- 5100 autoanalyser. *Int J Lab Hematol*, 2019;41(5):664-670.
15. Horn C, Negrier C, Kalina U, Seifert W, Friedman KD. Performance of a recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with recombinant albumin in one-stage clotting assays. *J Thromb Haemost*, 2019;17(1):138-148.
16. Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring factor IX activity of nonacog beta pegol with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: a two-center study. *J Thromb Haemost*, 2016;14(7): 1428 - 1435 .
17. Kihlberg K, Strandberg K, Rosen S, Ljung R, Astermark J. Discrepancies between the one-stage clotting assay and the chromogenic assay in haemophilia B. *Haemophilia*, 2017;23(4):620-627.
18. Kershaw GW, Dissanayake K, Chen VM, Khoo TL. Evaluation of chromogenic factor IX assays by automated protocols. *Haemophilia*, 2018;24(3):492-501 .
19. Marlar RA, Strandberg K, Shima M, Adcock D M. Clinical utility and impact of the use of the chromogenic vs one-stage factor activity assays in haemophilia A and B. *European journal of haematology*, 2020;104(1):3-14.
20. Oldenburg J, Pavlova A. Discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Hamostaseologie*, 2010;30(4):207-211 .
21. Duncan EM, Rodgers SE, McRae SJ. Diagnostic testing for mild hemophilia A in patients with discrepant one-stage, two-stage, and chromogenic factor VIII: C assays. *Semin Thromb Hemost*, 2013;39(3):272-282.
22. Moser KA, Adcock Funk DM. Chromogenic factor VIII activity assay. *Am J Hematol*, 2014;89(7):781-784.
23. Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Muller J, Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thromb Haemost*, 2014;111(5):851-861.
24. Trossaert M, Lienhart A, Nougier C, Fretigny M, Sigaud M, Meunier S et al. Diagnosis and management challenges in patients with mild haemophilia A and discrepant FVIII measurements. *Haemophilia*. 2014;20(4):550-558.
25. Bowyer AE, Goodeve A, Liesner R, Mumford AD, Kitchen S, Makris M. p.Tyr365Cys change in factor VIII: haemophilia A, but not as we know it . *Br J Haematol*. 2011;154(5):618-625.
26. Lyall H, Hill M, Westby J, Grimley C, Dolan G. Tyr346→Cys mutation results in factor VIII: C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype—is this mild haemophilia A? *Haemophilia*, 2008;14(1):78-80.
27. Rosner, Esther, et al. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thrombosis and haemostasis*, 1987;57(02): 144-147.
28. Chang S, Veronica T, Doris S. A "percent correction" formula for evaluation of mixing studies. *American journal of clinical pathology*, 2002;117(1):62-73.
29. Müller J, Miesbach W, Prüller F, Siegemund T, Scholz U, Sachs U J. An update on laboratory diagnostics in haemophilia A and B. *Hämostaseologie*, 2022;42(04):248-260.