

Principy vyšetření hemostázy, preanalýza



Dělení testů dle principu

→ Koagulační

→ Fotometrické

→ Imunochemické

→ Turbidimetrické (jiné než koagulační, imunochemické)

→ Sledování času rozpuštění koagula

→ Sledování rozpustnosti koagula

→ Jiné

Dělení testů dle principu

→ Koagulační

↘ sledování času srážení

- manuálně (kývání, rotace)
- aktivovaná doba srážení

↘ sledování času vytvoření fibrinového vlákna

- manuálně (háčkování)
- koagulometr (poloautomat, automat)
 - mechanické
 - kuličkové (sledování změn pohybu kuličky)
 - háčkové
 - optické
 - nefelometrie (sledování rozptylu světla)
 - turbidimetrie (sledování průchodnosti světla)

Dělení testů dle principu

→ Fotometrické

↘ sledování změn zbarvení v důsledku štěpení specifického chromogenního substrátu - detekce absorbance (A)

- end point“ (A)
- kinetické ($\Delta A/\text{min}$)

↘ limitace -hemolytické a ikterické vzorky

→ Turbidimetrické (jiné než koagulační, imunochemické)

↘ sledování změn zakalení

- detekce změn transmise (propustnosti T)
- detekce změn absorbance

↘ limitace- chylózní vzorky

Chromogeny

→ Chromogenní substrát

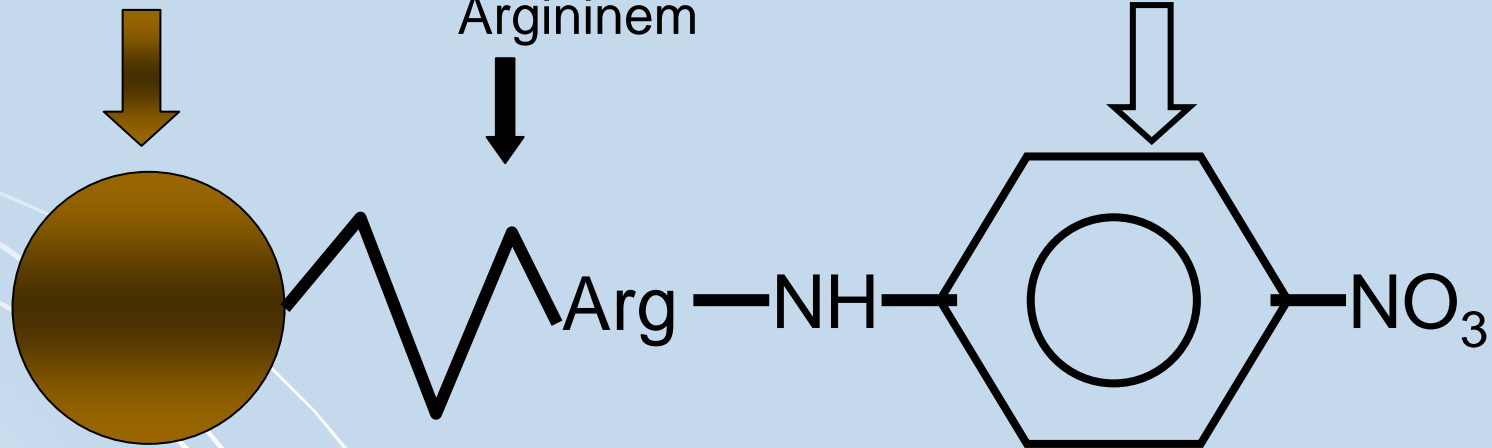
↘ uměle připravený

velkoobjemová
koncovka

aminokyselinové
raménko zakončené

bezbarvý
paranitroanilid

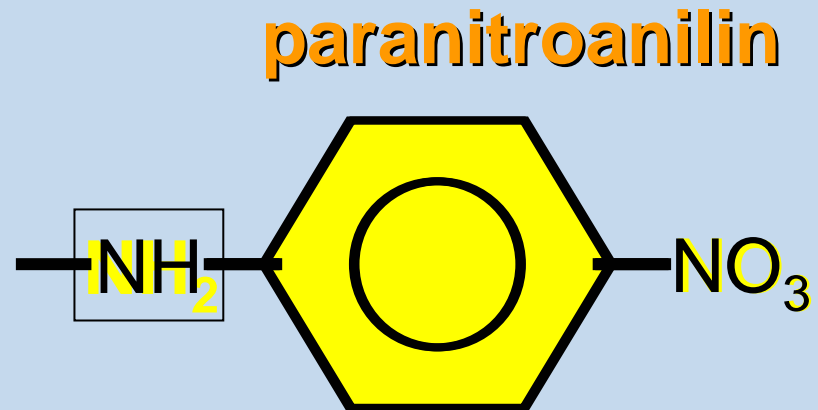
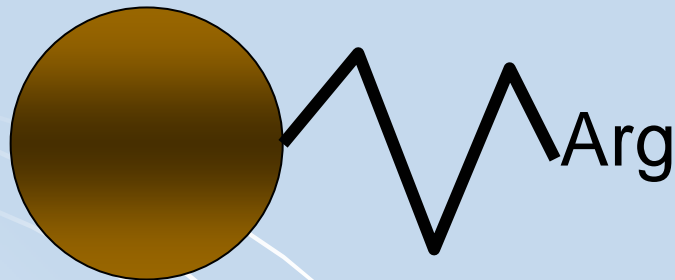
Argininem



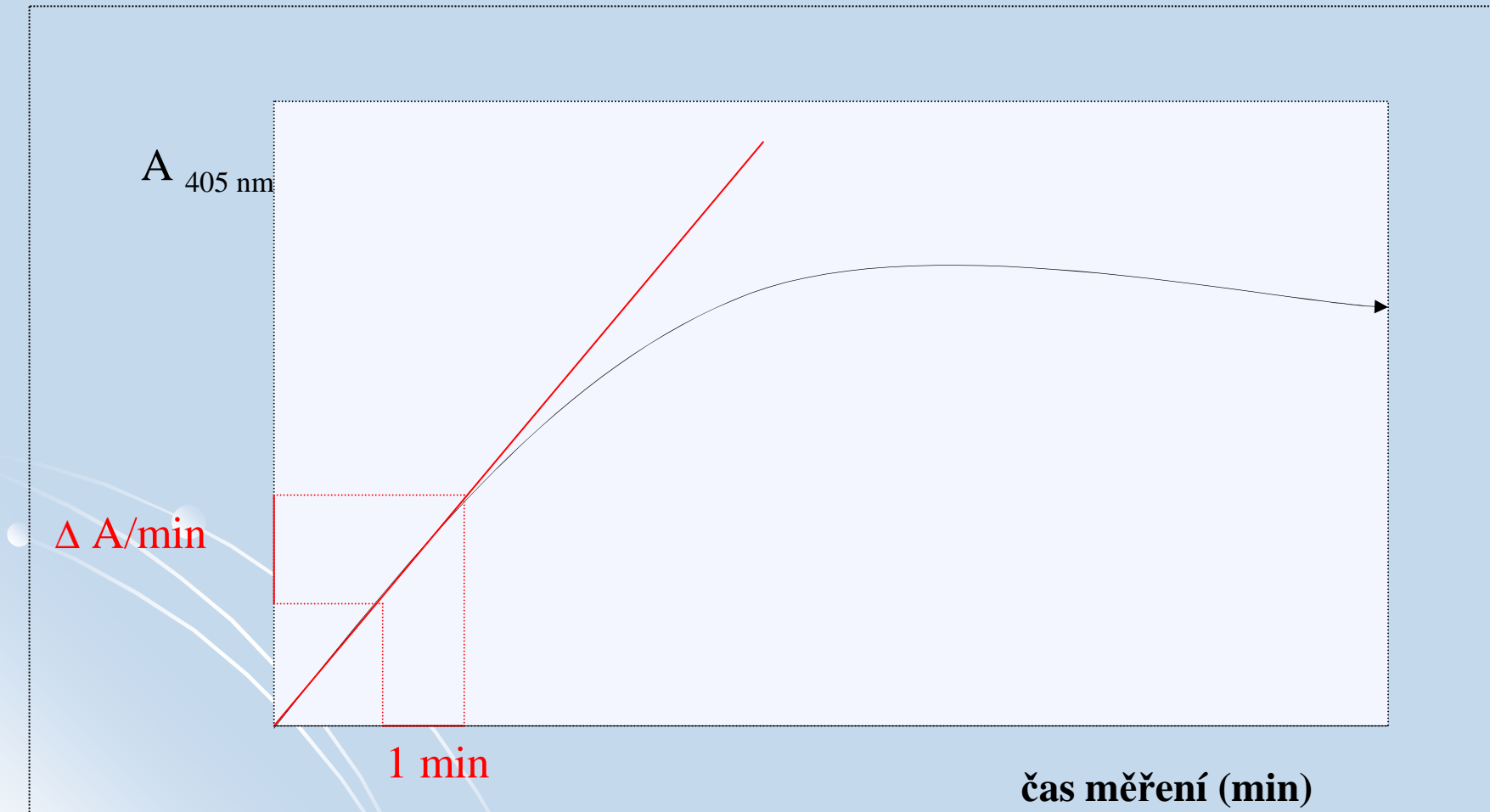
Chromogeny

→ Princip

- ↘ enzymy štěpí substrát – vzniká žluté zbarvení
- ↘ měříme při 405 nm



Kinetické měření



Dělení testů dle principu

→ Imunochemické

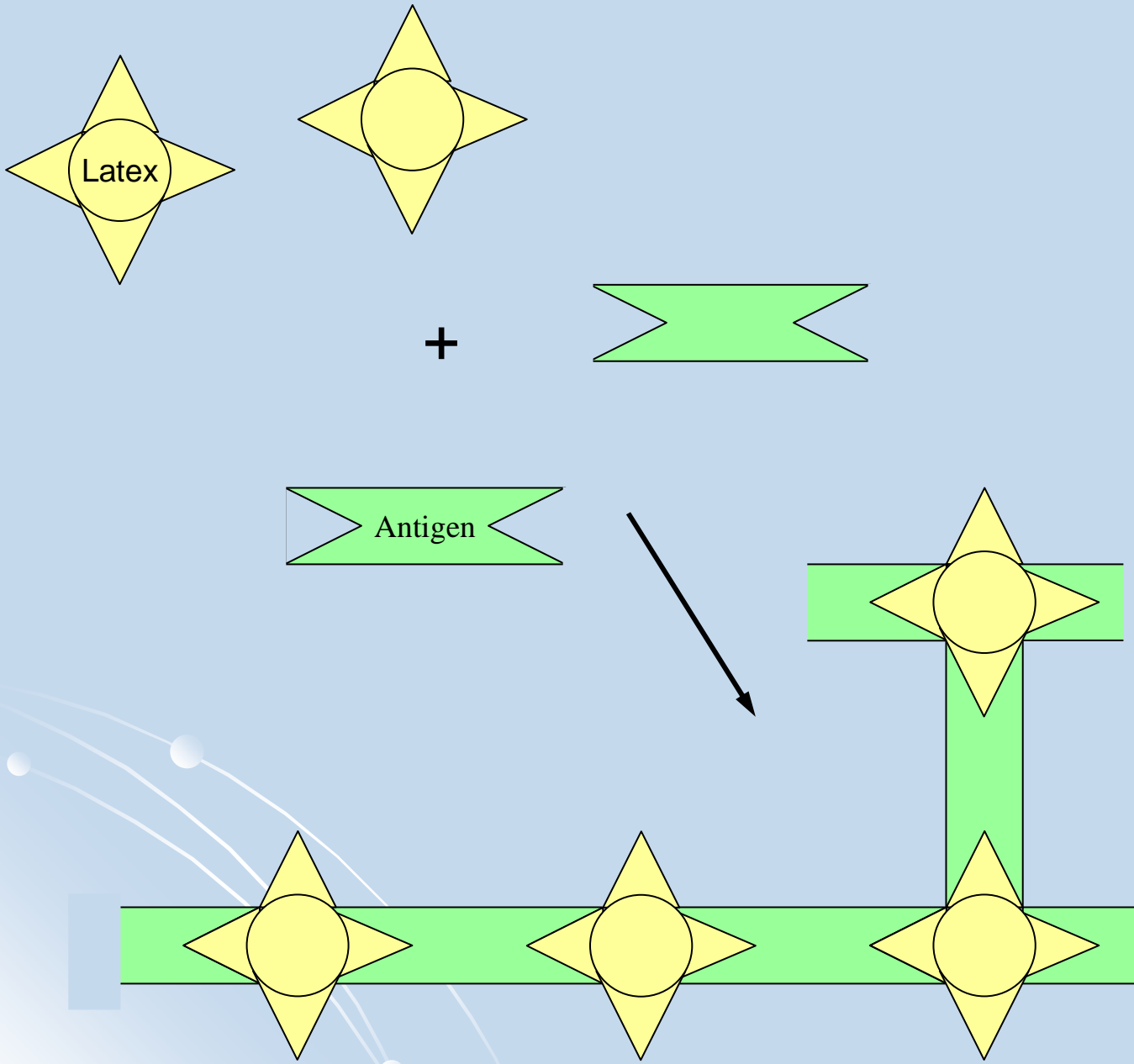
↘ sledování reakce antigenu s protilátkou

- aglutinace
- LIA
- ELISA
- EID



Aglutinační metody

- sledování aglutinace viditelných částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu
- odečítání makroskopicky
 - ↘ pozitivní(+, ++, +++)/negativní
 - ↘ semikvantitativní metody (udaná mez detekce)
- metody
 - ↘ latexaglutinační (např. FDP, D-Di)
 - ↘ hemaglutinační (např. FM)



Příklad vyšetření D-Dimerů

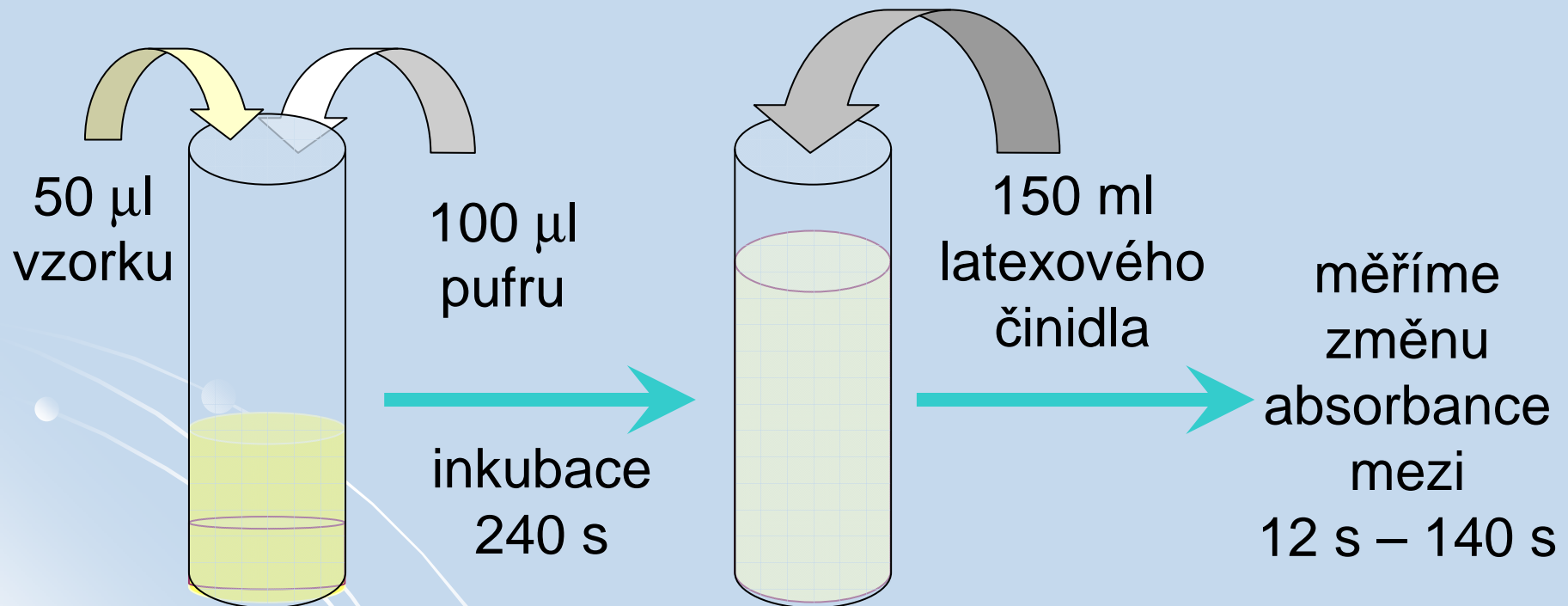
Mez detekce = 0,5 mg/l	neřaděný vzorek	vzorek řaděný 1:6	výsledek
aglutinace	-	-	< 0,5 mg/l
aglutinace	+	-	> 0,5 mg/l a < 3,0 mg/l
aglutinace	+	+	> 3,0 mg/l

Liquid immunoassay - LIA metody

- Sledování aglutinace mikrolatexových částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu
- Odečítání optickým systémem koagulometru
 - ↘ Změna zakalení ($\Delta A/\text{min}$)
- Kvantitativní metody (např. D-Di, vWF:Ag...)
- Limitace
 - ↘ Chylozita vzorku
 - ↘ Hookův jev (vysycení protilátky antigenem)

LIA testy

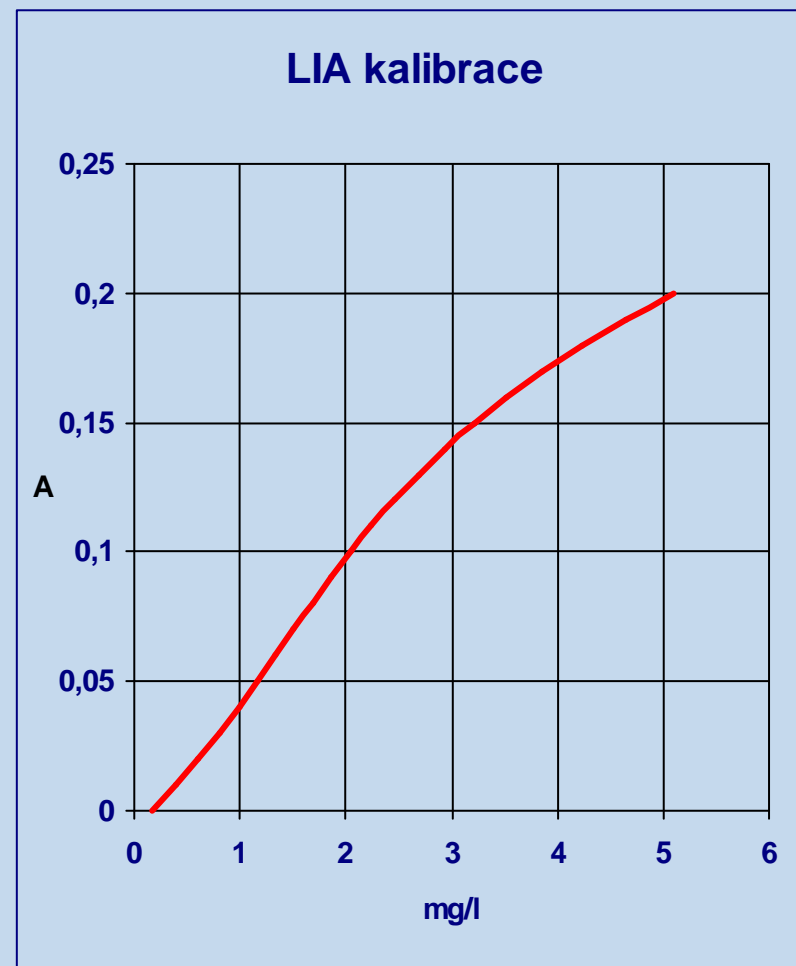
→ Provedení (STA© Liatest© D-Dimer)



LIA testy

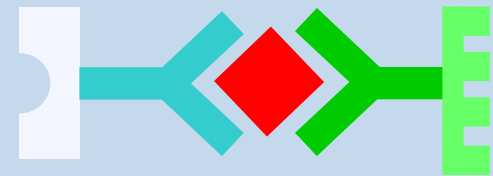
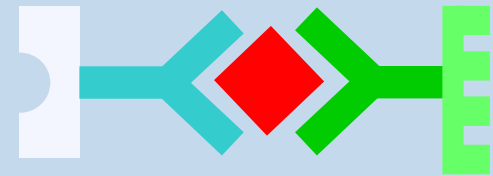
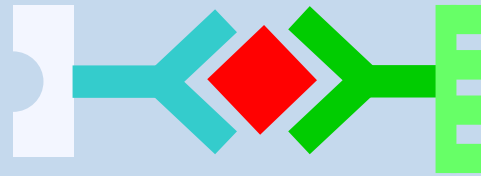
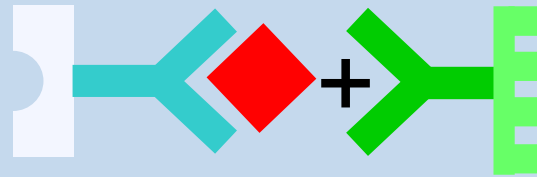
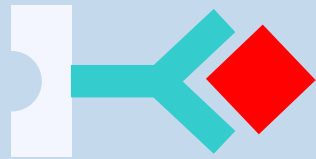
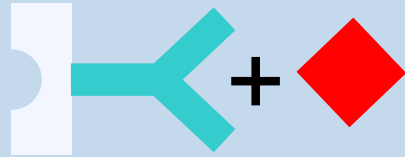
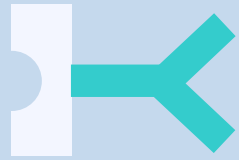
→ Kalibrace

- Sigmoidní
- Křivka 3. řádu
- Minimálně 5 bodů
- Platí pro celou šarži




ELISA metody

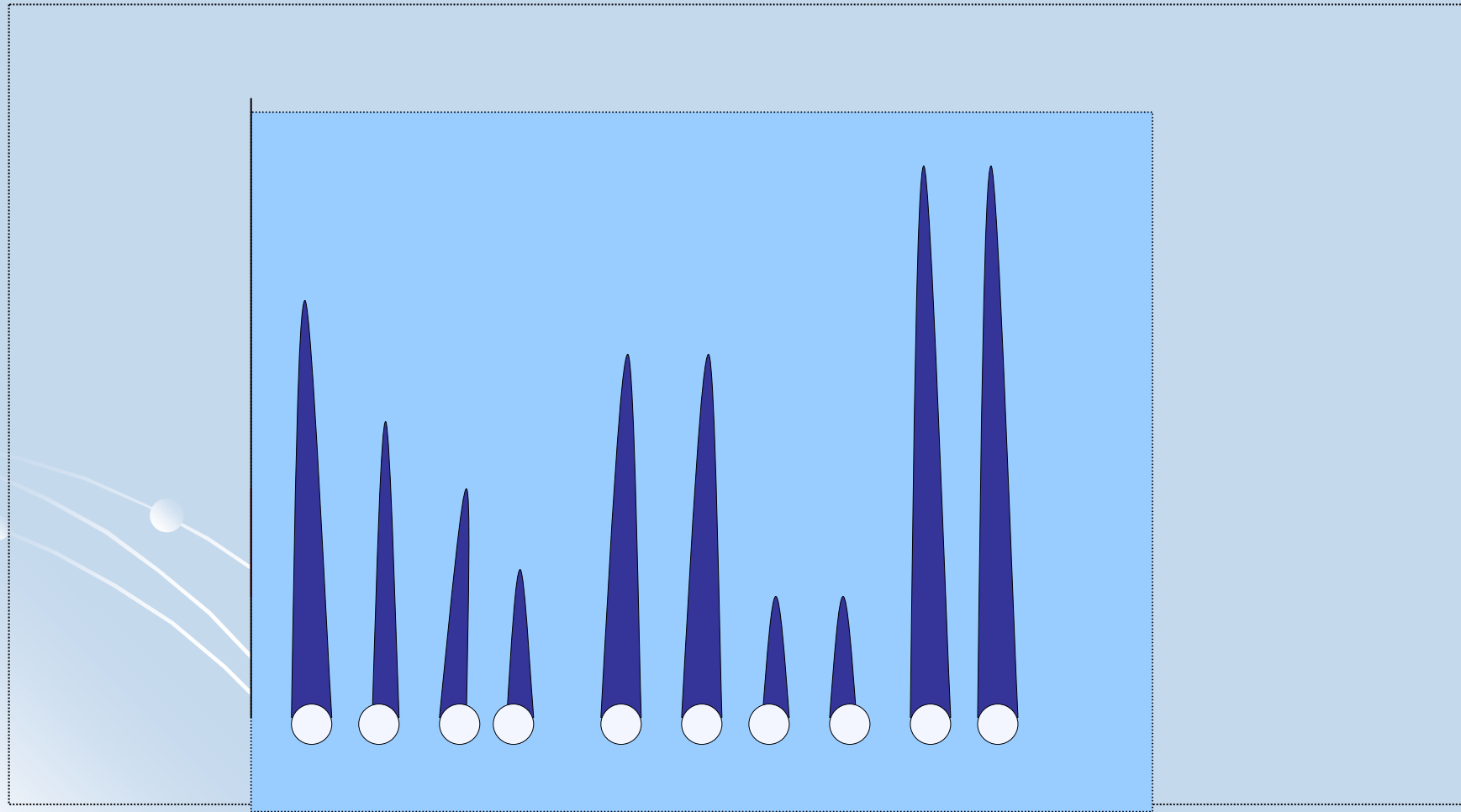
- ➔ Stanovení antigenu (Ag) pomocí protilátky (Ab) značené enzymem (AbE) - kvantitativní
 - inkubace vzorku v mikrotitračních jamkách s navázanou Ab proti vyš. Ag - vazba Ag na Ab
 - odsátí vzorku + promytí
 - inkubace AbE v jamkách - vazba na Ag
 - odsátí AbE a promytí
 - detekce enzymatické aktivity komplexu Ab-Ag - AbE po přidavku chromogenního substrátu (A)
 - přímá úměra: enzym. aktivita x množství Ag



Elektroimunodifúze - EID metody

- vyšetřovaný antigen reaguje s protilátkou přítomnou v agarózovém gelu při elektroforéze za vzniku precipitačního píku
 - délka píku je přímo úměrná koncentraci antigenu
 - kvantitativní metoda
- 

Princip EID



kalibrace

vzorky pacientů

Vyšetření plazmatických proteinů

→ Vyšetření funkční aktivity

- ↘ koagulační metody

- ↘ fotometrické metody

→ Vyšetření antigenu

- ↘ imunochemické metody

- ↘ umožňují odlišení defektů

 - kvalitativních

 - kvantitativních

Dělení testů

→ Testy globální

- ↘ postihují celý systém (i více)

→ Testy skupinové (screening)

- ↘ postihují určitou část koagulačního systému
- ↘ umožňují odlišení poruch vnitřní a vnější cesty a přeměny fibrinogenu

→ Testy speciální

- ↘ vyšetřují jednotlivé složky systémů

Správnost laboratorních výsledků

→ Faktory

- ↘ objektivní

- ↘ subjektivní

→ Faktory

- ↘ preanalytické

- ↘ analytické

- ↘ postanalytické

Preanalytické faktory

→ Příprava pacienta


→ Odběr vzorku

→ Transport vzorku

→ Zpracování vzorku

→ Skladování vzorku

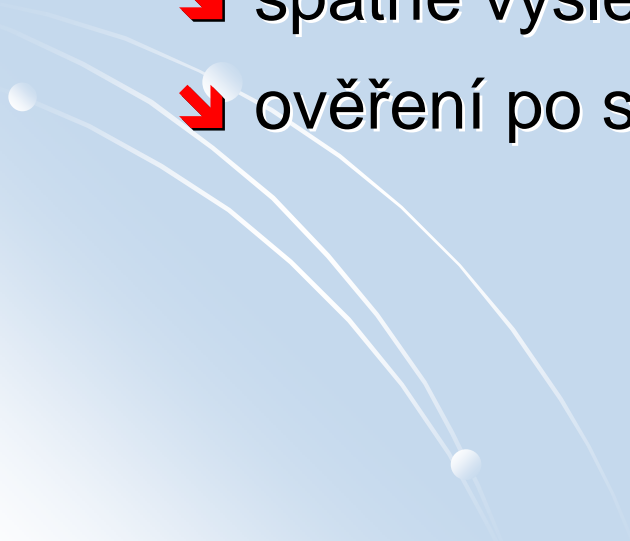
Příprava pacienta

- Odběr na lačno nebo po lehké snídani bez tuků
 - Dostatečný příjem tekutin
 - Uvedení času odběru
 - Uvedení léčby
 - Uvedení komplikace při odběru
- 

Odběr vzorku

- Minimální zatažení paže
- Do plastických nebo silikonovaných skleněných zkumavek
- První 2-3 ml nelze použít
- Antikoagulační roztok pro nesrážlivou krev - citrát sodný v ředění 1:10
- Šetrné promíchání krve s citrátem (5-10x)

Nedostatečné promíchání krve s citrátem

- Nebezpečí aktivace a srážení vzorku
 - Koncentrování citrátu u hladiny
 - ↘ automaty pipetují těsně pod hladinou naředěnou plazmu s nadbytkem citrátu
 - ↘ špatné výsledky
 - ↘ ověření po stažení plazmy a promíchání
- 

Antikoagulancia

→ Citrát sodný

↘ 0,109 mol/l (3,2 %) doporučeno

↘ 1,129 mol/l (3,8 %)

→ CTAD zkumavky

↘ brání aktivaci trombocytů

↘ doporučeno pro testy PAI-1, heparin, PF4...

Správný odběr vzorku

Vyřadit vzorky

→ Sražené

→ S chybným objemem krve (rozdíl 10%)

→ Hemolytické, ikterické a chylózní

↘ hemolytický a ikterický vzorek

● ovlivňuje výrazně fotometrická stanovení

↘ chylózní vzorek

● ovlivňuje výrazně koagulační stanovení na optických koagulometrech a imunochemická stanovení vyhodnocovaná opticky

Správný odběr vzorku

Množství krve

→ Méně

↘ prodloužení koagulačních časů

- APTT citlivé od 90 % objemu
- PT citlivé od 80 % objemu

→ Více

↘ zkrácení koagulačních časů??

Správný odběr vzorku

→ Hematokrit

→ < 30 % nebo >60 % upravit objem citrátu

$$\text{ml citrátu} = \frac{100 - \text{hematokrit}}{595 - \text{hematokrit}} \times \text{ml plné krve}$$

Transport vzorku

→ Čas

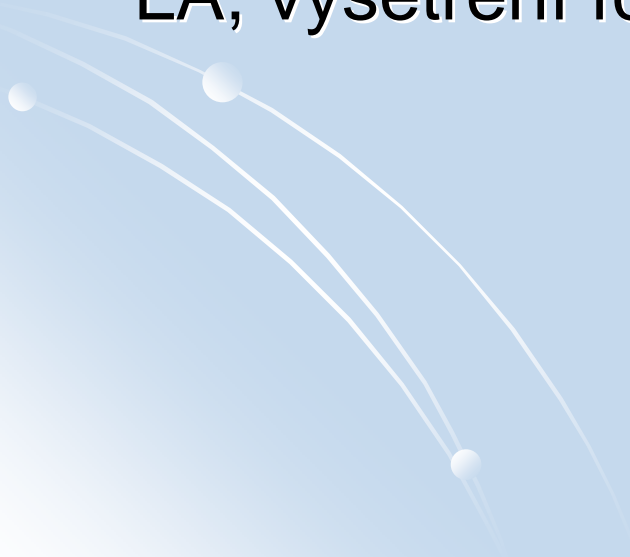
→ Teplota

→ Mechanické vlivy (potrubní pošta)



Zpracování vzorku

- Odstranění krevních buněk centrifugací
- Stažení plazmy
- Většina testů do 1 -2 hod po odběru
- Výjimka EGT, EF (15 - 30 min), heparin, PAI-1, LA, vyšetření fcí trombocytů



Vyšetřovaný materiál

→ Plazma

↘ plazma bohatá na trombocyty

- centrifugace 10 minut 150 - 250 g, sedimentace

↘ plazma chudá na trombocyty

- centrifugace 15 minut 2500 g

↘ bezdestičková plazma

- dvojnásobná centrifugace + filtrace

→ Plná krev

→ Sérum

Centrifugace

→ Výpočet otáček pro danou centrifugu

→ $g = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times N^2$

r = poloměr otáčení v cm, N = otáčky/min

Příklad:

$r = 15$ cm, 2500g 3860 otáček/min

Skladování vzorků

→ Laboratorní teplota 18 - 25 °C

↘ PT 8 hodin

↘ APTT 4 hodiny

↘ APTT (léčba heparinem) 2 hodiny

↘ jednotlivé faktory : 2 - 8 hod

→ Vyšší teplota ne

→ Uložení v lednici (aktivace FF VII a XII) ne

Zamrazování vzorků

- Plazma chudá na destičky/bezdestičková
- Objem > 500 μ l
- Zkumavka se zátkou
- Správná velikost zkumavky
- Zkumavka naplněná do 3/4
- Rychlé zamrazení (-70 $^{\circ}$ C, -196 $^{\circ}$ C)
- Sskladování zamrazených vzorků
 - ↘ krátkodobé -20 $^{\circ}$ C, dlouhodobé: - 70 $^{\circ}$ C

Rozmrazování vzorků

- Při 37 °C 15 minut
- Dobře promíchat
- Opakované zamrazení není možné



Analytické faktory

- Dodržování metodických postupů
- Správné pracovní návyky
- Správná funkce a kalibrace přístrojů
- Výběr diagnostických setů a reagensů
- Správná volba kalibračních a kontrolních materiálů
- Správně provedená kalibrace a kontroly kvality

Postanalytické faktory

- Rozmezí fyziologických hodnot
 - Terapeutické rozmezí
 - Vyjadřování výsledků
 - Vyhodnocení výsledků
 - Interpretace výsledků
- 