

# Speciální koagulační vyšetření I



# Koagulační faktory

## → Vyšetření funkční aktivity

↘ jednofázová metoda na principu APTT

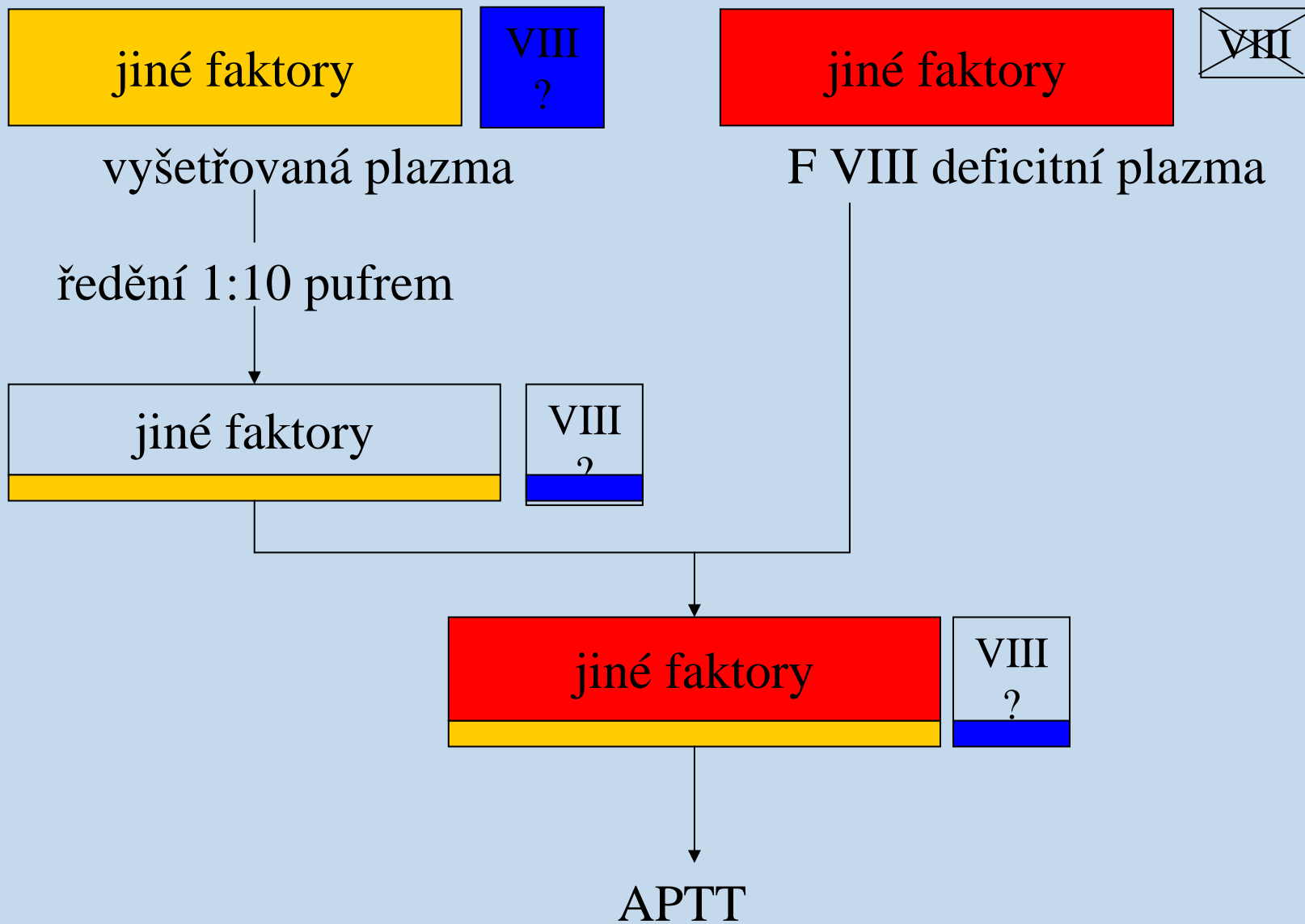
- FF VIII, IX, XI, XII, PK, HMWK

↘ jednofázová metoda na principu PT

- FF II, V, VII, X

## → Vyšetření antigenu

↘ EID, ELISA



koagulační čas závisí na aktivitě F VIII

# Vyšetření funkční aktivity koagulačních faktorů

## → Postup:

1 díl ředěné vyšetřované plazmy

1 díl neředěné deficitní plazmy

## → FF vnitřního systému

1 díl APTT reagensie, inkubace

1 díl  $\text{CaCl}_2$

## → FF vnějšího systému

inkubace, 2 díly  $\text{Ca}^{2+}$ -tromboplastinu

→ stanovení koagulačního času APTT/PT

→ odečtení % z kalibrační křivky

# Koagulační faktory - kalibrace

→ Kalibrační materiál

↳ komerční

→ Vyšetření

↳ různých ředění výchozí kalibrační plazmy s  
udanou hladinou FF: 100%, 50 %, 25 %, 12,5% ,  
(pro F VIII, IX 6,25 %, ...)

→ Kalibrace čtyř...více bodová

→ Závislost log/log

→ Klinický význam - zejména ↓ FF , ↑ F VIII

# Defekty faktorů

## → Vrozený

- hemofílie A, hemofílie B, defekt FF XII, XI, PK, HMWK, vWF, defekt FF II, V, VII, X

## → Získaný

- snížená syntéza
- zvýšená spotřeba
- zvýšené ztráty

# Snížení faktorů

→ Snížení - mimo kalibrovanou oblast ( $< 10\%$ )

→ Výchozí ředění vyšetřované plazmy 1 :10

→ opakování vyšetření s nižším ředěním plazmy (1 : 5)

→ odečtení a vydělení výsledku dilučním faktorem (:2)

# Zvýšení F VIII

- Zvýšení > 100 %
- Výchozí ředění vyšetřované plazmy 1 :10
  - ↘ opakovat vyšetření s vyšším ředěním plazmy 1 : 20
  - ↘ odečíst a vynásobit výsledek dilačním faktorem (x2)
- Pro F VIII > 200 %
  - ↘ opakovat s ředěním 1:40
  - ↘ odečíst a vynásobit 4x
- Pro F VIII > 400 %
  - ↘ opakovat s ředěním 1:80
  - ↘ odečíst a vynásobit 8x



# Korekční testy

- sledování korekce (zkrácení) APTT/PT po přidavku normální plazmy (**směs 1:1**)
- prodloužení se koriguje - defekt faktorů
- prodloužení se nekoriguje nebo jen částečně - přítomnost inhibitoru
  - specifického
  - nespecifického

# Identifikace specifického inhibitoru

Inhibitor namířený proti FF, časově závislý

Orientačně tzv. „**cirkulující antikoagulans**“

- Vyšetření APTT/PT u vzorků plazmy pacienta, normálu a směsí P+N (**1+4, 1+1, 4+1**) před a po 2 hodinové inkubaci při 37 °C

# Cirkulující antikoagulans

## vyhodnocení výsledků

→ Porovnání naměřených koagulačních časů jednotlivých směsí P + N s časy P a N

→ před inkubací

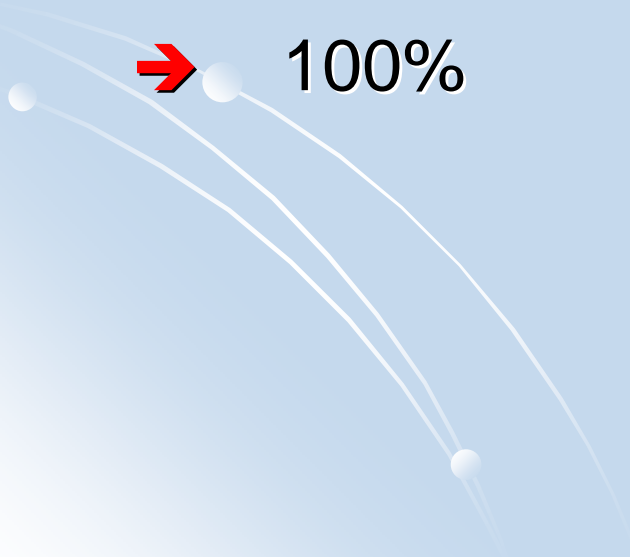
→ po inkubaci

→ Průkaz inhibitoru

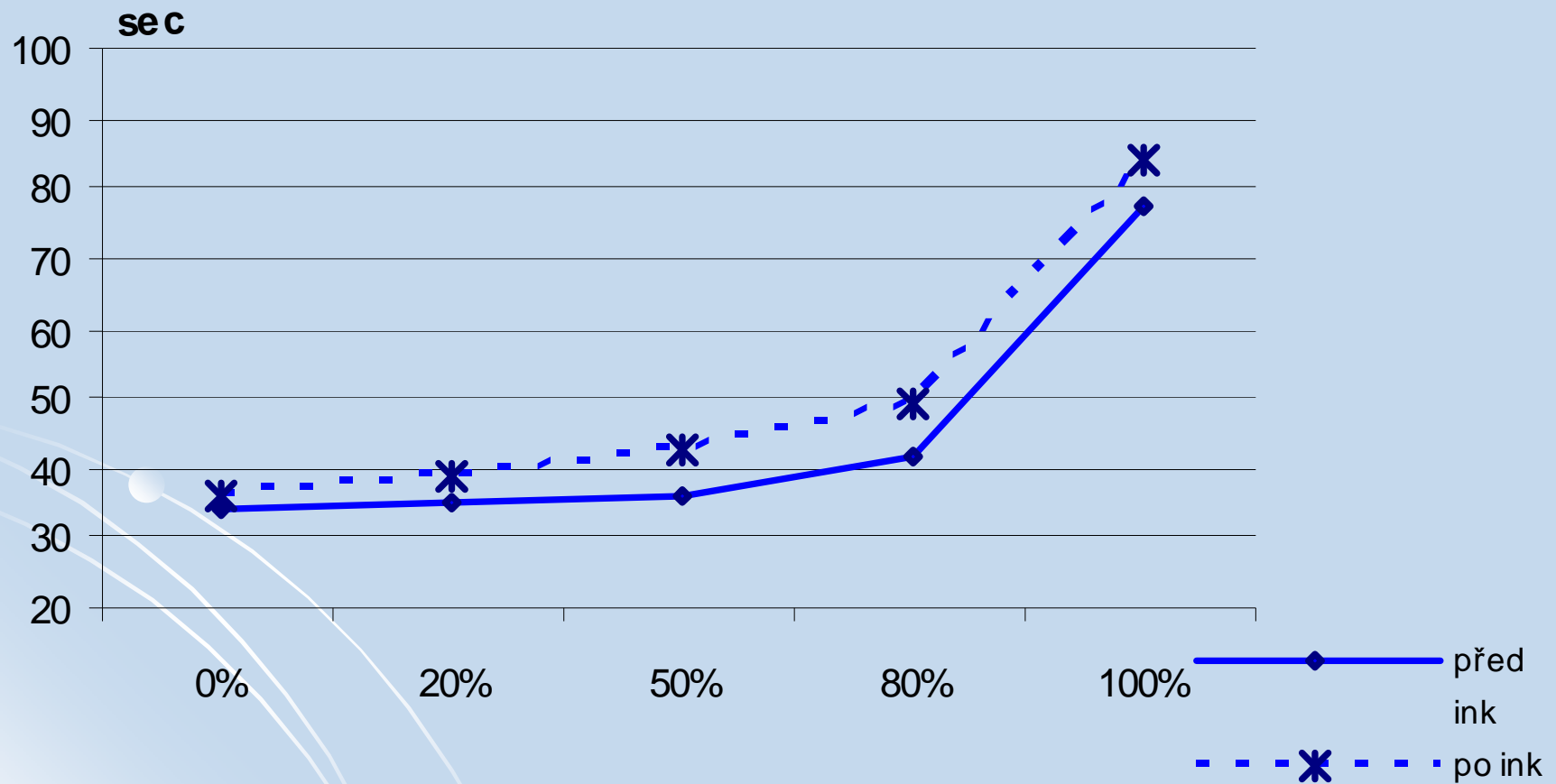
→ příměs 1/5 pac. plazmy výrazně prodlužuje čas normálu

→ příměs 1/5 norm. plazmy nezpůsobí korekci časů plasmy pacienta

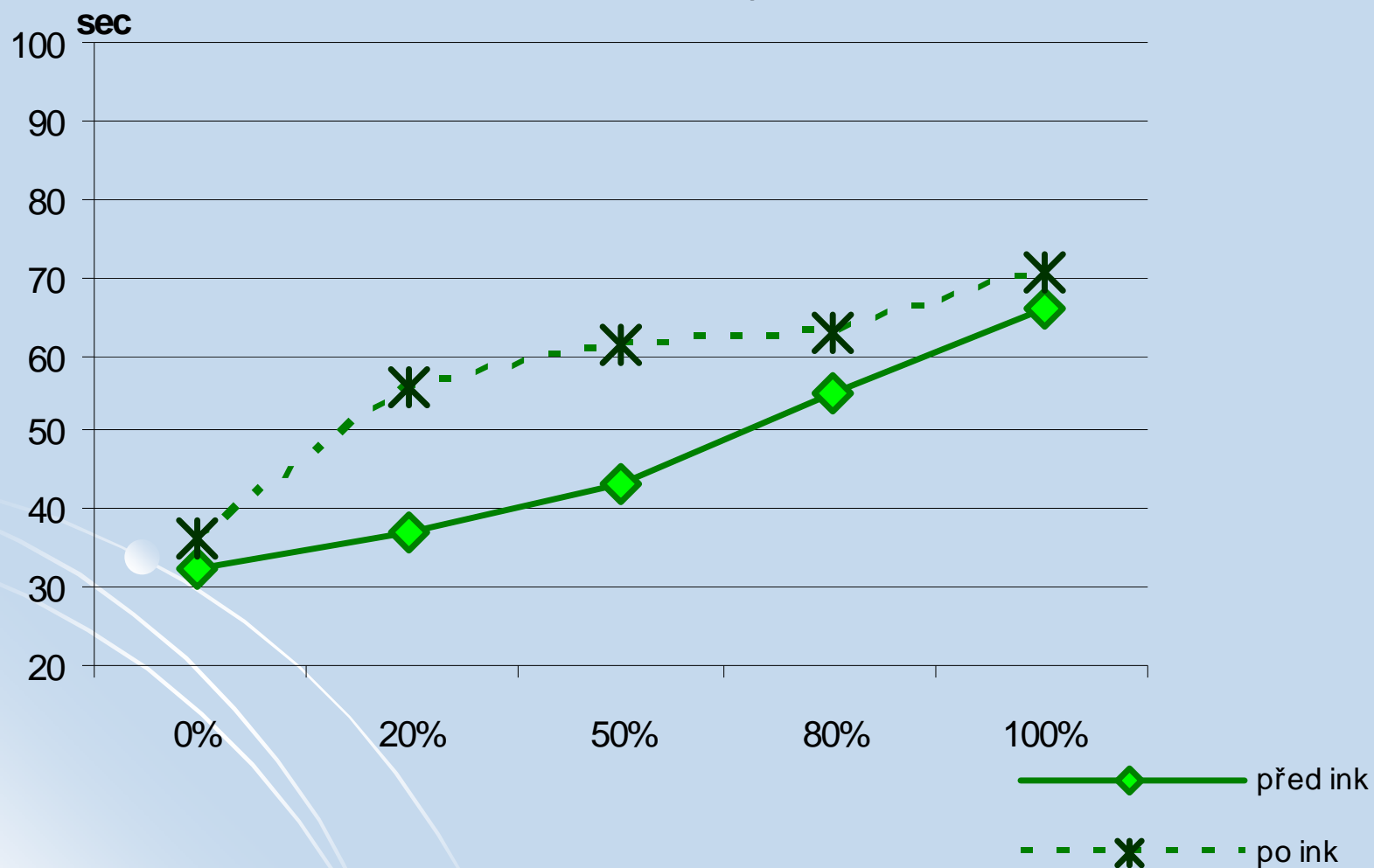
# Cirkulující antikoagulans grafické znázornění

- 0% = NP
  - 20% = směs NP+PP 4+1
  - 50% = směs NP+PP 1+1
  - 80% = směs NP+PP 1+4
  - 100% = PP
- 

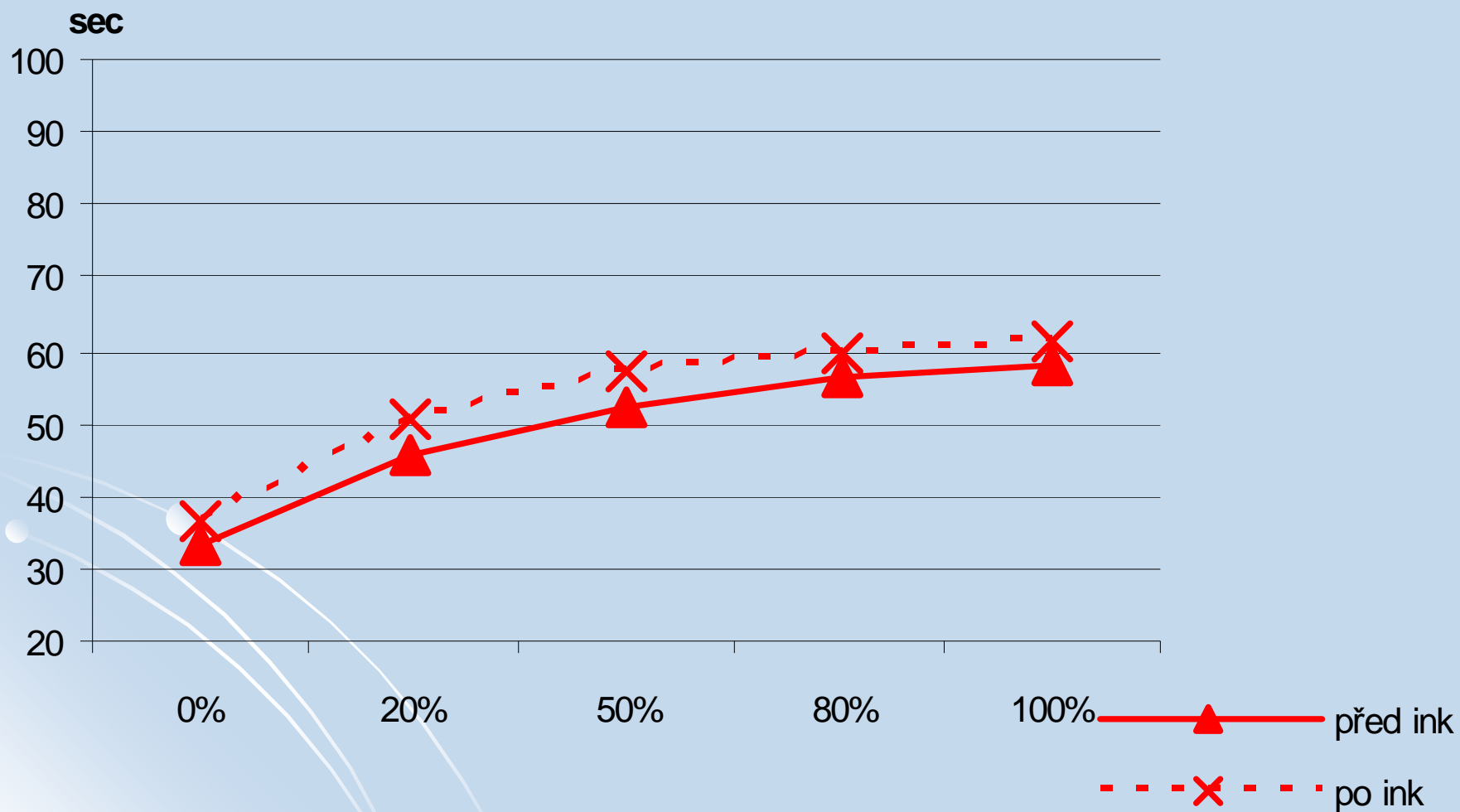
# Cirkulující antikoagulans APTT - defekt faktorů



# Cirkulující antikoagulans APTT - specifický inhibitor



# Cirkulující antikoagulans APTT - lupus antikoagulans



# Identifikace specifického inhibitoru

- Test „cirkulující antikoagulans“
- orientační vyšetření, kterým pouze prokážeme
  - přítomnost/ nepřítomnost inhibitoru
  - časovou závislost/ nezávislost inhibitoru





# Identifikace specifického inhibitoru

Kvantitativně **Bethesda metoda**

→ stanovení zbytkové aktivity faktoru po dvou hodinové inkubaci různých ředění pacientovy plazmy s normální plazmou (zdroj faktoru).

→ 1 Bethesda jednotka (B.U.)

množství inhibitoru, které během inkubace inaktivuje 50 % nabídnutého faktoru

→ přítomnost inhibitoru  $\geq 0,6$  B.U.

# Identifikace LA dle SSCC ISTH

- průkaz prodloužení fosfolipid závislého testu (dAPTT, dRVVT) = screening
- průkaz inhibitoru (negativní korekční testy)
- průkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru (neutralizační testy)

Použití **bezdestičkové plazmy** (PFP)

- dvojnásobná centrifugace + filtrace

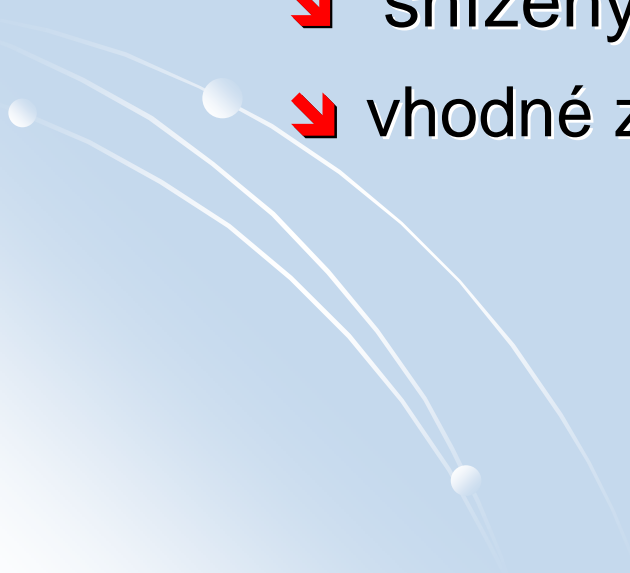
# Screeningové testy - LA

## → dAPTT

- ↘ snížený obsah fosfolipidů
- ↘ vhodné zastoupení fosfolipidů

## → dRVVT (aktivuje F X v přítomnosti PL a $\text{Ca}^{2+}$ )

- ↘ snížený obsah fosfolipidů
- ↘ vhodné zastoupení fosfolipidů



# Korekční testy - LA

- na principu testů, které ve screeningu prodloužené
  - ↘  $R > 1,2$
- vyšetření PP, NP a směsi PP a NP v poměru 1 : 1 bez inkubace (časově nezávislý inhibitor)



# Průkaz fosfolipidové závislosti - LA

Testy se zvýšenou koncentrací fosfolipidů

- ➔ na principu testů, které ve screeningu prodloužené a nedošlo ke korekci
- ➔ vyhodnocení zkrácení koagulačních časů
  - v přítomnosti nadbytku fosfolipidů
    - reagensie s ↑PL (APTT i RVVT)
    - po přidavku nadbytku PL
      - destičkových -test PNP (*Platelet Neutralisation Procedure*)
      - v hexagonální fázi - test HNP (*Hexagonal Neutralisation Procedure*)

# Vyšetření faktoru XIII

## → Stanovení funkční aktivity

- ↘ sledování rozpustnosti koagula

- ↘ fotometricky

## → Stanovení antigenu

- ↘ EID

- ↘ ELISA



# Testy primární hemostázy

- počet trombocytů (+ morfologie)
- doba krvácení (Duke, Ivy)
- PFA
- agregace trombocytů
- retrakce koagula



# Agregace trombocytů

## → Turbidimetrická metoda

↘ sledování změn průchodnosti světla (T) při tvorbě agregátů krevních destiček

## → Impedanční metoda

↘ sledování změn vodivosti vyvolaných tvorbou agregátů krevních destiček





# Agregace trombocytů

- Agregace samovolná (spontánní)
- Agregace stimulovaná (indukovaná)
  - ↳ induktory ADP, kolagen, adrenalin, ristocetin
- primární agregace - vlivem vnějšího podnětu
- sekundární agregace - vlastní příspěvek trombo
- reversibilní agregace
- ireversibilní agregace

# Agregace trombocytů

→ Postup

→ příprava PRP, PPP diferenciální centrifugací

→ stanovení počtu trombocytů (event. ředění PRP)

↘ PRP  $250 - 300 \times 10^9$ , PPP  $< 20 \times 10^9$

→ vyšetření agregace

↘ vložení kyvety s PPP a PRP (rozdíl T = 100%)

↘ sledování agregační odpovědi v PRP

● samovolná 10 min

● po přidavku induktoru 6 min

→ vyhodnocení agregační křivky

# Vyhodnocení agregační křivky

→ Maximální amplituda  $A_{max}$  (%)

↳ v maximu (reversibilní křivka)

↳ v 6. minutě (ireversibilní křivka)

→ Desagregace (%)

↳ jen u ADP v případě reversibilní křivky

→ Doba latence (s)

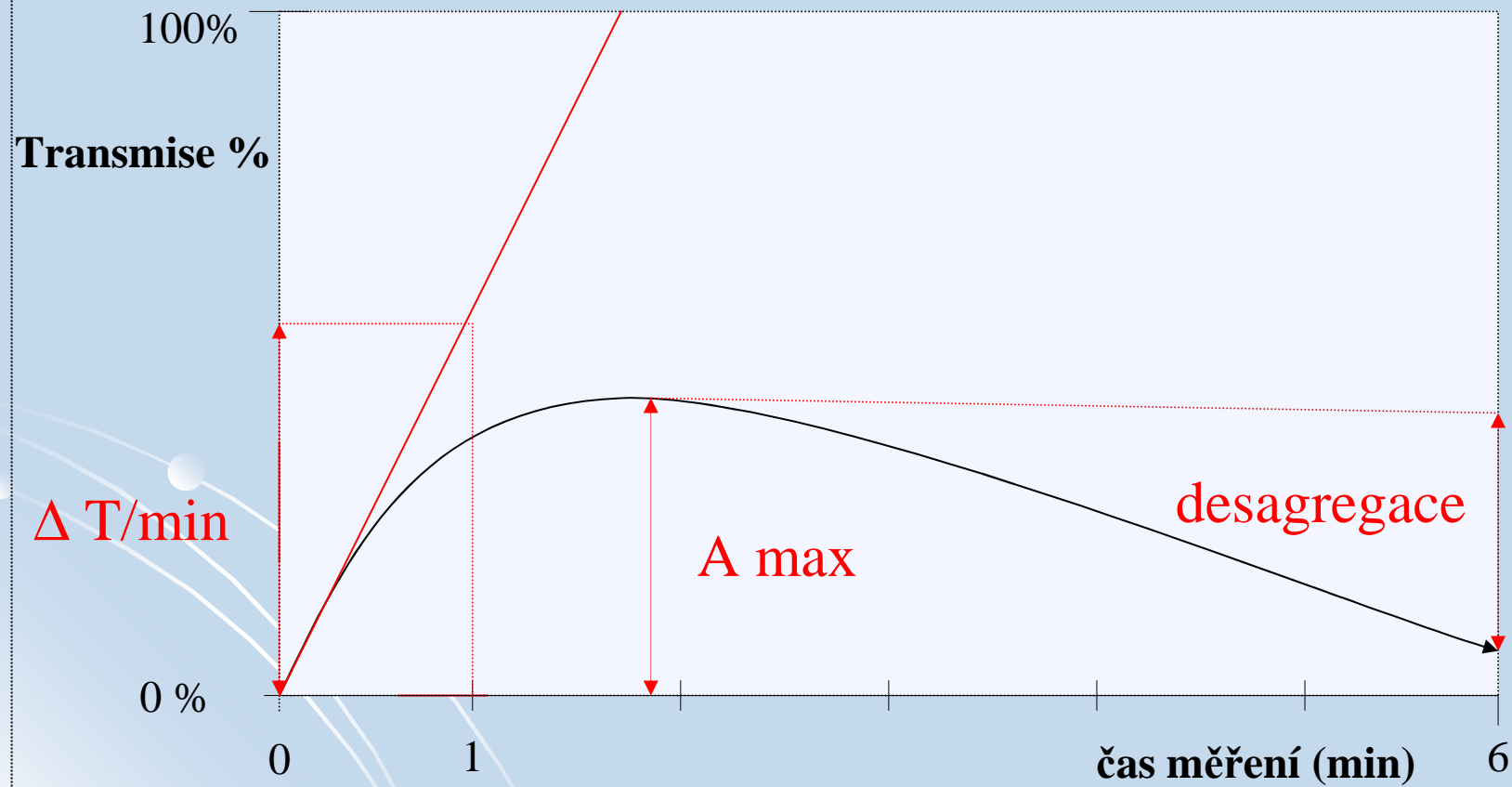
↳ časová prodleva před agregační odpovědí

↳ jen u kolagenu

→ Strmost křivky = slope (%/min)

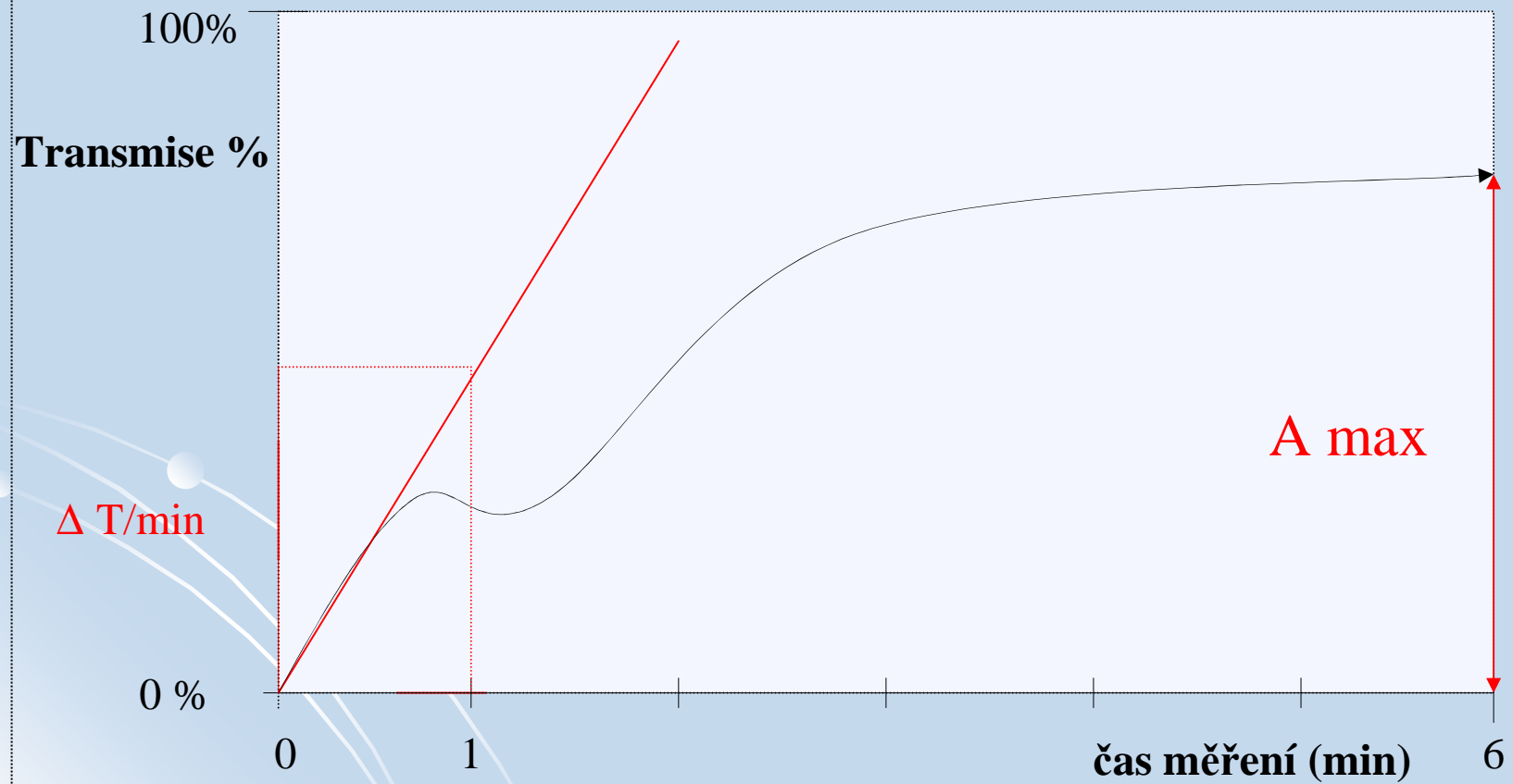
# Agregační křivka

## Agregace ADP 2,5



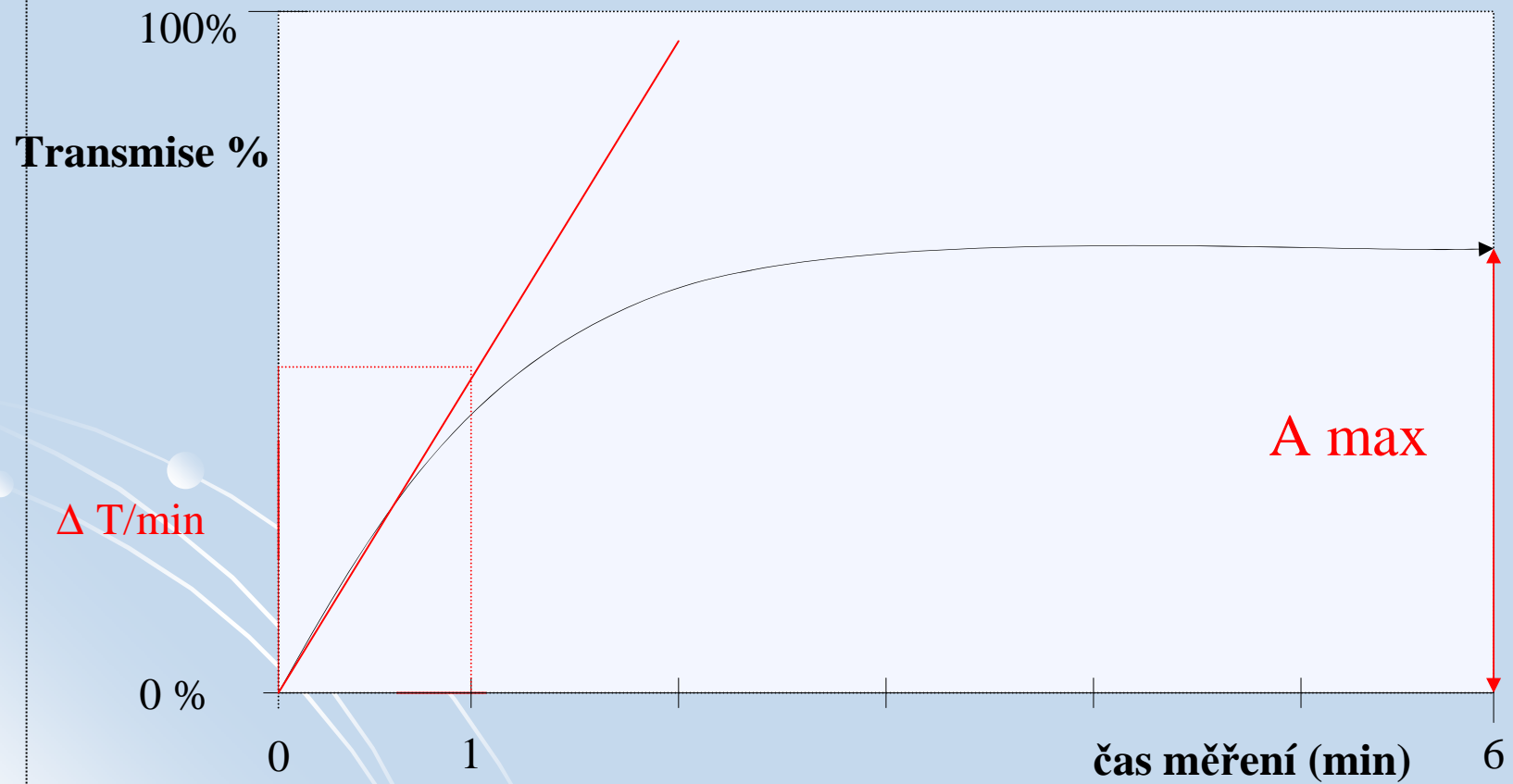
# Agregační křivka

## Agregace ADP 5

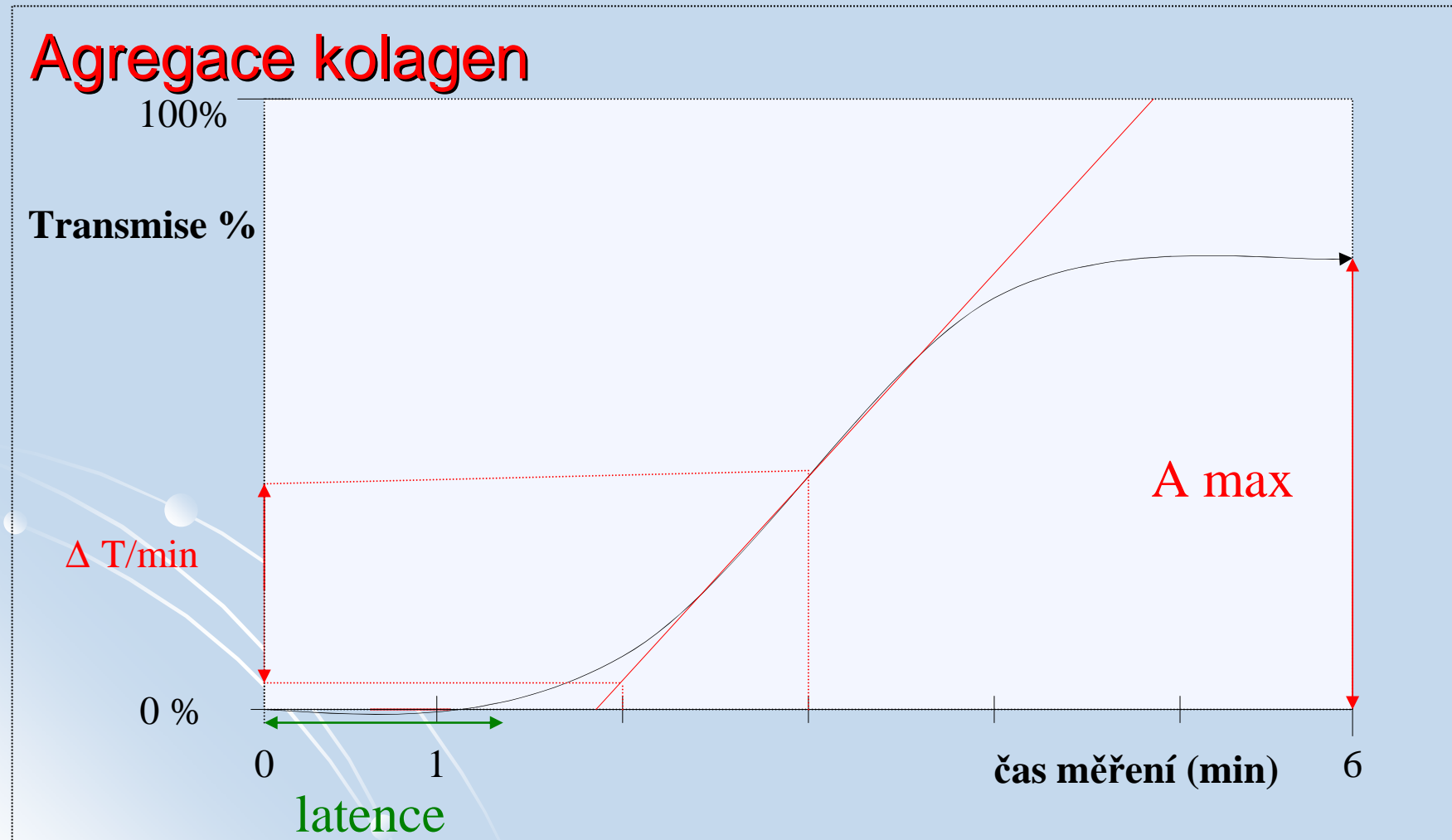


# Agregační křivka

## Agregace ADP 10

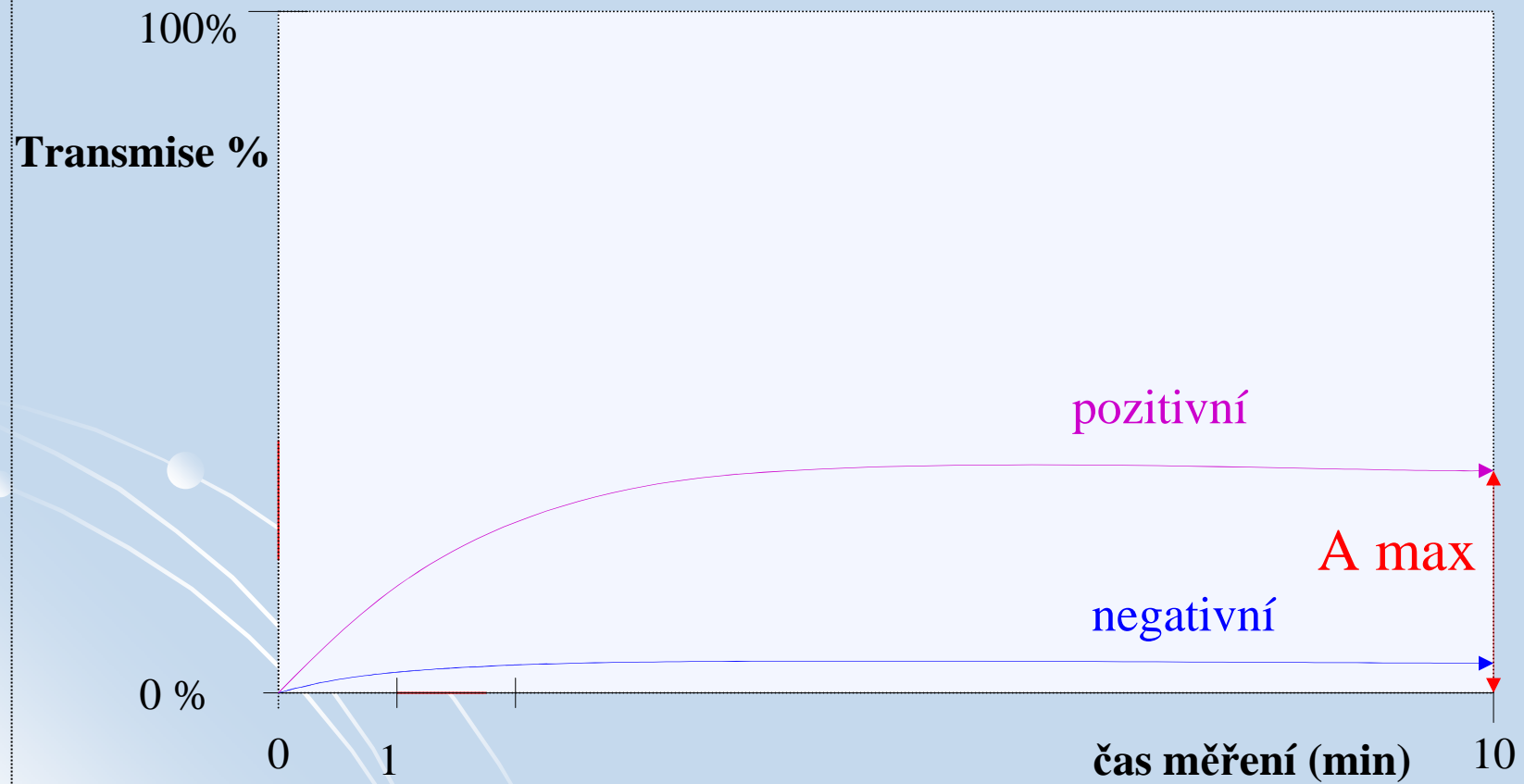


# Agregační křivka



# Agregační křivka

## Samovolná agregace





# Retrakce

Schopnost trombocytů smršťovat krevní nebo plazmatické koagulum (metoda dle Bethause)

## → Postup

- získání PRP sedimentací
- ředění PRP + přídavek  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -tromboplastin
- vytvoření plazmatického koagula v graduované zkumavce a oddělení koagula od stěn zkum.
- odečtení délky koagula po 3 hod
- odečtení % retrakce z tabulky

# Interpretace výsledků

	Heparin UFH	Kumariny	Defekt FF vnitř.syst.	Defekt F VII	Defekt FF II, V, X
PT	N, (↑)	↑↑	N	↑	↑
APTT	↑	↑	↑	N	↑
Fbg	N	N	N	N	N
TČ	↑↑	N	N	N	N