



Speciální koagulační vyšetření II

Přirozené inhibitory

 Antitrombin

 Systém PC/PS (ProC Global)

 Protein C

 Protein S

 APC-rezistence

Antitrombin

Vyšetření funkční aktivity

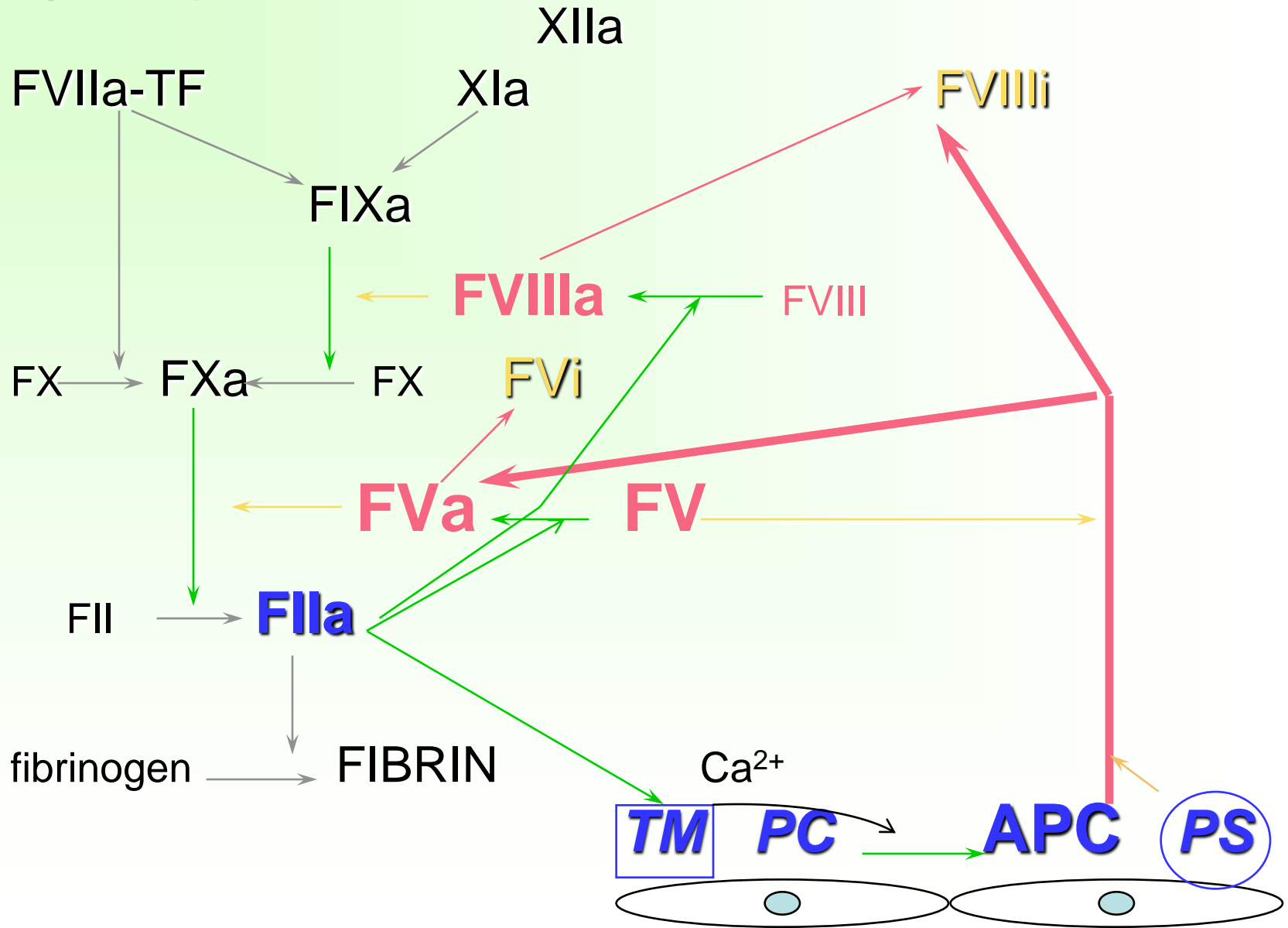
 fotometricky (IIa, Xa)

Vyšetření antigenu

 u vrozených defektů


 EID, ELISA

System proteinu C



Protein C


Vyšetření funkční aktivity

-  koagulační metody

-  fotometrické

Klinický význam - snížení

Normální hodnoty

-  60 - 130 %

Vyšetření antigenu

-  u vrozených defektů

-  EID, ELISA

Protein C – koagulační metoda

↪ Stanovení prodloužení koagulačního času (APTT) způsobené inaktivací F VIIIa a Va aktivovaným proteinem C.

↪ Postup

↪ ředěná vyšetřovaná plazma + aktivátor proteinu C

↪ neředěná protein C deficitní plazma

↪ APTT reagencie, inkubace

↪ CaCl_2

↪ stanovení koagulačního času

↪ odečtení funkční aktivity z kalibrační křivky

✓ lin/lin závislost

↪ vyjádření výsledku

✓ % normálu

Protein C- fotometrická metoda

↪ Sledování vzniku zbarvení v důsledku štěpení specifického chromogenního substrátu aktivovaným proteinem C.

↪ Postup

↪ ředěná vyšetřovaná plazma + aktivátor proteinu C

↪ specifický chromogenní substrát

↪ sledování vzniku zbarvení

✓ kineticky ($\Delta A/\text{min}$)

✓ „end point“ (A)

↪ odečtení funkční aktivity z kalibrační křivky


✓ lin/lin závislost

↪ vyjádření výsledku

✓ % normálu


Protein S


Vyšetření funkční aktivity

 koagulační metody

Klinický význam - snížení

Normální hodnoty

 muži 65 - 140 %

 ženy 50 - 140 %

Vyšetření antigenu - volný, celkový

 LIA

 ELISA

 EID

Protein S – koagulační metoda

↪ Stanovení prodloužení koagulačního času (PT) způsobené inaktivací Va systémem PC (PS + aktivovaný PC).

↪ Postup

↪ řaděná vyšetřovaná plazma

↪ neřaděná protein S deficitní plazma

↪ aktivovaný PC

↪ PT reagencie

↪ stanovení koagulačního času

↪ odečtení funkční aktivity (%) z kalibrační křivky

✓ lin/lin závislost

Rezistence na aktivovaný PC

= snížená antikoagulační odpověď na aktivovaný PC (APC)

↪ Popsána v r. 1993 Dahlbäckem

↪ Příčinou vrozené APC-R je ve většině případů Leidenská mutace faktoru V (FVL) - Bertina 1994

Rezistence na aktivovaný PC

↪ Příčiny získané APC-R mohou být

↪ zvýšení aktivity faktoru VIII

↪ lupus antikoagulant

↪ těhotenství, hormonální substituce (včetně HAK)

↪ antikoagulační léčba

↪ významné defekty proteinu C a S

↪ nesprávné zpracování vyšetřované plazmy

Možnosti vyšetření APC - rezistence

- ↪ Vyšetření fenotypu
 - ↪ koagulačními metodami
- ↪ Vyšetření genotypu
 - ↪ molekulárně genetické stanovení FVL

Koagulační vyšetření APC - R

↪ Vyšetření prodloužení koagulačních časů po přidavku APC

↪ vyšetření dvou koagulačních časů na principu aPTT nebo RVVT

✓ s přidavkem a bez přidavku APC

✓ (+ korekce FV deficitní plazmou)

↪ vyšetření jednoho koagulačního času s využitím jiných aktivátorů (hadí jedy)

✓ s přidavkem APC, F V deficitní plazmy

APC-R (APTT, RVVT)

↳ umožňují průkaz vrozené i získané APC-R

↳ Vyjádření výsledku

↳ poměr R

$$R = \frac{t \text{ (s APC)}}{t \text{ (bez APC)}} \quad (\text{norma např. } > 2,0)$$

↳ normalizovaný poměr nR

$$nR = \frac{R \text{ vzorku}}{R \text{ normálu}}$$

↳ Koagulační stanovení ovlivněné celou řadou faktorů

APC-R (APTT,RVVT)

diluce F V deficitní plazmou

↪ V poměru 1:5

(1 díl vyš. plazmy+4 díly F V def. plazmy)

↪ Citlivost testu pouze k vrozeným nebo získaným defektům F V

↪ Diluce a vyjadřování výsledku v nR zajišťuje téměř 100% citlivost pro F V Leiden

APC-R (jiné aktivátory, jeden koagulační čas)

- ↪ využívají hadí jedy (např. *Crotalus viridis Helli*, který je přímým specifickým aktivátorem faktoru X)
- ↪ výsledek je vyjadřován pouze jako koagulační čas
- ↪ normální hodnoty: časy > cut off (např. 120 s)
- ↪ test je citlivý pouze k F V Leiden a event. jiným vrozeným, případně získaným defektům faktoru V
- ↪ test není ovlivněn
 - ↪ antikoagulační léčbou,
 - ↪ defekty proteinu C/S,
 - ↪ přítomností LA, zvýšením F VIII

ProC Global

↪ globální funkční test

↪ stanovení antikoagulační kapacity systému PC nejen APC-R

↪ Použití

↪ ke screeningu vrozených i získaných poruch

↪ Princip

↪ test na bázi APTT s použitím hadího jedu (Agkistrodon contortrix), který aktivuje endogenní PC přítomný v testovaném vzorku

↪ sleduje se prodloužení APTT indukované aktivovaným endogenním PC

ProC Global - výsledky

↪ Vyšetření dvou koagulačních časů

↪ PCAT

✓ aPTT v přítomnosti aktivátoru proteinu C

↪ PCAT0

✓ aPTT bez aktivátoru proteinu C

↪ Výsledek - normalizovaný poměr (NR)

↪ vztahování poměru časů R ke standardě

ProC Global - výpočet

$$NR = \frac{PCAT}{PCATO} \times KF$$

$$KF = SV / \frac{PCAT \text{ stand.plazmy}}{PCATO \text{ stand.plazmy}}$$

KF - kalibrační faktor SV - citlivost standardní plazmy

ProC Global

- ↪ Normální hodnoty NR > 0,8
- ↪ Předpokládá se, že snížení poměru je v závislosti na riziku trombózy
- ↪ v důsledku inhibitoru heparinu ve reagensii je test necitlivý na přítomnost heparinu < 0,8 j./ml v plazmě
- ↪ test je však ovlivněn kumariny

ProC Global

- ↪ Test je citlivý na defekty v systému proteinu C (95 %)
 - ↪ Leidenská mutace faktoru V (100 %)
 - ↪ defekt proteinu C (85 %)
 - ↪ defekt proteinu S (56 %)
- ↪ Zachycuje vrozenou i získanou APC-R
- ↪ I samotná pozitivita PCG (bez známé příčiny) zvyšuje riziko VT (4x)
- ↪ Vhodný test pro screening trombofílie nikoli jako diagnostický test

Diagnostika APC-R - závěr

Diagnostika APC-R musí zahrnovat

↪ Nejen mol. biologické vyšetření F V Leiden,

↪ Ale také vhodná koagulační vyšetření k průkazu získané APC-R a ostatních vrozených APC-R, které se dosud běžně nevyšetřují

Testy k diagnostice vWF

- ↪ doba krvácení
- ↪ PFA
- ↪ APTT
- ↪ F VIII:C (funkční aktivita)
- ↪ funkční aktivita vWF (vWF:RCo)
- ↪ antigen vWF (LIA, ELISA, EID)
- ↪ agregace po ristocetinu
- ↪ kolagen vazebná kapacita vWF
- ↪ F VIII vazebná kapacita vWF
- ↪ multimerní struktury vWF
- ↪ molekulární diagnostika

Ristocetin kofaktorová aktivita vWF

↪ vWF:RCo slouží k posouzení na tromboocytech vázaných funkcí vWF v primární hemostáze

↪ využívá schopnosti vWF shlukovat tromboocyty v přítomnosti antibiotika ristocetinu

↪ detekce metodou

- ✓ agregační
- ✓ aglutinační
- ✓ optickou na koagulometrech

Ristocetin kofaktorová aktivita vWF

- ↪ Použití komerčních setů (většinou)
 - ↪ obsahující lyofilizované normální promyté trombocyty + ristocetin
- ↪ Sledování změn po přidavku vyšetřované plazmy chudé na destičky (zdroj vWF)

Agregační metoda vWF:RCo

↪ Princip

↪ sledování **změn transmise světla** v agregační kyvetě, obsahující suspenzi trombocytů a ristocetinu, po přidavku vyšetřované plazmy (PPP), registrované v podobě agregační křivky

↪ Vyhodnocení

↪ maximální změny transmise/min a odečtení hladiny VWF:RCo z kalibrační křivky (lin/log závislost)

↪ Vyjádření výsledků

↪ v % normálu

Agregační metoda vWF:RCo

↪ Destičkový agregační test využívající suspenzi zdravých promytých destiček v přítomnosti antibiotika ristocetinu a vWF pacienta v podobě plazmy chudé na destičky (PPP)

Aglutinační metoda vWF:RCo

↪ Princip

↪ sledování aglutinace v suspenzi trombocytů a ristocetinu po přidavku titrované ičkové vyšetřované plazmy (zdroj VWF) na skleněné desce

↪ Vyhodnocení

↪ makroskopické odečtení posledního titru při kterém ještě nastává aglutinace, vynásobení titru udanou citlivostí

↪ Vyjádření výsledků

↪ v % normálu (semikvantitativně např. >16% a < 32%)

Agregace po ristocetinu (RIPA)

↪ Princip

- ↪ destičkový agregační test v plazmě bohaté na trombocyty (PRP) pacienta v přítomnosti antibiotika ristocetinu
- ↪ použití různých koncentrací ristocetinu
 - ✓ z důvodu detekce zvýšené citlivosti vWF pacienta na nízkou koncentraci u typu 2B vWF choroby

↪ Vyhodnocení

- ↪ maximální amplituda A max (%)
- ↪ strmost křivky (%/min)

↪ Korekce normální PPP při ↓ RIPA

- ↪ 4 díly PRP pacienta + 1 díl PPP normálu

Kolagen vazebná kapacita vWF

↪ Princip

- ↪ vazba vWF na koňský kolagen navázaný na stěnách mikrotitrační desky
- ↪ následná detekce vázaného vWF enzymatickou imunochemickou reakcí (EIA)

↪ Vyhodnocení

- ↪ odečtení absorbance

↪ Vyjádření výsledku

- ↪ v % normálu odečtením z kalibrační křivky

Faktor VIII vazebná kapacita vWF

↪ Princip

- ↪ vazba vWF na stěny mikrotitrační desky potažené monoklonální protilátkou
- ↪ eluce F VIII pacienta
- ↪ inkubace s definovaným množstvím rekombinantního faktoru VIII
- ↪ detekce vázaného F VIII na vWF chromogenní metodou

↪ Vyhodnocení

- ↪ odečtení absorbance

↪ Vyjádření výsledku

- ↪ v % normálu odečtením z kalibrační křivky

Multimerní analýza

- ↪ Princip detekce multimerní struktury vWF
 - ↪ elektroforéza vzorku v SDS-agarózovém gelu
 - ↪ specifická detekce
 - ✓ autoradiograficky
 - ✓ Western blot
- ↪ Význam vyšetření
 - ↪ odlišení různých typů a podtypů vWF choroby

Molekulární analýza

- ↪ detekce specifických genetických defektů vWF
 - ↪ řetězovou polymerázovou reakcí a mutační analýzou

Testy fibrinolytického systému

↪ Rutinní testy

↪ euglobulinová lýza

↪ D-Dimery

↪ FDP

↪ Speciální testy (aktivita - fotometricky, antigen - ELISA, EID)

↪ plazminogen (↓)

↪ α -2-antiplazmin (↓)




↪ PAI-1(↑)

↪ tPA (↑)





↪ TAFI (↓)

Diagnostika krvácivých stavů

Screening

-  poruch primární hemostázy a vWF
-  v systému koagulačních faktorů
-  v systému fibrinolýzy

Speciální testy

-  primární hemostáza
-  vWF
-  systém koagulačních faktorů
-  systém fibrinolýzy

Diagnostika trombofilních stavů

Vyšetření hyperkoagulace

 nutné provedení speciálních testů k vyšetření jednotlivých trombofilních markerů

 zkrácení časů APTT (málo citlivé)

✓ v porovnání s předchozím výsledkem

✓ za vyloučení arteficiálního ovlivnění při odběru

 vyšetření molekulárních markerů

✓ D-Dimery - aktivace koagulace i fibrinolýzy





– sledování dynamiky změn kvantitativně

✓ FPA, F1+2, TAT - aktivace koagulace

– metody ELISA nejsou dostupné statim

Trombofilní markery

Defekty systémů


-  Přírodných inhibitorů krevního srážení
-  Koagulačních faktorů
-  Fibrinolýzy
-  Trombocytů


Přítomnost protilátek


-  Nespecifických (LA)
-  Specifických (inhibitor PC, PS, F V, AT..)

Defekty inhibitorů krevního srážení

 Antitrombin

 Systém PC/PS


 Protein C

 Protein S


 APC-rezistence

 TFPI


Defekty koagulačních faktorů

 Zvýšená hladina

 Faktor VIII

 Faktor XI, IX, II, VII, fibrinogen

 Dysproteinemie

 Fibrinogen,...

Defekty fibrinolýzy

↪ PAI

↪ Plazminogen

↪ Faktor XII

↪ Dysfibrinogenémie

↪ TAFI

Defekty trombocytů

↪ Hyperagregabilita trombo

↪ Samovolná agregace

↪ Agregace – nízké koncentrace ADP, Epi

↪ Aktivace trombocytů

↪ molekulární markery

✓ PF4, β TG - ELISA