

# **Speciální koagulační vyšetření II**

# Testy k diagnostice VWF

## ↳ Screeningové testy

↳ doba krvácení

↳ PFA

↳ APTT

## ↳ Specifické testy

↳ F VIII:C (funkční aktivita)

↳ funkční aktivita VWF (VWF:RCo, VWF:Ac)

↳ antigen VWF (LIA, ELISA, EID)

↳ kolagen vazebná kapacita VWF

## ↳ Diskriminační testy

↳ agregace po ristocetinu

↳ F VIII vazebná kapacita VWF

↳ multimerní struktury VWF

## ↳ Molekulární diagnostika

# Vyšetření aktivity VWF

↪ Metody stanovení **schopnosti vazby VWF na GPIb**

↪ vyšetření **ristocetin kofaktorové aktivity** (VWF:RCo)

↪ **metody ristocetin nezávislé** (VWF:Ac)

# Metoda VWF:RCo

## ↪ Reagencie

↪ lyofilizované normální promyté trombocyty + ristocetin

↪ Využívá antibiotikum ristocetin, který indukuje vazbu plazmatického VWF na GPIb cílových trombocytů a jejich aglutinaci

↪ detekce metodou

- ✓ agregační
- ✓ turbidimetrickou na koagulačních automatech
- ✓ aglutinační

# Metoda VWF:RCo

## ↪ Agregáčn metoda

↪ sledování změn transmise světla ve směsi trombocytů a ristocetinu po přidavku vyetrovan plazmy (PPP)

- ✓ vyhodnocení změny transmise/min z agregáční křivky
- ✓ vyjdren výsledku v % odečtením z kalibrační křivky

## ↪ Turbidimetrick metoda

↪ sledování změn turbidity ve směsi trombocytů a ristocetinu po přidavku vyetrovan plazmy (PPP)

- ✓ vyhodnocení změn absorbance z kinetického měření
- ✓ vyjdren výsledku v % odečtením z kalibrační křivky

# Metoda VWF:RCo

## ↪ Aglutinační metoda

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

- ✓ makroskopické odečtení posledního titru při kterém ještě nastává aglutinace, vynásobení titru udanou citlivostí reagencie
- ✓ vyjádření výsledku v % semikvantitativně např. >16% a < 32%)

# Metoda ristocetin nezávislá

↪ Kvantitativní automatizovaná metoda

↪ standartizovaná

↪ Princip

↪ vyhodnocení vazby VWF na rekombinantně připravený GPIb s mutacemi, která nevyžaduje přítomnost antibiotika ristocetinu

↪ detekce aglutinace latexových částic s navázanou protilátkou proti GPIb

- ✓ metodou imunoturbidimetrickou na koagulačních automatech
  - vyhodnocení změn absorbance z kinetického měření
  - vyjádření výsledku v % odečtením z kalibrační křivky

# 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



# 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

# Faktor VIII vazebná kapacita vWF

## ↳ Princip

- ↳ vazba VWF na stěny mikrotitrační desky potažené monoklonální protilátkou proti VWF
- ↳ eluce F VIII pacienta
- ↳ inkubace s definovaným množstvím rekombinantního faktoru VIII
- ↳ detekce vázaného F VIII na VWF fotometrickou 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 (klinický význam ↓, riziko trombózy)

↳  $\alpha$ -2-antiplazmin (klinický význam ↓, riziko krvácení)

↳ PAI-1 (↑)

↳ tPA (↑)

## ↳ Molekulární markery (ELISA)

↳ komplex PAP

# 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 času 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..)





# Přirozené inhibitory

 Antitrombin

 Systém PC/PS

 Protein C

 Protein S

 APC-rezistence

# Antitrombin

## ↳ Vyšetření funkční aktivity

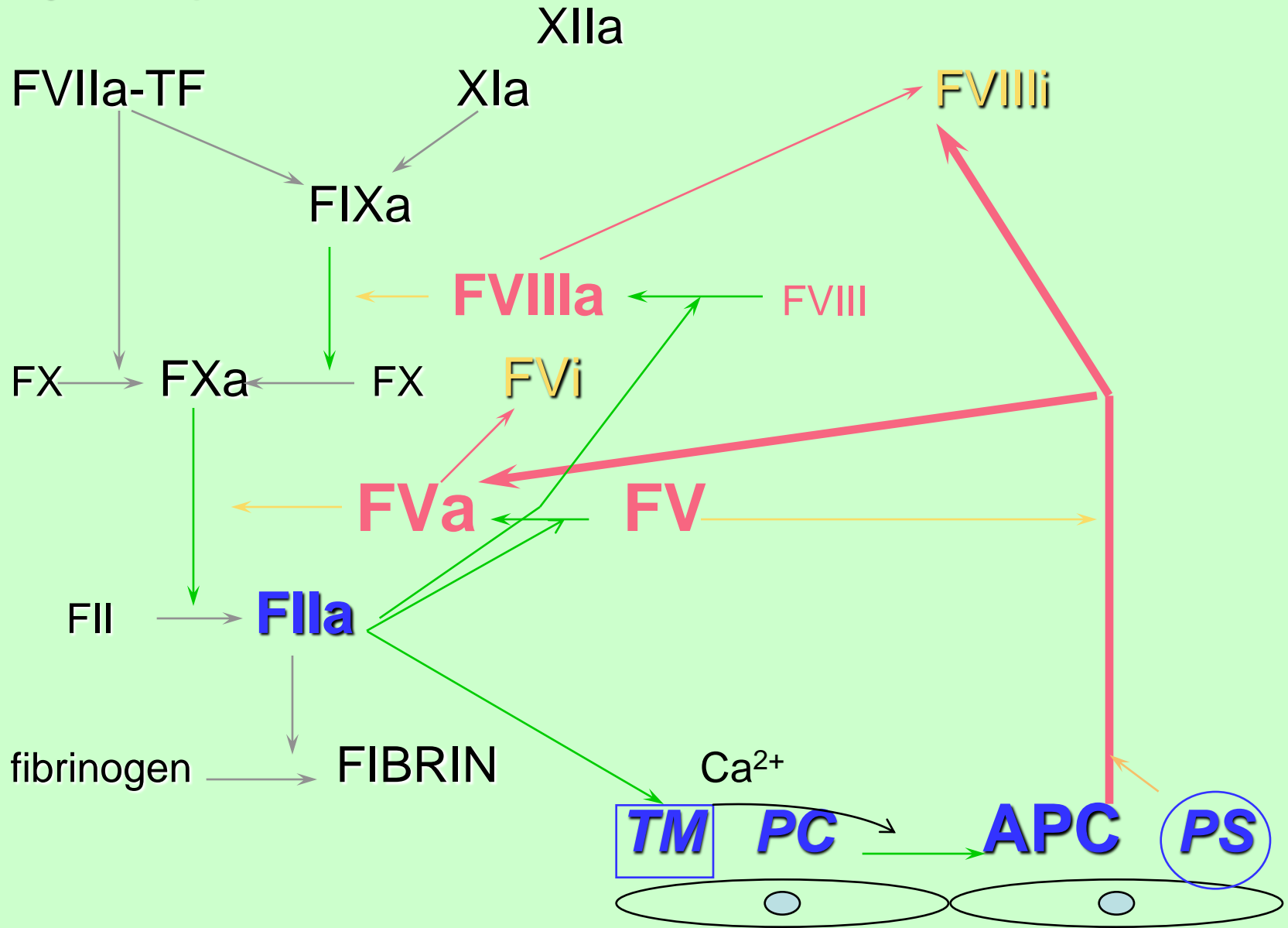
↳ fotometricky (IIa, Xa)

## ↳ Vyšetření antigenu

↳ u vrozených defektů

↳ LIA, 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

↪  $\text{CaCl}_2$

↪ 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)

↪ Příčinou **vrozené APC-R** je ve většině případů Leidská mutace faktoru V (FVL)

↪ Příčinou **získané APC-R**

↪ zvýšení F VIII

↪ LA

↪ těhotenství, hormonální substituce (včetně HAK)

↪ antikoagulační léčba

↪ významné defekty PC a PS

↪ nesprávné zpracování vyšetřované plazmy

# Možnosti vyšetření APC - rezistence

## ↳ Vyšetření fenotypu

↳ koagulačními metodami

✓ průkaz vrozené i získané APC-R

## ↳ Vyšetření genotypu

↳ molekulárně genetické stanovení FVL

# Koagulační vyšetření APC - R

↪ Vyšetření prodloužení koagulačních časů po  
přídavku APC

## 1. Vyšetření dvou koagulačních časů

- ✓ s přídavkem a bez přídavku APC
- ✓ vyjádření výsledku
  - poměr  $R = t_{s\text{ APC}} / t_{\text{bez APC}}$  (norma např. > 2,0)

## 2. Vyšetření jednoho koagulačního času

- ✓ s přídavkem APC
- ✓ vyjádření výsledku
  - koagulační čas (norma: časy > cut off (např. 120 s))

# 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 aktivátoru proteinu C - 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

↳ APTT v přítomnosti aktivátoru proteinu C (PCAT)

↳ APTT bez aktivátoru proteinu C (PCAT0)

## ↳ Výsledek - **normalizovaný poměr (NR)**

↳ vztažení poměru časů R ke standardě

↳ Normální hodnoty **NR > 0,8**

↳ Předpokládá se, že **snížení poměru je v závislosti na riziku trombózy**

# 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

- ↪ Test je citlivý na defekty v systému proteinu C (95 %)
  - ↪ Leidská 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

# Defekty koagulačních faktorů

## ↳ Zvýšená hladina

↳ Faktor VIII

↳ Faktor XI, IX, II, VII, fibrinogen

## ↳ Dysproteinémie

↳ Fibrinogen,...



# Defekty fibrinolýzy

↪ PAI

↪ Plazminogen

↪ Faktor XII

↪ Dysfibrinogenémie

↪ TAFI

↪ Molekulární markery (D-Di, PAP)

# Defekty trombocytů

## ↳ Syndrom lepivých destiček

### ↳ Hyperagregabilita trombo

- ✓ po Epi + ADP - typ I
- ✓ po Epi - typ II
- ✓ po ADP - typ III

## ↳ Aktivace trombocytů

### ↳ samovolná agregace

### ↳ molekulární markery

- ✓ PF4,  $\beta$ TG - ELISA

# Diagnostika HIT

## ↳ Trombocytopenie

↳ aplikace heparinu je provázena nevysvětlitelným poklesem počtu trombocytů

✓ <  $150 \times 10^9/l$  nebo o více než 50 %

↳ v časovém úseku odpovídajícím imunizaci heparinem

## ↳ Vyloučení trombocytopenie z jiných příčin

↳ DIC, LA, TTP, HUS, AITP

↳ potransfúzní purpura

↳ dřeňový útlum

## ↳ Průkaz přítomnosti protilátek

# Laboratorní testy HIT

## ↳ Testy imunologické

### ↳ vyšetření protilátek proti Heparin/PF4

- ✓ kvalitativní testy - průkaz přítomnosti/nepřítomnost
- ✓ ELISA - průkaz protilátek různých tříd IgG, IGM a IgA

## ↳ Testy funkční

### ↳ vyšetření schopnosti HIT protilátek aktivovat normální trombocyty jen v přítomnosti heparinu (ne v nepřítomnosti a při vysoké koncentraci)

- ✓ destičkový agregační test
- ✓ test uvolnění serotoninu (referenční metoda)
- ✓ průkaz uvolnění destičkových mikropartikulí (cytoflowmetrie, ELISA), event. jiné

# Destičkový agregační test

↳ Vyšetření agregace trombocytů normálu (PRP) v přítomnosti heparinu a plazmy (PPP) pacienta

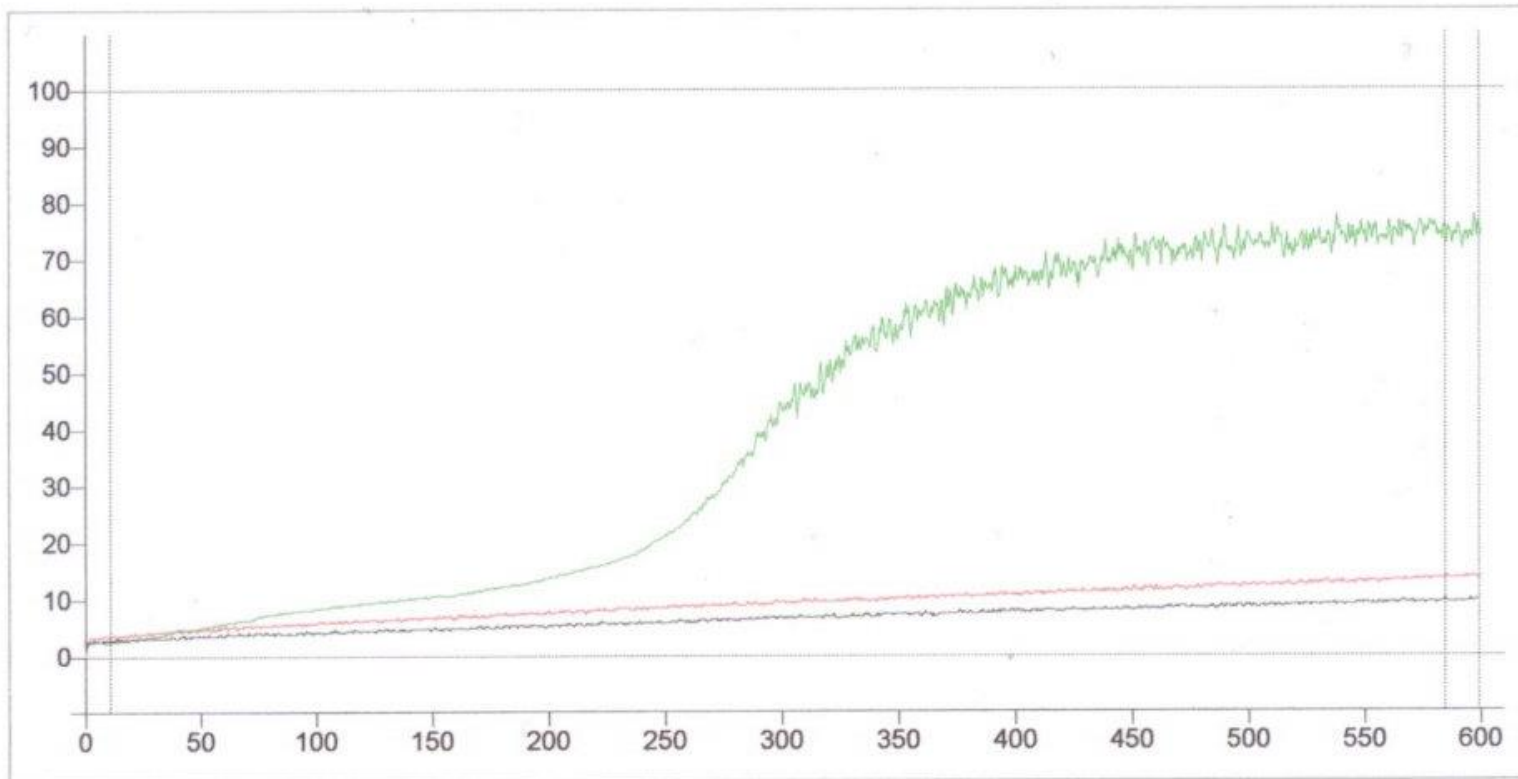
↳ porovnání agregační odezvy

✓ v přítomnosti heparinu

- v terapeutické koncentraci ( 1 U / ml)
- a vysoké koncentraci ( 100 U / ml)
  - » vyloučení falešné positivity
  - » štěpení imunokomplexů při vysoké koncentraci heparinu

✓ v nepřítomnosti heparinu (fyziologický roztok)

OKH FN Bohunice



*	Date	Time	Inductor	Sample ID	Aggregation	Slope	Desaggregation	Remark
✓ !	2/1/08	9:37:38 AM	FYZ.ROZ.	SMES II	9.6 %	3.0 %/min		
✓ !	2/1/08	11:26:37 AM	FRAGMIN 100	SMES II	13.8 %	6.2 %/min		
✓ !	2/1/08	9:48:04 AM	FRAGMIN	SMES II	74.7 %	35.3 %/min		