Rutinní koagulační testy
Interpretace výsledků

Zavřelová J.

Antitrombin

Stanovení funkční aktivity - fotometricky

➔ princip

- 1/ inkubace ředěné vyš. plazmy s nadbytkem
  - trombinu
  - (F Xa)
- v přítomnosti heparinu
- za vzniku komplexu
  - trombin -AT-heparin
  - (F Xa - AT - heparin)
- a zbytkového trombinu (F Xa)

Antitrombin

- 2/ stanovení zbytkového
  - trombinu
  - (F Xa)
- pomocí specifického chromogenního substrátu
  - end point (A)
  - kineticky (ΔA/min)

➔ vyjádření výsledků v %

- odečet z kalibrační křivky (lin/lin závislost)

Stanovení antigenu - imunochemicky

- - LIA, ELISA, EID

Kalibrace - antitrombin

- kalibrační materiál
  - komerční
- vyšetření
  - různých ředění výchozí kalibrační plazmy s udanou hladinou antitrombinu
- kalibrace tří…více bodová
- závislost lin/lin

Antitrombin - klinický význam

- klinický význam
  - snížení
- normální hodnoty: 80 – 120 %

- zvýšené hodnoty bez klinického významu(> 120%)
- vyšetření dalších ředění vyšetřované plazmy
  - běžně se neprovádí
  - jen pro event. snížení vlivu zbarvení plazmy

Antitrombin - klinický význam

- snížení AT
- vrozený nedostatek
- získaný nedostatek
  - snížená syntéza
  - zvýšené ztráty
  - zvýšená spotřeba (DIC, TEN, rozsáhlé operace)
  - jiné příčiny (těhotenství, kontraceptiva)

D-Dimery

Specifické štěpné produkty fibrinu

- ➔ marker aktivace koagulace i fibrinolýzy
- ➔ metody semikvantitativní
  - latexaglutinační (hemaglutinační)
  - imunofiltrace
- ➔ metody kvantitativní
  - LIA
  - ELISA
  - EID

Kalibrace – LIA D-Dimery

- vyšetření
  - více standartních materiálů s různým hladinou D-Di
  - načtení kalibrace čárovým kódem
    - kalibrace vícebodová
    - závislost nelineární (polynom)
- vyjadřování výsledků v mg/l (norma < 0,5 mg/l)
  - klinický význam zvýšení
- omezení – rozsah kalibrace (např. 0 - 4 mg/l)
  - nutnost provedení vyšetření dalších ředění

D-Dimery - klinický význam

- Zvýšení D-Di
  - TEN, DIC
  - poranění, po operaci
  - zánět
  - primární hyperfibrinolýza
  - trombolytická léčba
  - hepatopatie
  - odvržení transplantovaných štěpů
  - fyziologicky
    - těhotenství, porod, menstruace, fyzická zátěž

D-Dimery - klinický význam

- Zvýšení D-Di
  - vysoká senzitivita testů
  - nízká specifita testů
  - význam má sledování dynamiky změn
- Negativní výsledek přínosnější
  - negativní prediktivní hodnota (96-98%)

FDP

Fibrin/fibrinogen degradační produkty

➔ průkaz aktivace fibrinogenolýzy / fibrinolýzy

➔ metody semikvantitativní

- latexaglutinační
  - v séru
    - odběr do spec. zkumavek s trombinem a reptilázou
  - v plazmě
- metody kvantitativní
  - LIA
  - EID

Stanovení solubilního fibrinu

Komlexy FM/oligomerů s fibrinogenem, FDP

- ➔ průkaz aktivace koagulace
- ➔ metody přímé
  - ➘ parakoagulační
    - etanolgelifikační test
    - protaminsulfátový test
  - ➘ hemaglutinační
  - ➘ LIA
- ➔ metody nepřímé
  - ➘ fibrinopeptid A… (ELISA)

Etanolgelifikační test

- průkaz přítomnosti solubilních komplexů FM
- parakoagulační test
  - sledování tvorby gelu po přídavku 50% etanolu k vyšetřované plazmě (20 °C)
- Ovlivnění výsledku
  - odběr (aktivace) - falešná pozitivita
  - čas zpracování (do 30 min) - ↑falešná negativita
  - teplota (20 °C) - ↑ negativní, ↓ pozitivní

EGT - klinický význam

- DIC
- TEN
- sepse
- metastázující karcinomy
- SLE

Monitorování léčby

- Antikoagulační léčba
  - kumariny
    - PT (INR)
- Antitrombotická
  - UFH
    - APTT (R)
    - (anti Xa, anti IIa)
  - LMWH
    - anti Xa
    - (anti IIa)

Stanovení heparinu anti Xa (IIa)

- Princip: měření schopnosti heparinu katalyzovat inhibici F Xa (IIa) antitrombinem
  - inkubace ředěné plazmy s nadbytkem F Xa (IIa) -inhibiční působení komplexu AT-heparin na F Xa (IIa)
  - měření zbytkového F Xa (IIa) po přídavku chromogenního substrátu
  - vyjádření výsledků v IU/ml (kIU/l) odečtením z kalibrační křivky
- Provádění: preventivní/ léčebné podávání LMWH /UFH

Kalibrace heparin antiXa/IIa

- kalibrační materiál
  - komerční (pro LMWH a/heparin)
- vyšetření
  - 3-4 kalibrační plazmy s udanou různou hladinou anti Xa (IIa)
- kalibrace tří…více bodová
- závislost lin/lin (ΔA/min na IU/ml)
- vyjadřování výsledků IU/ml (kIU/l)

Jiná antitrombotika – anti Xa

- Bemiparin (Zibor)
  - LMWH s vyšším poměrem antiXa/antiIIa
  - vyjádření výsledků IU/ml (kIU/l)
- Fondaparinux (Arixtra)
  - pentasacharid
  - vyjádření výsledků μg/ml (mg/l)
- Rivaroxaban (Xarelto), Apixaban (Eliquis), Edoxaban (Lixiana)
  - přímé inhibitory F Xa
  - vyjádření výsledků μg/l

Přímá antitrombotika – anti IIa

- Dabigatran (Pradaxa)
  - přímý inhibitor trombinu (IIa)
  - sledování inhibice konstantního množství trombinu
- Koagulační metoda (ředěný TT) set Hemoclot Thrombin inhibitors
  - ve směsi ředěné vyšetřované plazmy a normální plazmy
    - koagulační čas je přímo úměrný koncentraci dabigatranu
- Fotometrická metoda
  - v ředěné vyšetř. plazmě po přídavku chromogenního substrátu
    - ΔA/min je nepřímo úměrná koncentraci dabigatranu
- Vyjádření výsledků μg/l

Kalibrace jiná antitrombotika

- kalibrační materiál
  - komerční pro jednotlivé léky (s výjimkou Ziboru)
- vyšetření
  - 3-4 kalibrační plazmy s udanou různou hladinou léku
- kalibrace tří…více bodová
- závislost lin/lin
  - antiXa ΔA/min na IU/ml, mg/l, μg/l ..
  - antiIIa sec/ μg/l, ΔA/min/ μg/l

Globální testy

- Doba krvácení
- Euglobulinová lýza
- Analýza PFA
- Trombelastografie
- TGA
- Konzumpce protrombinu
- Doba srážlivosti
- Rekalcifikační čas

Doba krvácení

Globální test primární hemostázy

- ➔ měří se doba, za kterou dojde k zástavě krvácení v místě dle možnosti standardního vpichu nebo řezu
- ➔ metoda dle Duke - standardní řez do ucha
  - ➘ norma < 270 s
- ➔ metoda dle Ivyho - řez na předloktí pomocí firemních nožíků při zatažení paže tonometrem na 40 mm Hg sloupce
  - ➘ např. Surgicutt norma 120 - 480 s

Doba krvácení - klinický význam

Prodloužení DK

- trombocytopenie
- trombocytopatie
- von Willebrandova choroba
- porucha cévní stěny
- afibrinogenémie
- ovlivnění léky (salicyláty)

Euglobulinová lýza

Globální test fibrinolytického systému

➔ měří se čas potřebný k rozpuštění koagula euglobulinové frakce (EF) plazmy (norma>180min)

- příprava EF plazmy precipitací vyšetř. plazmy za specifických podmínek (pH = 5,2)
  - EF se skládá z fibrinogenu, fibrinolytických enzymů a z protrombinu (ev. trombinu), neobsahuje inhibitory fibrinolýzy
- rozpuštění precipitátu (zvýšením pH)
- vznik koagula EF po přídavku Ca^{2+}
- sledování rozpouštění koagula (cca po 15 min)

Euglobulinová lýza

Ovlivnění výsledku:

- odběr
  - aktivace
- čas zpracování
  - do 30 minut
- koncentrace fibrinogenu
  - hypofibrinogenémie
- rozpuštění precipitátu

Euglobulinová lýza- klinický význam

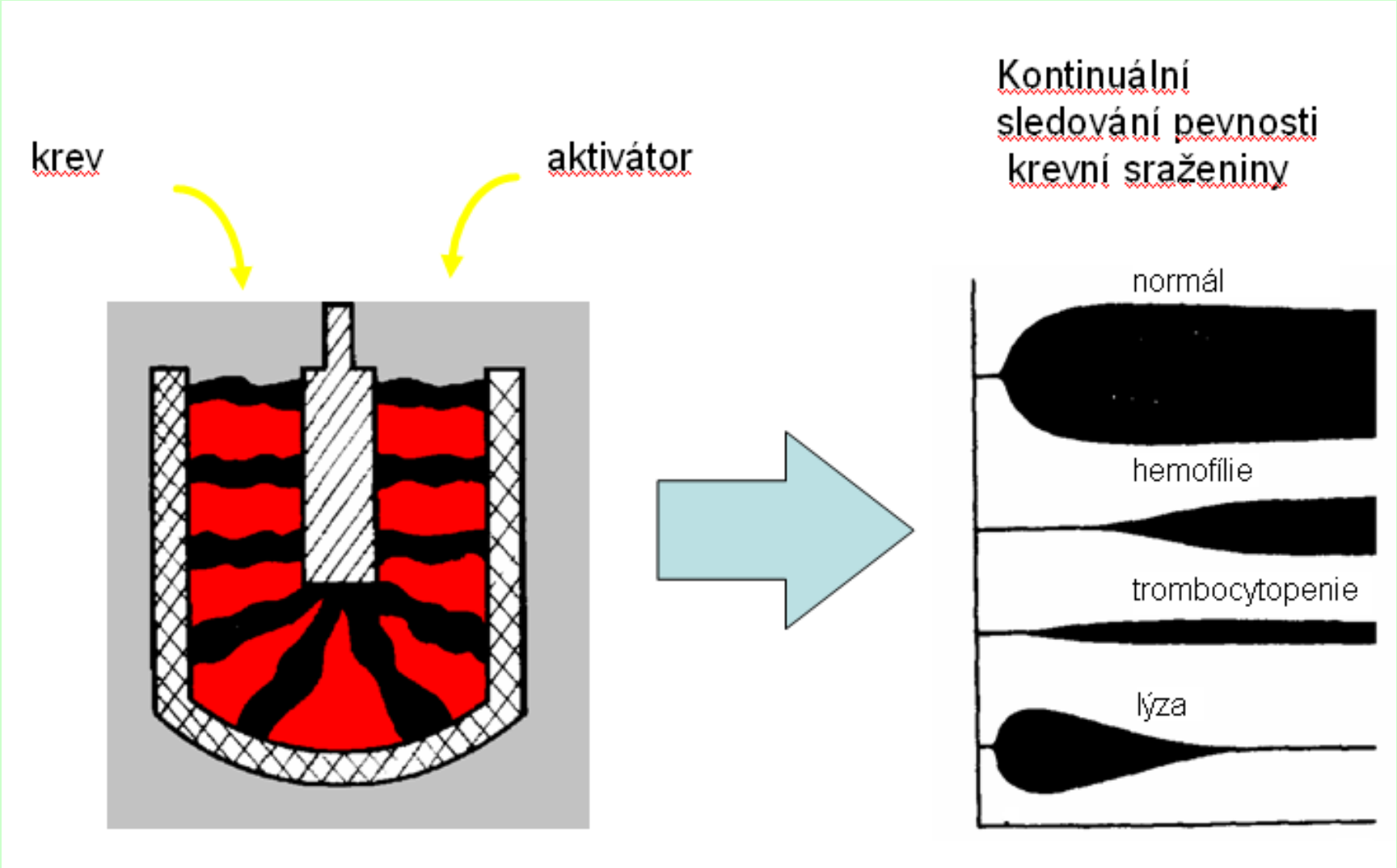
- zkrácení
  - DIC (sekundární hyperfibrinolýza)
  - primární hyperfibrinolýza
  - trombolytická léčba
  - cirhóza
  - zvýšená duševní a tělesná zátěž
  - novorozenec
- prodloužení
  - podezření na hyperkoagulaci

Tromboelastometrické vyšetření

- kontinuální monitorování procesu krevního srážení a následné lýzy v podobě grafického záznamu = tromboelastogramu
- klasická tromboelastometrie
  - sledování oscilace kyvety se srážlivou krví, ve které je zavěšen trn připojený k indikátoru světla
- rotační tromboelastometrie
  - sledování oscilace trnu v pevné kyvetě s krví

Rotační tromboelastometr

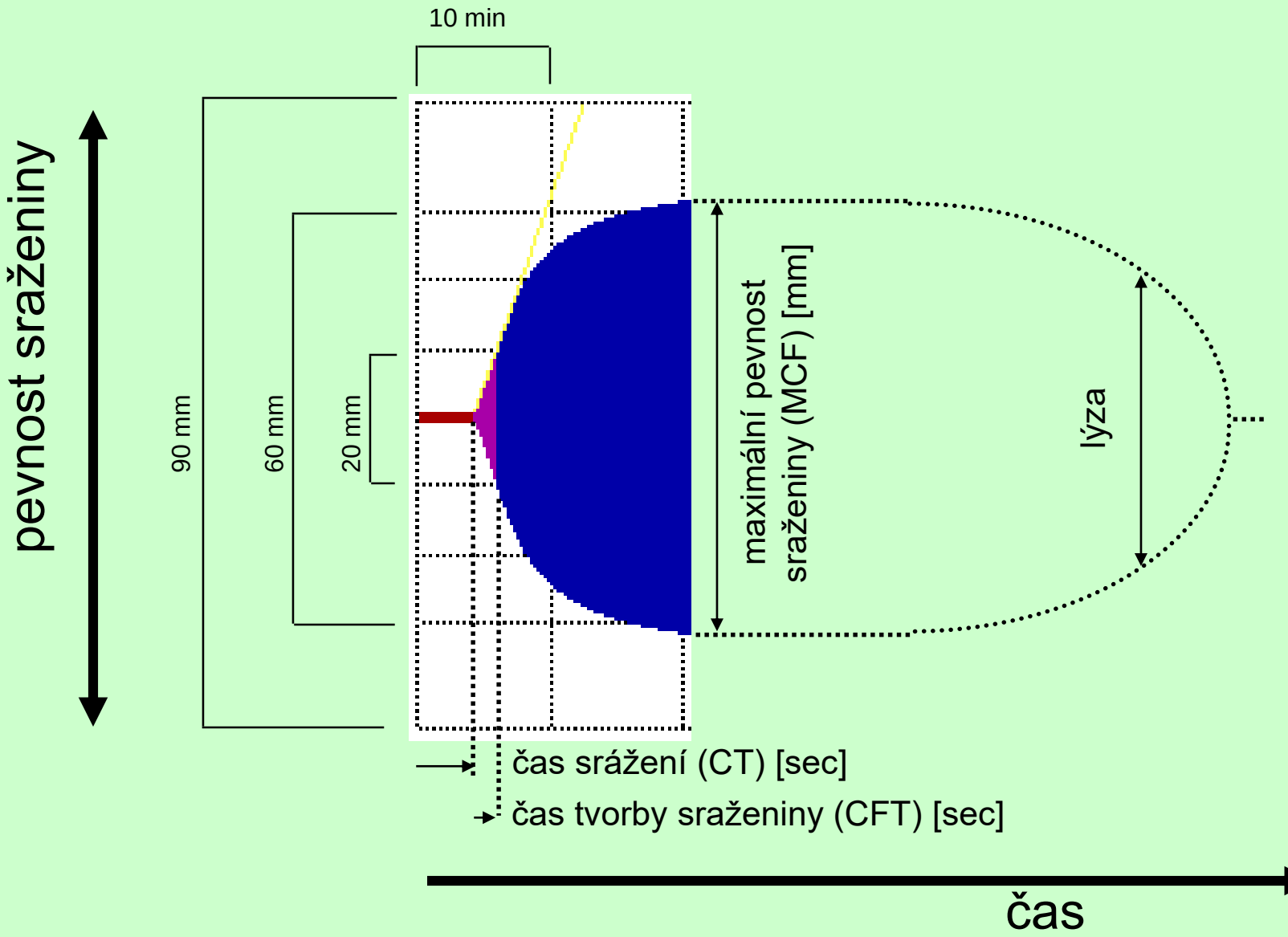
Tromboelastometrie



Tromboelastometrie

- schopnost krevní sraženiny tvořit mechanické spojení mezi kyvetou a trnem
- rotační pohyb (kyvety nebo trnu)
  - brzděný tvořící se krevní sraženinou
  - je převáděn na amplitudu
  - je mírou pevnosti sraženiny
- záznam amplitud v čase
  - trombelastograf
  - symetrická křivka
    - nad a pod základní linií

roTEM analýza: parametry



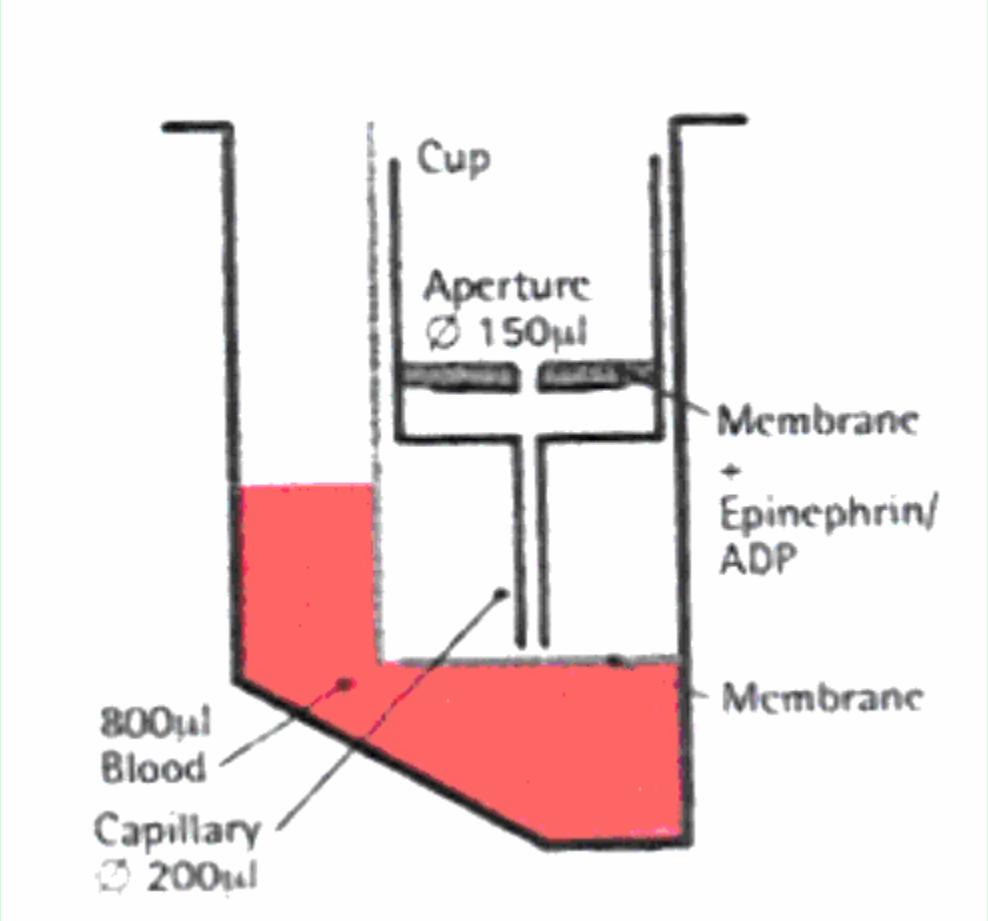
Klinický význam TEM

- Poskytuje informaci o
  - tvorbě trombinu indukované aktivací vnějšího nebo vnitřního koagulačního systému
  - obsahu fibrinogenu a trombocytů
  - odpovídající polymerizaci sraženiny
  - rozpouštění fibrinu
- Výhody
  - jednoduchost provedení vyš. z plné citrátové krve
  - dostupnost výsledku v krátkém časovém intervalu
- Nevýhody
  - použití k hrubé orientaci o stavu hemostázy
  - zejména k akutní analýze na operačních sálech a jednotkách intenzivní péče

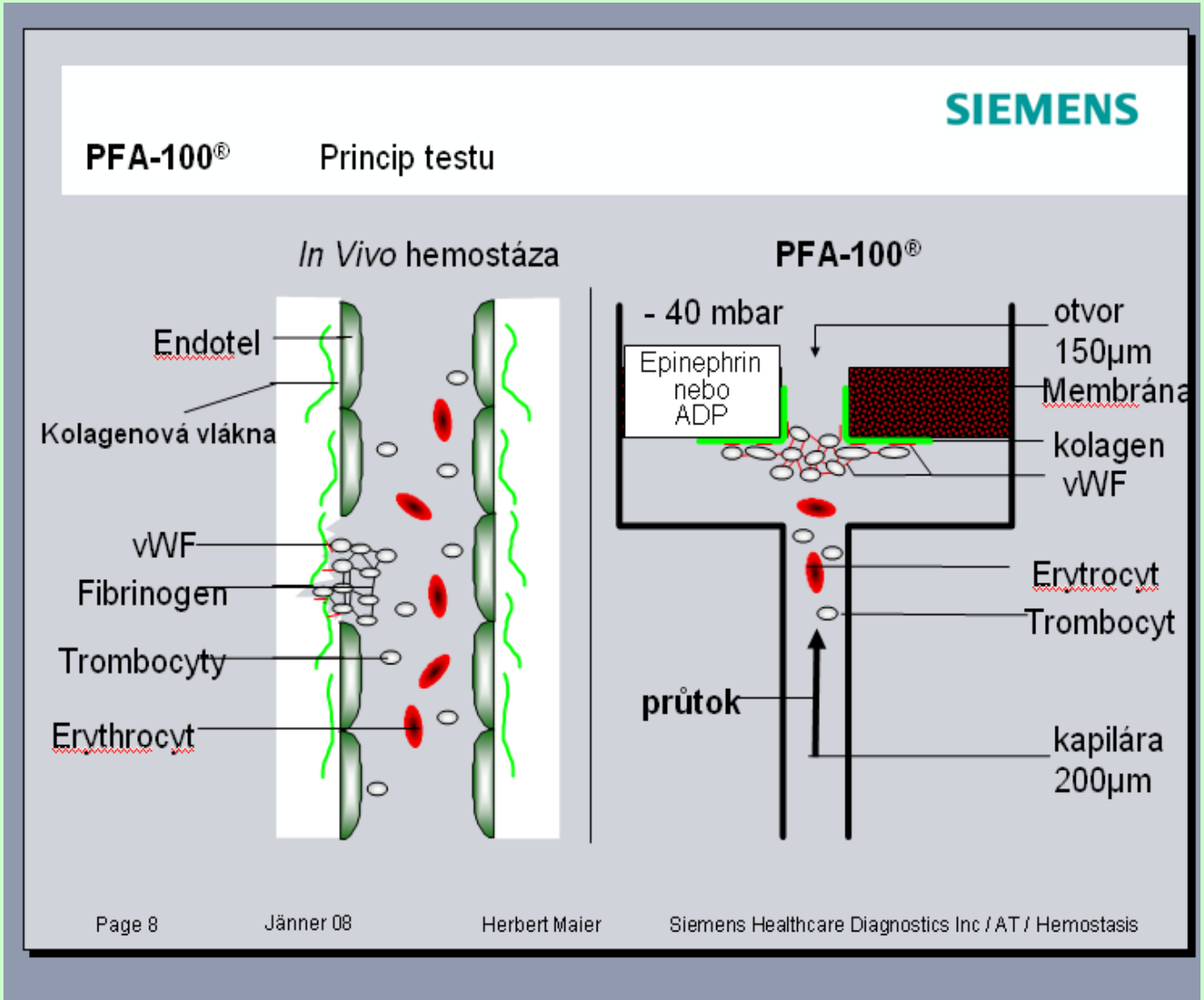
Vyšetření PFA

- kvantitativní měření primární hemostázy zahrnující adhezi, degranulaci a tvorbu hemostatické zátky měřené v citrátové plné krvi
- sledování tvorby destičkového trombu, který postupně vyplňuje otvor v membráně
  - potažené bud kolagenem a epinefrinem
  - nebo kolagenem a ADP
- výsledek je čas potřebný k dosažení kompletního uzávěru otvoru membrány

Vyšetření PFA



Vyšetření PFA



PFA - klinický význam

- ➔ přeoperační screening
- ➔ diagnostika vrozených a získaných trombocytopatií
- ➔ diagnostika vWF choroby (typ 1)
- ➔ sledování účinnosti léčby

Trombin generační test (TGT, TGA)

- Globální test hemostázy
  - speciální přístroj fluorometr
  - vyšetření citrátové plazmy (PPP nebo PRP)
- Princip
  - k vyšetř. plazmě je přidán fluorogenní substrát
  - trombin vznikající aktivací koagulační kaskády směsí PL (jen u PPP), TF a Ca^{2+} přeměňuje fluorogenní substrát na fluorofor, jehož signál je zaznamenáván fluorometrem
  - při měření pacienta musí být použit trombinový kalibrátor

Ceveron®Alpha (Technoclone, Medista)

Grafické znázornění průběhu TGA

• **Lag Phase** (iniciační fáze) **[min]**
čas aktivace koagulačního systému

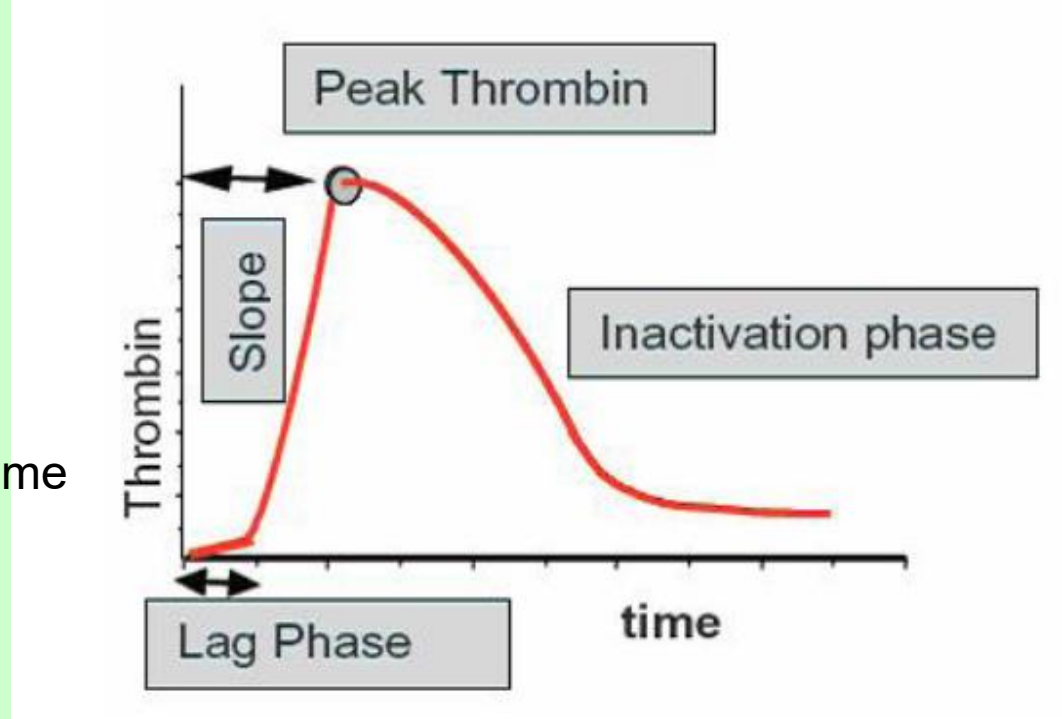
• **Peak time [min]**

• **Peak Thrombin** (výška píku) **[nM]**
maximální koncentrace trombinu

• **Velocity Index** (Slope) **[nM/min]**
strmost křivky=peak thrombin / peak time

• **Inactivation phase**
pokles tvorby trombinu

• **Area Under the Curve** (AUC – plocha pod křivkou) **[nM]**
celkové množství vygenerovaného trombinu



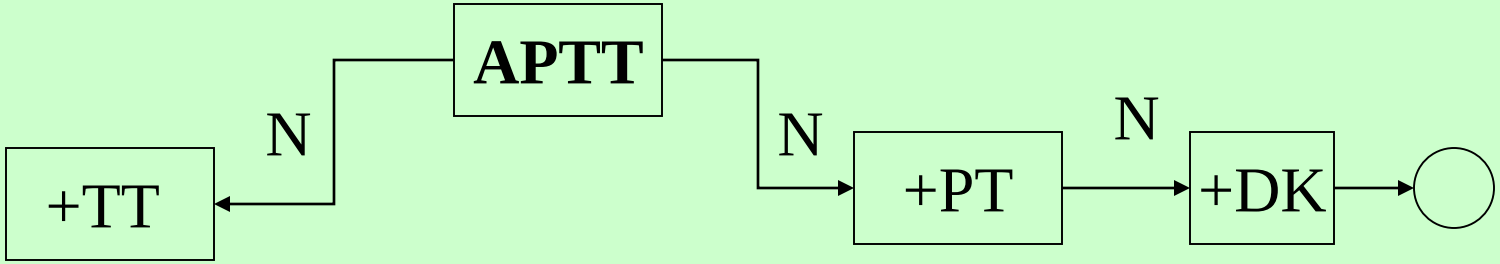
TGT – klinický význam

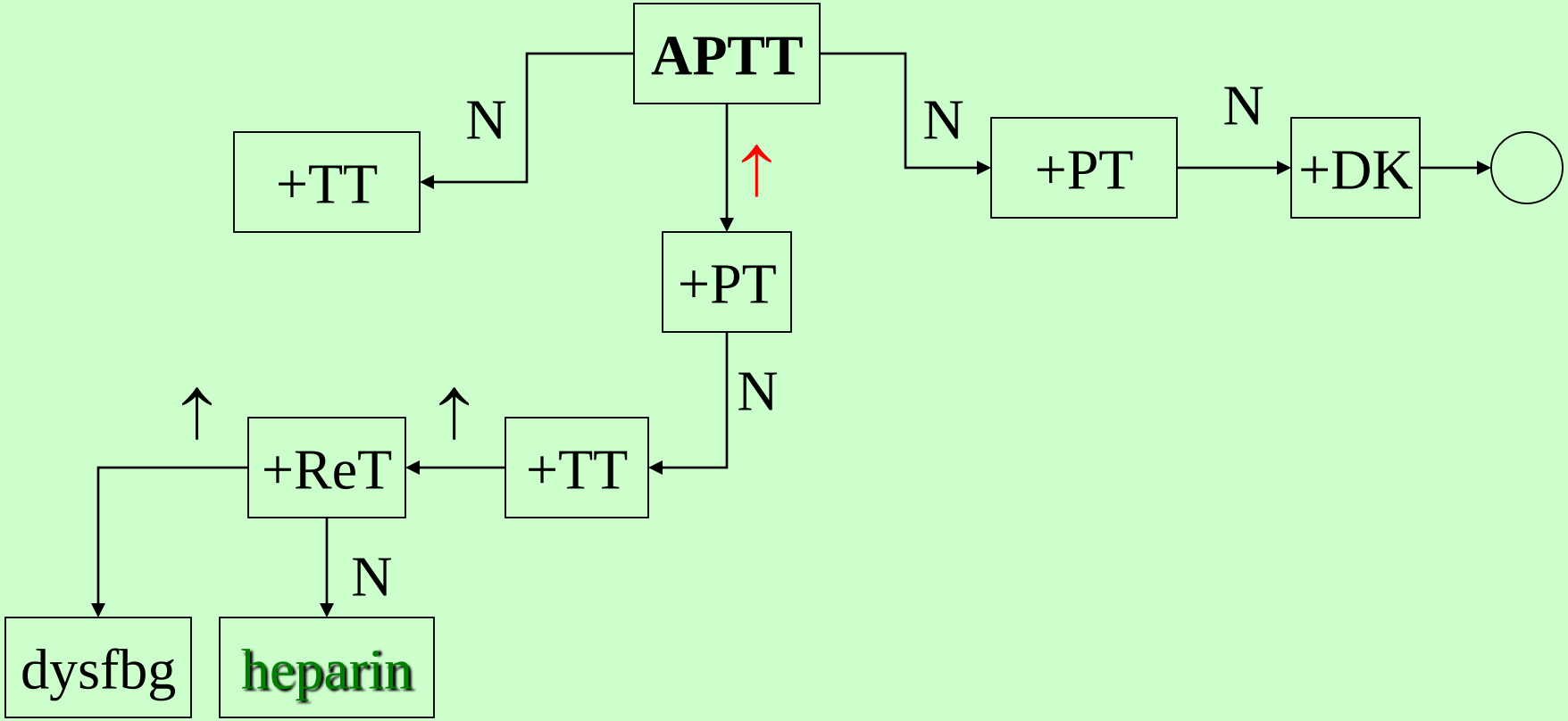
- vhodná metoda pro posouzení globální funkce hemostázy
- získání úplného obrazu trombotické či krvácivé tendence u pacientů
  - s vysokým rizikem trombózy
  - s vysokým rizikem krvácení přínosná při
- využití při monitorování léčby hemofiliků s inhibitorem, monitorování antikoagulační léčby

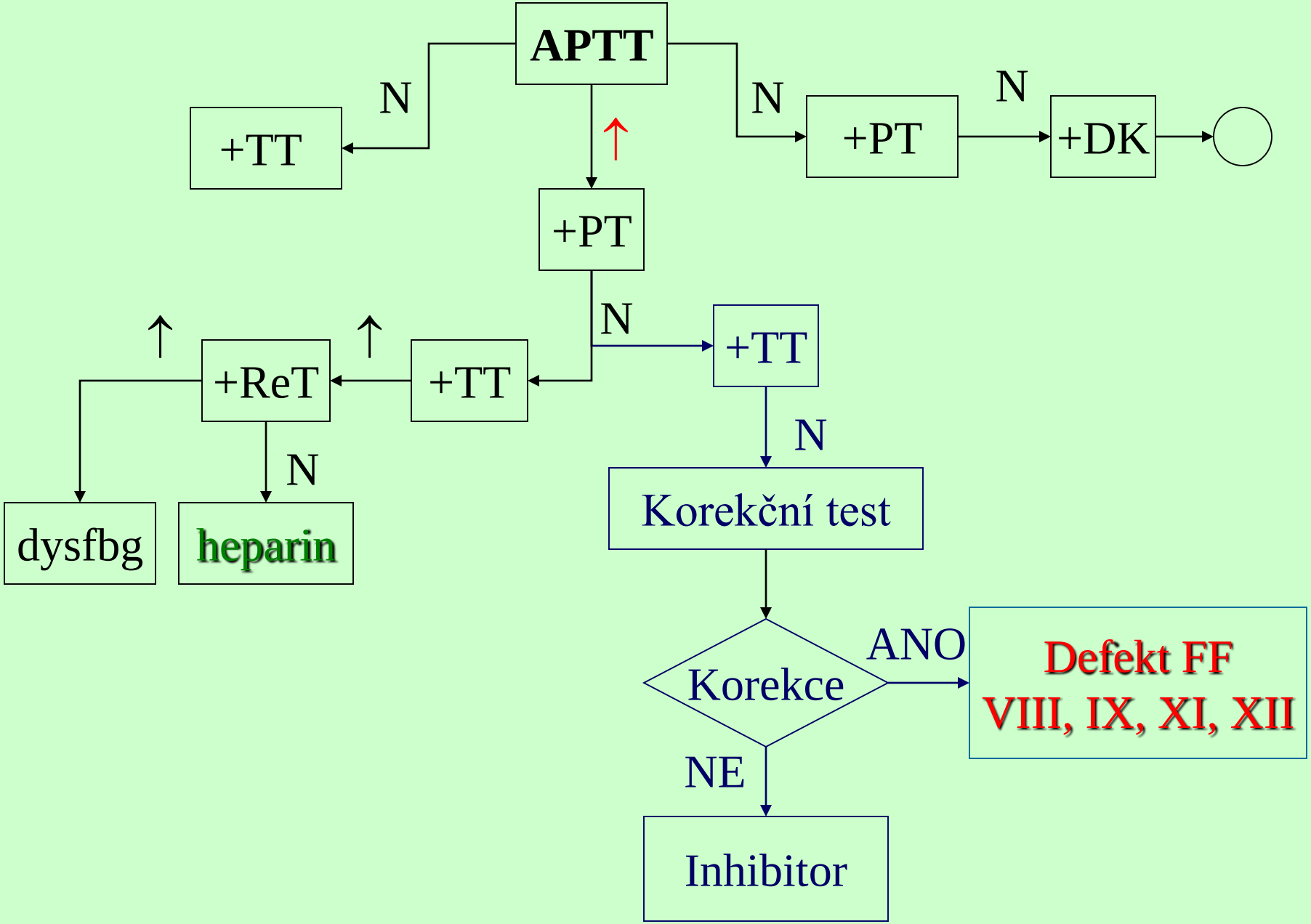
Konzumpce protrombinu

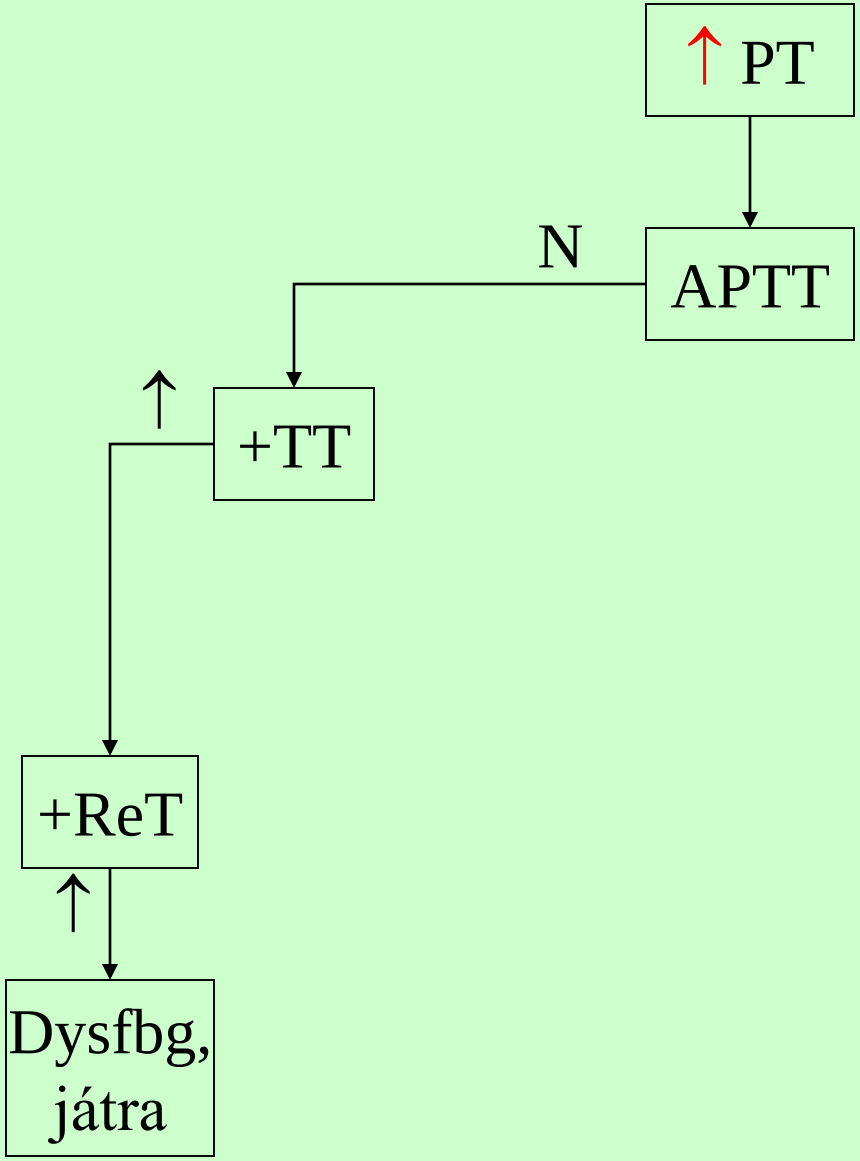
- vyšetření destičkové i plazmatické funkce krve
- stanovuje se zbytkové množství protrombinu v séru po vysrážení krve za standartních podmínek
  - odběr (3 skleněné zkumavky, množství krve)
  - zpracování (ihned po odběru)
  - 4 hodiny 37 °C
  - vlastní vyšetření zbytkového protrombinu v séru
    - inkubace séra s Ca^{2+}tromboplastinem
    - stanovení koagulačního času po přídavku fibrinogenu (norma > 30 s)

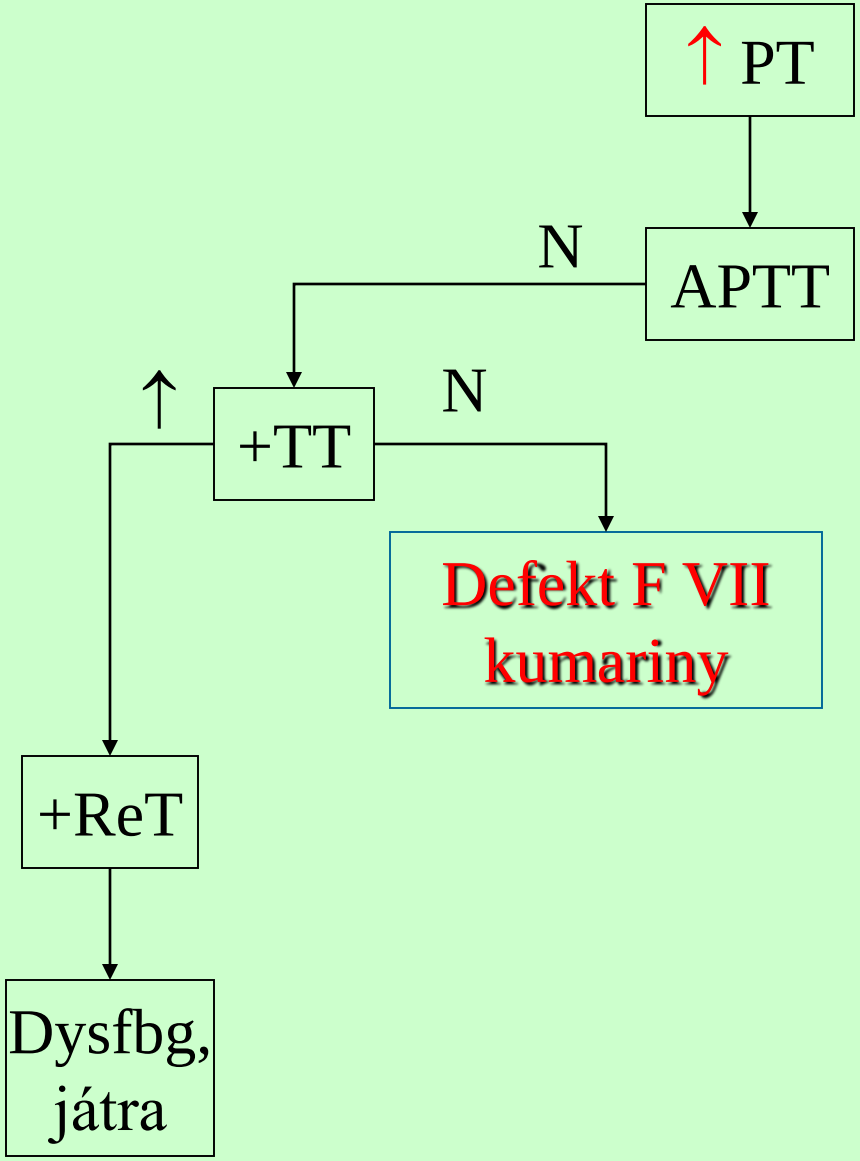
Interpretace základních koagulačních testů

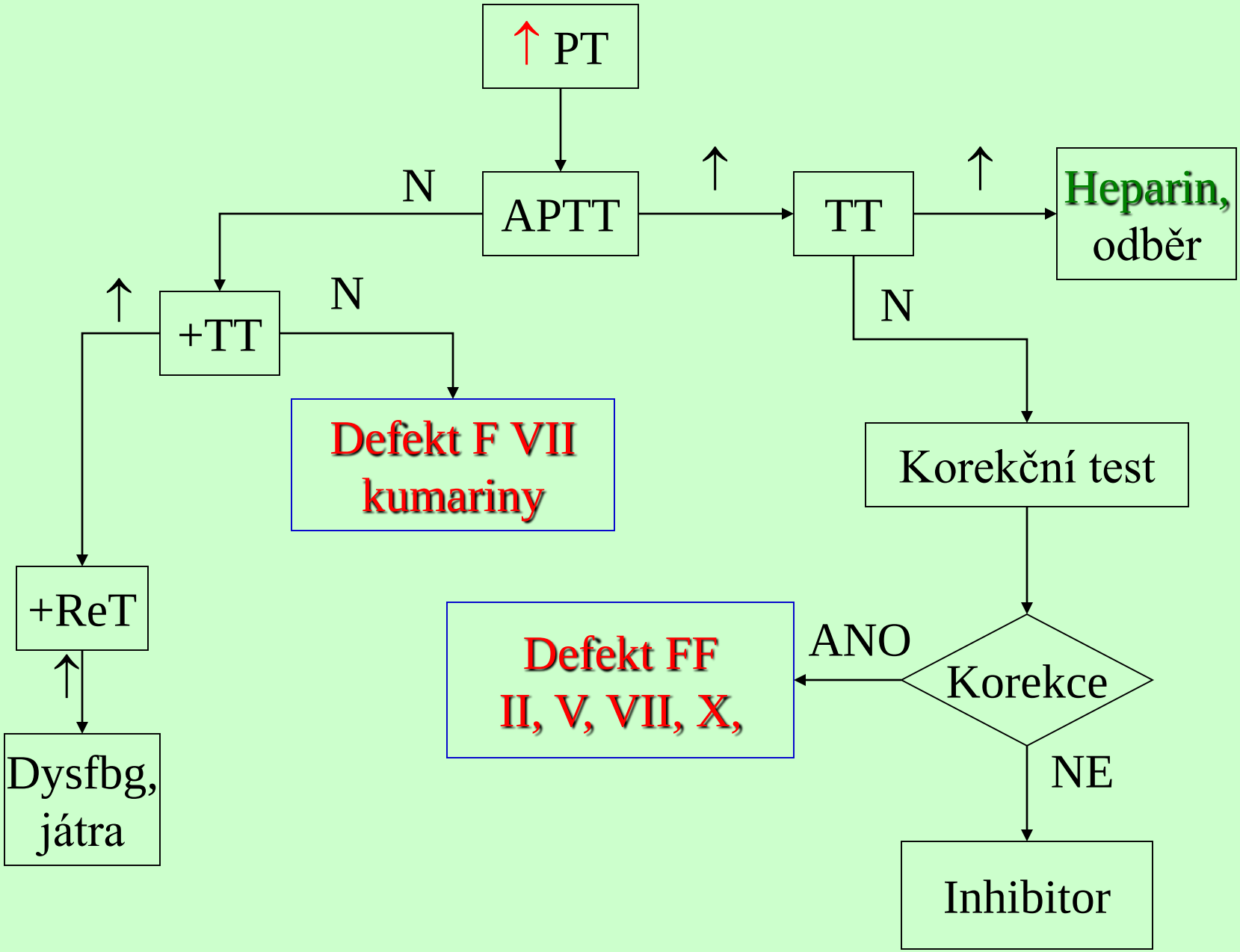

APTT
N
+TT
N
+PT
N
+DK

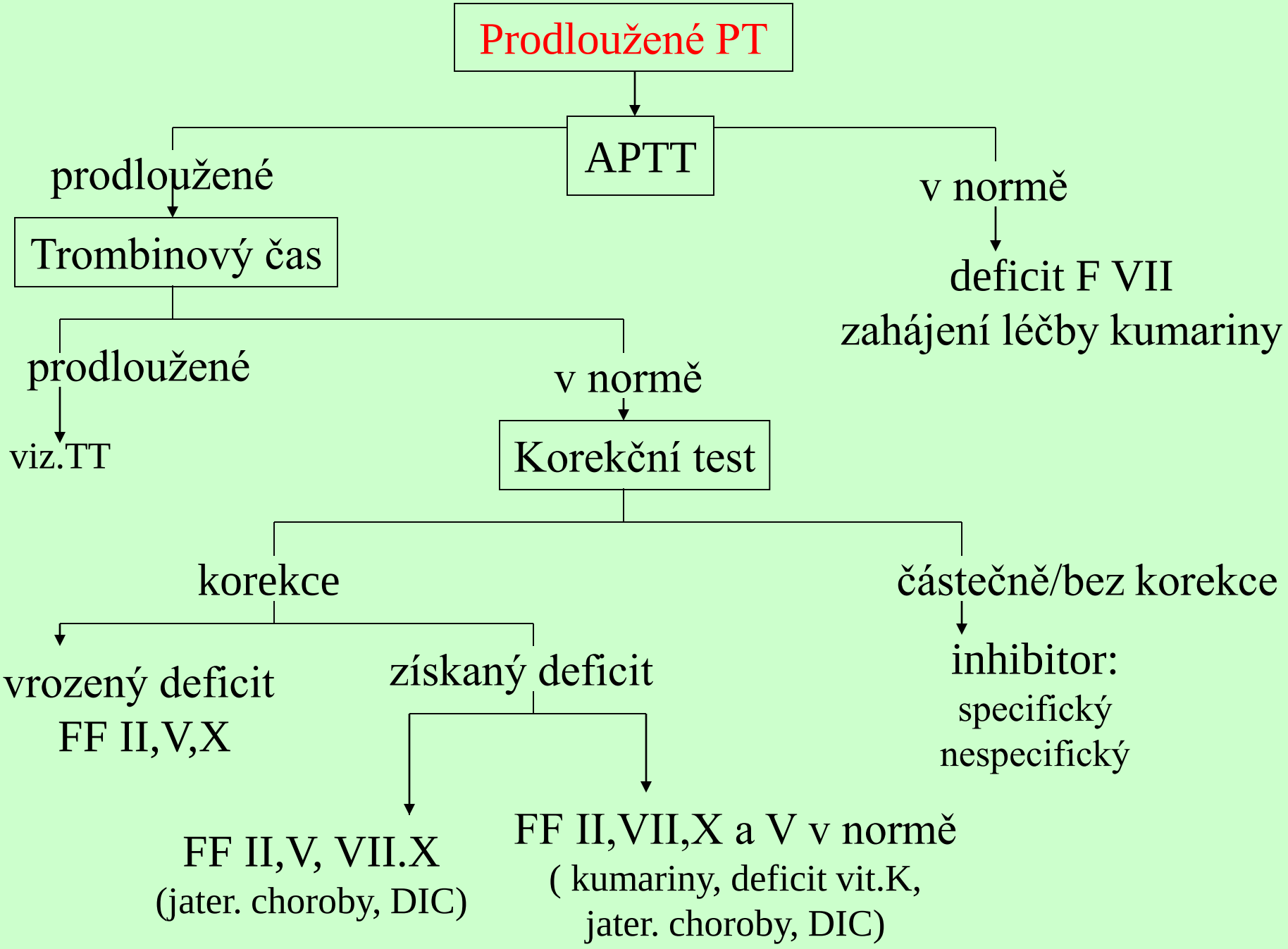

APTT
N
+TT
N
+PT
N
+DK
+PT
N
+TT
+ReT
N
dysfbg
heparin

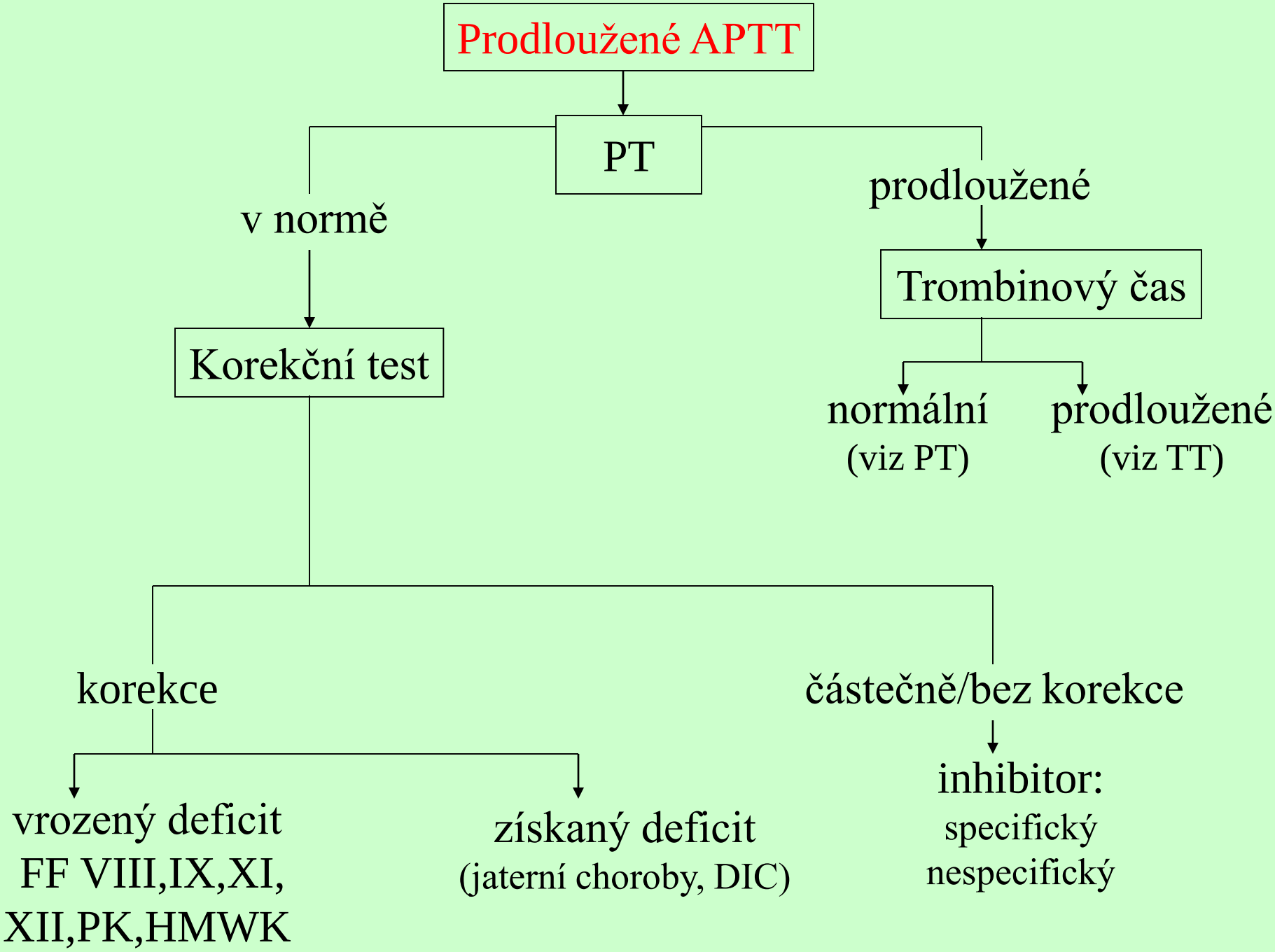

APTT
N
+TT
N
+PT
N
+DK
+PT
N
+TT
+TT
+ReT
N
dysfbg
heparin
N
Korekční test
Korekce
ANO
Defekt FF
VIII, IX, XI, XII
NE
Inhibitor

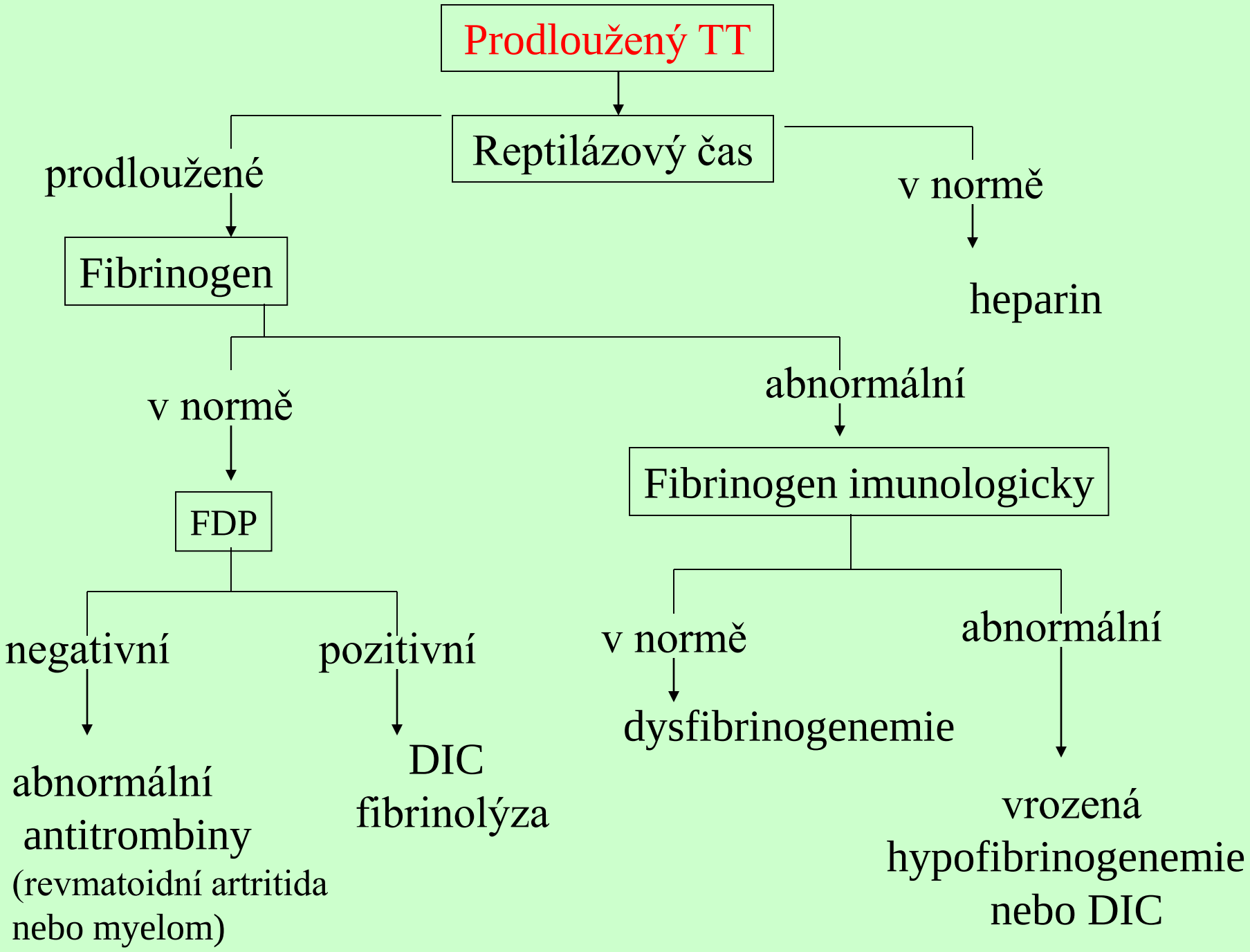

↑ PT
N
APTT
↑
+TT
+ReT
↑
Dysfbg,
játra

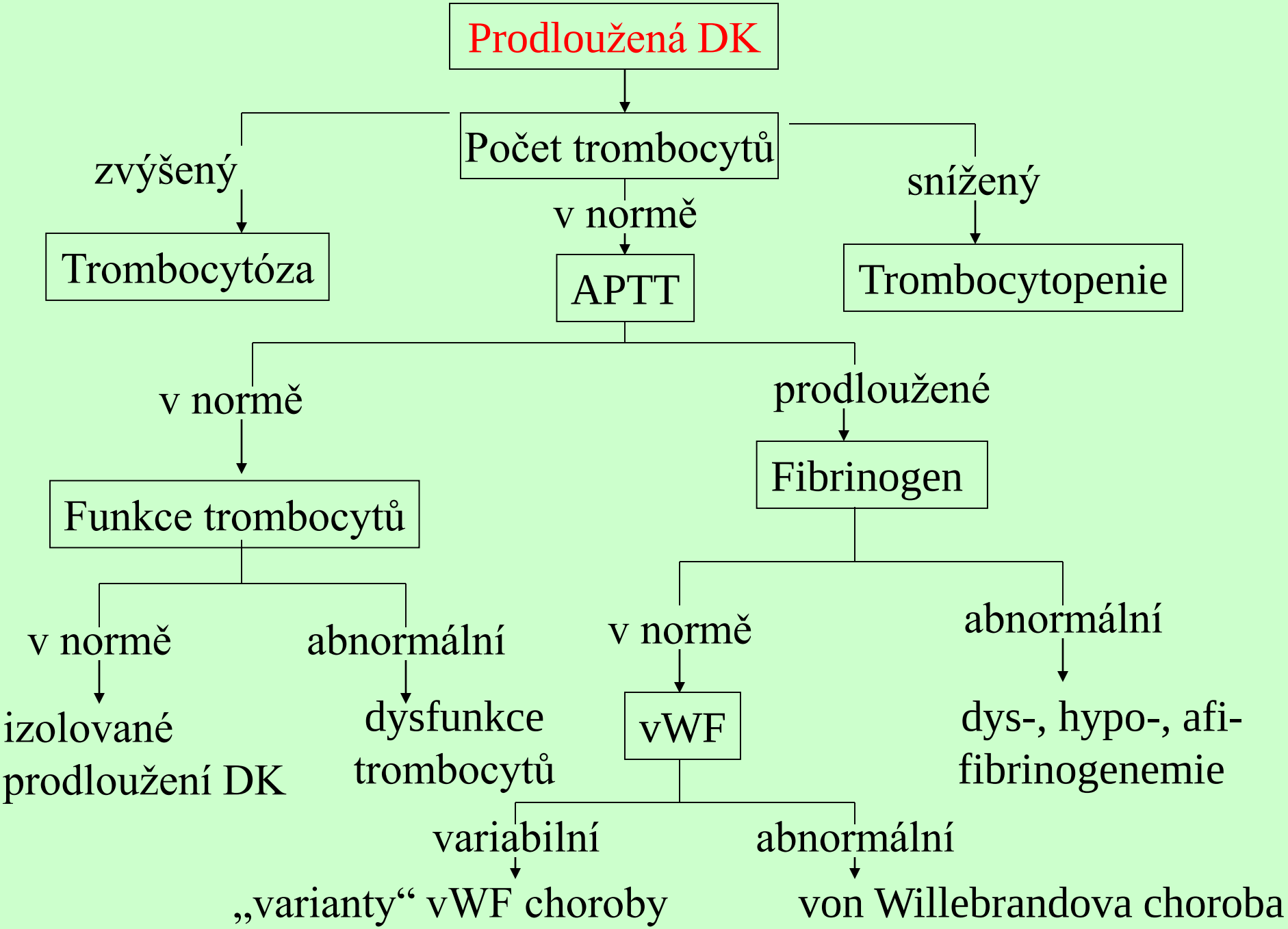

↑ PT
APTT
N
+TT
↑
N
Defekt F VII
kumariny
+ReT
Dysfbg,
játra


↑ PT
N
APTT
↑
TT
↑
Heparin,
odběr
↑
+TT
N
N
Defekt F VII
kumariny
Korekční test
+ReT
Defekt FF
II, V, VII, X,
ANO
Korekce
Dysfbg,
játra
NE
Inhibitor


Prodloužené PT
APTT
prodloužené
v normě
Trombinový čas
deficit F VII
zahájení léčby kumariny
prodloužené
v normě
viz.TT
Korekční test
korekce
částečně/bez korekce
vrozený deficit
FF II,V,X
získaný deficit
inhibitor:
specifický
nespecifický
FF II,V, VII.X
(jater. choroby, DIC)
FF II,VII,X a V v normě
(kumariny, deficit vit.K,
jater. choroby, DIC)


Prodloužené APTT
PT
v normě
prodloužené
Korekční test
Trombinový čas
normální
(viz PT)
prodloužené
(viz TT)
korekce
částečně/bez korekce
vrozený deficit
FF VIII,IX,XI,
XII,PK,HMWK
získaný deficit
(jaterní choroby, DIC)
inhibitor:
specifický
nespecifický


Prodloužený TT
Reptilázový čas
prodloužené
v normě
heparin
Fibrinogen
v normě
abnormální
FDP
Fibrinogen imunologicky
negativní
pozitivní
v normě
abnormální
dysfibrinogenemie
abnormální antitrombiny (revmatoidní artritida nebo myelom)
DIC fibrinolýza
vrozená hypofibrinogenemie nebo DIC


Prodloužená DK
Počet trombocytů
zvýšený
Trombocytóza
v normě
APTT
snížený
Trombocytopenie
v normě
Funkce trombocytů
prodloužené
Fibrinogen
v normě
izolované prodloužení DK
abnormální
dysfunkce trombocytů
v normě
vWF
abnormální
dys-, hypo-, afi-fibrinogenemie
variabilní
„varianty“ vWF choroby
abnormální
von Willebrandova choroba

PT	APTT	TT
norma	norma	norma

➔ A) + **trombo** i **DK** norma

Příčiny:

- **inic. DIC**

Doplňující vyšetření:

- **AT**

➔ B) +↑**DK**, **trombo** norma

Příčiny:

- **v.Willebr. choroba**
- **trombastenie, jiné trombocytopatie**

Doplňující vyšetření:

- **F VIII, vWF:RCo/Ac, vWF:Ag**
- **funkce trombo**

➔ C) +↓ **trombo**, **DK** N/↑

Příčiny:

- **trombocytopenie**
- **trombocytopatie**
- **inic. DIC**

Doplňující vyšetření:

- **počet trombo**
- **vyšetření funkce trombo**

PT	APTT	TT
patol	norma	norma

Příčiny:

- snížení F VII
- snížení FF protrombin. komplexu
- kumariny
- novorozenec

Doplňující vyšetření:

- F VII
- anamnéza, další vyš. (biochem.)
- anamnéza

PT	APTT	TT
norma	patol	norma

Příčiny:

- snížení FF F VIII,IX,XI,XII
- v.Willebr. choroba
- specifický/nespecifický inhibitor
- novorozenec

Doplňující vyšetření:

- F VIII, IX, XI, XII
- F VIII,VWF:RCo/Ac,VWF:Ag
- průkaz inhibitoru

PT	APTT	TT
norma	norma	patol

Příčiny:

- heparin
- poruchy polymerizace fibrinu
- dysfibrinogenémie

Doplňující vyšetření:

- reptilázový čas
- fibrinogen, FDP
- fibrinogen (LIA)

PT	APTT	TT
patol	patol	norma

Příčiny:

- komplexní koag. porucha různé geneze
- snížení FF II, V, X
- inhibitor F V
- léčba kumariny
- novorozenec

Doplňující vyšetření:

- fibrinogen, trombocyty, D-Dimery, bioch.
- F II, V, X
- průkaz inhibitoru
- anamnéza

PT	APTT	TT
patol	norma	patol

Příčiny:

- kombinovaná koagulopatie

Doplňující vyšetření:

- fibrinogen, FF, FDP, biochemie

PT	APTT	TT
norma	patol	patol

Příčiny:

- heparin
- kombinovaná koagulopatie

Doplňující vyšetření:

- reptilázový čas
- FF, fibrinogen

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