

Koagulace - principy testů

– teoretická část výuky 2023

→ **6.4.2023 – 3 hod (12.00 – 14.50 hod, přednášky)**

povinné pro absolventy Bc z jiných fakult než LF MU!

- principy vyšetření hemostázy, preanalýza
- kalibrace a kontroly v koagulační laboratoři

→ **13.4.2023 – 2 hod (7.00 - 8.50 hod, cvičení)**

- základní koagulační testy
- rutinní a globální koagulační testy
- interpretace výsledků

→ **20.4.2023 - 2 hod (7.00 - 8.50 hod, cvičení)**

- speciální koagulační testy I

→ **27.4.2023 – 2 hod (7.00 - 8.50 hod, cvičení)**

- speciální koagulační testy II

Koagulace – cvičení

- praktická část výuky 2023

→ 13.4.2023 – 2 hod (9,00 – 10.50 hod)

↘ Skupina 1

- Kalibrace a praktické provedení základních koagulačních vyšetření - **Protokol č.1**

↘ Skupina 2

- Interpretace výsledků rutinních koagulačních testů - **Protokol č.2**
- Monitorování antitrombotické léčby - **Protokol č.4**

↘ Skupina 3

- Vyšetření agregace trombocytů - **Protokol č.3**

→ 20.4.2023 – 2 hod (9,00 – 10.50 hod)

↘ Skupina 1

- Vyšetření agregace trombocytů - **Protokol č.3**

↘ Skupina 2

- Kalibrace a praktické provedení základních koagulačních vyšetření - **Protokol č.1**

↘ Skupina 3

- Interpretace výsledků rutinních koagulačních testů - **Protokol č.2**
- Monitorování antitrombotické léčby - **Protokol č.4**

→ 27.4.2023 – 2 hod (9,00 – 10.50 hod)

↘ Skupina 1

- Interpretace výsledků rutinních koagulačních testů - **Protokol č.2**
- Monitorování antitrombotické léčby - **Protokol č.4**

↘ Skupina 2

- Vyšetření agregace trombocytů - **Protokol č.3**

↘ Skupina 3

- Kalibrace a praktické provedení základních koagulačních vyšetření - **Protokol č.1**

Zápočet - koagulace

→ Podmínky zápočtu

↘ účast praktika

↘ odevzdání protokolů 1,2,3,4

Praktická zkouška koagulace

- Kalibrace rutinních a speciálních koagulačních vyšetření – kalibrační křivka, odečet
- Interpretace výsledků koagulačních testů
 - ↘ PT, APTT, Fbg, TT, AT, D-Di
- Zkušební otázka z laboratorní hematologie

Principy vyšetření hemostázy, preanalýza

Jiřina Zavřelová

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

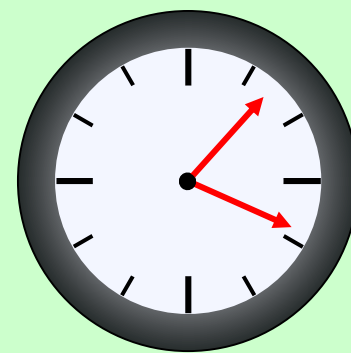
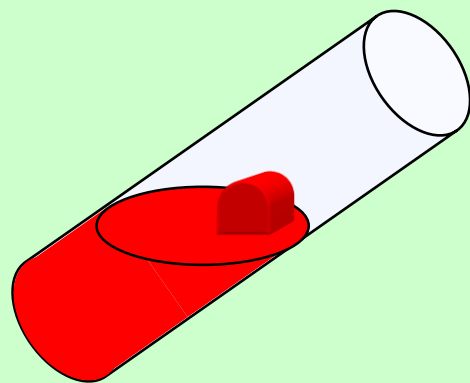
↘ sledování času srážení (srážlivá plná krev)

- bez přídavku aktivátoru/aktivovaná doba srážení (ACT)
 - manuálně (kývání)
 - POCT (přenosné přístroje point-of-care)

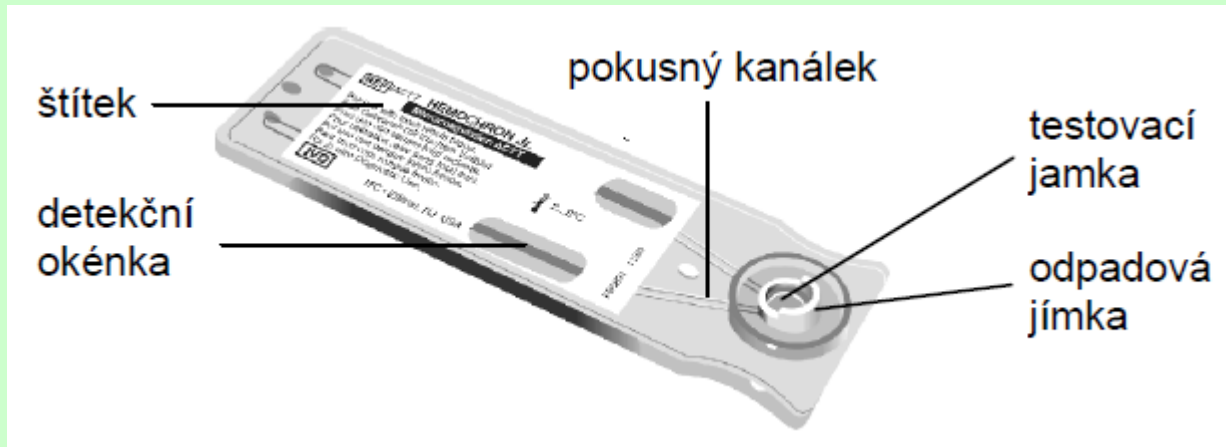
↘ sledování času vytvoření fibrinového vlákna

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

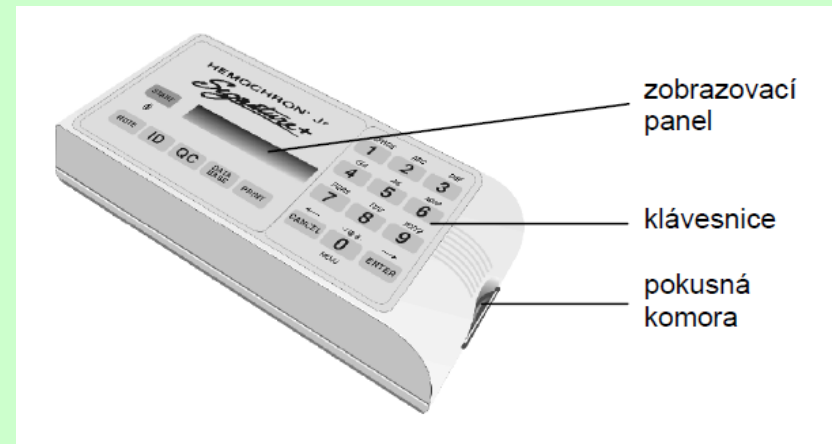
Doba srážení- manuální metoda



POCT –ACT (HEMOCHRON)

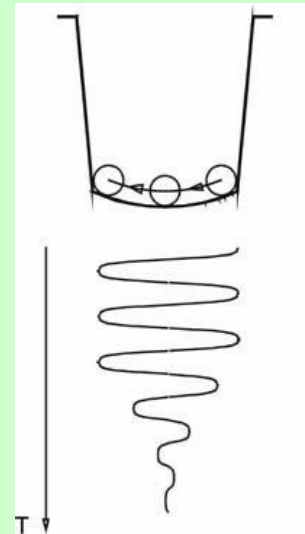
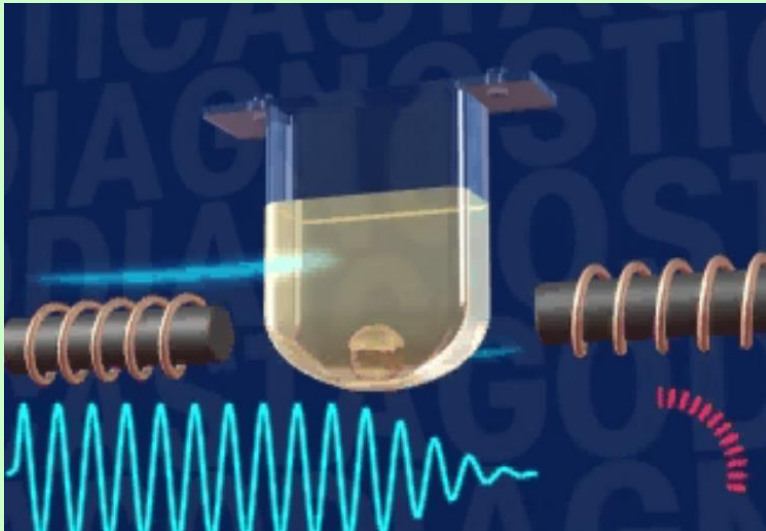


- ➔ Odkápnutí krve do testovací jamky jednorázové květy s reagensy (aktivátor) a vložení do pokusné komory
- ➔ Pohyb vzorku po smíchání vzorku s reagensy v pokusném kanálku předurčenou rychlostí
- ➔ Začátek tvorby koagula je detegován na základě zpomalení toku vzorku v pokusném kanálku mezi optickými detektory LED



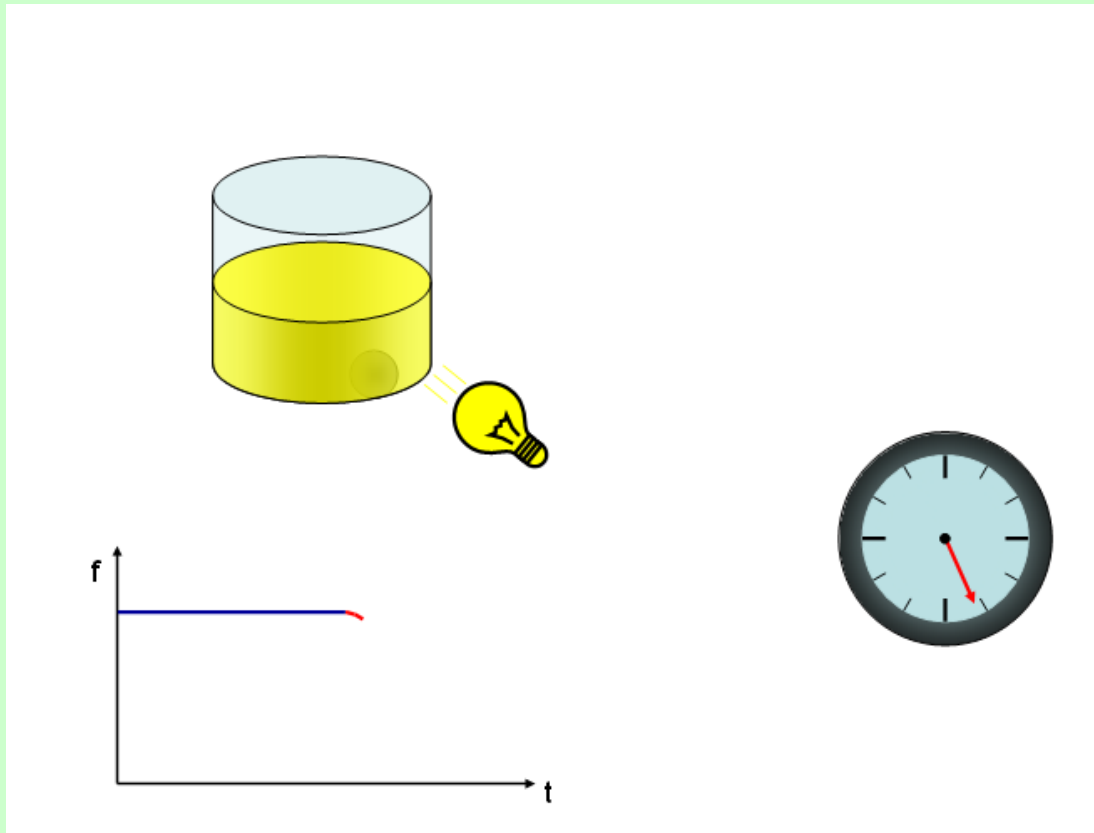
Mechanické koagulometry Stago

- Měření odchylky oscilační amplitudy kuličky
- Při stálé vizkozitě – stálé kyvadlové houpání kuličky díky dvěma zahnutým kolejničkám na dně kyvet a elektromagnetickému poli vytvářenému na obou stranách (cívky)
- Zmenšení amplitudy – nárůst vizkozity – jev koagulace. Na základě změny amplitudy se stanovuje koagulační čas.



Mechanický koagulometry Benk

- Sledování změny frekvence (f) průchodů rotující kuličky v kyvetě pomocí optického senzoru

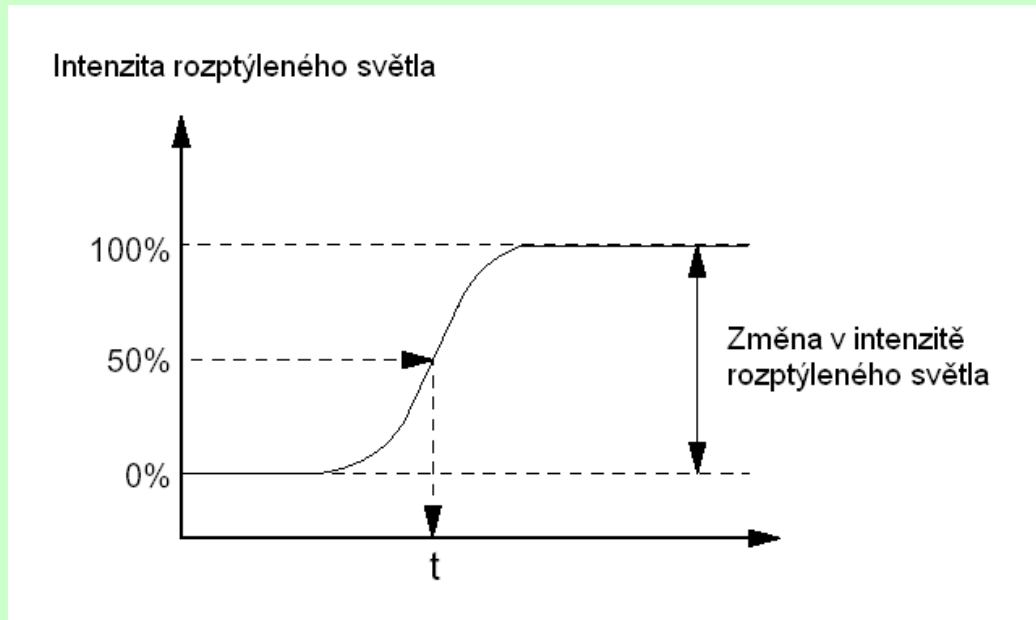


Optické koagulometry

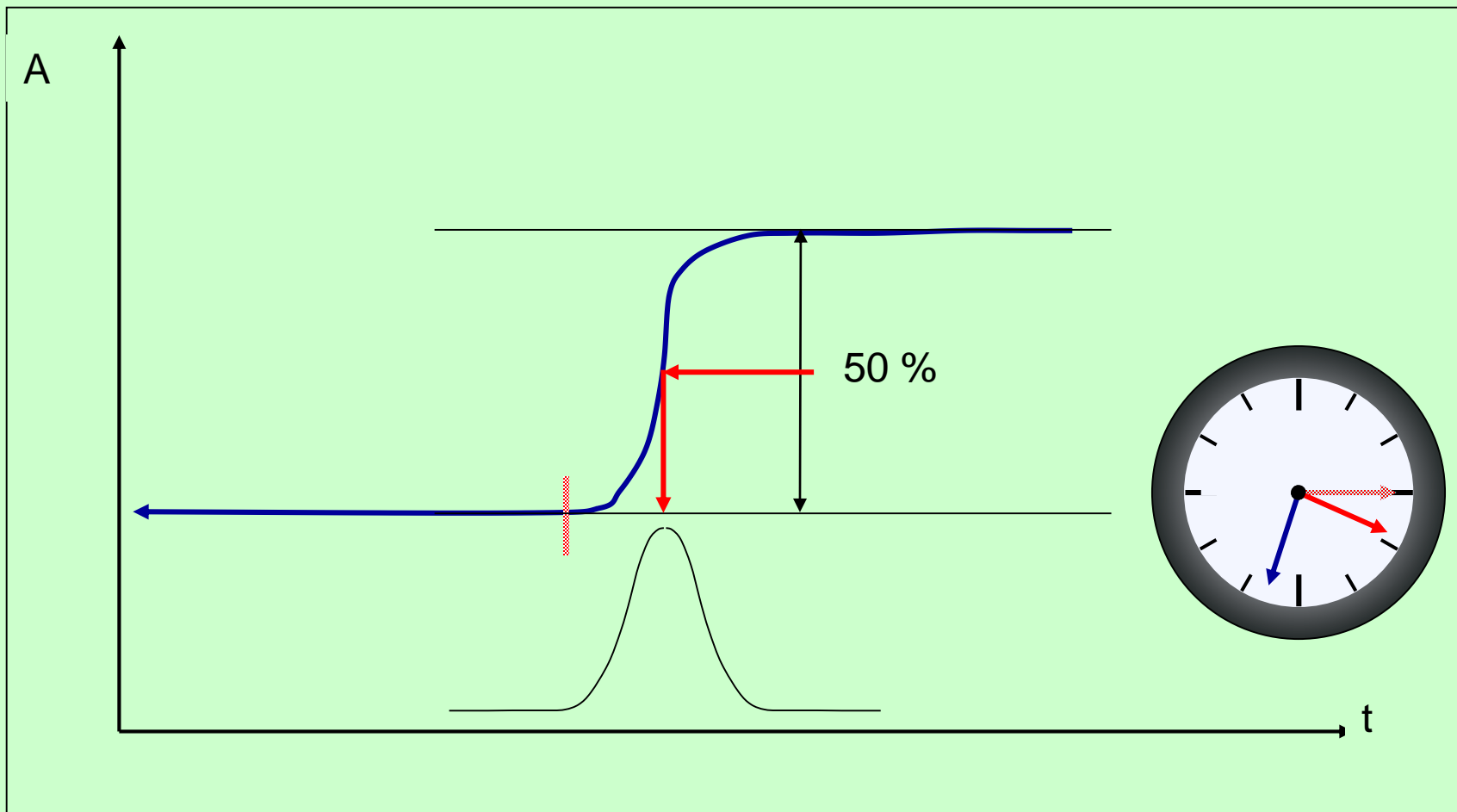
- Detekce koagulačního času
 - ↘ Procentuální detekce
 - ↘ Derivace křivky
 - ↘ Vyhodnocení počáteční rychlosti

Procentuální detekce

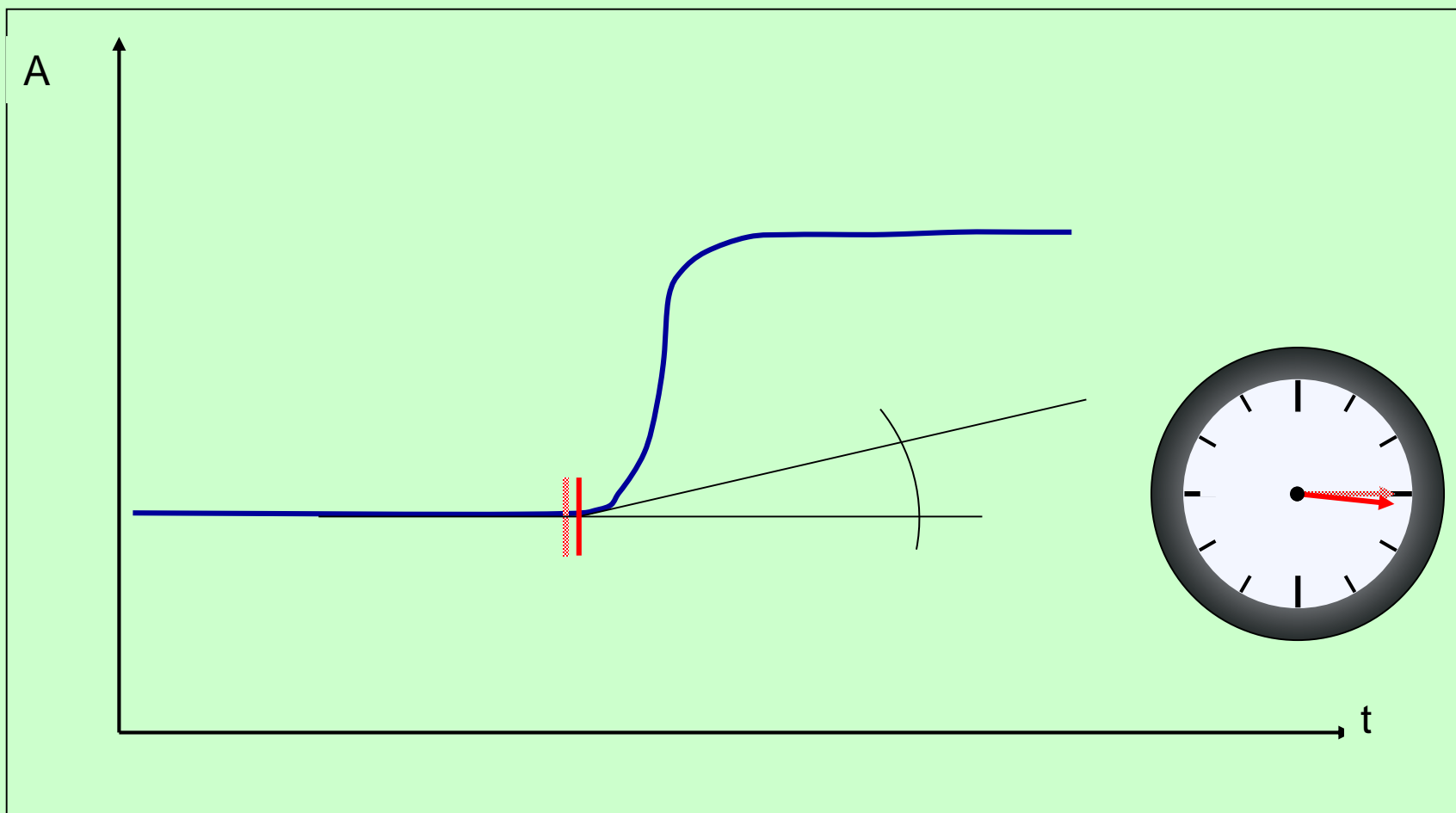
- Intenzita rozptýleného světla po přidání reagencie před začátkem procesu koagulace je definována jako 0%
- Intenzita rozptýleného světla po ukončení procesu koagulace s maximálním zákalem jako 100%
- Koagulační čas pak odpovídá procentuálně definované intenzitě rozptýleného světla z koagulační křivky (např. 50 %)



Rozdíl a derivace



Počáteční rychlost



Dělení testů dle principu

→ Fotometrické - kolorimetrické

↘ 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

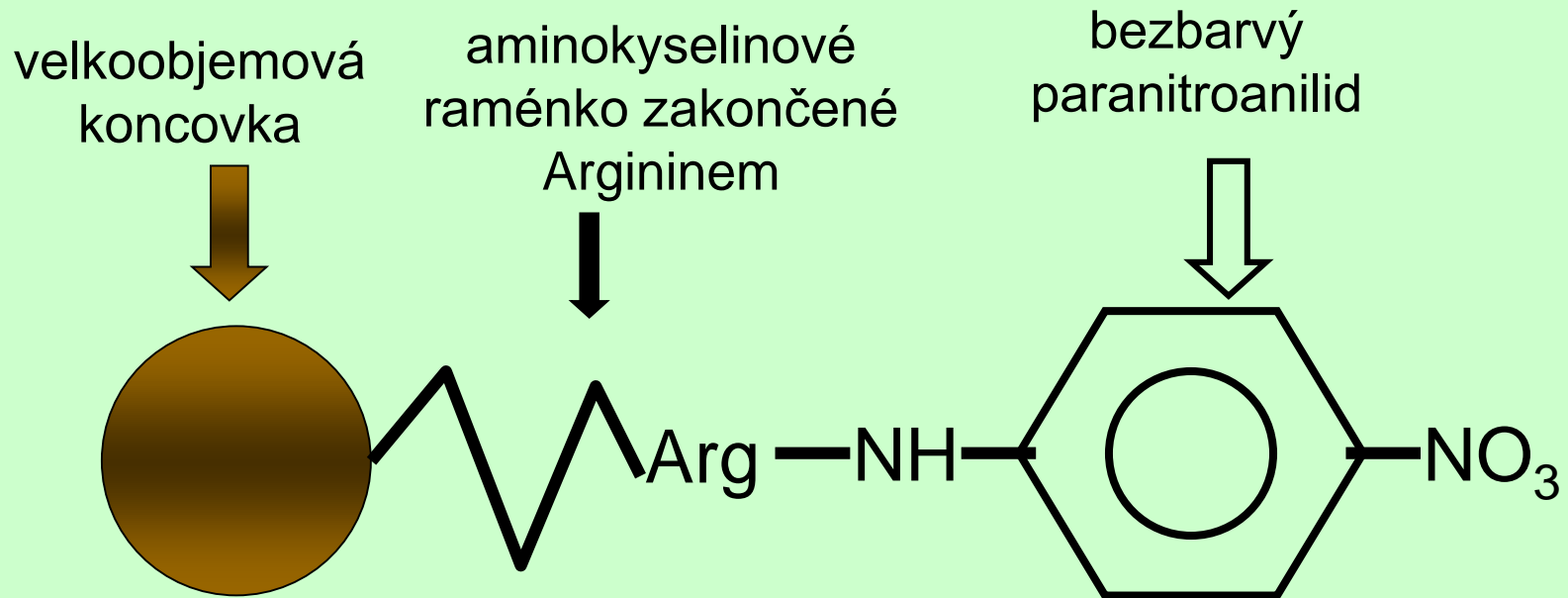
- detekce změn transmise (propustnosti T)

↘ limitace- chylózní vzorky

Kolorimetrické testy

→ Chromogenní substrát

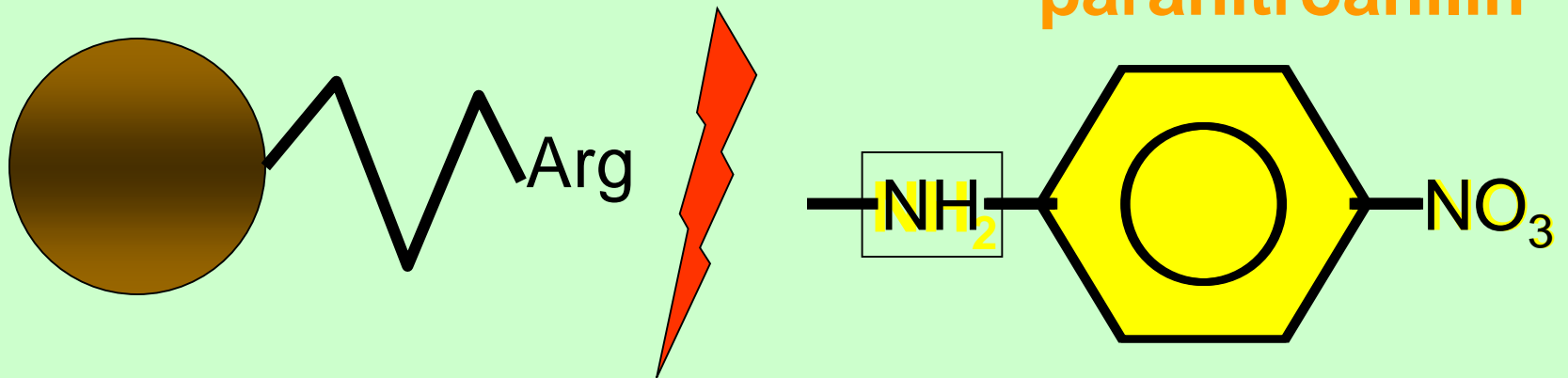
↘ uměle připravený



Kolorimetrické testy

→ Princip

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



Dělení testů dle principu

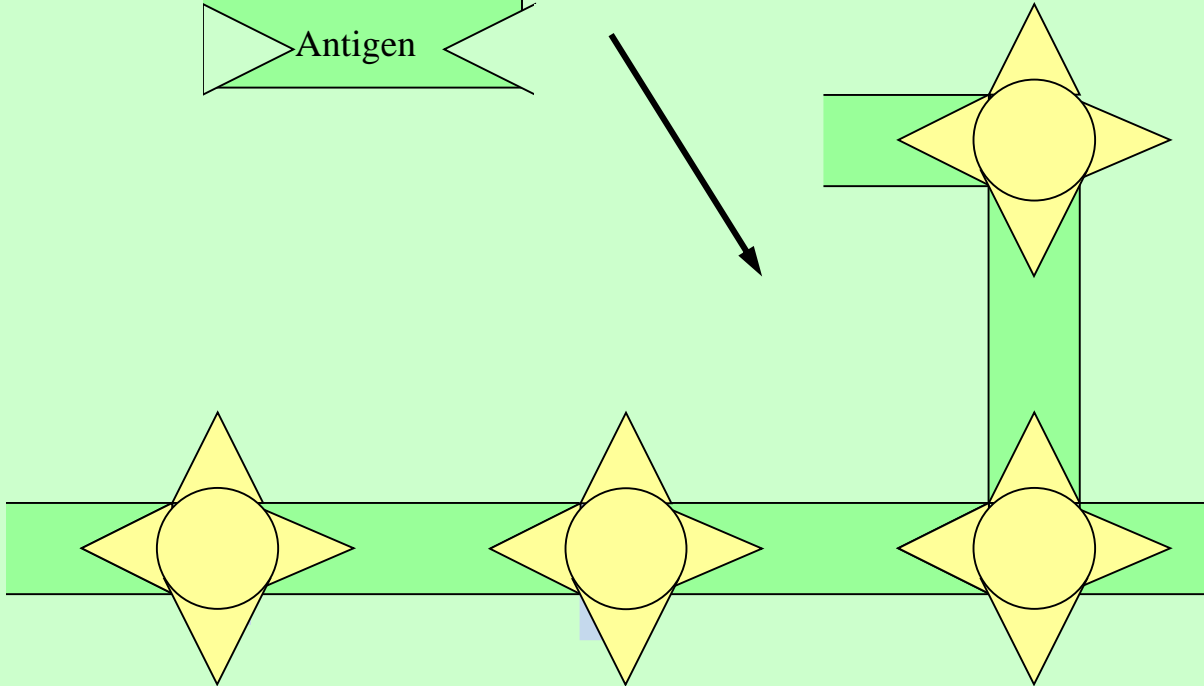
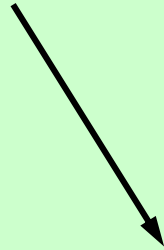
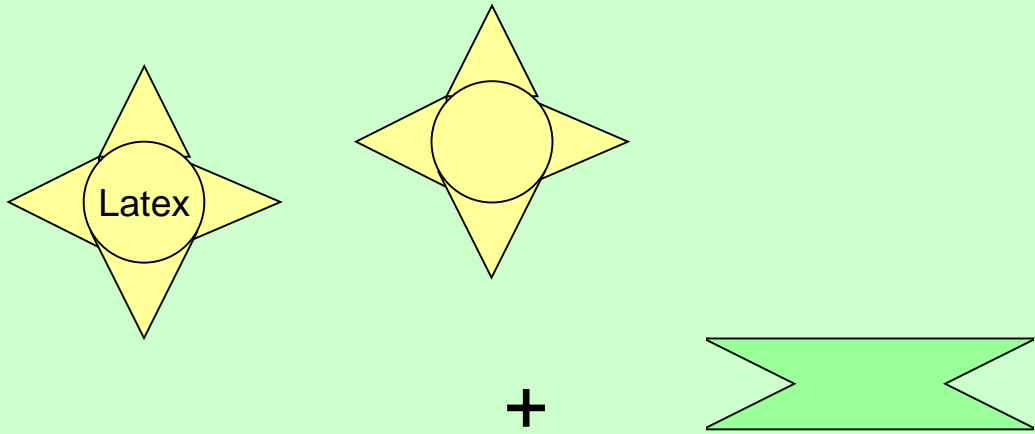
→ Imunochemické

↘ 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

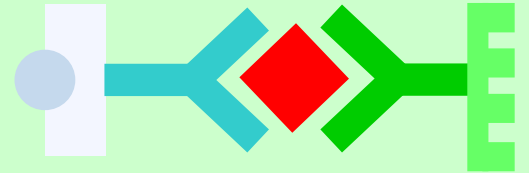
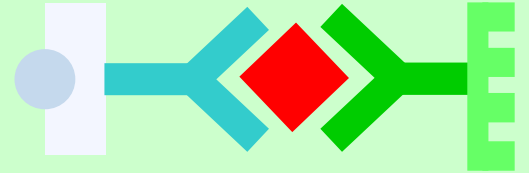
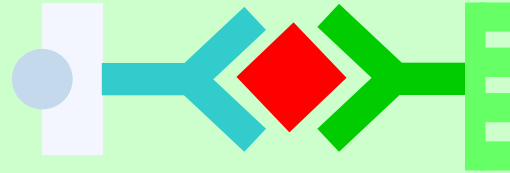
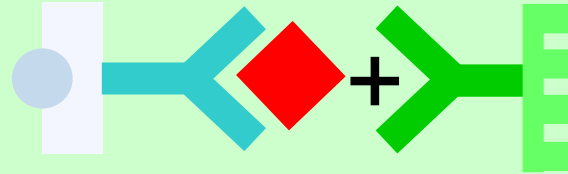
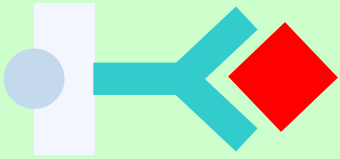
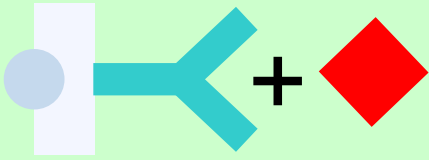
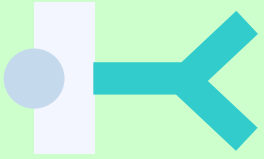
Mez detekce = 0,5 mg/l	neřaděný vzorek	vzorek řaděný 1:6	výsledek
aglutinace	-	-	< 0,5 mg/l
aglutinace	+	-	> 0,5 mg/l a < 3,0 mg/l
aglutinace	+	+	> 3,0 mg/l

Liquid immunoassay - LIA metody

- Sledování **aglutinace mikrolatexových částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu**
- Odečítání **optickým systémem** koagulometru
 - ↘ Změna zakalení ($\Delta A/\text{min}$) při 540 nm
- **Kvantitativní metody** (např. D-Di, vWF:Ag...)
 - ↘ kalibrační křivka – polynom 3.řádu (vícebodová)
- **Limitace**
 - ↘ Chylozita vzorku
 - ↘ Hookův jev (vysycení protilátky antigenem)

ELISA metody

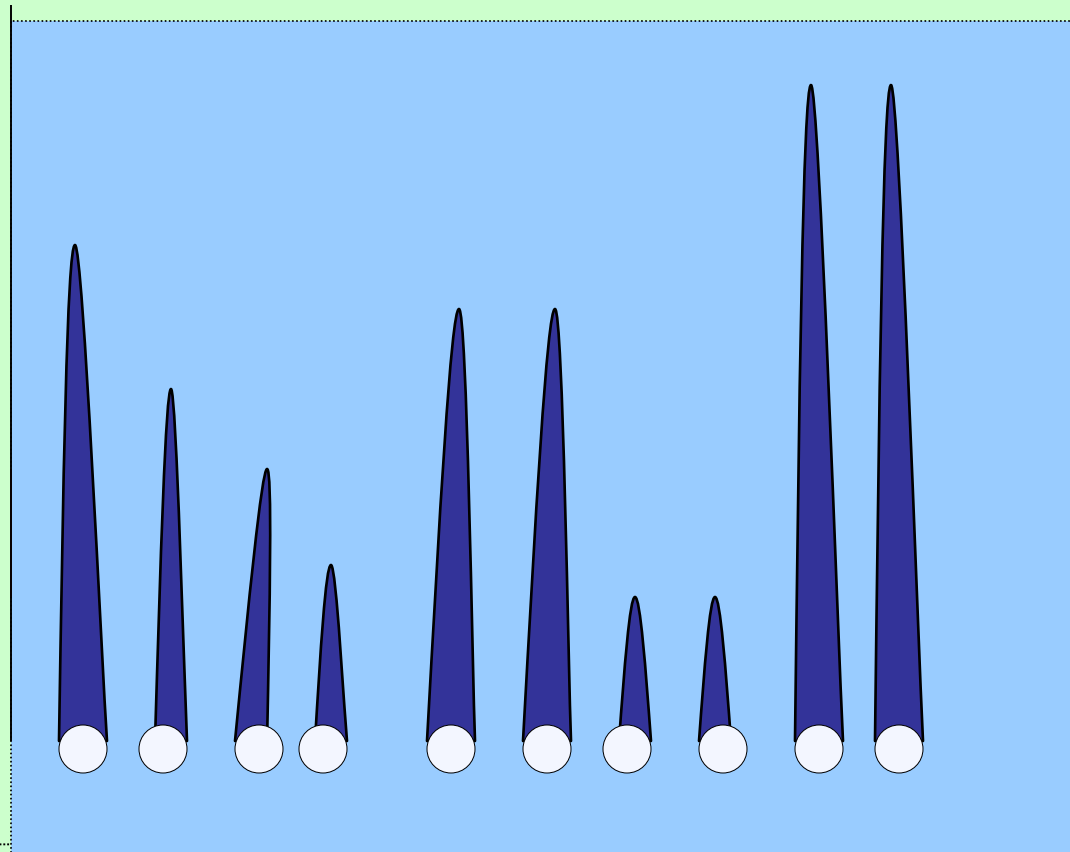
- Stanovení antigenu (Ag) pomocí protilátky (Ab) značené enzymem (AbE) – kvantitativní metody
 - ↘ inkubace vzorku v mikrotitračních jamkách s navázanou Ab proti vyš. Ag - vazba Ag na Ab
 - ↘ odsátí vzorku + promytí
 - ↘ inkubace AbE v jamkách - vazba na Ag
 - ↘ odsátí AbE a promytí
 - ↘ detekce enzymatické 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

→ Odlišení defektů

- ↘ kvalitativních

- ↘ kvantitativních

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)

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%)

↘ méně krve

- prodloužení koagulačních časů
 - APTT citlivé od 90 % objemu
 - PT citlivé od 80 % objemu

↘ více krve

- zkrácení koagulačních časů??

Správný odběr vzorku

→ Hemolytické, ikterické a chylózní

↘ hemolytický a ikterický vzorek

- ovlivňuje výrazně fotometrická stanovení
- při výrazné hemolýze i koagulační stanovení
 - aktivace krevního srážení uvolněním TF

↘ chylózní vzorek

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

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 (max 2 hod)
- Teplota (18-25°C)
- Mechanické vlivy (potrubní pošta)

Zpracování vzorku

- Odstranění krevních buněk centrifugací
- Stažení plazmy
- Většina testů do 1 - 4 hod po odběru
- Výjimka EGT, EF (15 - 30 min), heparin, PAI-1, LA, vyšetření funkcí 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, ultracentrifugace ne)

→ 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 primárních vzorků

- Laboratorní teplota 18 - 25 °C
 - ↘ PT 6 hodin
 - ↘ APTT 4 hodiny
 - ↘ APTT (léčba heparinem) 1 hodinu
 - ↘ Ostatní vyšetření: 4 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
 - ↘ naplněná do 3/4
- Rychlé zamrazení (-70 °C, -196 °C)
- Skladování zamrazených vzorků
 - ↘ krátkodobé -20 °C, dlouhodobé: -70 °C

Rozmrazování vzorků

- Při 37 °C min 5 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