

Speciální koagulační vyšetření I

Zavřelová J.

Koagulační faktory

→ Vyšetření **funkční aktivity**

↘ jednofázová metoda na principu APTT

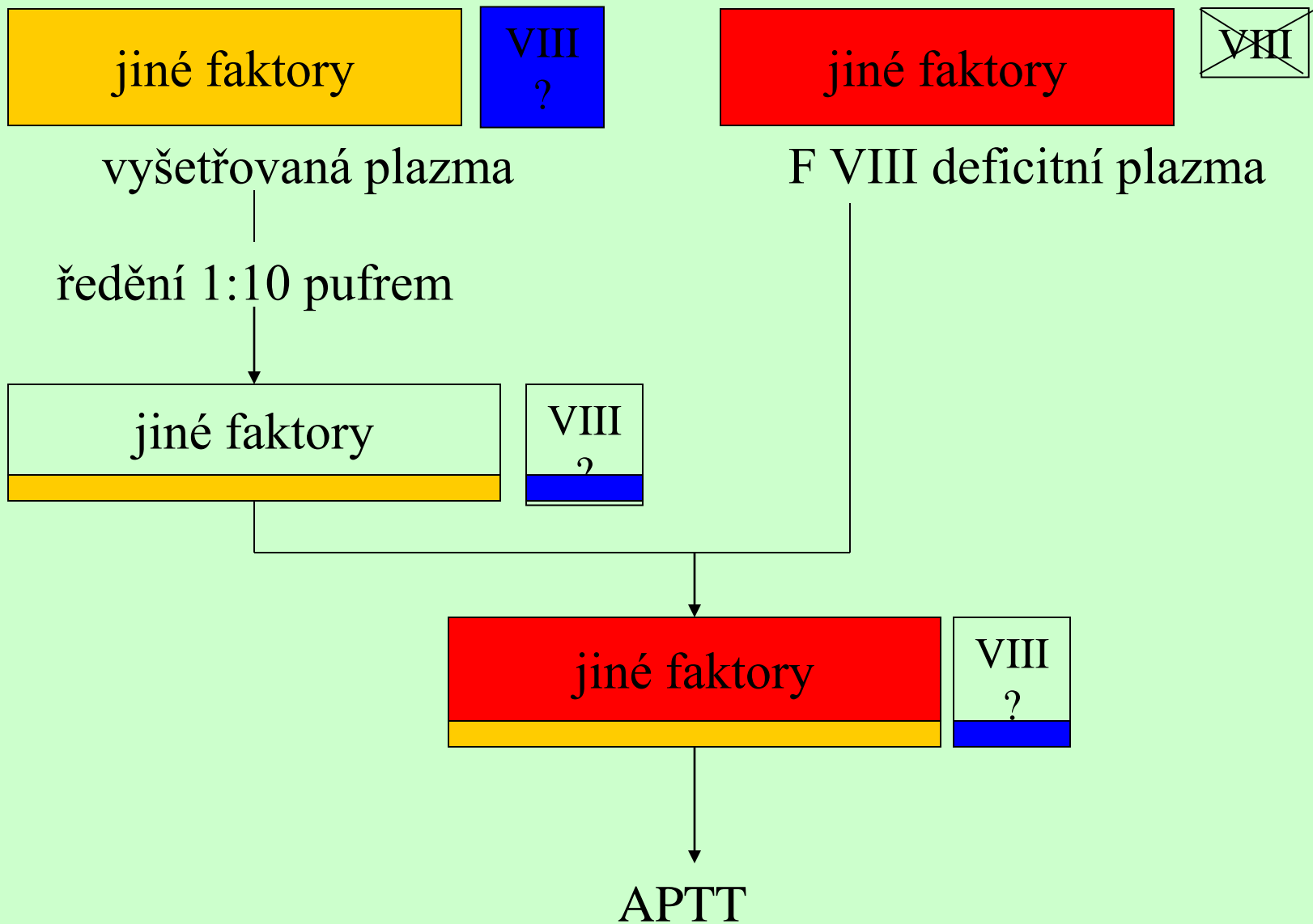
- FF VIII, IX, XI, XII, PK, HMWK

↘ 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 1:10 / 1:20

1 díl neředěné deficitní plazmy

→ FF vnitřního systému

1 díl APTT reagencie, inkubace

1 díl CaCl_2

→ FF vnějšího systému

inkubace, 2 díly 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** (lin/log)

→ Klinický význam - zejména ↓ **FF** , ↑ **F VIII** (IX, XI)

Snížení faktorů

- Snížení - mimo kalibrovanou oblast ($< 10\%$)
- **Výchozí ředění** vyšetřované plazmy **1 :10 / 1:20**
 - ↘ opakování vyšetření s nižším ředěním plazmy
 - **1 : 5 / 1:10**
 - ↘ odečtení a vydělení výsledku dilučním faktorem (:2)
- **Kalibrační křivka Low**
 - ↘ kalibrovaná oblast cca 1,0 – 25,0 %
 - ↘ výchozí ředění vyšetřované plazmy **1:5**

Zvýšení F VIII

- Zvýšení $> 100 \%$
- Výchozí ředění vyšetřované plazmy 1 :10 / 1:20
 - ↘ opakovat vyšetření s vyšším ředěním plazmy
 - 1 : 20
 - ↘ odečíst a vynásobit výsledek dilučním faktorem (x2)
- Pro F VIII $> 200 \%$
 - ↘ opakovat s ředěním 1:40
 - ↘ odečíst a vynásobit 4x / 2x
- Pro F VIII $> 400 \%$
 - ↘ opakovat s ředěním 1:80
 - ↘ odečíst a vynásobit 8x / 4x

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

FVIII -fotometrická metoda

- Tvorba enzymatického komplexu- tenázy
 - ↘ F VIIIa aktivovaný trombinem v přítomnosti konstantního množství F IXa, PL a Ca²⁺
- která aktivuje F X dodávaný v konstantním nadbytku na F Xa
- Měření tvorby F Xa pomocí chromogenního substrátu

Korekční testy

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

Korekční test

→ korekce

Vzorek	APTT (s)
NP	35,0
1NP + 1 PP	38,0
PP	75,0

Korekční test

→ není korekce

Vzorek	APTT (s)
NP	35,0
1NP + 1 PP	60,0
PP	65,0

Korekční test

→ jen částečná korekce

Vzorek	APTT (s)
NP	35,0
1NP + 1 PP	50,0
PP	65,0

Identifikace specifického inhibitoru

- screening (prodloužení APTT/PT)
- průkaz inhibitoru (cirkulující antikoagulans)
- průkaz specifity inhibitoru (vyšetření faktorů)
- kvantifikace inhibitoru (Bethesda metoda)

Průkaz specifického inhibitoru

Inhibitor namířený proti FF, časově závislý

Orientačně tzv. „**cirkulující antikoagulans**“ „CAg“

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

Hodnocení cirkulující antikoagulans

- pokud není přítomnost/nepřítomnost zřetelná
- vhodné spočítat pro jednotlivé směsi teoreticky čas, který by odpovídal smíchání různého počtu dílů PP a NP
 - ↘ pro směs 1 po: $(1 \times \text{PPpo} + 4 \times \text{NPpo}):5$
 - ↘ pro směs 2 po: $(1 \times \text{PPpo} + 1 \times \text{NPpo}):2$
 - ↘ pro směs 3 po: $(4 \times \text{PPpo} + 1 \times \text{NPpo}):5$
- pokud je naměřený čas delší než teoretický svědčí to pro přítomnost inhibitoru

Cirkulující antikoagulans

vyhodnocení výsledků

→ Porovnání naměřených koagulačních časů jednotlivých směsí PP + NP s časy PP a NP

↘ před inkubací

↘ po inkubaci

→ Průkaz inhibitoru

↘ příměs 1/5 PP výrazně prodlužuje čas NP (směs 1+4)
– silný inhibitor

↘ není žádná/částečná korekce (směs 1+1)

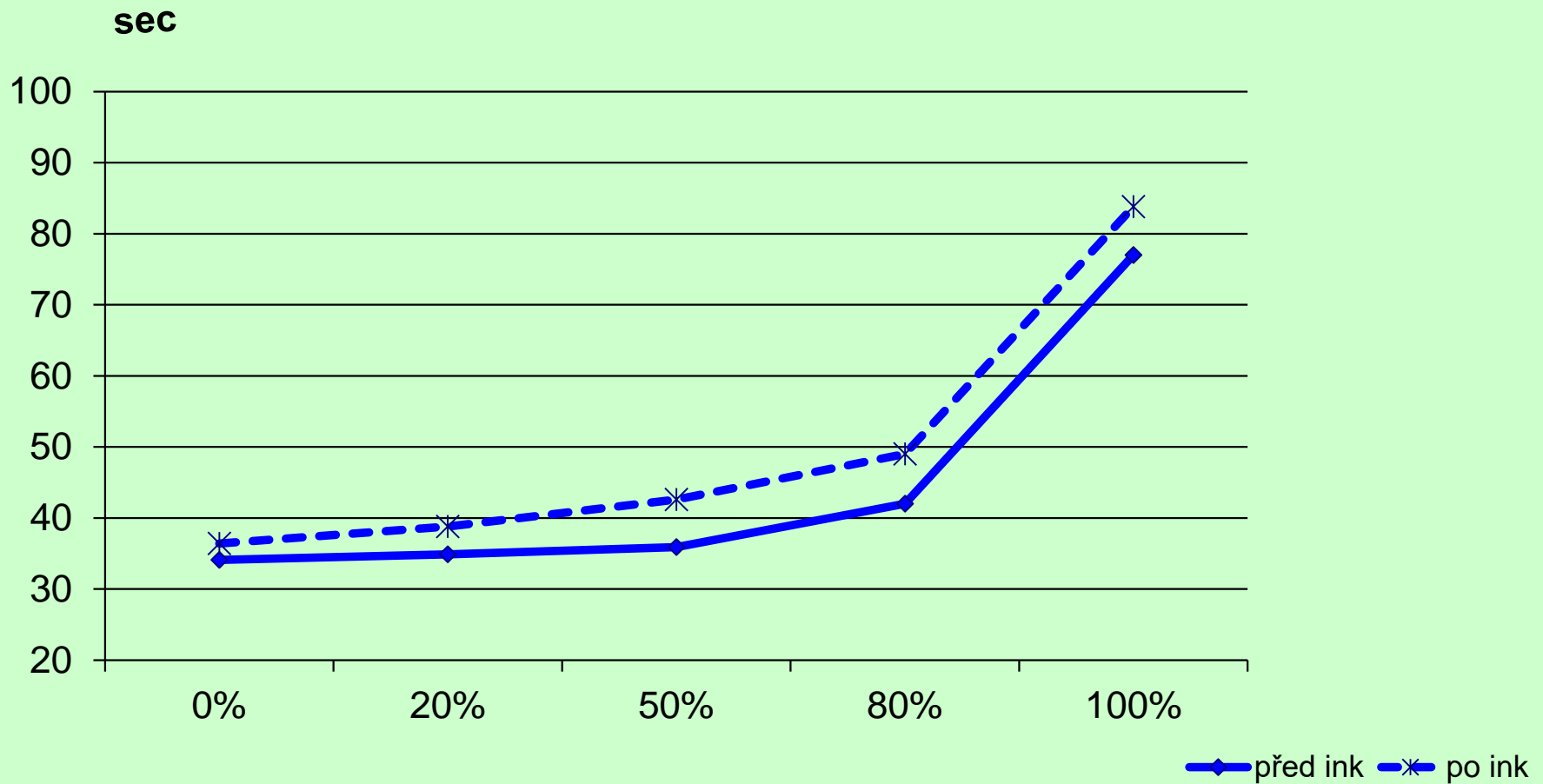
↘ příměs 1/5 NP nezpůsobí korekci časů PP pacienta (směs 4+1) - slabý inhibitor

Cirkulující antikoagulans

grafické znázornění

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

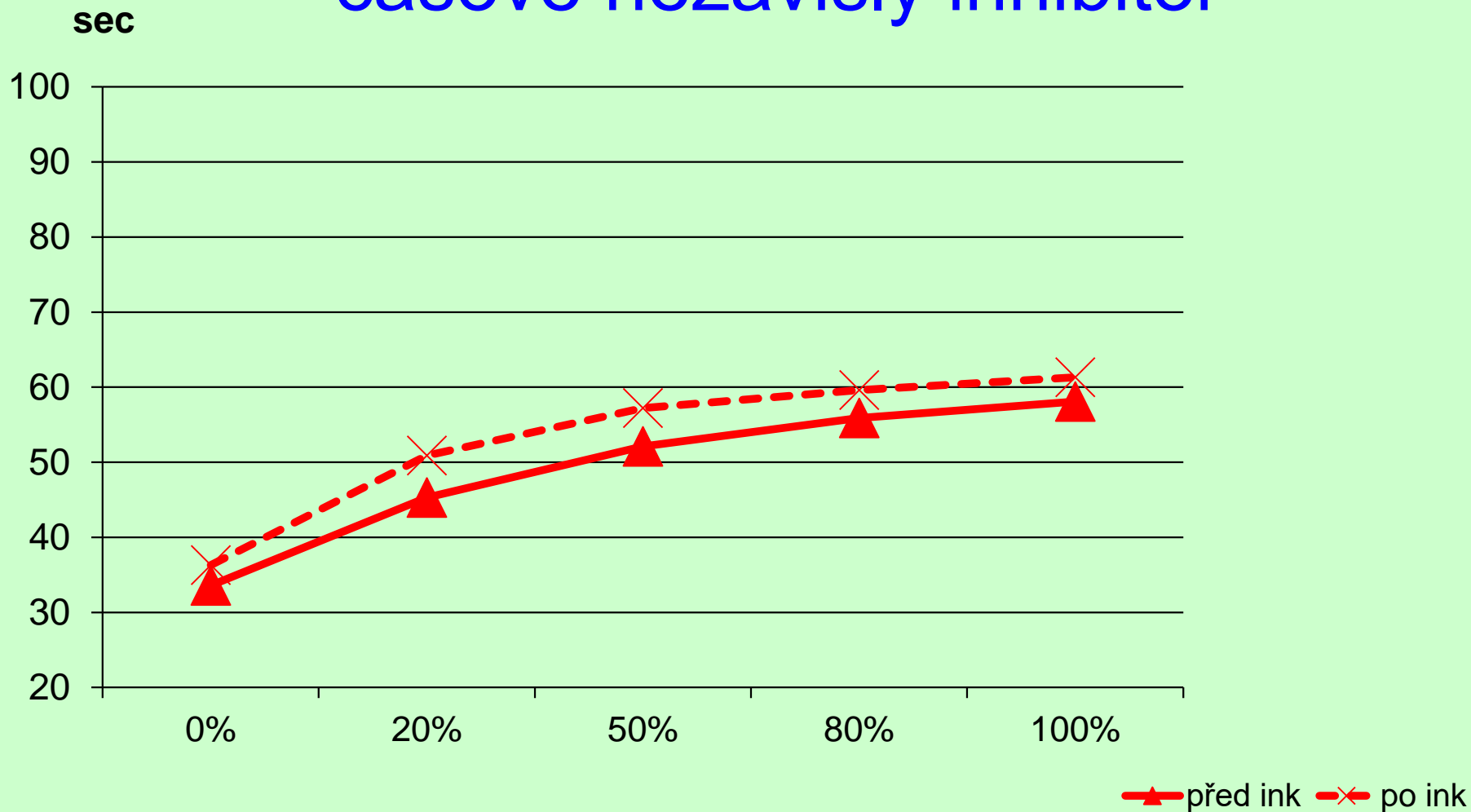
Cirkulující antikoagulans APTT - inhibitor nepřítomen



Cirkulující antikoagulans APTT - časově závislý inhibitor



Cirkulující antikoagulans APTT - časově nezávislý inhibitor



Průkaz specifického inhibitoru

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

Průkaz specifity inhibitoru

→ Vyšetření funkční aktivity faktorů

↳ jednofázová metoda na principu PT a/ APTT

→ Snížení funkční aktivity jen jednoho faktoru

↳ faktor < 10%, ale může být i vyšší

Identifikace specifického inhibitoru

Kvantitativně **Bethesda metoda**

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

→ **1 Bethesda jednotka (B.U.)**

množství inhibitoru, které během inkubace inaktivuje 50 % nabídnutého faktoru

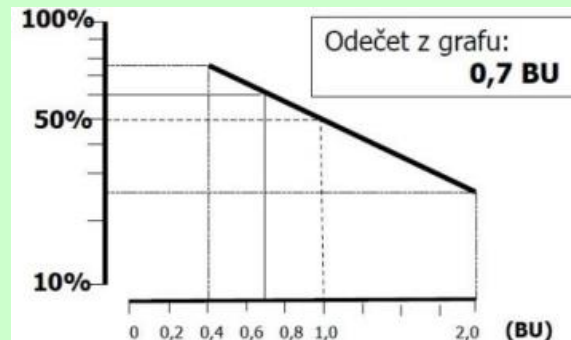
→ přítomnost inhibitoru $\geq 0,8$ B.U./ml

Bethesda metoda - postup

- **Titrace** vyšetřované plazmy **PP** (neř, 1:2, 1:4, 1:8...) a **příprava směsí** (1 díl PP a 1 díl NP)
- **Příprava kontrolní směsi** (1 díl pufru + 1 díl NP)
- **Inkubace** směsí PP a kontrolní **2 hod při 37 °C**
- **Vyšetření faktoru** v směsích PP a kontrolní
- **Výpočet zbytkové aktivity faktoru (A_{zb})**
 - ↘ $=(\text{aktivita směsi PP} / \text{aktivita kontrolní směsi}) \times 100$
- **Odečtení B.U.** (graf závislosti A_{zb} na B.U.)

↘ A_{zb} 100%...0 B.U.

↘ A_{zb} 50%.....1 B.U.



Nijmegen modifikace Bethesda metody

- Přesné stanovení nízkých titrů inhibitorů
 - ↘ eliminace vlivu změn pH použitím **pufrované NP**
 - ↘ použití **faktor deficitní plazmy k ředění** namísto pufry
 - ↘ přítomnost inhibitoru $\geq 0,5$ B.U./ml

Příklady vyšetření inhibitoru Bethesda metoda

→ Kontrolní směs:	40%
→ neř.:	0%
→ 1:2	1%
→ 1:4	2%
→ 1:8	6%
→ 1:16	20%
→ 1:32	28%
→ 1:64	32%
→ 1:128	39%
→ 1:256	40%

Inhibitor 16 B.U.

→ Kontrolní směs:	60%
→ neř.:	0%
→ 1:2	0%
→ 1:4	0%
→ 1:8	7%
→ 1:16	22%
→ 1:32	38%
→ 1:64	51%
→ 1:128	54%
→ 1:256	59%

Inhibitor 21 B.U.

Příklad vyšetření inhibitoru

Bethesda metoda – pacient 1,2

→ Kontrolní směs:	48%
→ neř.:	40%
→ 1:2	43%
→ 1:4	44%
→ 1:8	45%
→ 1:16	42%
→ 1:32	46%
→ 1:64	48%
→ 1:128	47%
→ 1:256	49%

Inhibitor ? B.U.

→ Kontrolní směs:	54%
→ neř.:	0%
→ 1:2	0%
→ 1:4	2%
→ 1:8	8%
→ 1:16	15%
→ 1:32	27%
→ 1:64	39%
→ 1:128	51%
→ 1:256	59%

Inhibitor ? B.U.

Příklad vyšetření inhibitoru

Bethesda metoda – pacient 1,2

→ Kontrolní směs: 48%

→ neř.: 40%

→ 1:2 43%

→ 1:4 44%

→ 1:8 45%

→ 1:16 42%

→ 1:32 46%

→ 1:64 48%

→ 1:128 47%

→ 1:256 49%

Inhibitor 0,24 B.U. - nepřítomen

→ Kontrolní směs: 54%

→ neř.: 0%

→ 1:2 0%

→ 1:4 2%

→ 1:8 8%

→ 1:16 15%

→ 1:32 27%

→ 1:64 39%

→ 1:128 51%

→ 1:256 59%

Inhibitor 32 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)
- vyloučení jiných koagulopatií

Použití **bezdestičkové plazmy** (PFP)

- ↘ dvojnásobná centrifugace

Laboratorní diagnostika - LA

→ Screening (reagencie s ↓PL)

- dAPTT

- dRVVT (aktivuje F X v přítomnosti PL a Ca^{2+})

→ Korekční testy

- na principu testů, které ve screeningu pozitivní

- vyšetření PP, NP, směsi 1:1 PP+NP bez inkubace (časově nezávislý inhibitor)

→ Konfirmační testy (↑ PL)

- na principu testů, kde screening pozitivní

- vyhodnocení zkrácení koagulačních časů

Vyhodnocení screeningové testy - LA

→ dAPTT

↘ $R > \text{cutt off}$ pozitivní

↘ $R < \text{cut off}$ negativní

→ dRVVT

↘ $R > \text{cutt off}$ pozitivní

↘ $R < \text{cut off}$ negativní

Vyhodnocení korekční testy LA

→ Vyhodnocení

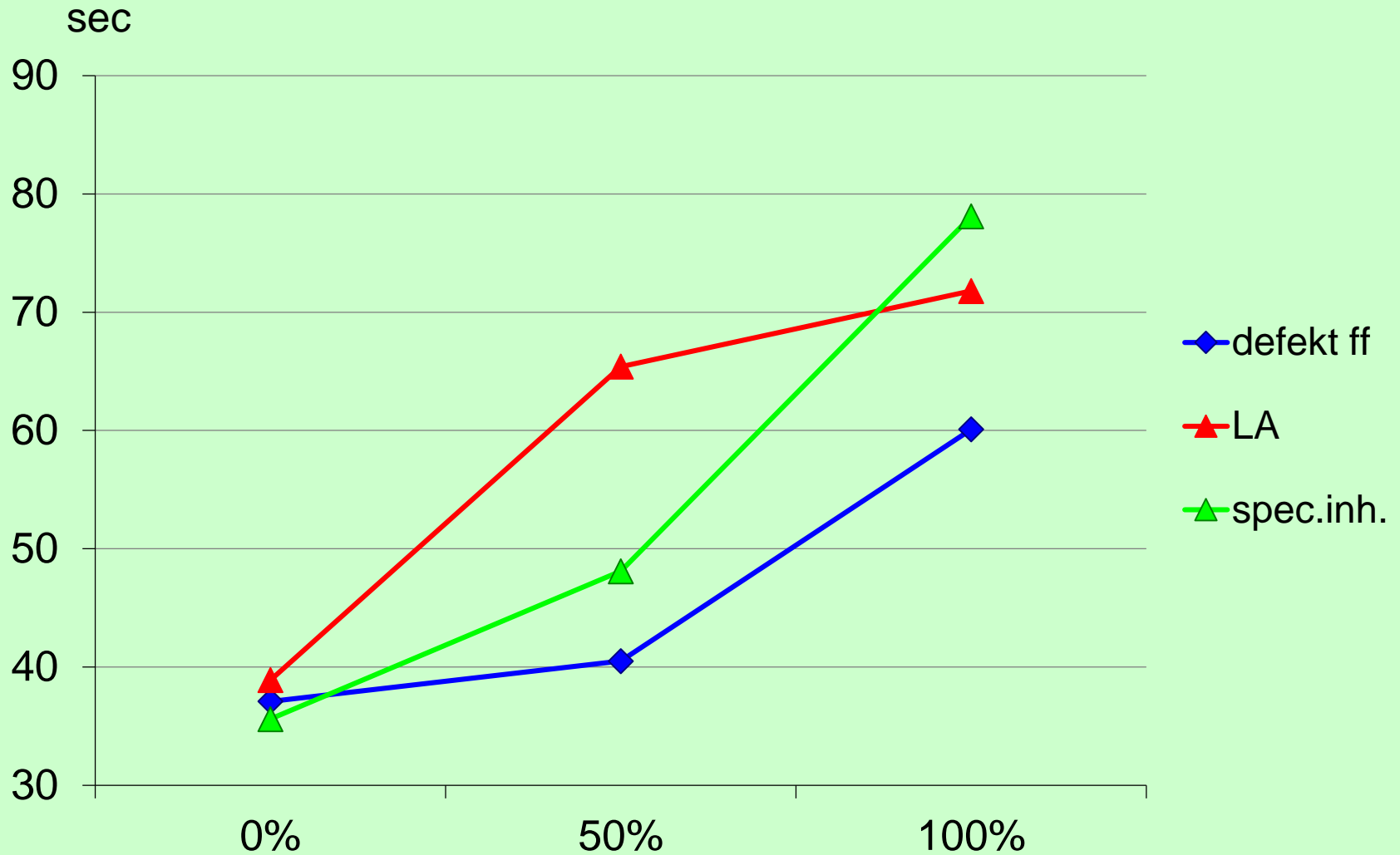
↘ **Ratio R** = $t_{1:1} / t_N$

- < cut off negativní
- > cutt of pozitivní

↘ **Index Cag** (Rösnerův index) **ICA** = $(t_{1:1} - t_N) / t_P \times 100$

- < cut off negativní
- > cut off pozitivní

Korekční test dAPTT



Vyhodnocení konfirmačních testů - LA

Zkrácení koagulačních časů v přítomnosti \uparrow PL

→ Reagencie s \uparrow PL (APTT, RVVT-Confirm)

↘ Vyhodnocení normalizované Ratio

• $nR = R_{\text{Screen}} / R_{\text{Confirm}} > \text{cutt off}$ pozitivní

→ Po přidavku nadbytku PL – reagencie stejná jako pro screening (dAPTT, dRVVT)

↘ vyhodnocení rozdílu časů

• $CT1(\text{screen}) - CT2(\text{screen} + \text{PL}) > 8\text{s}$ pozitivní

Vyšetření faktoru XIII

→ Stanovení **funkční aktivity**

↘ sledování rozpustnosti koagula

↘ **fotometricky**

- F XIII aktivovaný trombinem konjuguje specifický chromogenní substrát s glycinetylerem za současného uvolňování amoniaku, které se stanovuje pomocí paralelně probíhající enzymatické reakce (měří se úbytek NADH při 340 nm)

→ Stanovení **antigenu**

↘ LIA

↘ ELISA

↘ EID

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

Turbidimetrická metoda

Function of an APACK photometer

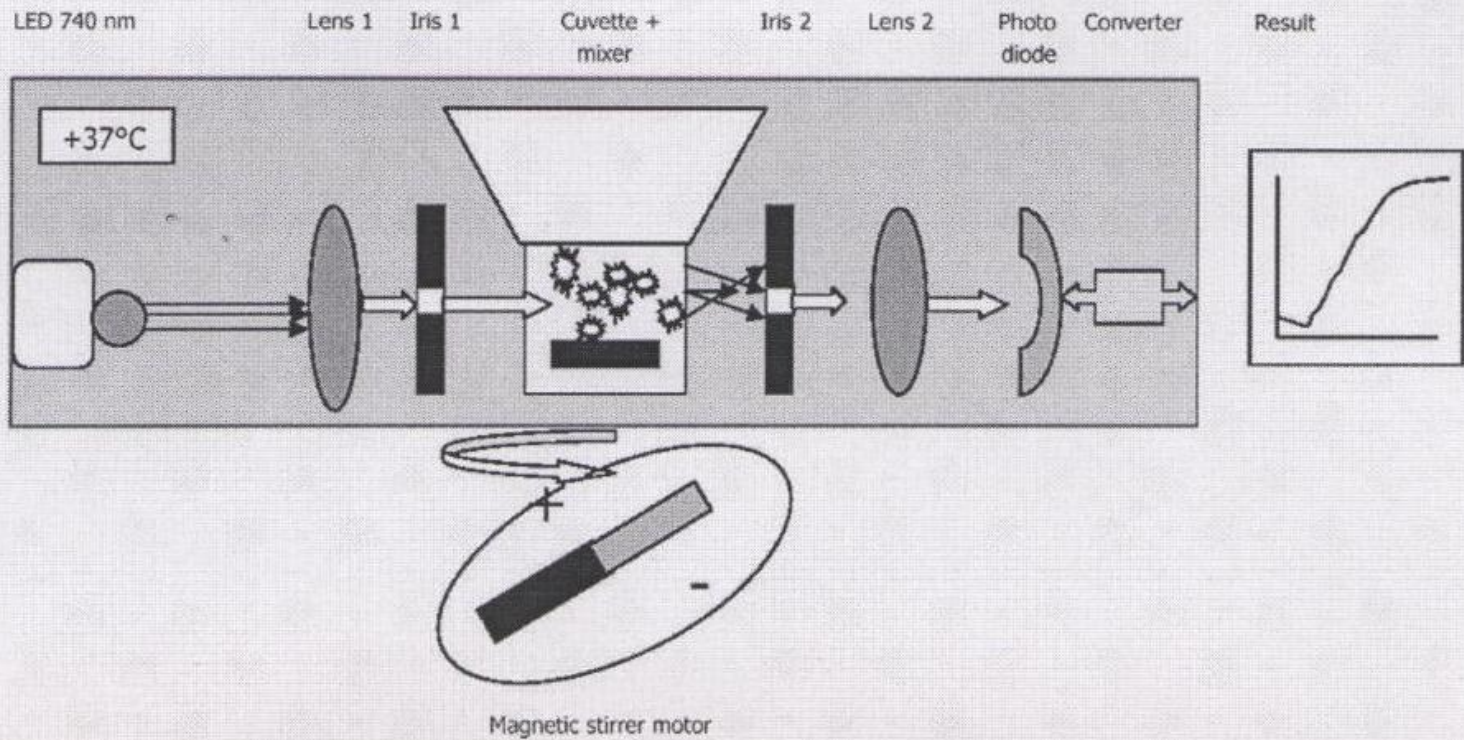
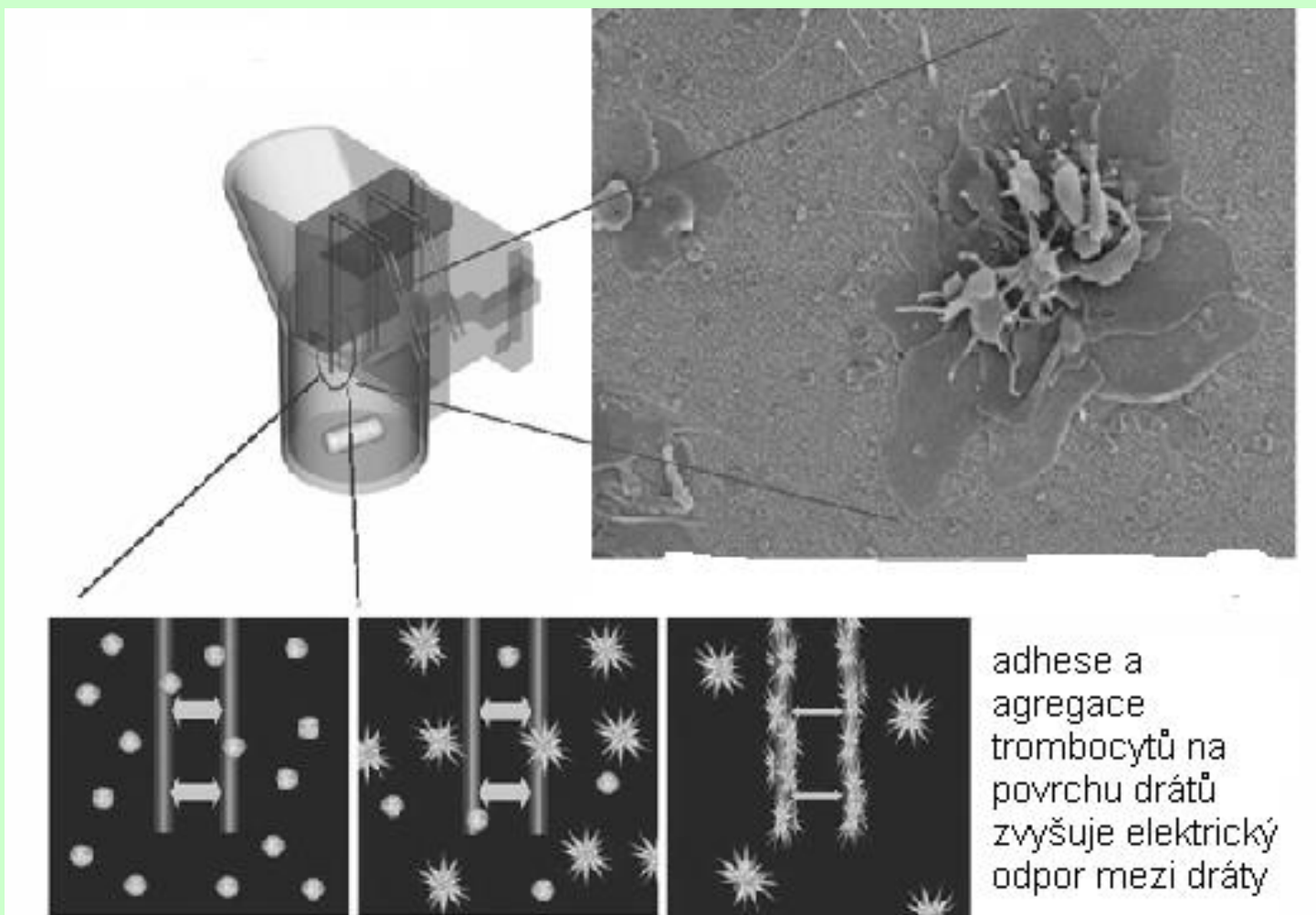


Figure 6

Measuring principle

Impedanční metoda



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 x10⁹, PPP <20x10⁹

→ 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)

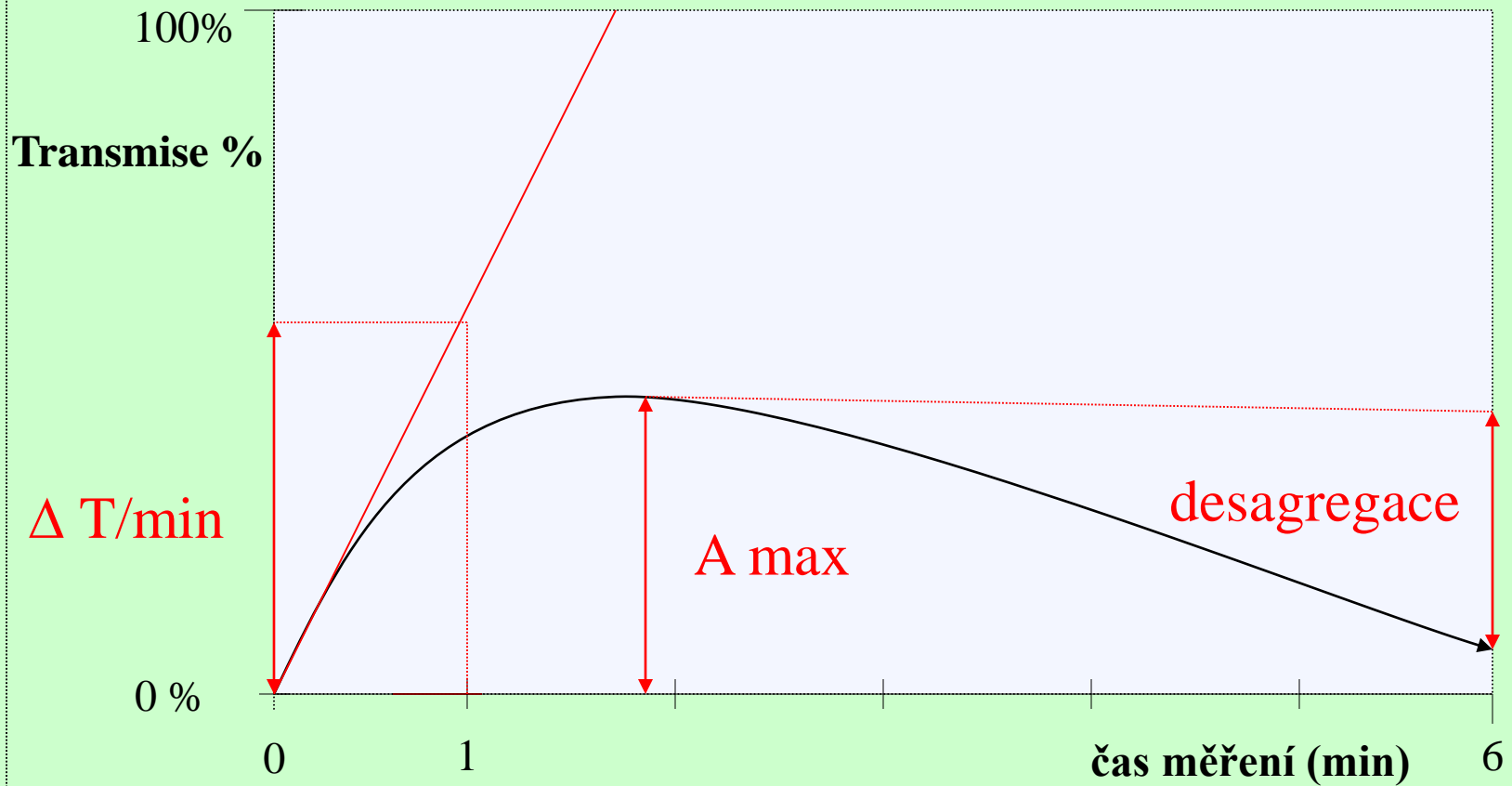
↘ časová prodleva před agregační odpovědí

↘ jen u kolagenu

→ Strmost křivky = slope (%/min)

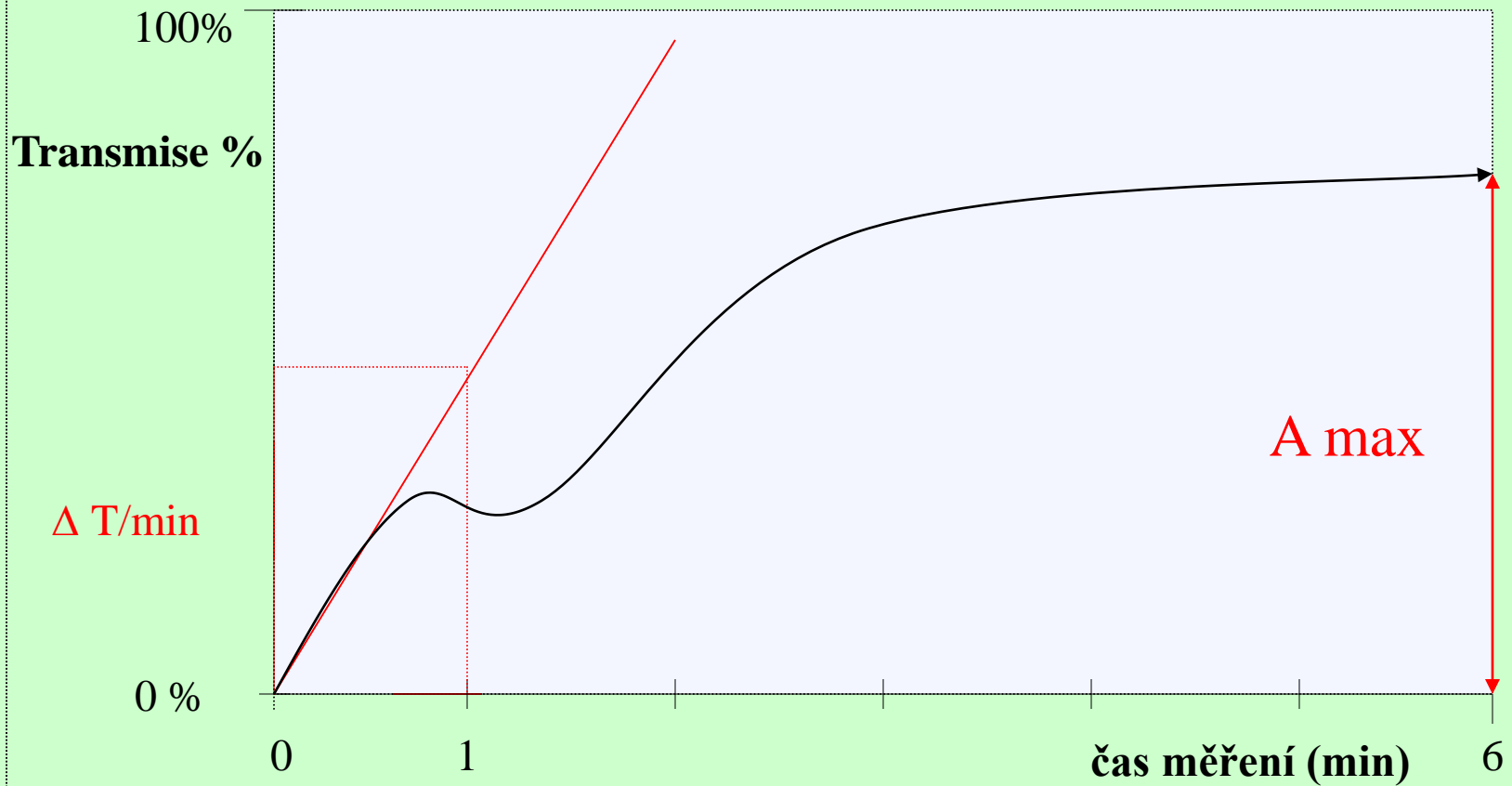
Agregační křivka

Agregace ADP 2,5



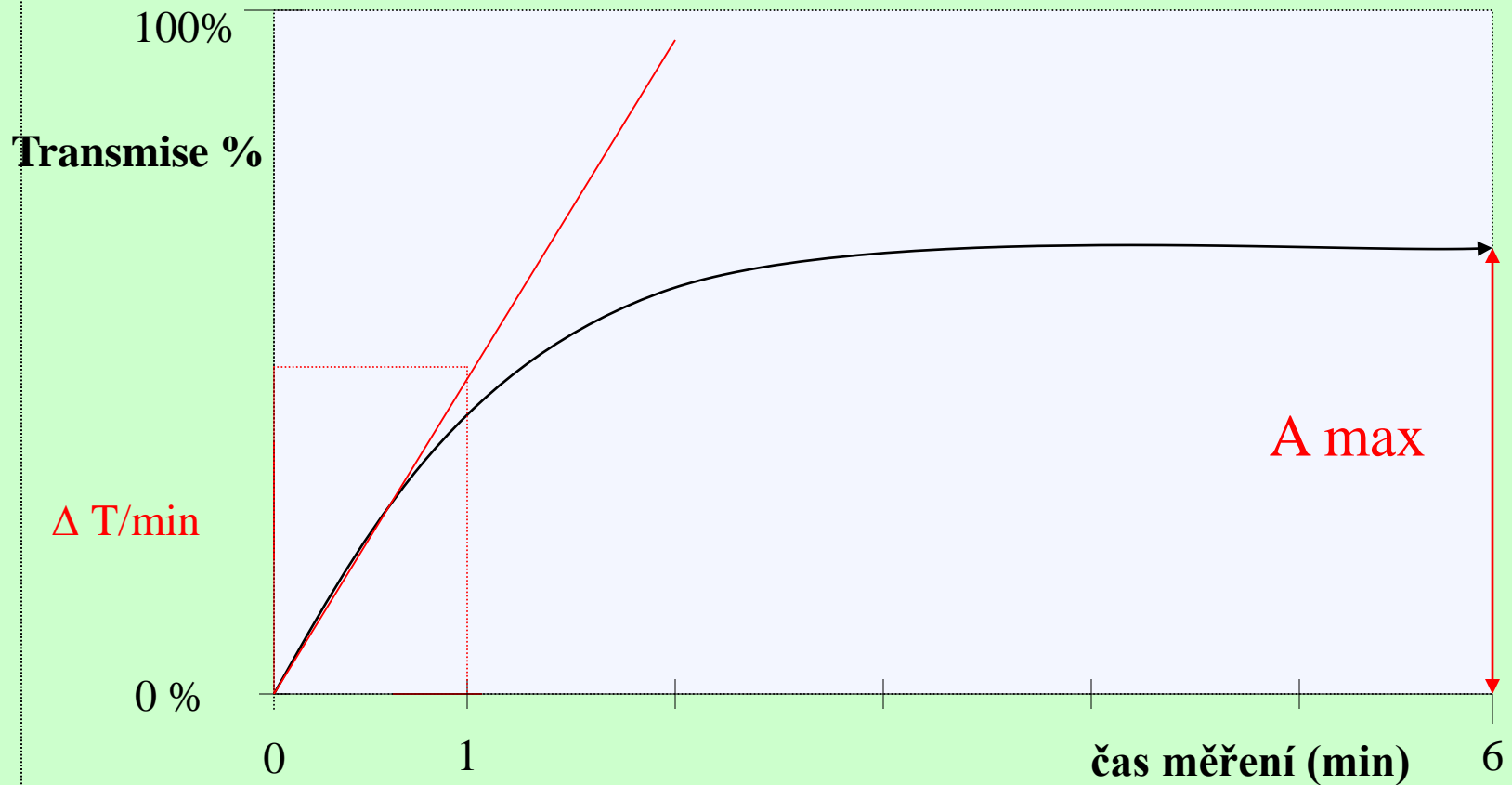
Agregační křivka

Agregace ADP 5



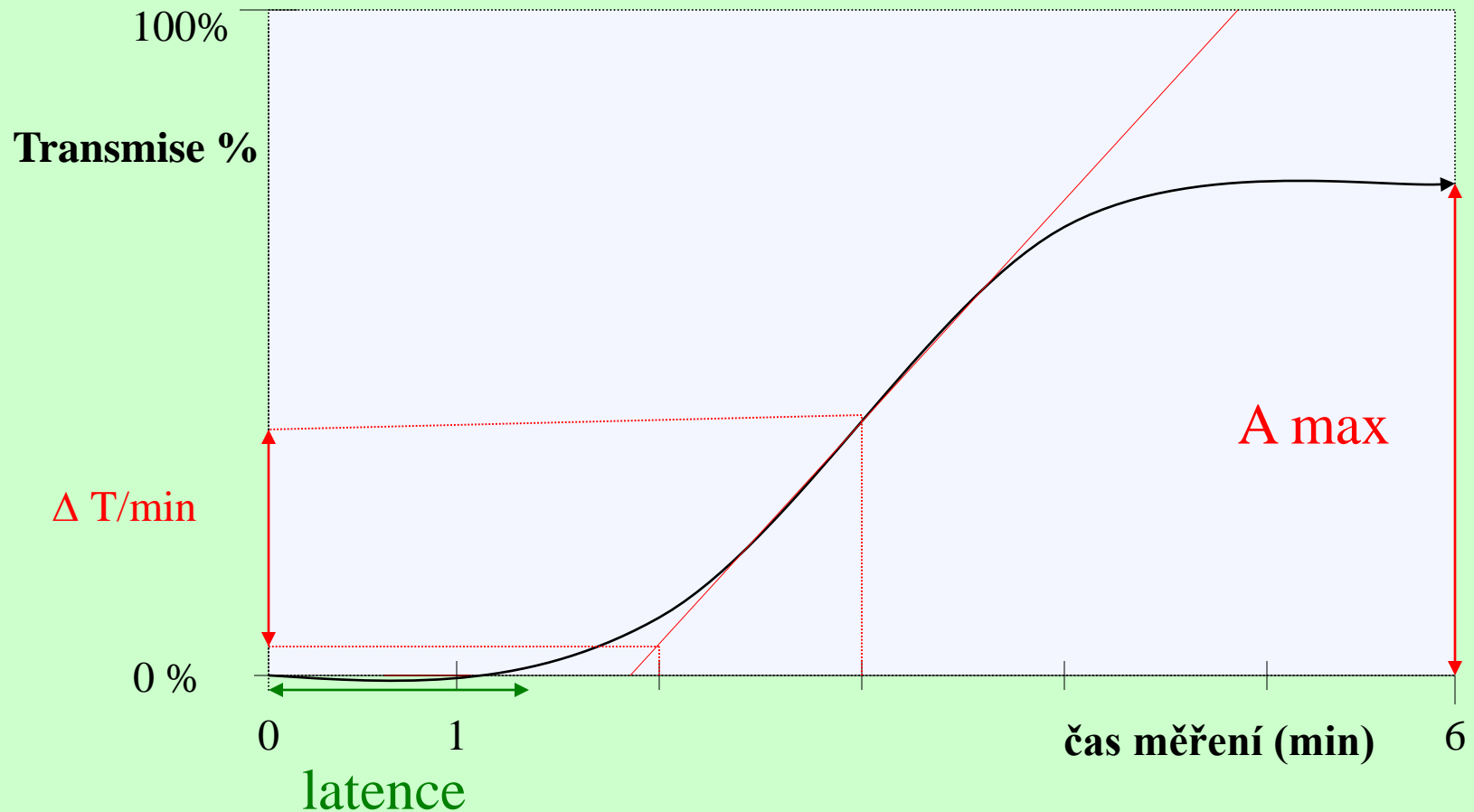
Agregační křivka

Agregace ADP 10



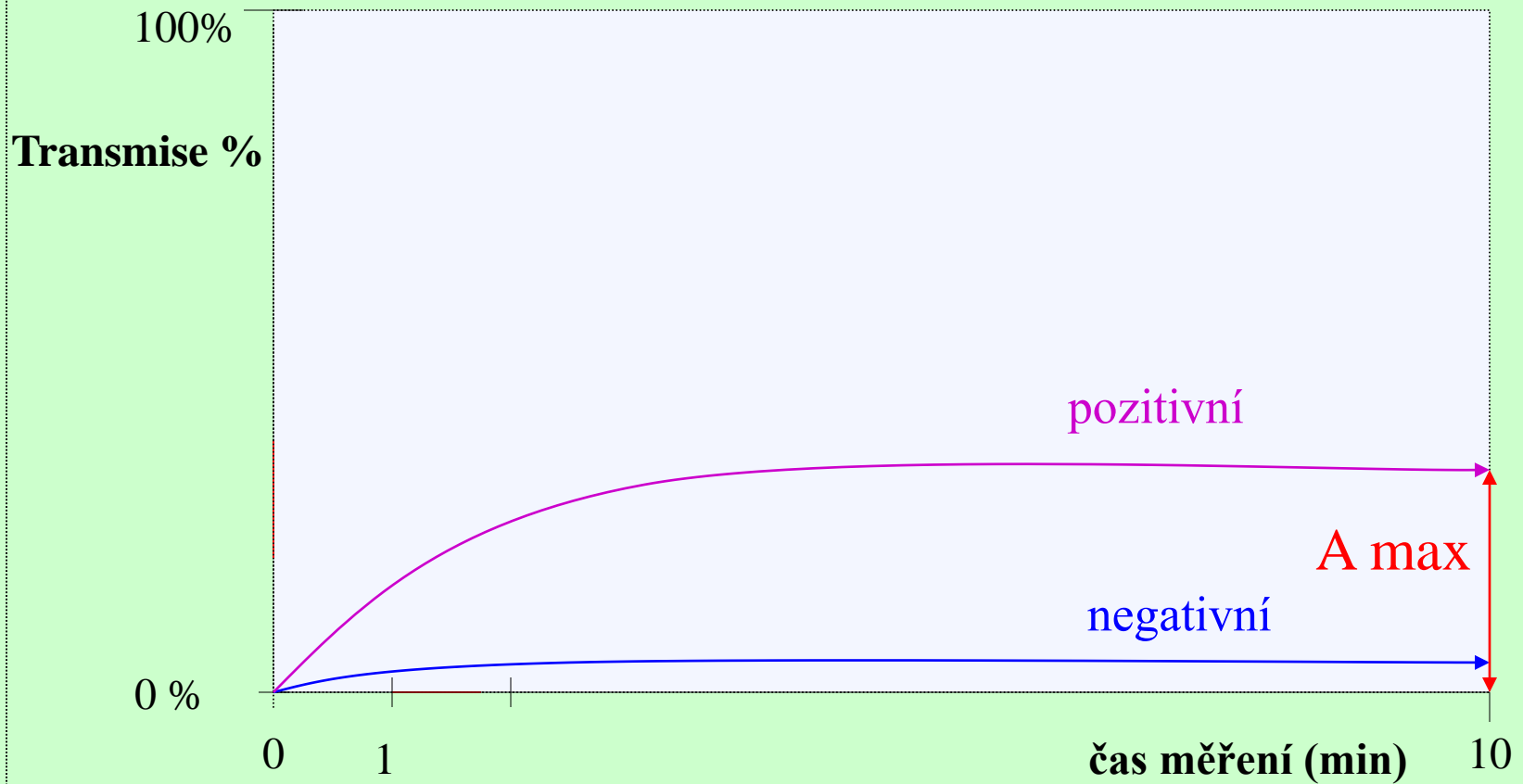
Agregační křivka

Agregace kolagen

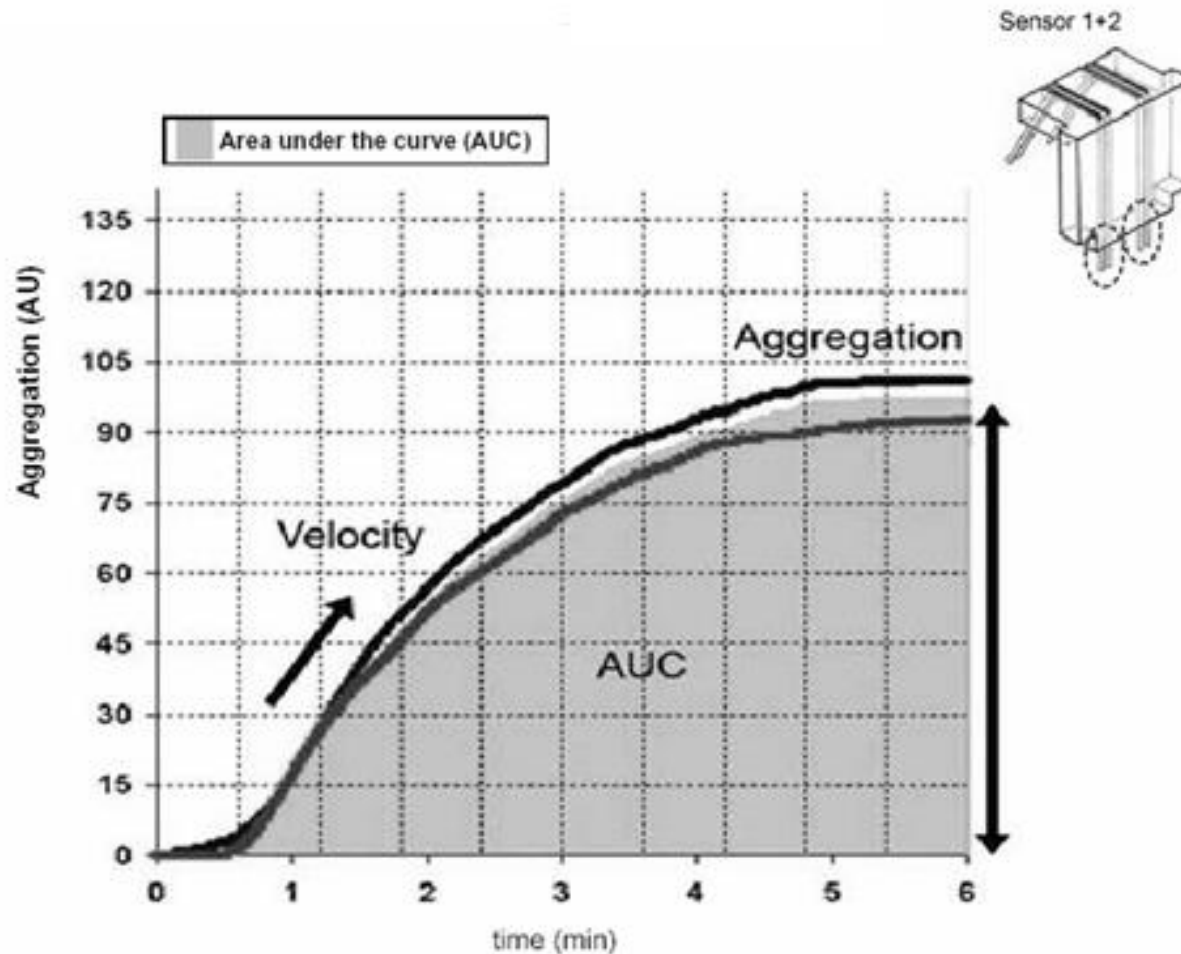


Agregační křivka

Samovolná agregace



Vyhodnocení - impedanční metoda



Klinický význam vyšetření agregace

→ Snížení agregační odpovědi

- ↘ hypofunkce trombocytů (vyloučit vliv léků)

→ Zvýšení agregační odpovědi

- ↘ u spontánní agregace - trombofilní riziko
- ↘ u indukované agregace lze hodnotit zvýšení pouze při nízkých koncentracích induktorů (ADP, adrenalin) při podezření na syndrom lepivých destiček

→ Monitorování antiagregační léčby

Retrakce

- Schopnost trombocytů smršťovat krevní nebo plazmatické koagulum (metoda dle Bethause)
- Postup
 - ↘ získání PRP sedimentací
 - ↘ ředění PRP + přídavek Ca^{2+} , 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