

PRINCIPY VYŠETŘENÍ HEMOSTÁZY

(minimum přístrojové techniky a souvisejících analytických metod v krevním srážení)

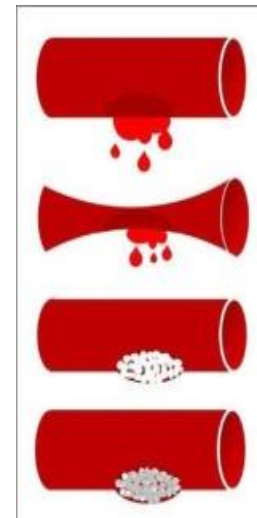
Andrea Štěpařová
OKH FN Brno
10. 10. 2019

Hemostáza

- proces, při kterém dochází k **zástavě krvácení** v místě poranění a při neporušeném cévním řečišti naopak **udržuje tekutost krve**

- složky hemostázy:

- Cévy
- Krevní destičky
- Plazmatické faktory
 - Faktory koagulační
 - Přirozené inhibitory
 - Faktory fibrinolýzy



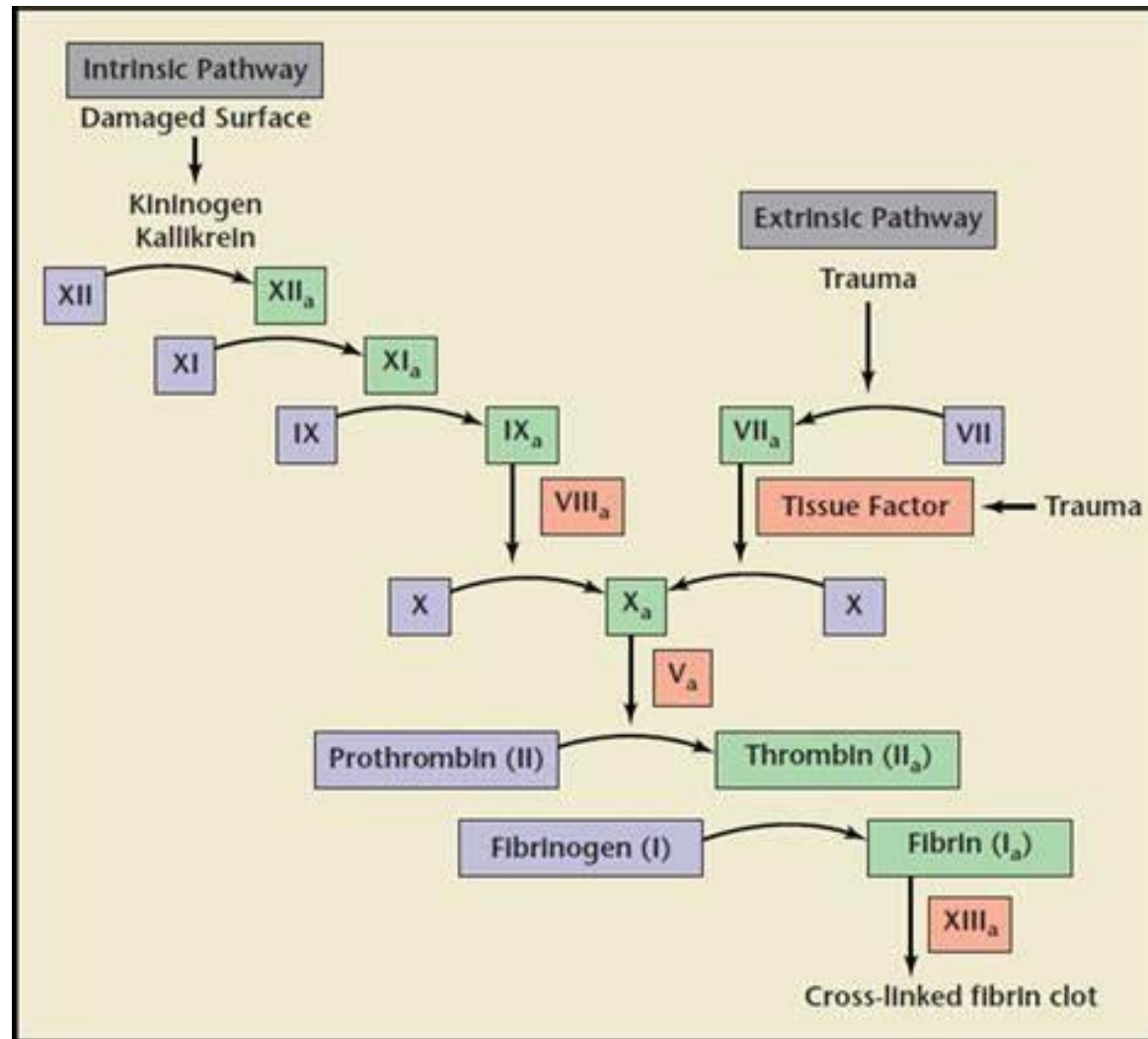
Vazokonstrikce

Primární hemostáza

Sekundární hemostáza

- zástava krvácení představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku **nerozpustného fibrinu**

Koagulační kaskáda



Vyšetřovací techniky v hemostáze

- Dle principu stanovení
 - 1. Koagulační
 - 2. Zákalové
 - 3. Spektrofotometrické
 - 4. Imunochemické
 - 5. Parakoagulační (Gelifikační)
 - 6. POCT (point-of-care)
 - 7. Průtoková cytometrie
 - 8. PCR

1. Koagulační

- dělení podle automatizace
- Manuální – „háčkování“
- Přístrojové
 - Poloautomaty
 - Automaty – koagulometry
- dělení koagulometrů dle typu detekce
- Elektromagnetická
 - kulička
 - kovový plátek
 - háček
- Optická
 - optický paprsek

Koagulometry - kuličkové

- Princip:
- kovová kulička se pohybuje v magnetickém poli
- vlivem změny viskozity prostředí po spuštění koagulačního procesu dochází ke zpomalení pohybu kuličky a k jejímu vychýlení z dřívějšího směru
- změna magnetického pole po vychýlení kuličky je převedena na elektrický impuls, který zastaví ukazatel času

- **př. přístrojů: STA R Evolution, STA R Max (STAGO)**
- **př. testů: PT, APTT, Fbg, TT**

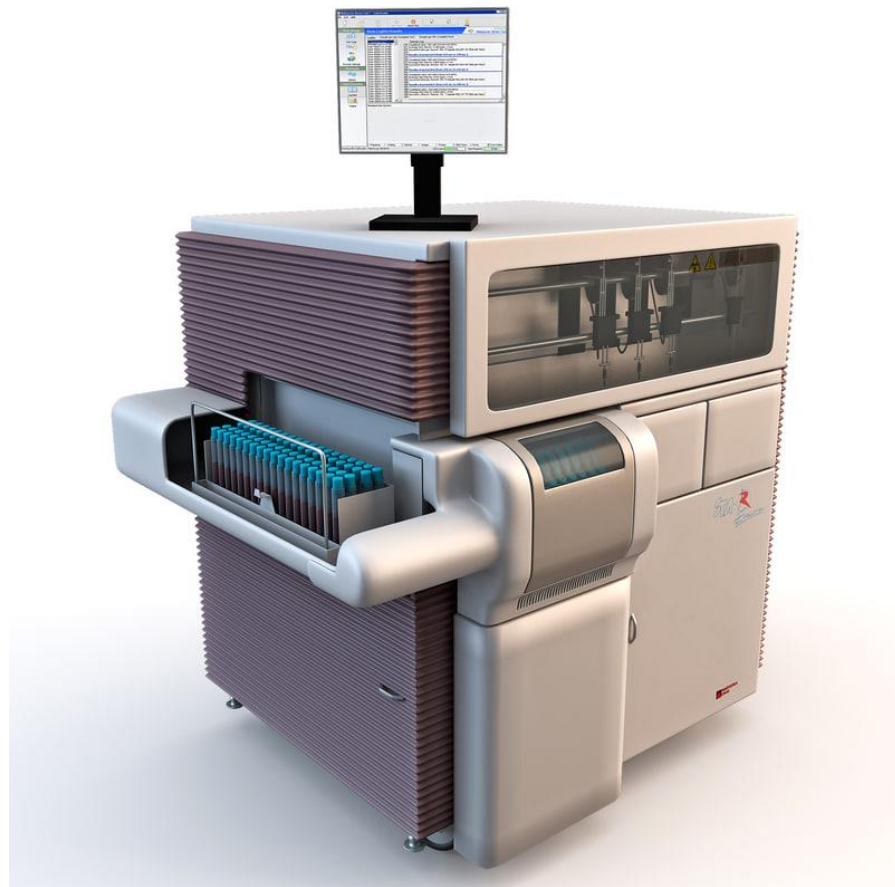
- [princip kuličkového koagulometru](#)



Koagulometry - kuličkové



- STA R Max (STAGO)



- STA R Evolution (STAGO)

Koagulometry - kuličkové

- Výhody
- kývavý pohyb kuličky – mění se rychlost
 - v úvratích má kulička nulovou rychlost
 - velice vysoká citlivost
 - měření fibrinogenu od 0,2 g/l
- Nevýhody
- velký objem reagensí pro fotometrické testy
 - z důvodu přítomnosti kuličky

Koagulometry - optické

- Princip:

- monochromatické světelné záření prochází kyvetou vzorkem, která na fotočlánek propouští nebo odráží jen určité množství záření
- optická hustota dopadajícího záření odráží vlastnosti média v aktuálním stavu koagulačního děje
- měří se snížení optické hustoty po vytvoření fibrinového vlákna nebo koagula
- měří vznik zákalu nikoli přímo koagula

Koagulometry - optické

- problém vyhodnocení naměřené reakční křivky
- různí výrobci mají rozdílné řešení
 - určení rozdílu před a po koagulaci
 - derivace koagulační křivky
 - určení počáteční rychlosti



- **Koagulometr Sysmex CA 7000**

Koagulometry - optické

- Citlivé na rychlost tvorby koagula
 - nízký fibrinogen – nepřesné výsledky
 - přítomnost inhibitorů (heparin)
- Citlivé na zabarvení plasmy
 - ikterická plasma
 - chylózní plasma
 - hemolytická plasma

2. Zákalové (fotooptické)

- Princip:

- vyšetření zakalení testovacího systému z důvodu tvorby koagula, agregátů krevních destiček, reakce antigenu s protilátkou
- zjišťuje se optická hustota rozptýleného světla procházejícího měřicí kvyetou a dopadajícího na detektor

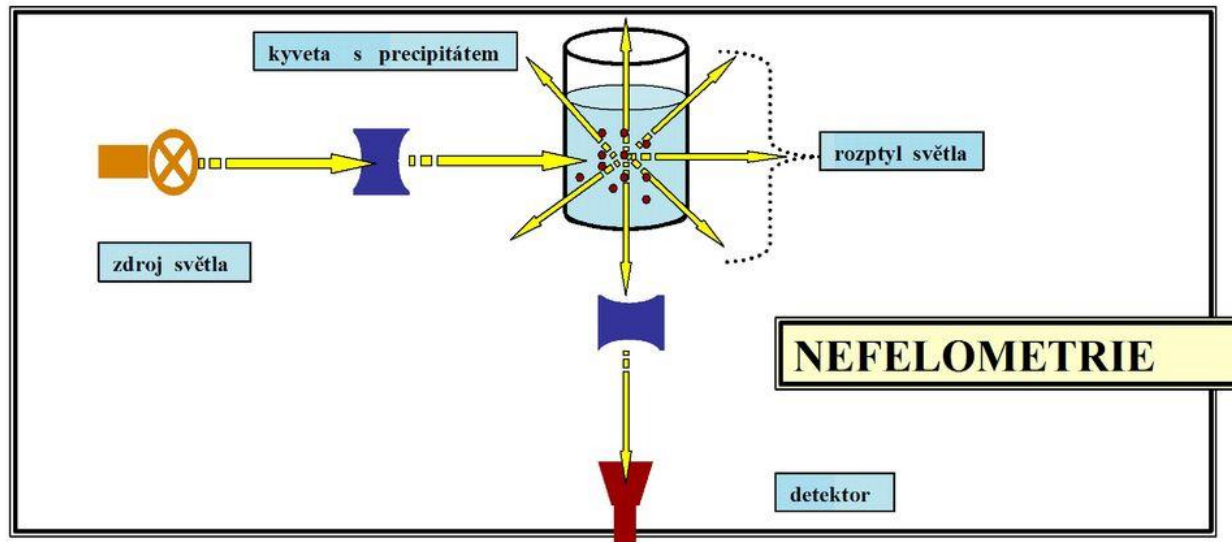
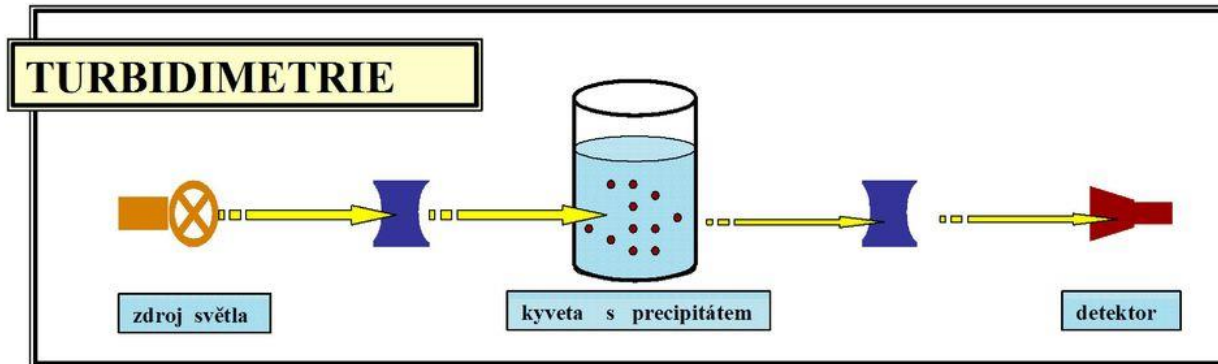
- Turbidimetrie

- změna průchodnosti světla kvyetou
 - **př. Agregace PLT – agregometr AFACT 4004**

- Nefelometrie

- rozptyl světla ve směru kolmém na dopadající paprsek (detektor je umístěn v úhlu 90 stupňů)

2. Zákalové (fotooptické)

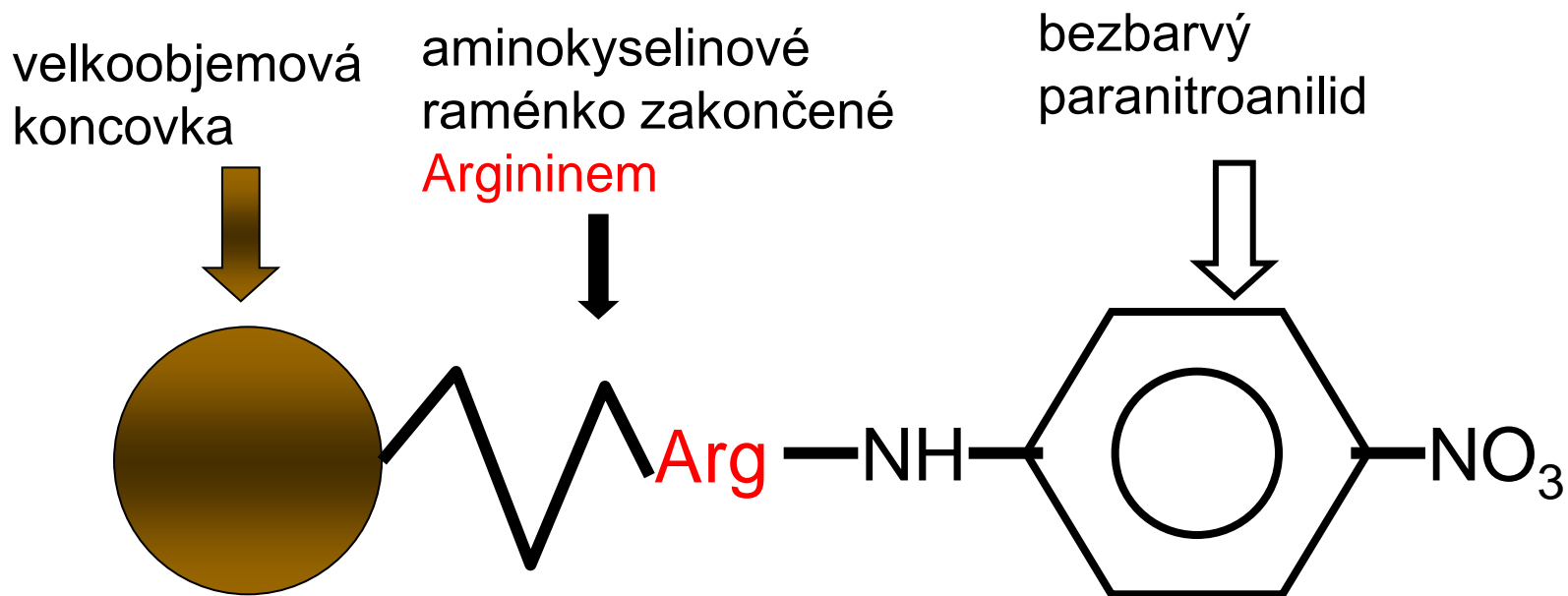


3. Spektrofotometrické

- Princip:
- stanovení intenzity zbarvení (absorbance), ke kterému dochází v důsledku štěpení specifického chromogenního substrátu
- detekce absorbance při vhodné vlnové délce
 - „end point“ (A) – měří se absorbance na konci reakce
 - kinetické ($\Delta A/\text{min}$) - měří se změna absorbance za časovou jednotku
- Limitace: hemolytické a ikterické vzorky
- př. AT

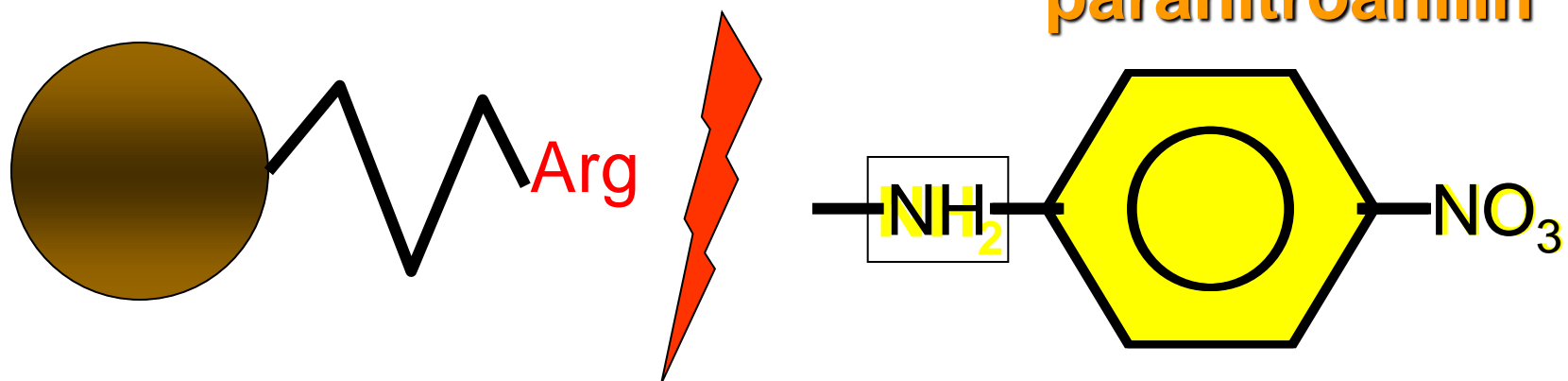
• Chromogenní substrát

- uměle připravený



• Princip

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



4. Imunochemické (imunologické)

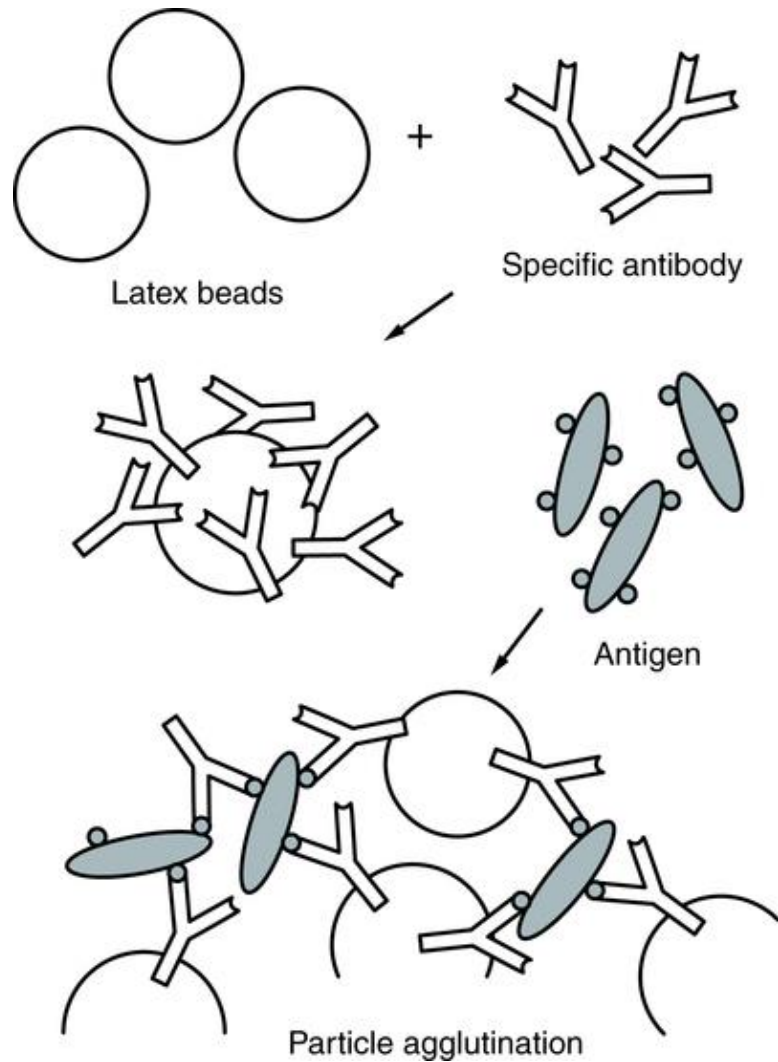
- Sledování reakce antigenu s protilátkou
- 4.1 Aglutinace
- 4.2 LIA (Liquid Immuno Assay)
- 4.3 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
- 4.4 EID (Elektroimunodifúze)
- 4.5 RIA (Radioimunoanaláza) – detekce - gamačítač

4.1 Aglutinační metody

- Princip:

- sledování aglutinace (shlukování) viditelných částic (latex, červená krvinka) s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu
- odečítání makroskopicky
 - pozitivní(+, ++, +++)/negativní
 - semikvantitativní metody (udaná mez detekce)
- př. metod
 - latexaglutinační (např. FDP, D-Di)
 - hemaglutinační (např. SFM)

Latexagglutination



Příklad vyšetření D-Dimerů

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

4.2 LIA (liquid immuno assay)

- Princip:

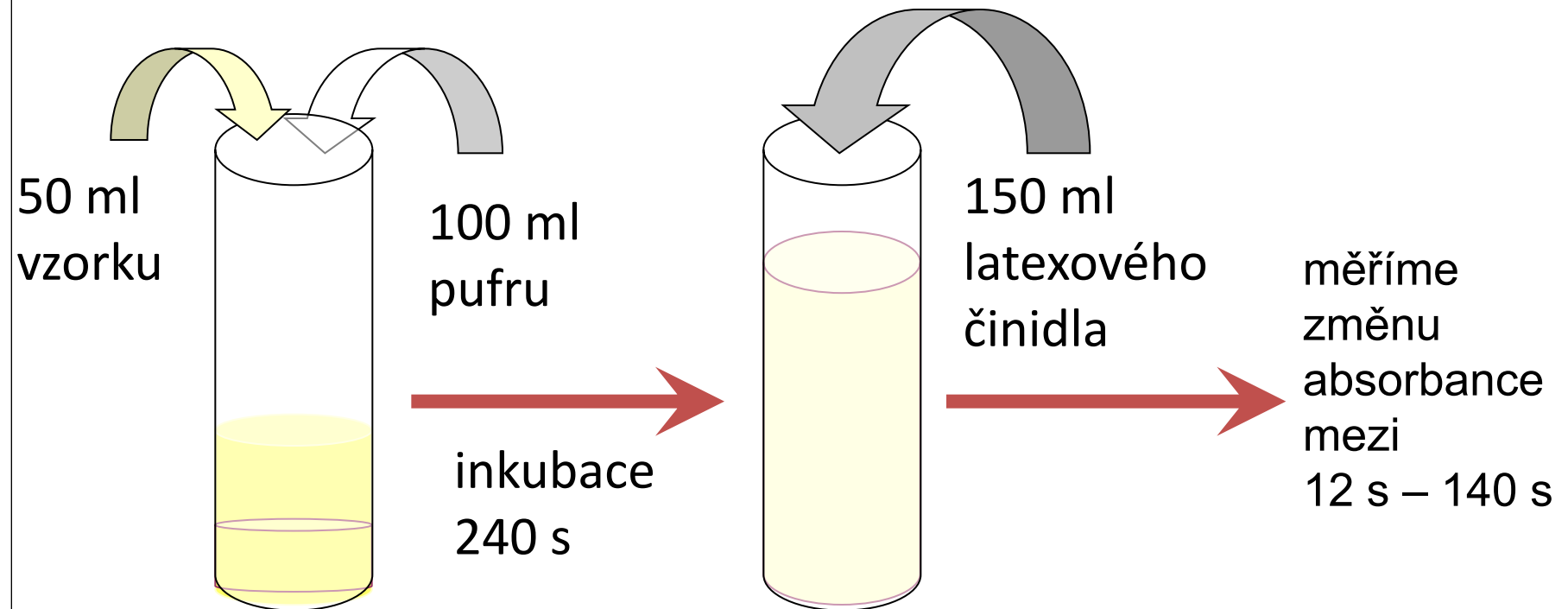
- sledování aglutinace mikrolatexových částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu
- odečítání optickým systémem
- zeslabení světelného/laserového paprsku po průchodu měřicí kyvetou ($\Delta A/\text{min}$)

- kvantitativní metody (odečet z kalibrační křivky)
 - př. D-Di, vWF:Ag

- Limitace:
 - Chylozita vzorku
 - Hookův jev (vysycení protilátky antigenem)

LIA (liquid immuno assay)

× Provedení (STA© Liatest© D-Dimer)



4.3 ELISA (enzym linked immunosorbent assay) (EIA (Enzym immunoassay))

- Princip:

- kvantitativní stanovení antigenu (Ag) pomocí protilátky (Ab) značené enzymem (AbE = konjugát)
 - př. vWF:CBA, vWF:FVIIIB, MPK, PAI, ADAMTS-13 Aktivita, ADAMTS-13 Inhibitor, HIT

- dle automatizace:

- **Manuálně** – manuální provedení + detekce pomocí spektrofotometrického systému na čtení mikrotitračních destiček
 - př. KIM (Microplate reader system)
- **Automaty** – provádějící všechny kroky analýzy - dávkování vzorků, přidávání reagensů, inkubaci, promývání a detekci mikrotitračních destiček
 - př. DS2 DYNEX

ELISA – přístrojová technika

- KIM (Microplate reader systém)

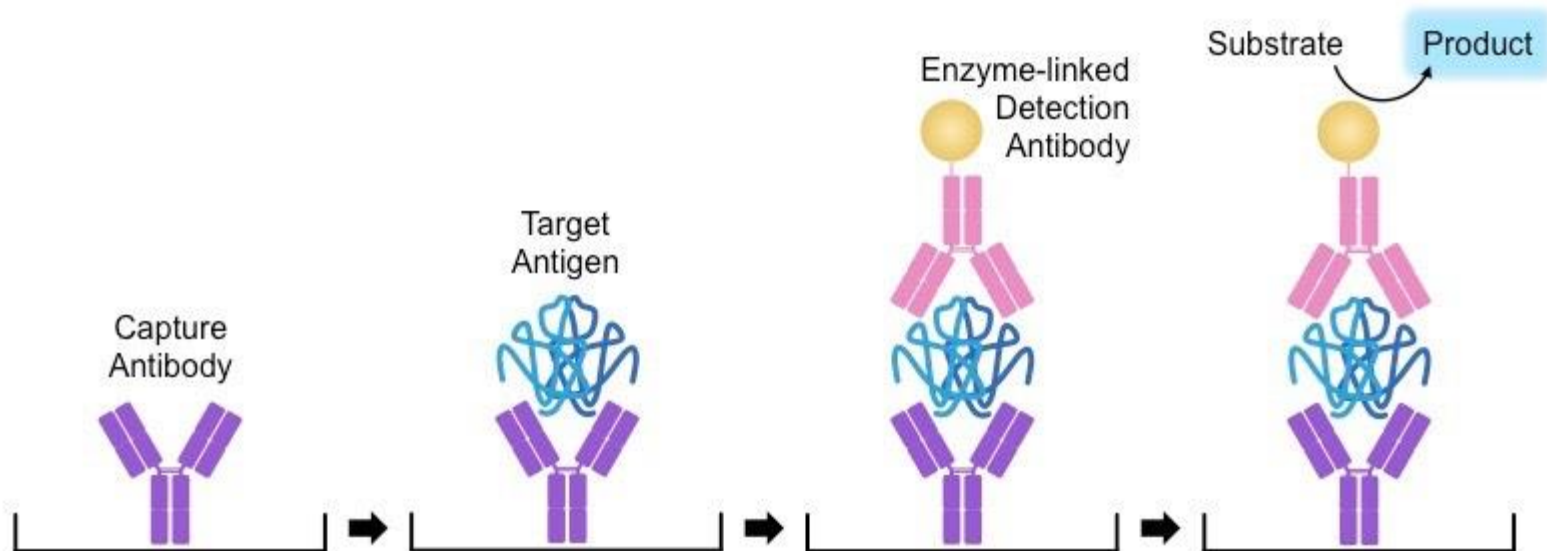


- DS2 DYNEX

4.3 ELISA - postup

- inkubace vzorku (+ kalibrátory a kontroly) v mikrotitračních jamkách s navázanou Ab proti vyšetřovanému Ag – vazba Ag-Ab
- odsátí vzorku + promytí jamek
- inkubace konjugátu (AbE) v jamkách – vazba na Ag
- odsátí AbE + promytí jamek
- detekce enzymatické aktivity komplexu Ab-Ag -AbE po přidavku chromogenního substrátu (A)
- odečítání výsledku: intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci Ag

4.3 ELISA - princip



5. Gelifikační (parakoagulační)

- využívají schopnosti některých látek (etanol, protaminsulfát) parakoagulovat (gelifikovat) v plazmě přítomné **monomery fibrinu**
- kvalitativní testy, hrubě orientační
- hodnocení v plasmě – vločky, vlákna fibrinu nebo viditelný gel
- **př. ethanolgelifikační test**
protaminsulfátový test

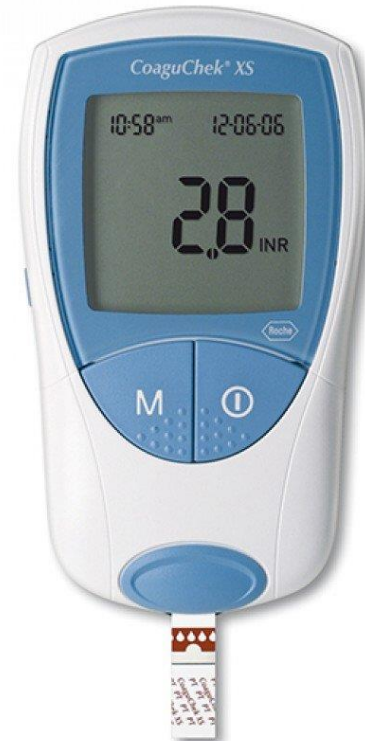
6. POCT

= point-of-care

- přenosné přístroje
- testování v místě péče o pacienta – přímo u lůžka (bed-side test), na ambulanci apod.
- speciálně upravené testovací soupravy, jednorázové pomůcky
- používají se k rychlé orientaci o parametrech koagulace
 - **Př. CoaguCheck® XS**
HEMOCHRON Jr., Signature Elite

6. POCT pro stanovení protrombinového času (PT)

- přístroje určené k monitorování léčby kumariny
- praktičtí lékaři, kardiologové, angiologové
- kapilární nebo venózní krev
 - př. CoaguCheck® XS (Roche)



6. POCT pro stanovení PT - princip

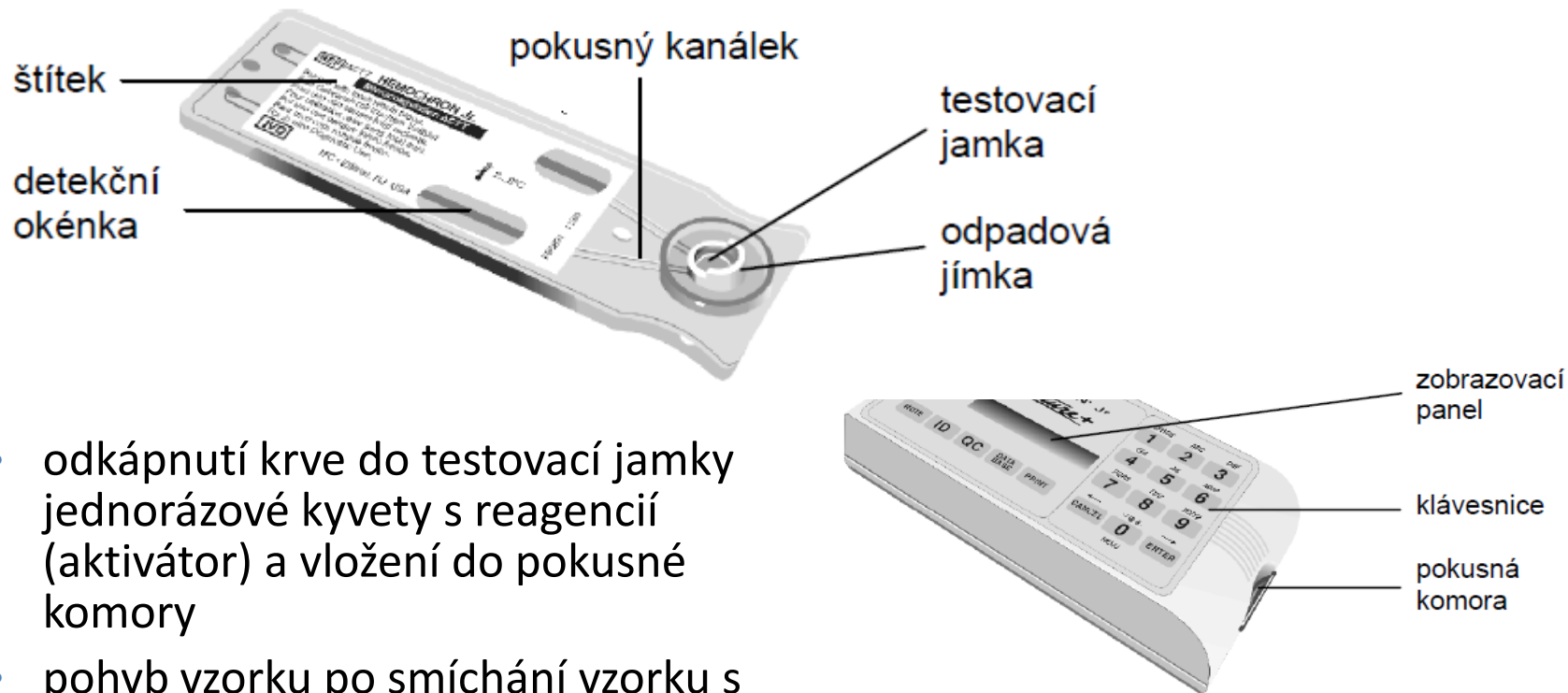
- do přístroje se vkládá testovací proužek obsahující lyofilizovanou reagensii (tromboplastin a peptidový substrát)
- tromboplastin po přidavku krve aktivuje koagulaci za vzniku trombinu
- trombin štěpí substrát a přitom generuje elektrochemický signál, který je přístrojem převeden na obvyklé jednotky koagulace
- vyhodnocený výsledek: **PT – INR, %Quick, sekundy**

6. POCT (Act+)

- př. Hemochron® Jr.,
Hemochron Signature Elite®
- pro stanovení aktivovaného koagulačního času (ACT+)
- k monitorování léčby heparinem ze vzorku plné krve
- gynekologie, kardiochirurgie, koronární jednotky, hemodialýza
- různé typy jednorázových kytet: PT, APTT, Citrate PT(APTT)



6. POCT – ACT+ (HEMOCHRON)



- odkápnutí krve do testovací jamky jednorázové kyvety s reagenty (aktivátor) a vložení do pokusné komory
- pohyb vzorku po smíchání vzorku s reagenty v pokusném kanálku předurčenou rychlostí
- začátek tvorby koagula je detegován na základě zpomalení toku vzorku v pokusném kanálku mezi optickými detektory LED

Dělení koagulačních testů

- A/ Globální

- popisují celý systém srážecího procesu
 - **doba krvácení, retrakce, TEG, aj.**

- B/ Skupinové (screening)

- popisují určitou část koagulačního systému
- umožňují odlišení poruch **vnitřní** a **vnější cesty** a **přeměny fibrinogenu**
 - **aPTT, TT, PT, ProCGlobal, aj.**

- C/ Specifické

- stanovuje se jeden z koagulačních činitelů (jednotlivé složky)
 - **FII, FV, FVII, FVIII, FX, FIX, FXI, FXII, PC, PS, vWF:Ac, vWF:Ag, aj.**

C/ Specifické koagulační testy

- Funkční aktivita

- **koagulační**

- jednofázové (jednostupňové) koagulační metody na principu PT nebo APTT

- **metody využívající chromogenních substrátů**

- dvoustupňové chromogenní metody

- Množství látky

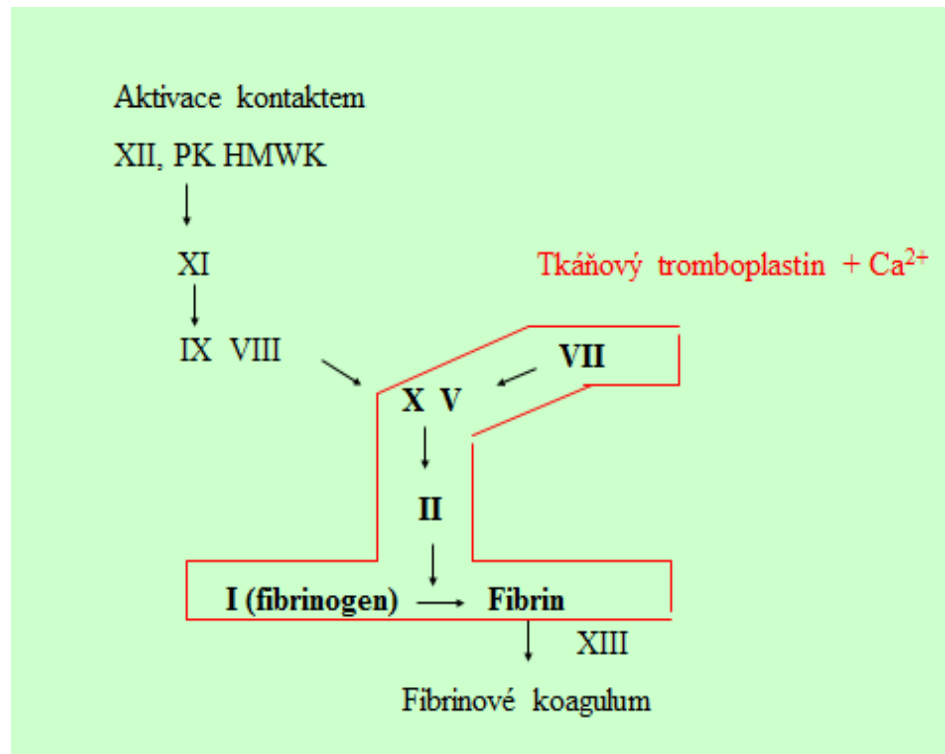
- vyšetření antigenu

- imunochemické metody
 - umožňují odlišení defektů
 - kvalitativních
 - kvantitativních

PT - PROTROMBINOVÝ ČAS

= tromboplastinový čas dle Quicka

- monitoruje **zevní** koagulační systém – FF II, V, VII, X a fibrinogen
- sledování času tvorby fibrinu po přidavku Ca^{2+} tromboplastinu (PL, Ca^{2+} , TF) k vyšetřované plazmě



PT - PROTROMBINOVÝ ČAS

- Vyjádření výsledků:

- koagulační čas v sekundách
- poměr **R** = čas vyšetřované plazmy pacienta / čas normálu
- **INR** – mezinárodní normalizovaný poměr
- % koagulační aktivity odečtením z kalibrační křivky

- **INR = R^{ISI} – pouze při léčbě kumariny (warfarin)**

- ISI – mezinárodní index citlivosti
- citlivost daného tromboplastinu stanovena vůči mezinárodnímu standardnímu tromboplastinu
- hodnota ISI stanovena pro každou šarži reagensie, výrobcem reagensie
- hodnota ISI by měla být < 1,5
- INR zajišťuje standardizaci a umožňuje porovnání výsledků PT z jednotlivých laboratoří

PT - PROTROMBINOVÝ ČAS

• Indikace PT

- základní koagulační test
- předoperační vyšetření
- krvácivý stav
- **léčba kumariny – monitoring léčby**
- podezření na patologický inhibitor

• Referenční rozmezí:

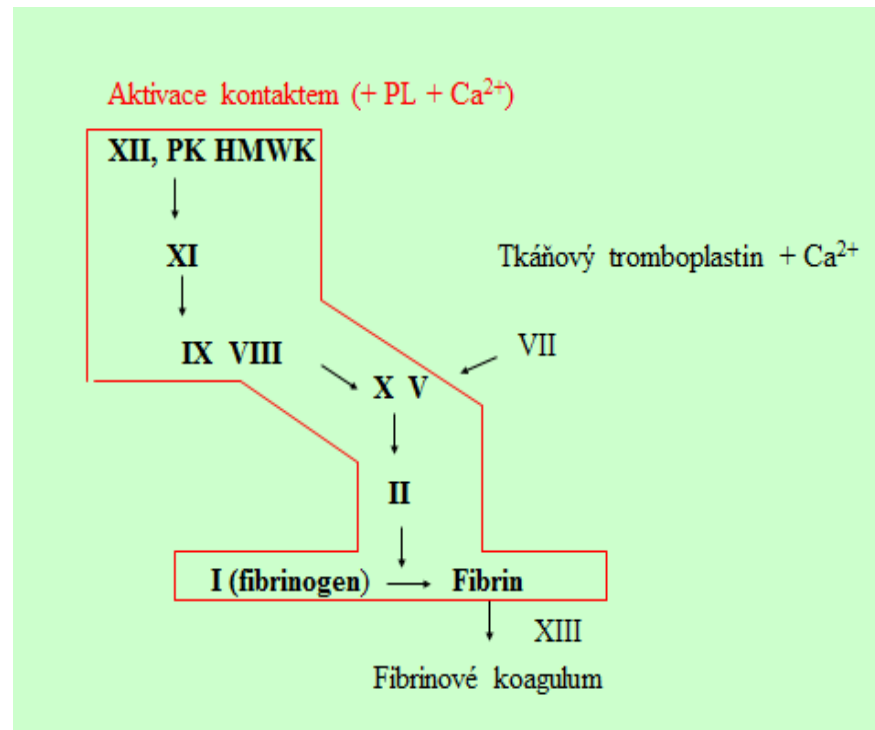
- liší se dle typu reagensie
- koagulační čas: 11 – 17 s
- $R = 0,8 - 1,2$
- terapeutický rozsah INR = 2,0 – 4,0

• Klinický význam: má prodloužení času

- **defekt faktorů** vnějšího systému FVII, FX, FII, ale i FV a fibrinogenu
 - vrozený
 - získaný – snížená syntéza, zvýšená spotřeba, zvýšené ztráty
- nedostatek vitamínu K
- léčba **kumariny (warfarin)**
- jaterní onemocnění
- DIC
- vyšší dávky heparinu (dle typu a dávky, dle citlivosti reagensie)
- **přítomnost inhibitoru** (specifický, nespecifický – LA)
- fyziologicky u novorozence

APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový test

- monitoruje **vnitřní** koagulační systém – PK (prekalikrein), HMWK (vysokomolekulární kininogen), FF XII, XI, IX, VIII ale i II, V, X a fibrinogen
- sledování času tvorby fibrinu po přidavku aktivátoru (př. kaolin), parciálního tromboplastinu (kefalin = fosfolipidy) a Ca^{2+} (CaCl_2) k vyšetřované plazmě



APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový test

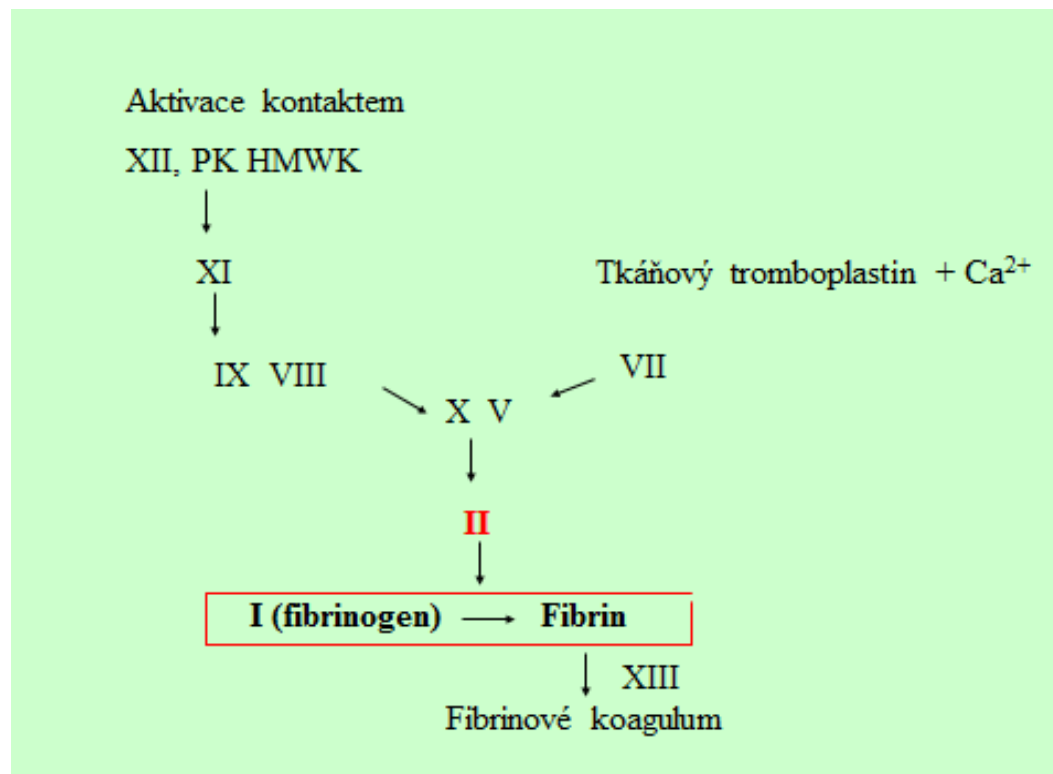
- Vyjádření výsledků:
 - koagulační čas v sekundách
 - poměr **R** (čas vyšetřované P/čas normální P)
- Referenční rozmezí:
 - koagulační čas - výrazně se liší dle typu reagencie (26 – 40 s)
 - poměr $R = 0,8 - 1,2$
- Indikace vyšetření APTT:
 - základní koagulační test
 - předoperační vyšetření
 - krvácivý stav
 - **léčba heparinem** – terapeutické rozmezí je závislé na typu reagencie
 - podezření na patologický inhibitor

APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový test

- **Klinický význam:** má prodloužení koagulačního času
 - defekt faktorů vnitřního systému FXII, XI, IX, FVIII, PK, HMWK (při současném prodloužení PT i nedostatek FX, ale i FV, FII a fibrinogenu pod 0,6 g/l
 - vrozený – hemofilie A, B
 - získaný - snížená syntéza, zvýšená spotřeba, zvýšené ztráty
 - defekt vWF
 - přítomnost inhibitorů (specifický, nespecifický)
 - fyziologicky u novorozence
 - heparin
 - arteficiálně (odběr, zpracování)
- má zkrácení koagulačního času
 - trombotické stavy
- **APTT je nejčastěji používaný test k monitorování léčby nefrakcionovaným heparinem!**

Trombinový čas

- monitoruje třetí fázi koagulace, tj. štěpení fibrinogenu trombinem
- sledování času tvorby **fibrinu** po přidavku trombinu (nízká koncentrace) k **neředěné** vyšetřované plazmě



Trombinový čas

- Vyjádření výsledků:
 - koagulační čas v sekundách
 - poměr R (čas vyšetřované P/čas normální P)
- Referenční rozmezí:
 - dle typu reagencie (< 24s)
- Klinický význam: má prodloužení koagulačního času
 - hypo/afibrinogémie
 - dysfibrinogémie
 - heparin
 - přítomnost inhibitoru (myelom, revmatoidní artritida)
 - fyziologicky u novorozence

Reptilázový čas

- reptiláza je hadí jed vykazující aktivitu podobnou trombinu
- na rozdíl od trombinu není však jeho působení ovlivněno přítomností heparinu
- sledování koagulačního času po přidavku reptilázy k neředěné vyšetřované P
- Referenční rozmezí:
 - dle typu reagentie (< 21s)
- Klinický význam:
 - podobný jako u TT s výjimkou vlivu heparinu

Fbg - Fibrinogen

- **funkční vyšetření** – vyšetření schopnosti přeměny na fibrin = **dle Clause**
- vyšetření **množství** – imunologické metody – LIA, ELISA
- **metoda dle Clause** – sledování času tvorby fibrinu po přidavku **nadbytku trombinu** (vysoká koncentrace) k **ředěné vyšetřované** plazmě
- **Vyjadřování výsledků:**
 - v g/l
 - nutnost opakování vyšetření
 - u nízkých hladin Fbg – opakovat v menším ředění a přepočet
 - u vysokých hladin Fbg – opakovat ve vyšším ředění a přepočet

Fbg - Fibrinogen

- Referenční rozmezí:

- 1,8 – 4,2 g/l

- Klinický význam:

- snížení – vrozené hypo, afibrinogenémie, těžké poruchy jater (syntéza), zvýšená spotřeba, zvýšené ztráty, trombolytická léčba, dysfibrinogenémie
- zvýšení – těhotenství, zánět, nádorová onemocnění, stavy po operaci

AT - Antitrombin

- stanovení **funkční aktivity** AT se provádí **fotometrickou metodou**
 - využívá se schopnosti AT vytvářet v přítomnosti heparinu ireversibilní komplexy
 - vyšetřovaná plazma je inkubovaná s nadbytkem trombinu v přítomnosti heparinu
 - následně se stanovuje množství zbytkového trombinu přidáním specifického chromogenního substrátu, který je trombinem štěpen za vzniku zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná množství zbytkového trombinu a nepřímo úměrná množství AT ve vzorku

AT - Antitrombin



AT III plasma sample



Thrombin

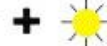
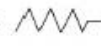
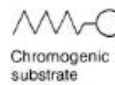
Heparin



AT III/Heparin
Thrombin complex



Residual thrombin



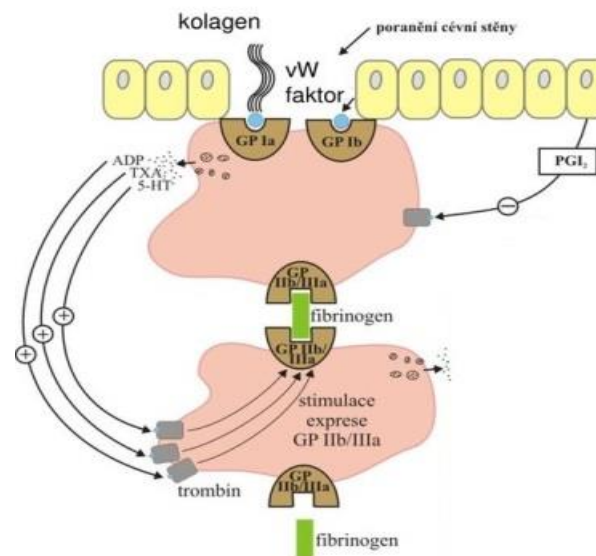
Coloured dye

AT - Antitrombin

- Vyjadřování výsledků:
 - výsledky funkční aktivity AT se uvádějí v % a získávají se odečtením z kalibrační křivky
- Referenční rozmezí:
 - 80 – 120%
- Klinický význam: má snížení inhibiční aktivity - představuje zvýšené trombofilní riziko
 - defekty AT
 - vrozené
 - získané – snížená syntéza (jaterní onemocnění, fyziologicky - novorozenec), zvýšené ztráty (nefrotický syndrom), zvýšená spotřeba (DIC, TEN, rozsáhlé operace), jiné příčiny (těhotenství, kontraceptiva)
 - zvýšení inhibiční aktivity nemá klinický význam

Testy primární hemostázy

- Počet a morfologie PLT
- Globální testy
 - Doba krvácení
 - Vyšetření retrakce plazmatického koagula
- Funkční testy
 - Adheze
 - Agregace



PFA

- Materiál

- plná krev

- Princip

- sledování tvorby destičkového trombu, který postupně vyplňuje otvor (štěrbinu) v membráně potažené buď **kolagenem a epinefrinem** nebo **kolagenem a ADP**
- agregační a adhezivní funkce trombocytů

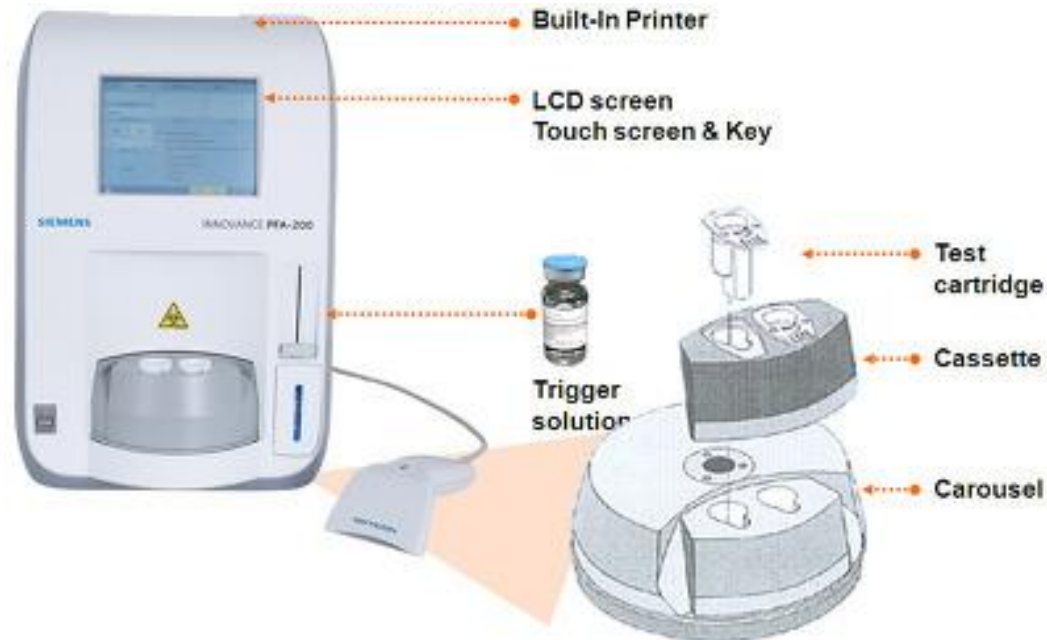
- Reagencie

- Jednorázové cartridge: Col/Epi , Col/ADP
- Trigger solution – startovací roztok
 - (nanášen na membránu v měřícím modulu)

PFA

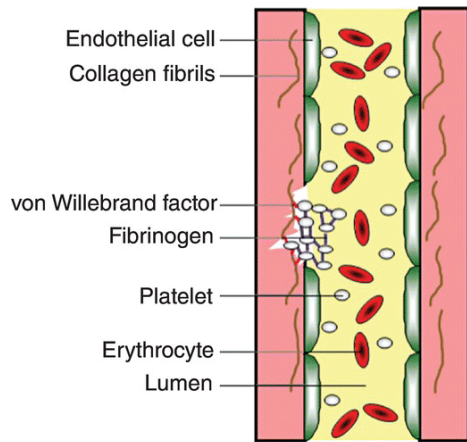
- Vyhodnocení

- výsledkem testu je čas potřebný k dosažení kompletního uzávěru otvoru membrány = **CT (Closure time)**
 - Col/Epi > 300s, Col/ADP > 300 s - VWD
 - Col/Epi > 300s , Col/ADP v normě – léčba ASA

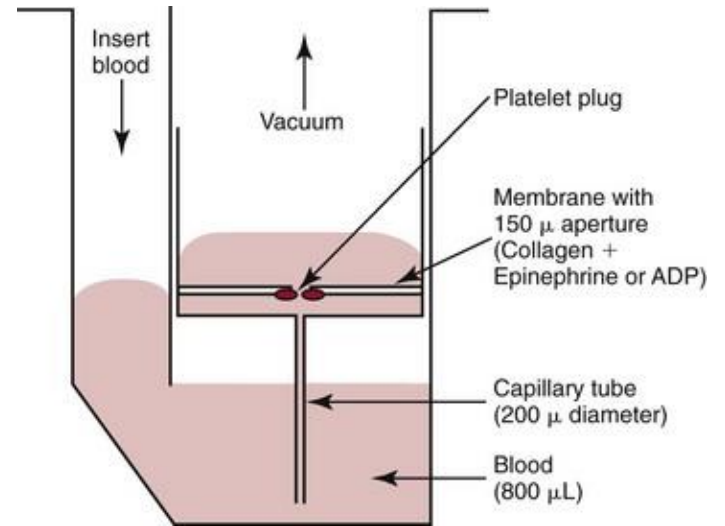
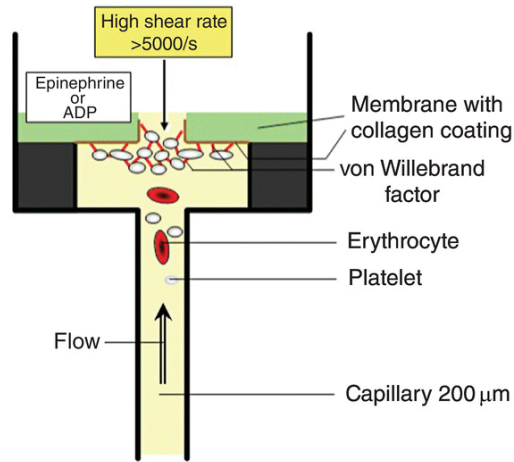


PFA

In vivo haemostasis



PFA-100[®]



Vyšetření agregace trombocytů

- Turbidimetrická metoda

- sledování změn průchodnosti světla (transmise - T), ke které dochází vlivem tvorby agregátů krevních destiček
- Vyšetřovaný materiál: PRP (platelet-rich plasma)
- př. **APACT 4004**

- Impedanční metoda

- sledování změn vodivosti vyvolaných tvorbou agregátů krevních destiček
- Vyšetřovaný materiál: plná krev
- př. **Multiplate®**

Vyšetření agregace trombocytů

- **agregace samovolná (spontánní)**
- **agregace indukovaná (stimulovaná)**
 - Induktory: ADP, kolagen, adrenalin (epinefrin), ristocetin, kyselina arachidnová, trombin
- **primární agregace** – vlivem vnějšího podnětu
- **sekundární agregace** – vlastní příspěvek trombocytů

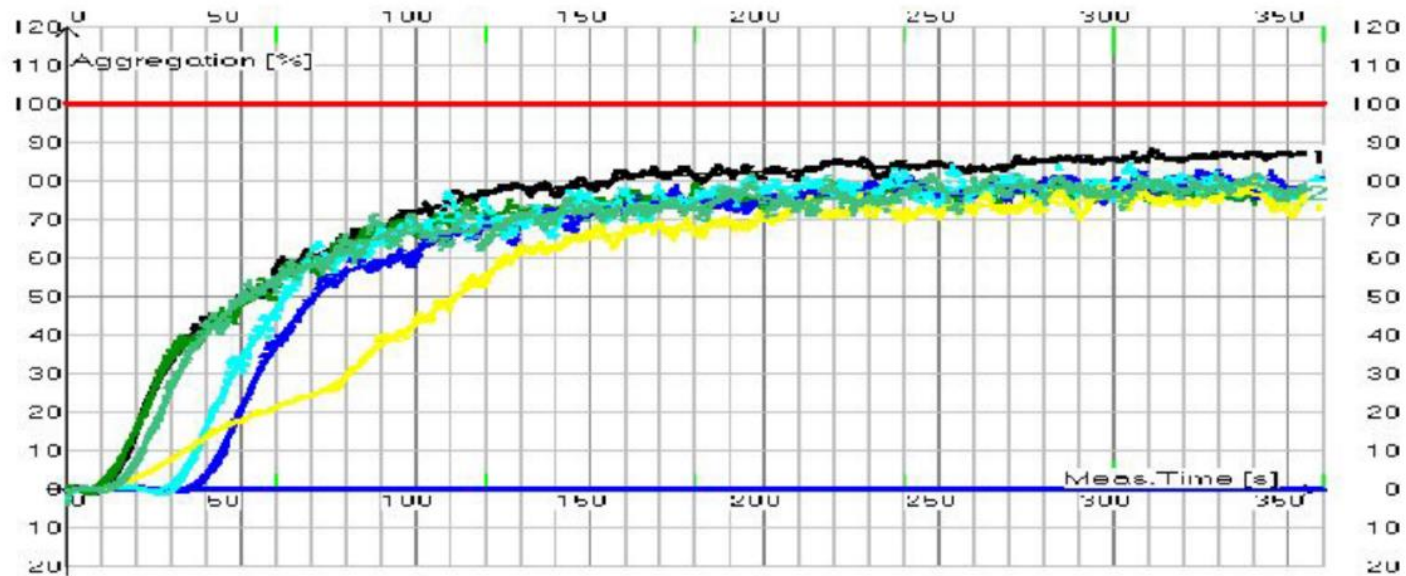
Vyšetření agregace trombocytů (turbidimetrie)

- **Maximální amplituda A max (%)**
- **Desagregace (%)**
 - jen u ADP v případě reversibilní křivky
- **Doba latence (s)**
 - časová prodleva před agregační odpovědí
 - jen u kolagenu
- **Strmost křivky Slope (%/min)**



Agregometr AACT 4004

Vyhodnocení agregace



Agregace

Date	Time	User	First name	Last name	Pat.#	Test	Remark	Channel	Agg. Max [%]	Agg. Inclination [%/min]	Agg. LagPhase [s]	De-Agg. De-Agg. [%]
06.12.2016	08:58:36	Labor				ADP 5 µM	PRP 304 PPP 0		87.29	109.59		0.00
06.12.2016	08:58:48	Labor				ADP 10 µM		2	78.24	107.65		0.00
06.12.2016	08:59:01					Kollagen 2 µg/ml		3	80.65	107.44	42.2	
06.12.2016	08:59:13					Kollagen 5 µg/ml		4	80.39	108.72	32.6	
06.12.2016	09:08:01					Epi 10 µM		1	77.42	45.81		
06.12.2016	09:08:13					Kys. arachidonová 5		2	79.58	109.89	15.8	

Vyšetření agregace trombocytů – impedance

- vyšetření ve vzorku plné krve jednorázové testovací cartridge
- široká paleta standardizovaných testů a reagensů (aktivátory: kys. arachidonová, kolagen, ADP, TRAP-6, ristocetin)

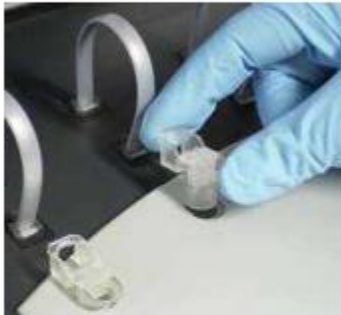
► Multiplate® reagents



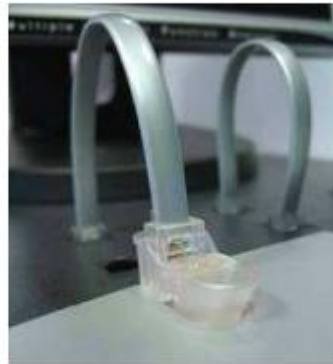
Vyšetření agregace trombocytů (impedance)

► Performing the test

put the test cell into the measuring position



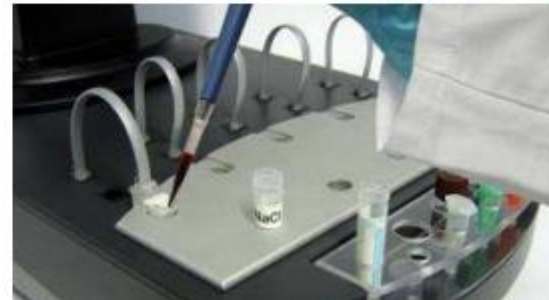
attach the sensor cable



pipette 300 μ l of saline + 300 μ l of blood*

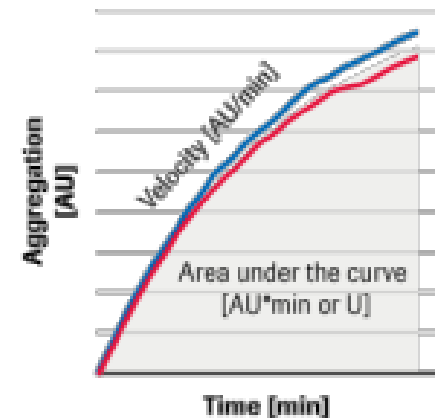
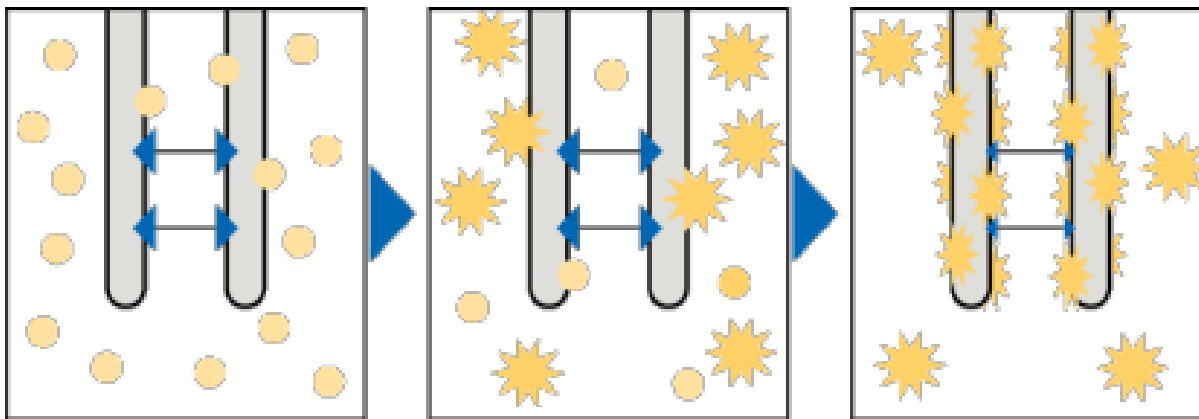


allow 3 minutes for warming and equilibration



Vyšetření agregace trombocytů (impedance)

- adheze a agregace trombocytů na povrchu drátů zvyšuje elektrický odpor mezi dráty (senzory)



- plocha pod křivkou AUC ($\text{AU} \cdot \text{min}$)
- 2 senzory – 2 křivky

Vyšetření retrakce plazmatického koagula

- schopnost trombocytů retrahovat (smršťovat) plazmatické koagulum (metoda dle Bethause)
- **Materiál**
 - PRP získaná sedimentací
- **Postup**
 - ředění PRP + přídavek Ca^{2+} (Ca^{2+} - tromboplastin)
 - vytvoření plazmatického koagula v graduované zkumavce a oddělení koagula od stěn zkumavky
 - odečtení délky koagula po 3 hod
 - odečtení % retrakce z tabulky

Vyšetření retrakce plazmatického koagula

- **Klinický význam**

- snížení - upozorňuje na poruchu retrakční schopnosti trombocytů



Děkuji za pozornost

Andrea Štěpařová

OKH FN BRNO

Úsek koagulace

Steparova.Andrea@fnbrno.cz
