

# Speciální koagulační vyšetření I



# Koagulační faktory

## → Vyšetření funkční aktivity

### ↘ jednofázová metoda na principu APTT

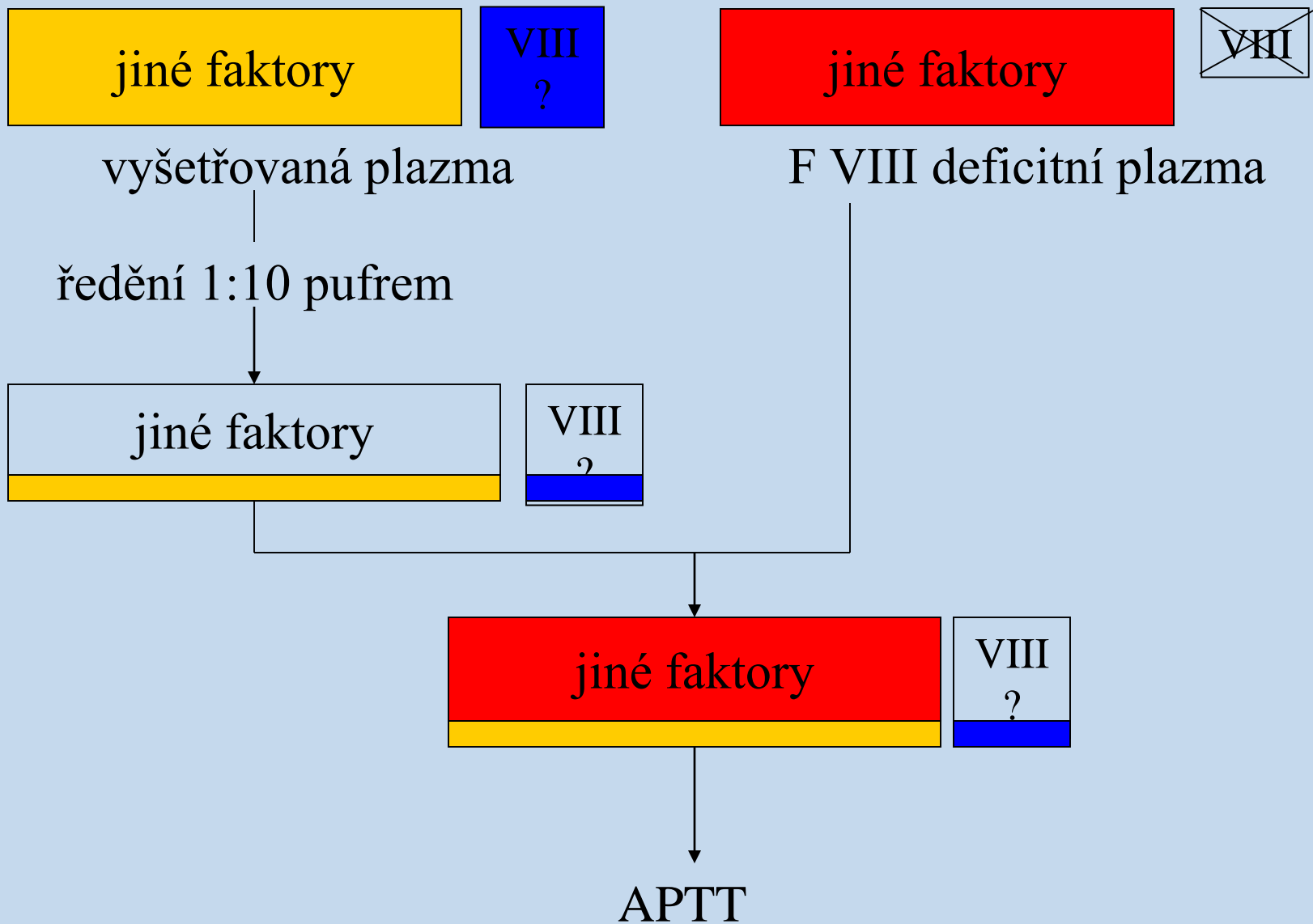
- FF VIII, IX, XI, XII, PK, HMWK

### ↘ 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 díl **neředěné deficitní plazmy**

→ FF vnitřního systému

1 díl **APTT** reagencie, inkubace

1 díl  $\text{CaCl}_2$

→ FF vnějšího systému

inkubace, 2 díly  **$\text{Ca}^{2+}$ -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

# 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

# Snížení faktorů

- Snížení - mimo kalibrovanou oblast ( $< 10\%$ )
- Výchozí ředění vyšetřované plazmy 1 : 10
  - ↘ opakování vyšetření s nižším ředěním plazmy 1 : 5
  - ↘ 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
  - ↘ 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
- Pro F VIII > 400 %
  - ↘ opakovat s ředěním 1:80
  - ↘ odečíst a vynásobit 8x



# FVIII -fotometrická metoda

- Tvorba enzymatického komplexu- **tenázy**
  - ↘ F VIIIa aktivovaný trombinem v přítomnosti konstantního množství F IXa, PL a Ca<sup>2+</sup>
- 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 (**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)
- 

# Identifikace specifického inhibitoru

Inhibitor namířený proti FF, časově závislý

Orientačně tzv. „**cirkulující antikoagulans**“

→ 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

# Cirkulující antikoagulans

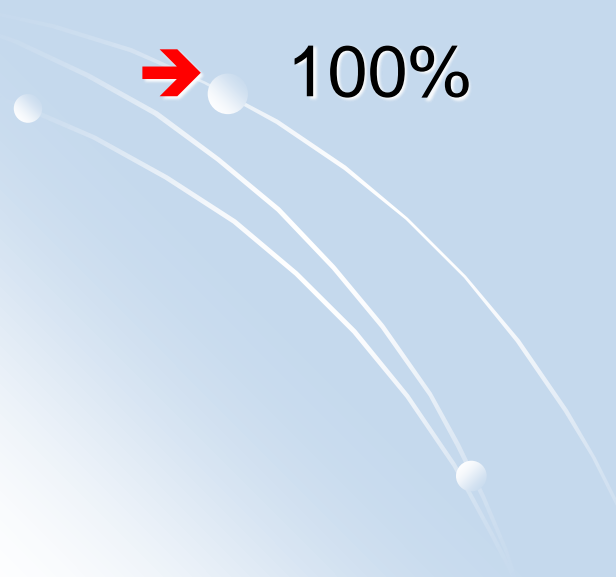
## vyhodnocení výsledků

- 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

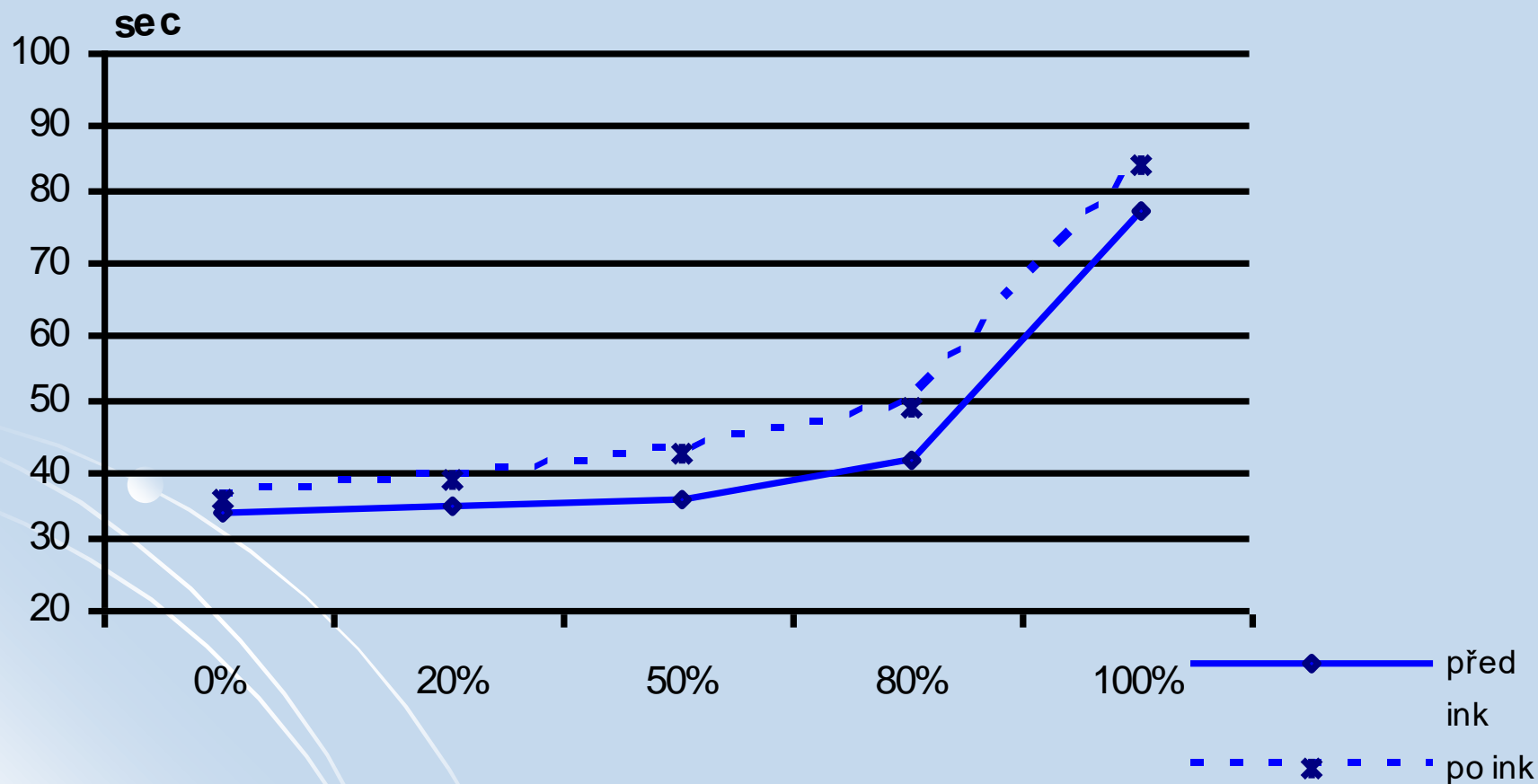


# Cirkulující antikoagulans

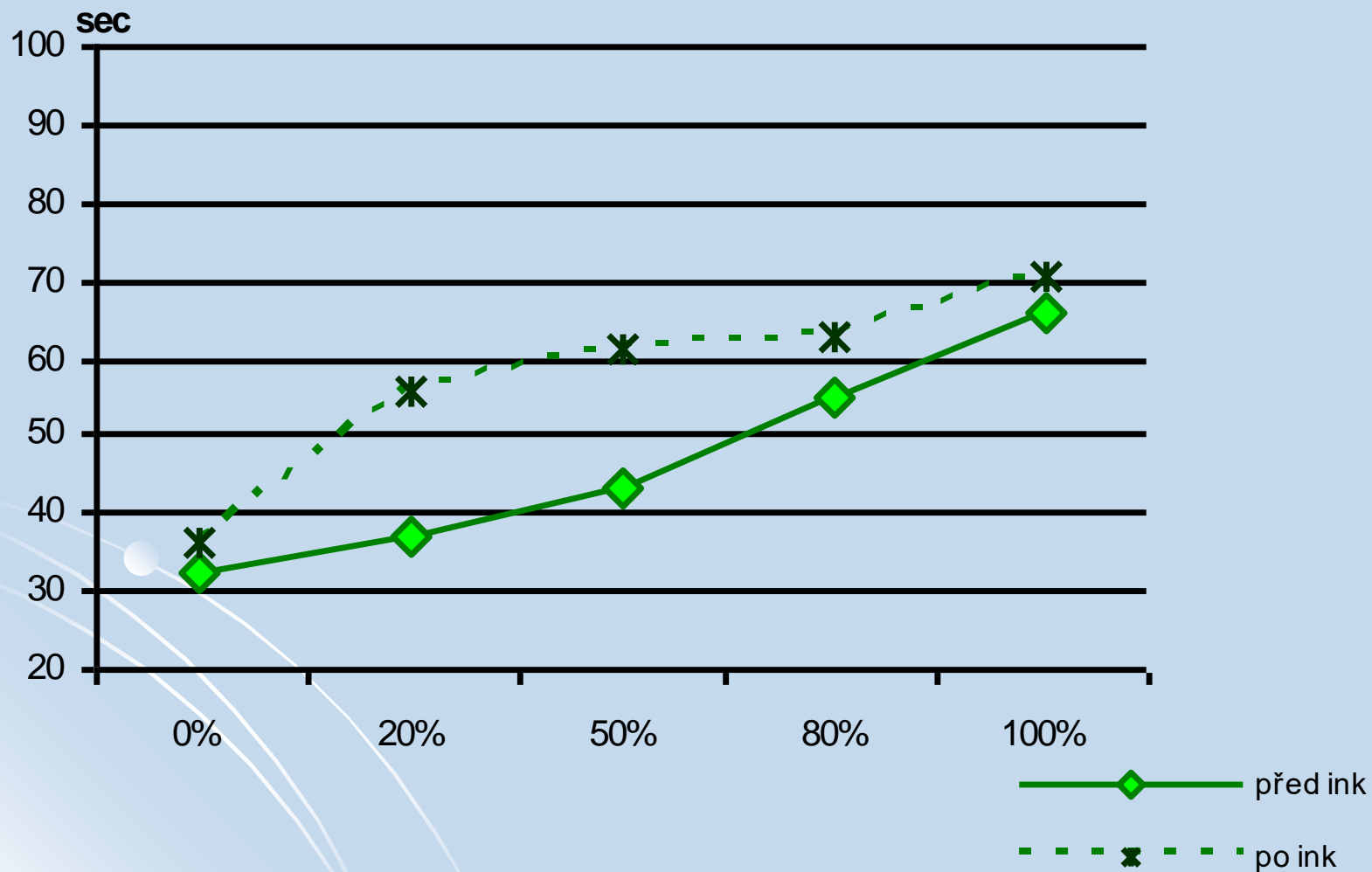
## grafické znázornění

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

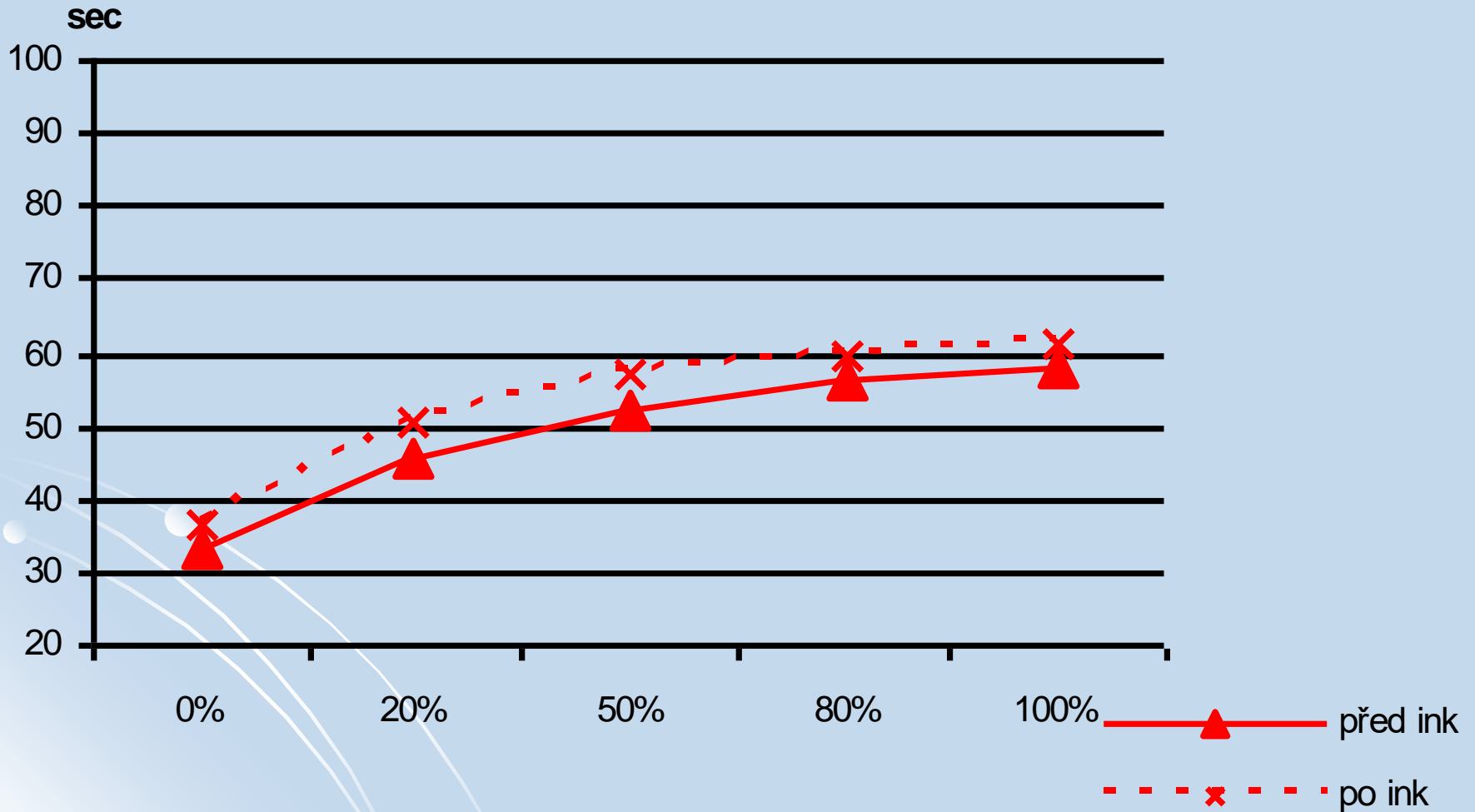
# Cirkulující antikoagulans APTT - defekt faktorů



# Cirkulující antikoagulans APTT - časově závislý inhibitor



# Cirkulující antikoagulans APTT - časově nezávislý inhibitor



# Identifikace specifického inhibitoru

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

# 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  $\geq 0,6$  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)
- Použití **bezdestičkové plazmy** (PFP)
  - ➔ dvojnásobná centrifugace

# Laboratorní diagnostikay - LA

## → Screening (reagencie s ↓PL)

- ↘ dAPTT

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

## → Korekční testy

- ↘ na principu testů, kde screening pozitivní

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

## → Konfirmační testy (v přítomnosti ↑ PL)

- ↘ na principu testů, kde screening pozitivní a negativní korekce


- ↘ vyhodnocení zkrácení koagulačních časů



# Vyšetření faktoru XIII

- Stanovení funkční aktivity
  - ↘ sledování rozpustnosti koagula
  - ↘ fotometricky
- Stanovení antigenu
  - ↘ LIA
  - ↘ EID
  - ↘ ELISA

# 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

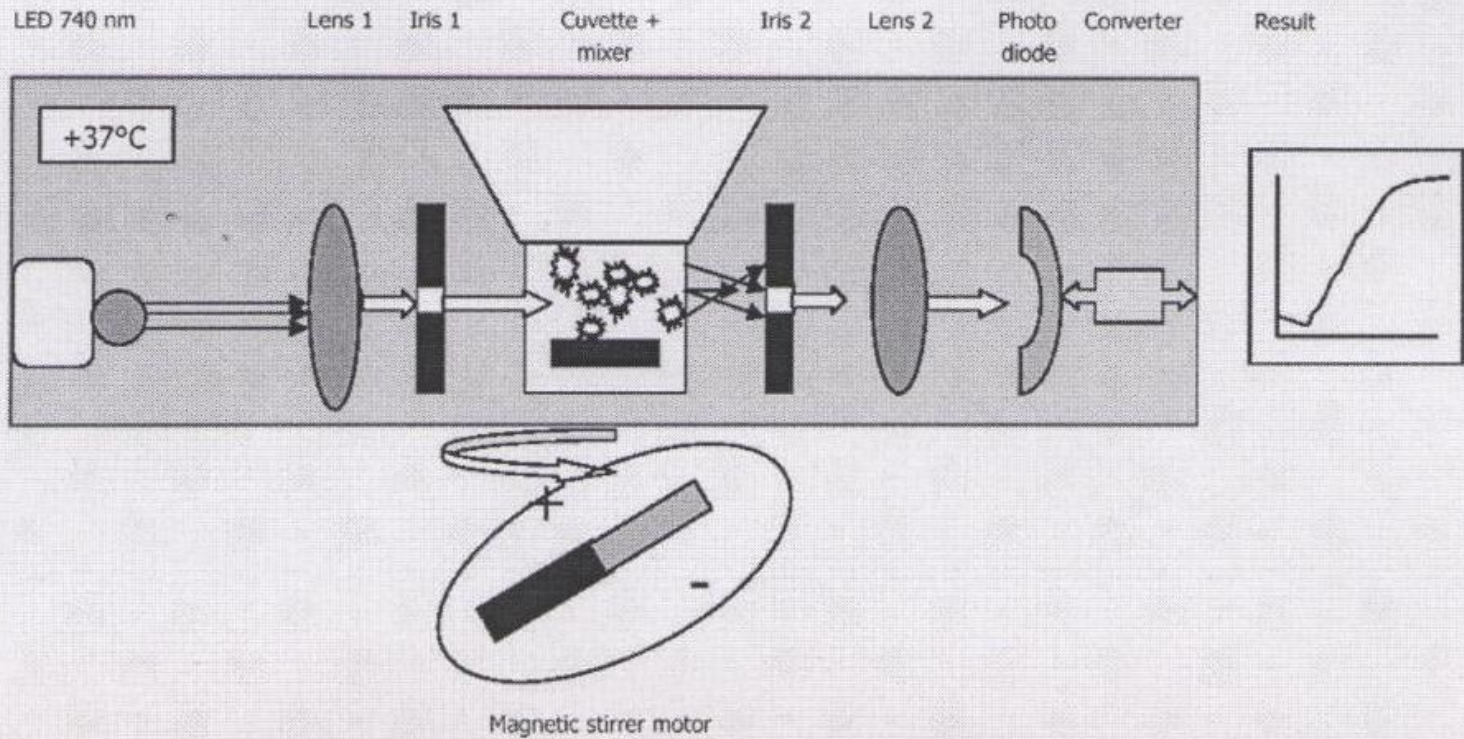
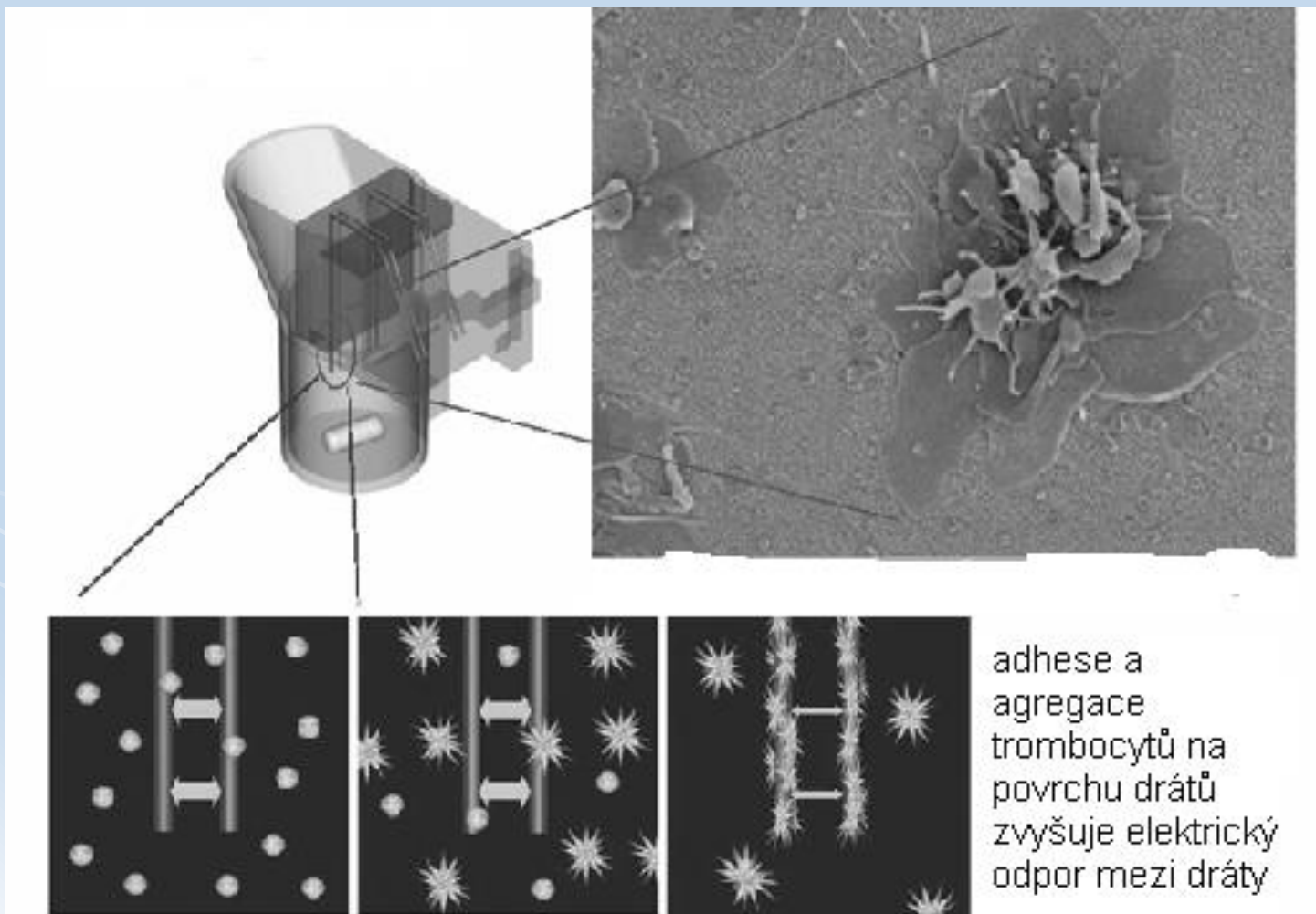


Figure 6

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  $250 - 300 \times 10^9$ , PPP  $< 20 \times 10^9$

→ vyšetření agregace (agregometr)

↘ vložení kyvety s PPP a PRP (rozdíl T = 100%)

↘ sledování agregační odpovědi v PRP v čase

● 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

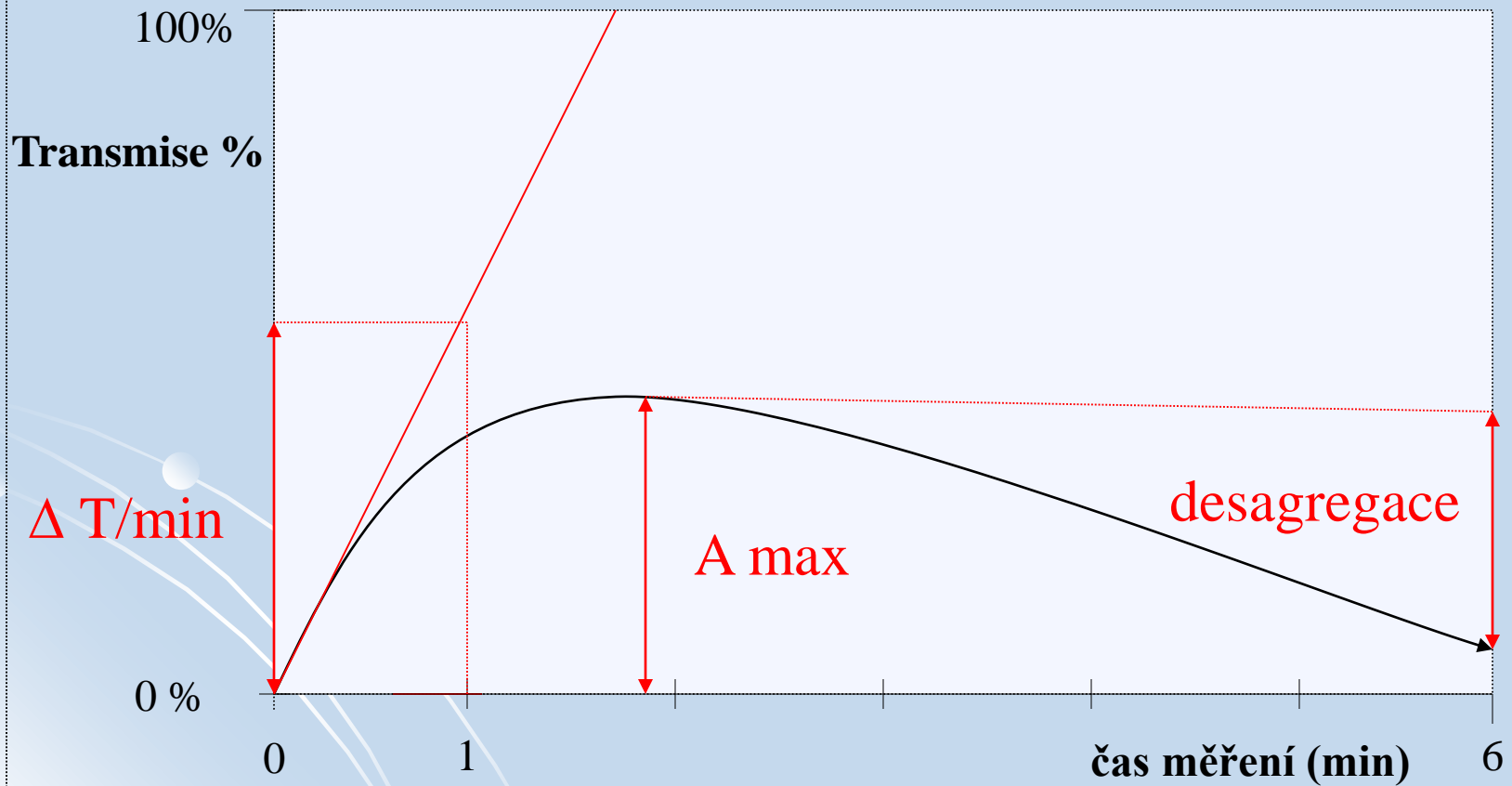
↘ jen u kolagenu

→ Strmost křivky = slope (%/min)



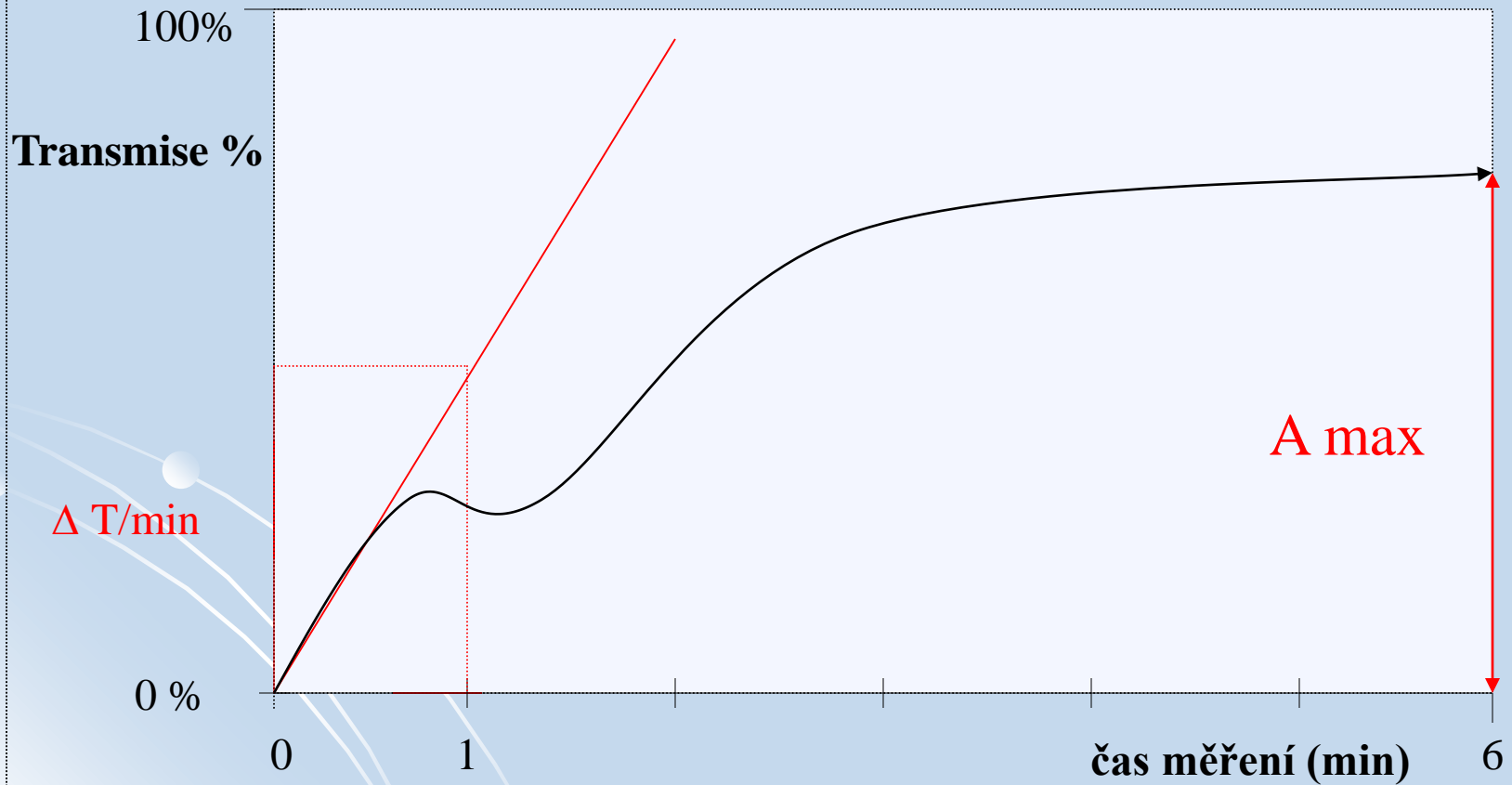
# Agregační křivka

## Agregace ADP 2,5



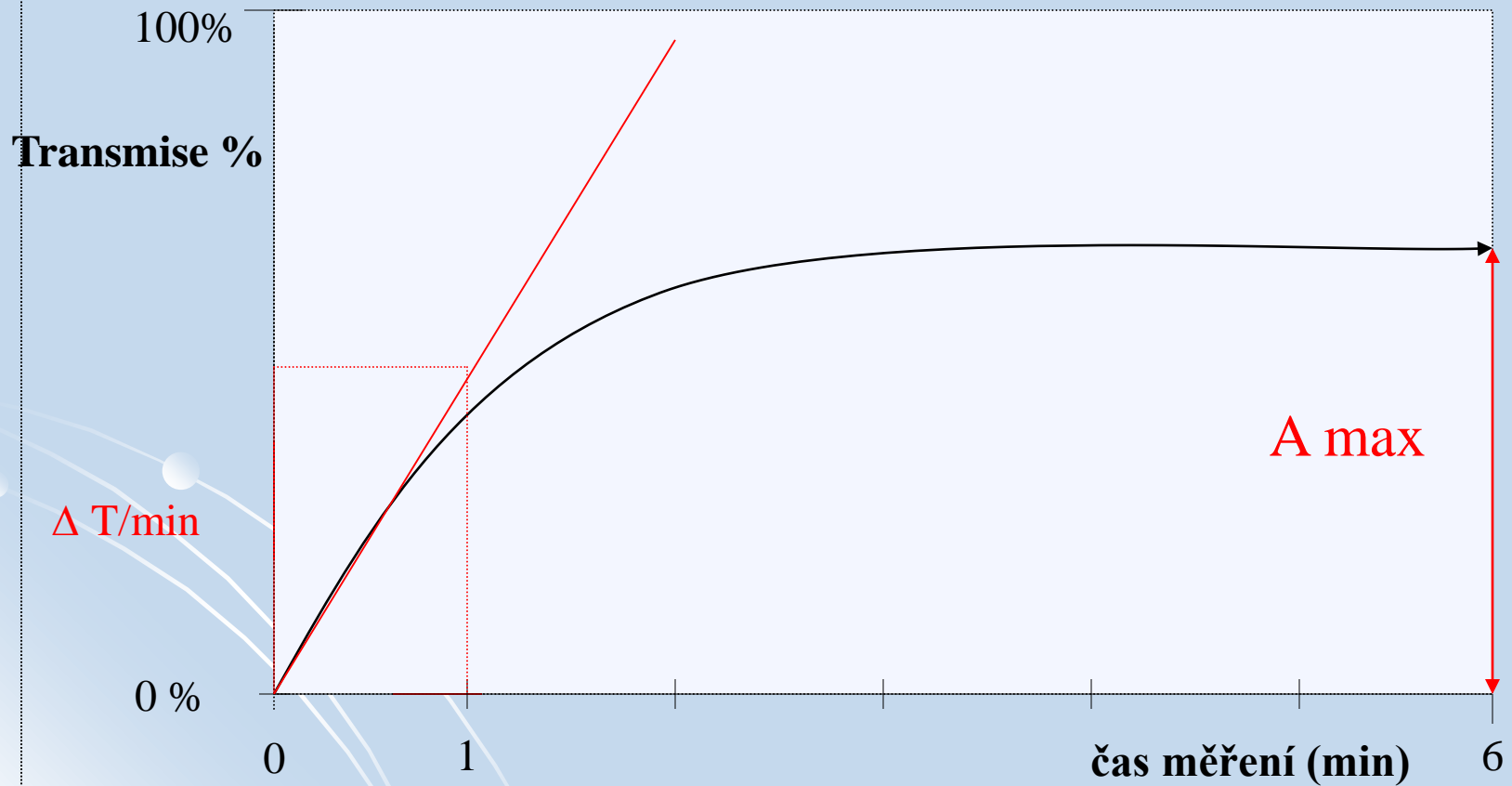
# Agregační křivka

## Agregace ADP 5



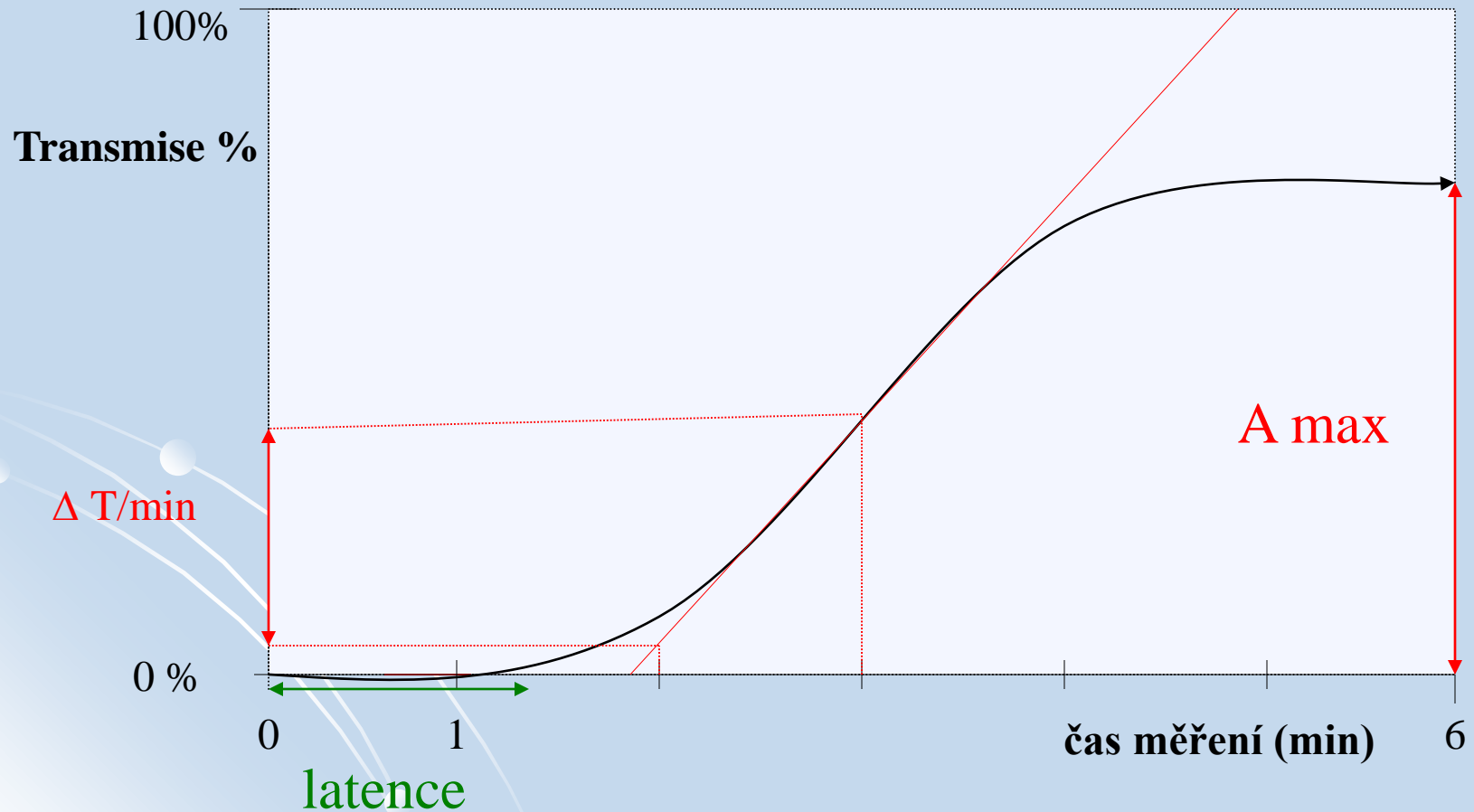
# Agregační křivka

## Agregace ADP 10



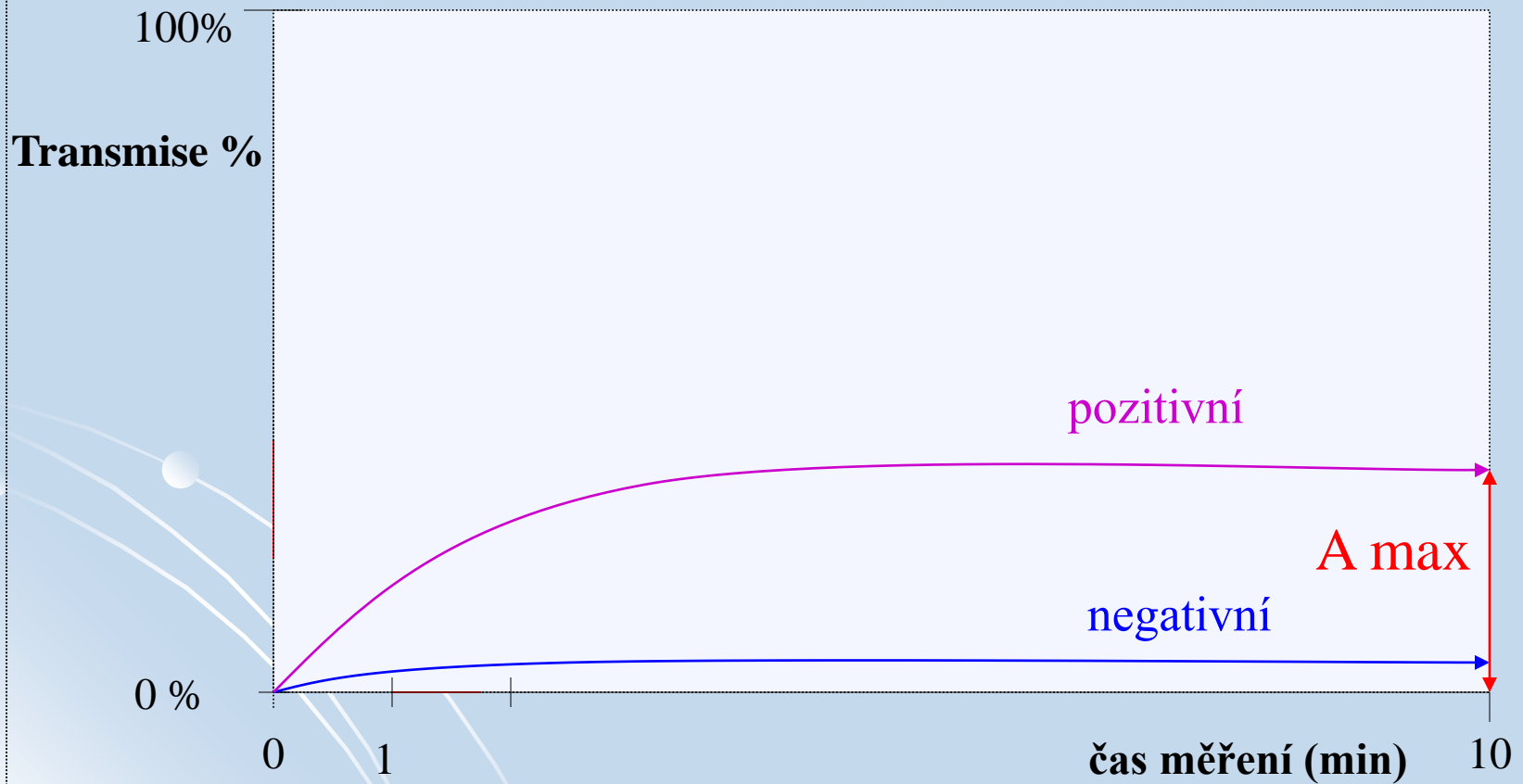
# Agregační křivka

## Agregace kolagen

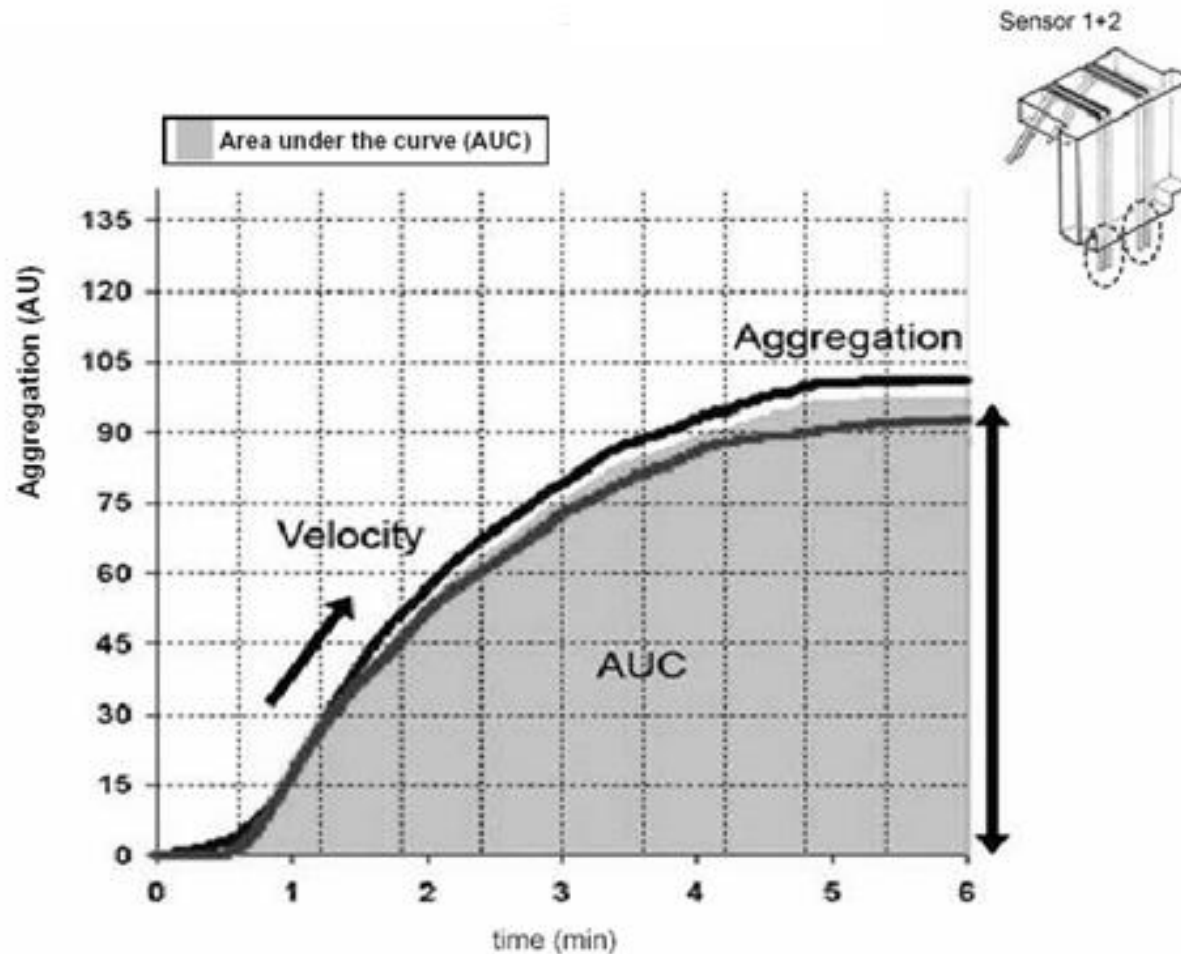


# Agregační křivka

## Samovolná agregace



# Vyhodnocení - impedanční metoda



# Retrakce

Schopnost trombocytů smršťovat krevní nebo plazmatické koagulum (metoda dle Bethause)

## → Postup

- ↘ získání PRP sedimentací
- ↘ ředění PRP + přídavek  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -tromboplastin
- ↘ vytvoření plazmatického koagula v graduované zkumavce a oddělení koagula od stěn zkum.
- ↘ odečtení délky koagula po 3 hod
- ↘ odečtení % retrakce z tabulky