

Speciální koagulační vyšetření I



Koagulační faktory

→ Vyšetření funkční aktivity

↘ jednofázová metoda na principu APTT

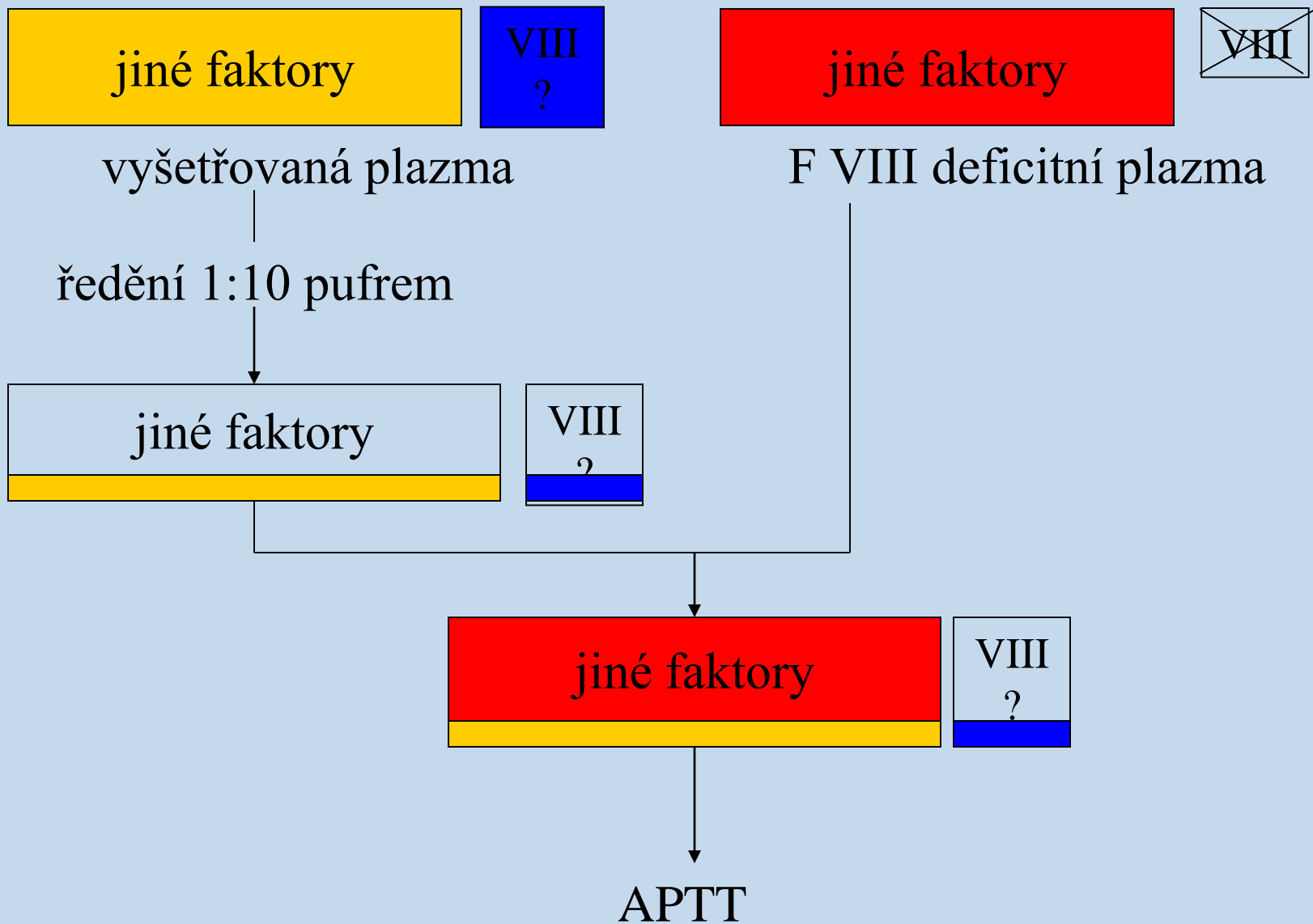
- FF VIII, IX, XI, XII, PK, HMWK

↘ 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 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% ,

→ 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 Ca²⁺

→ která **aktivuje F X** dodávaný **v** konstantním nadbytku na F Xa

→ **Měření tvorby F Xa pomocí chromogenního substrátu**

→ **Klinický význam**

↳ vyloučení hemofílie, v přítomnosti LA, monitorování léčby

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)

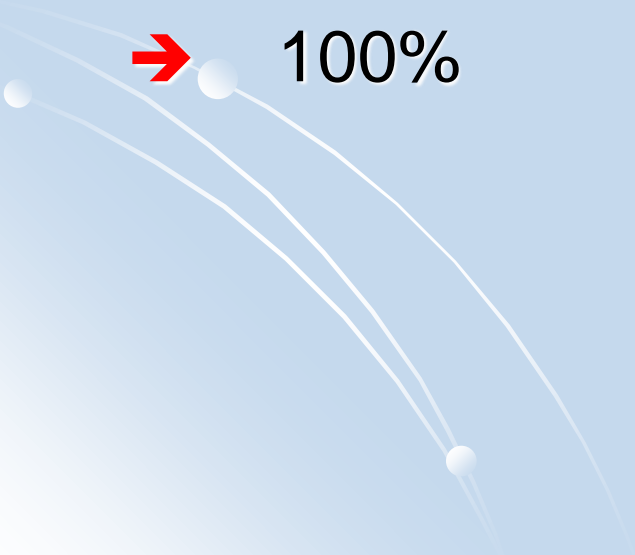
● – silný inhibitor

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

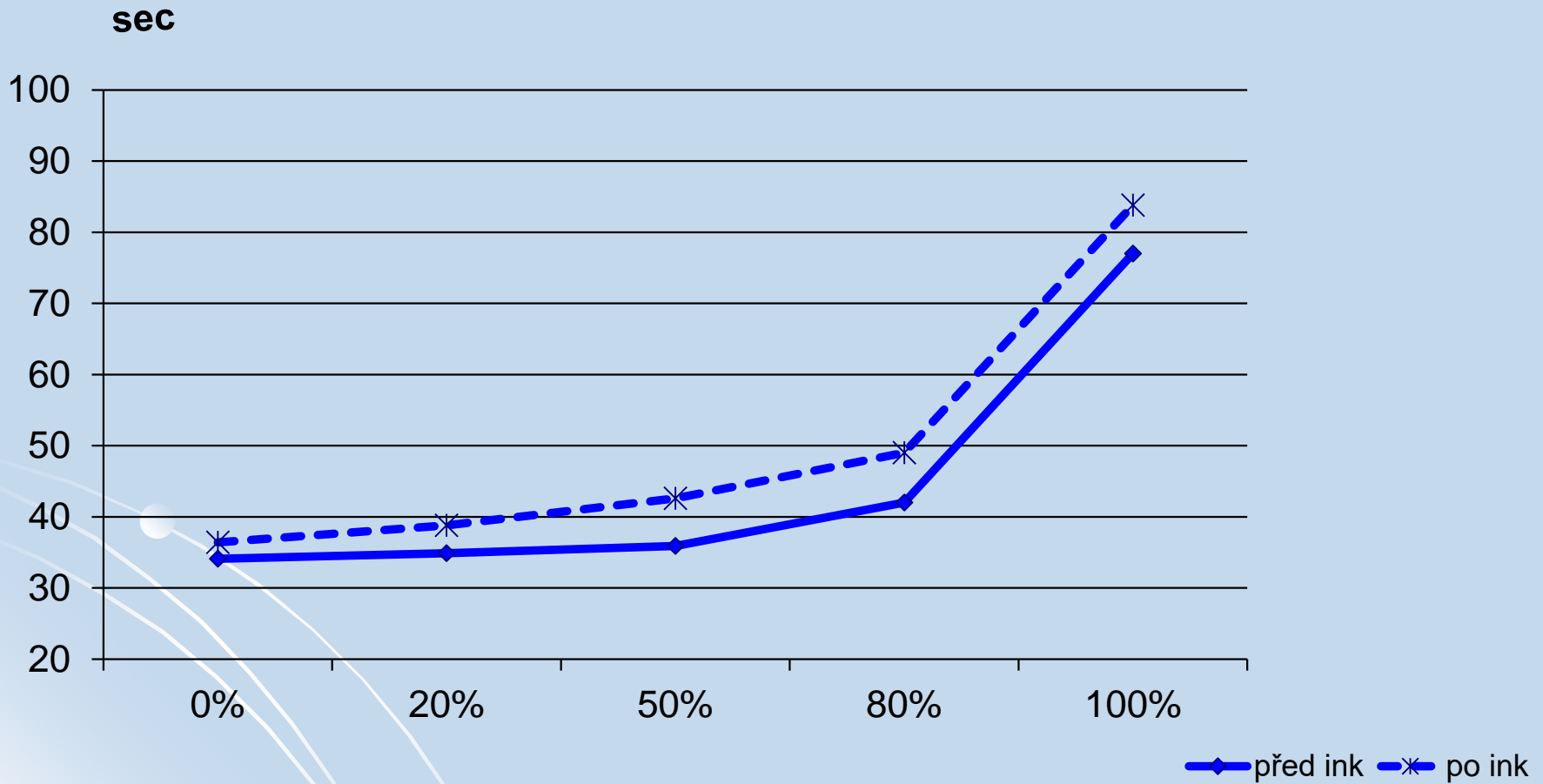
→ příměs 1/5 NP nezpůsobí korekci časů PP pacienta (směs 4+1) - slabý inhibitor

Cirkulující antikoagulans

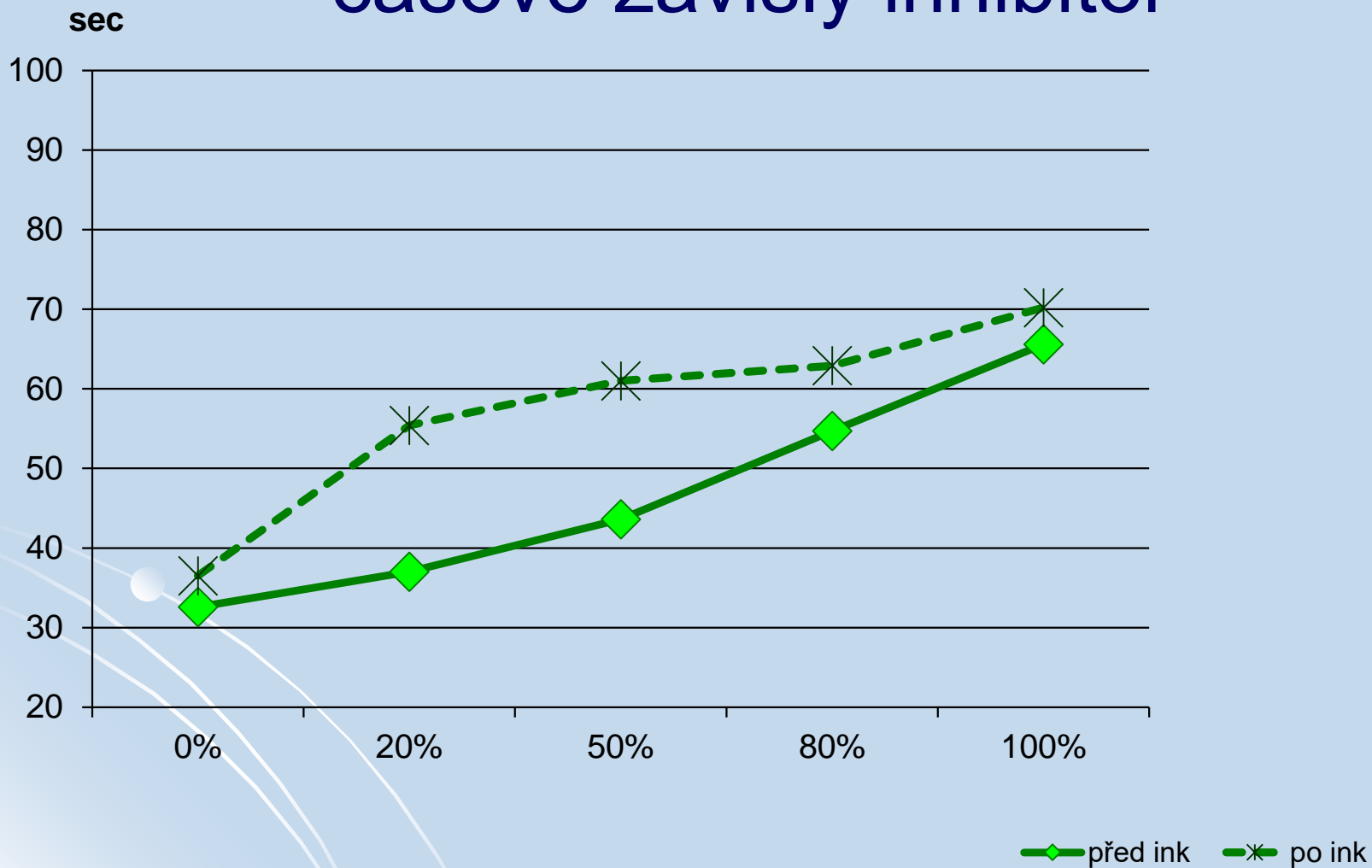
grafické znázornění

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

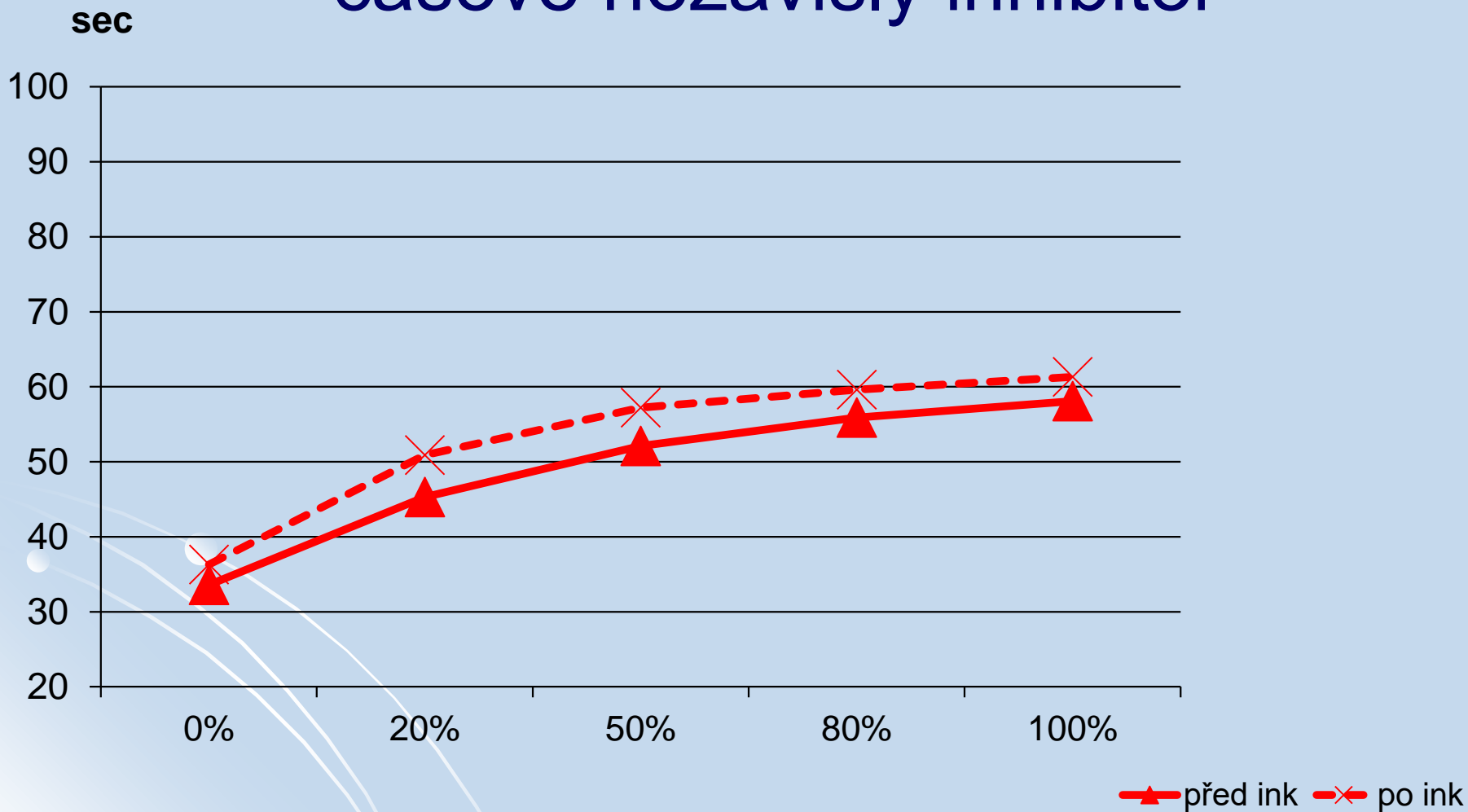
Cirkulující antikoagulans APTT - defekt faktorů



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 $\geq 0,8$ 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 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 (v PRP)

→ Impedanční metoda

- ↘ sledování změn vodivosti vyvolaných tvorbou agregátů krevních destiček (plná krev)

Turbidimetrická metoda

Function of an APACK photometer

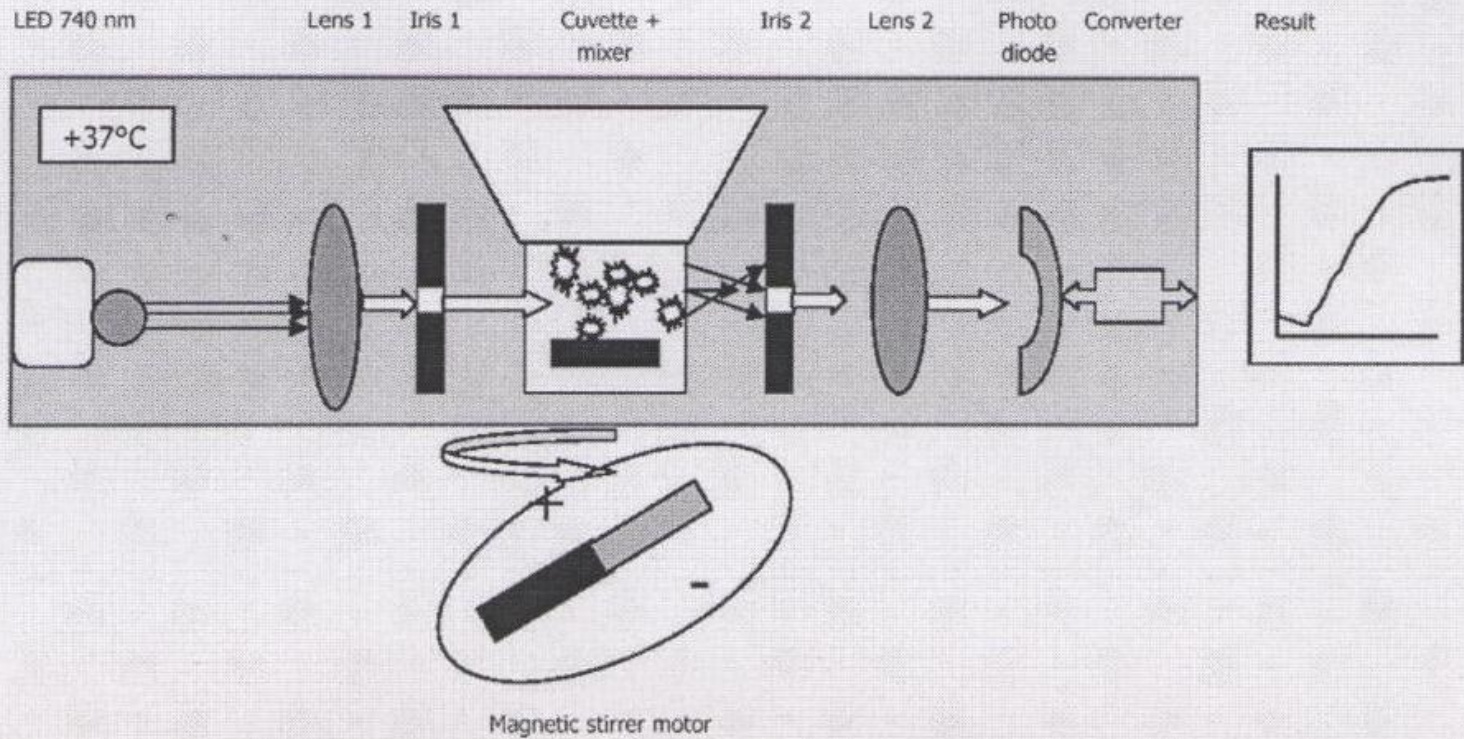
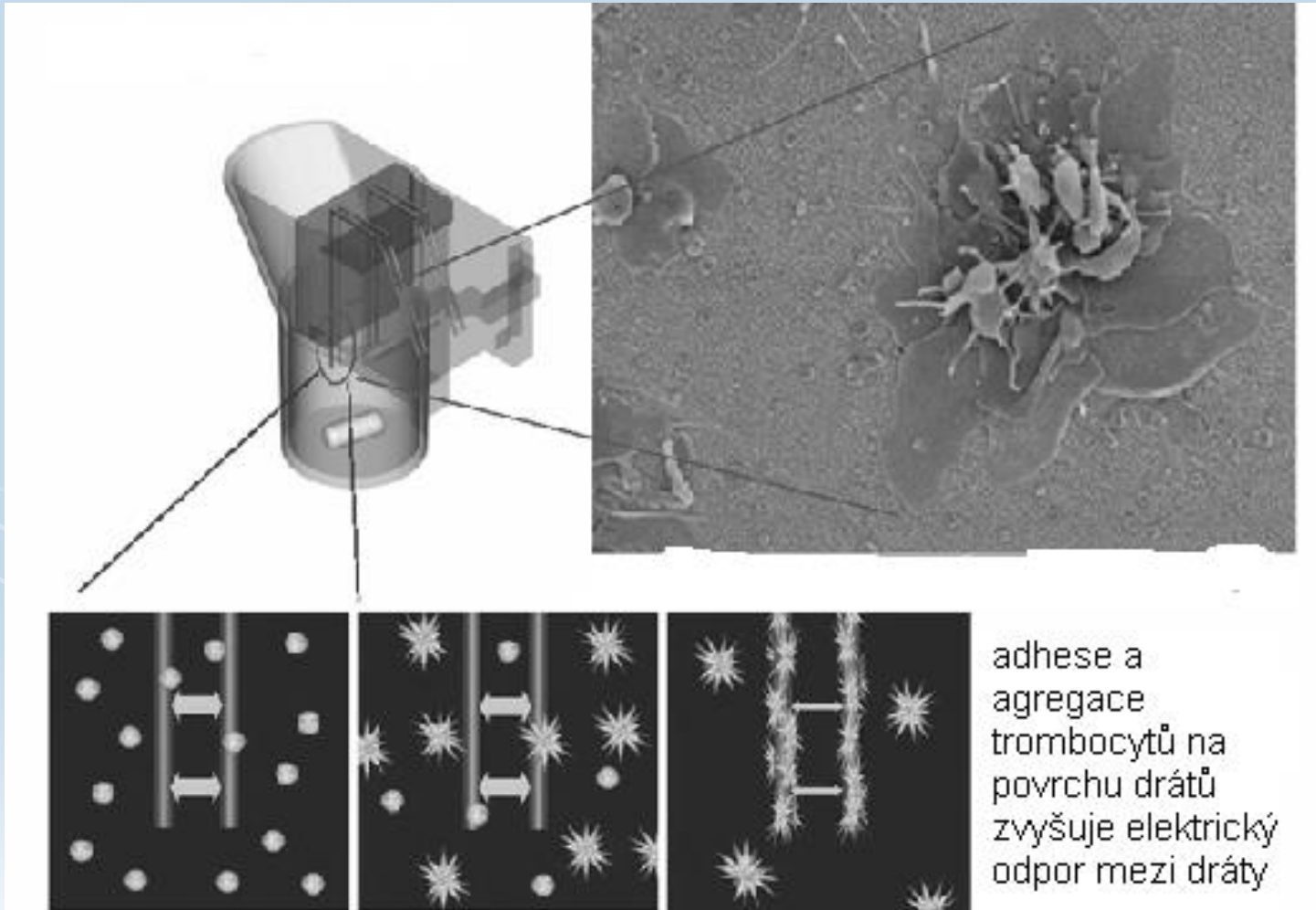


Figure 6

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 (ev. ředění PRP > 600×10^9)

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

→ 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)

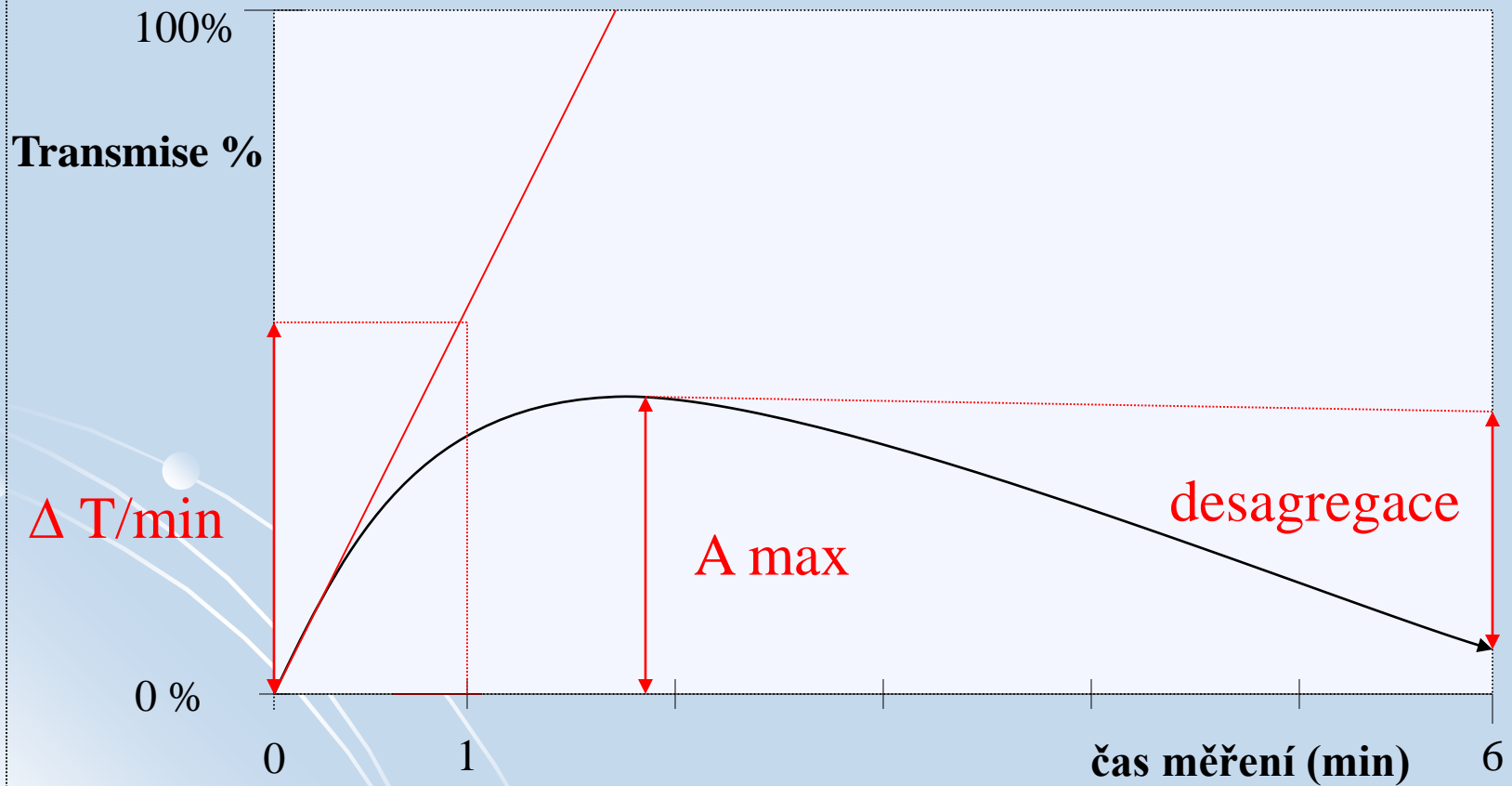
↘ časová prodleva před agregační odpovědí

↘ jen u kolagenu

→ Strmost křivky = slope (%/min)

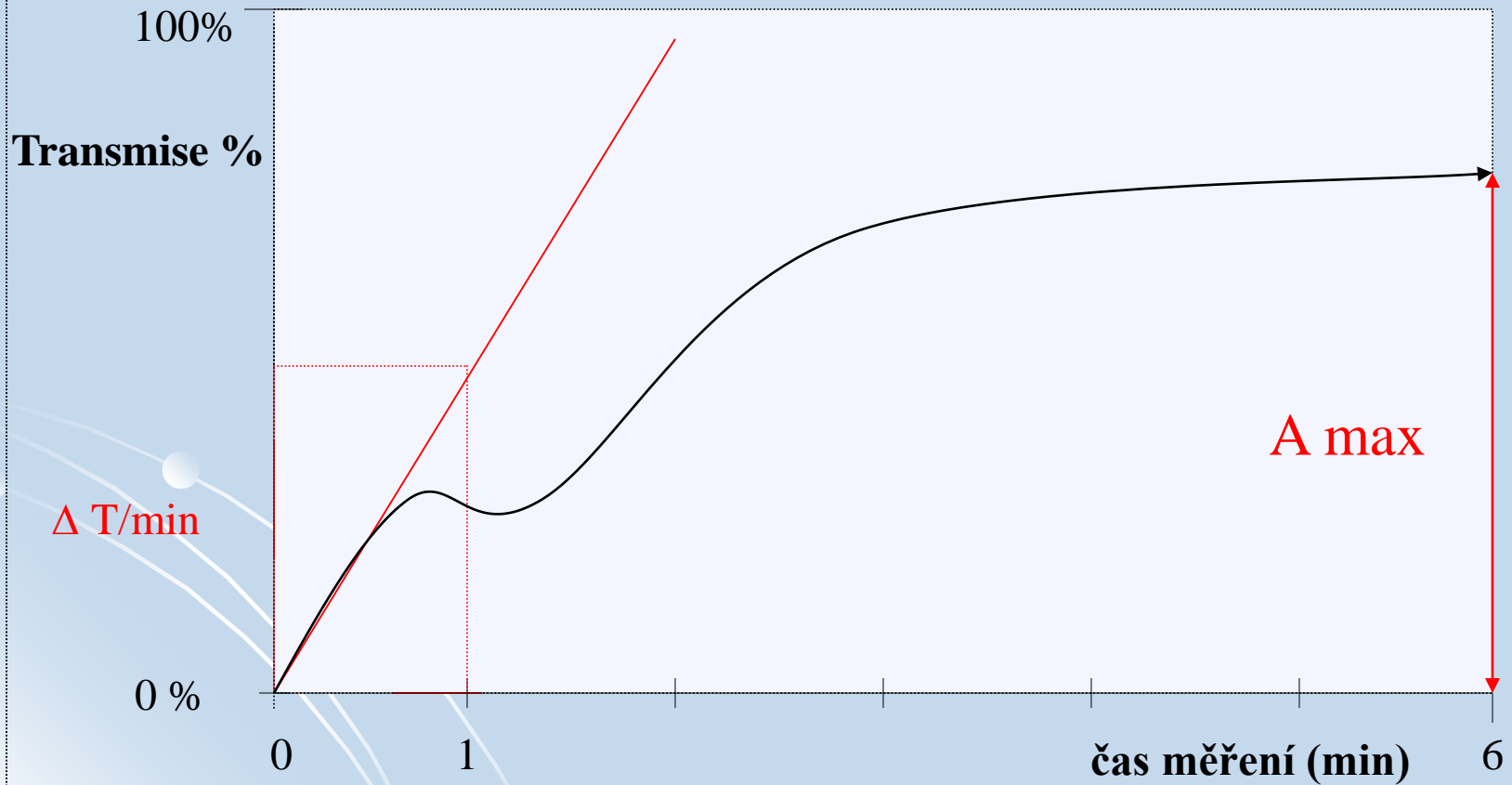
Agregační křivka

Agregace ADP 2,5



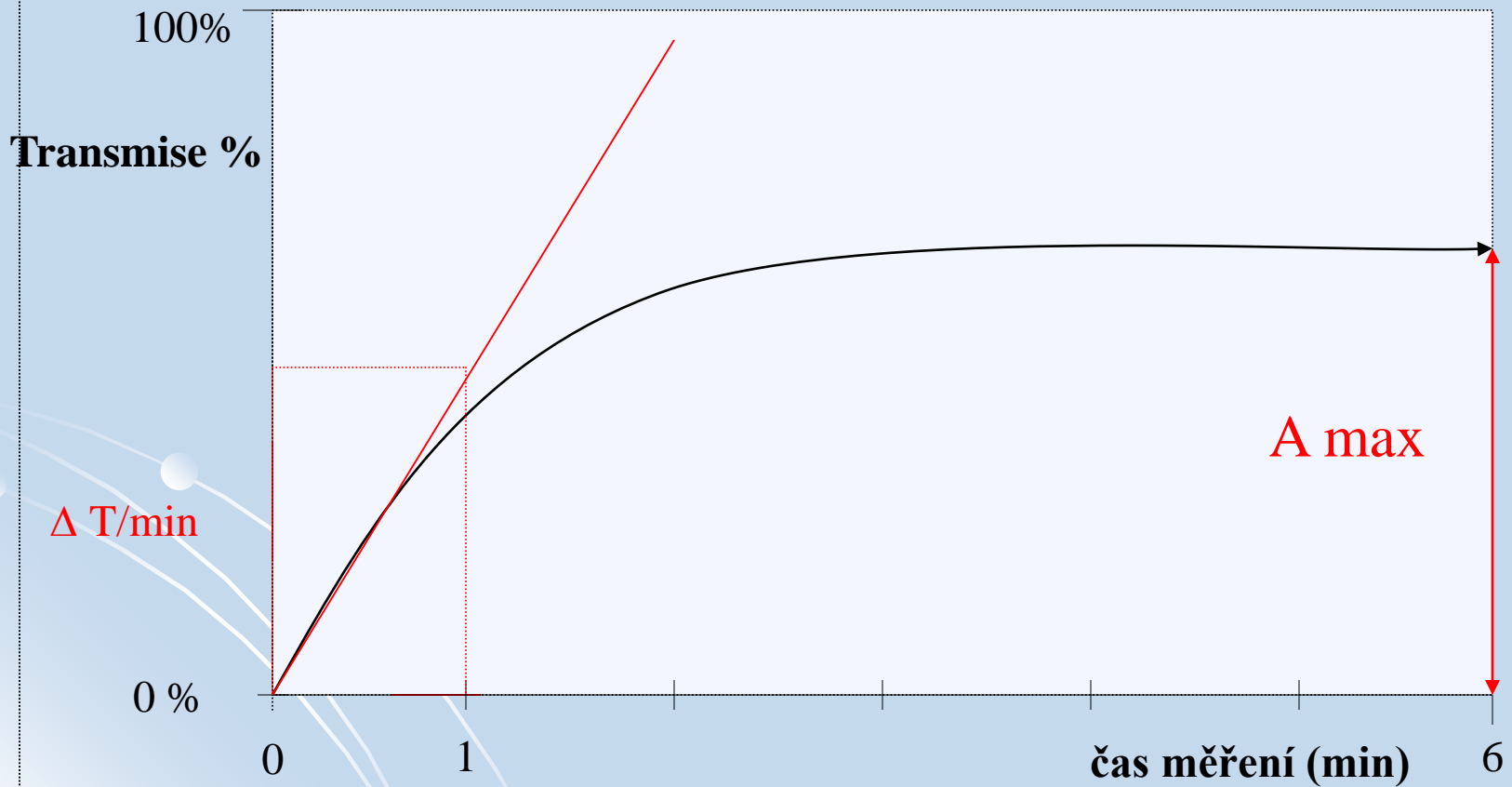
Agregační křivka

Agregace ADP 5



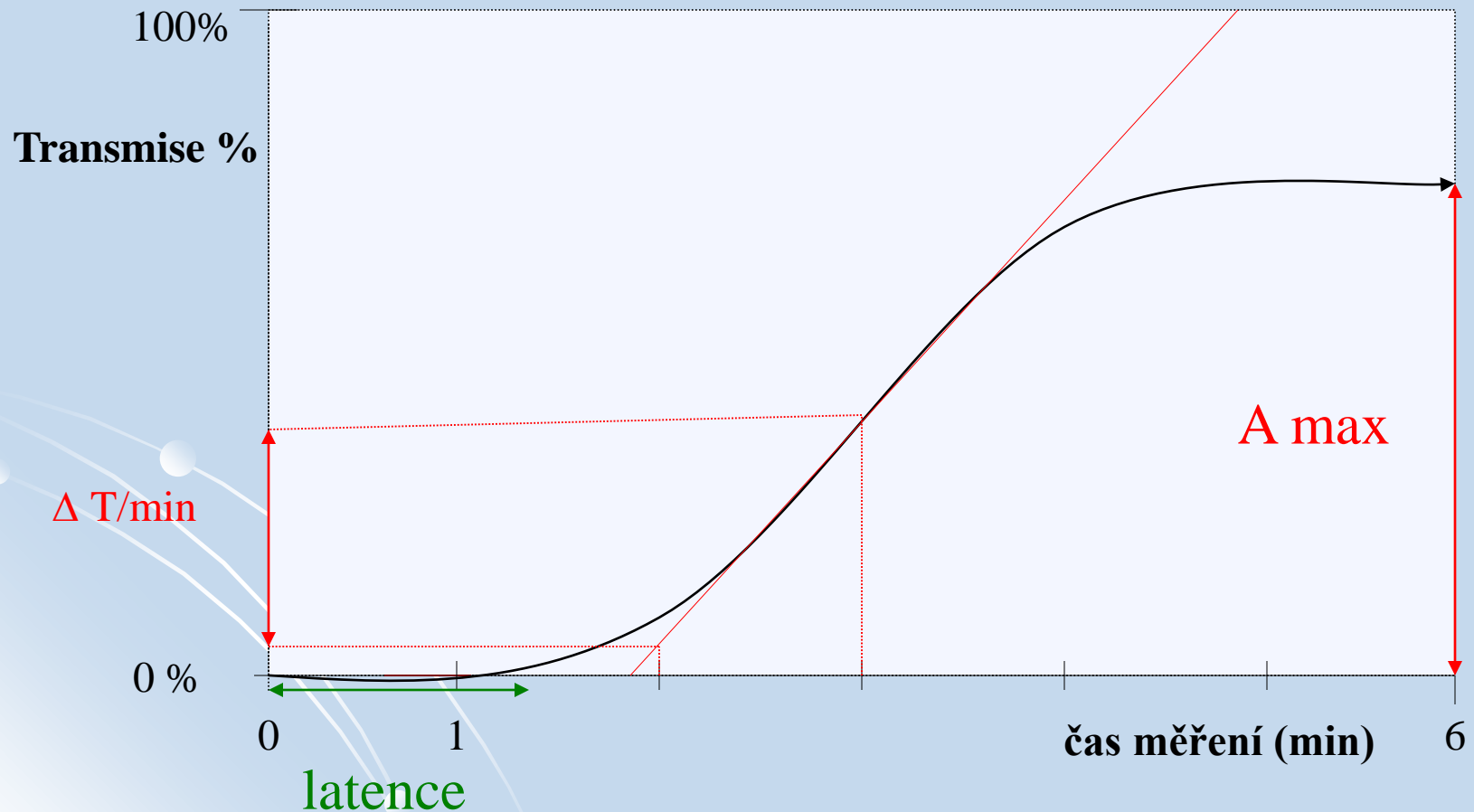
Agregační křivka

Agregace ADP 10



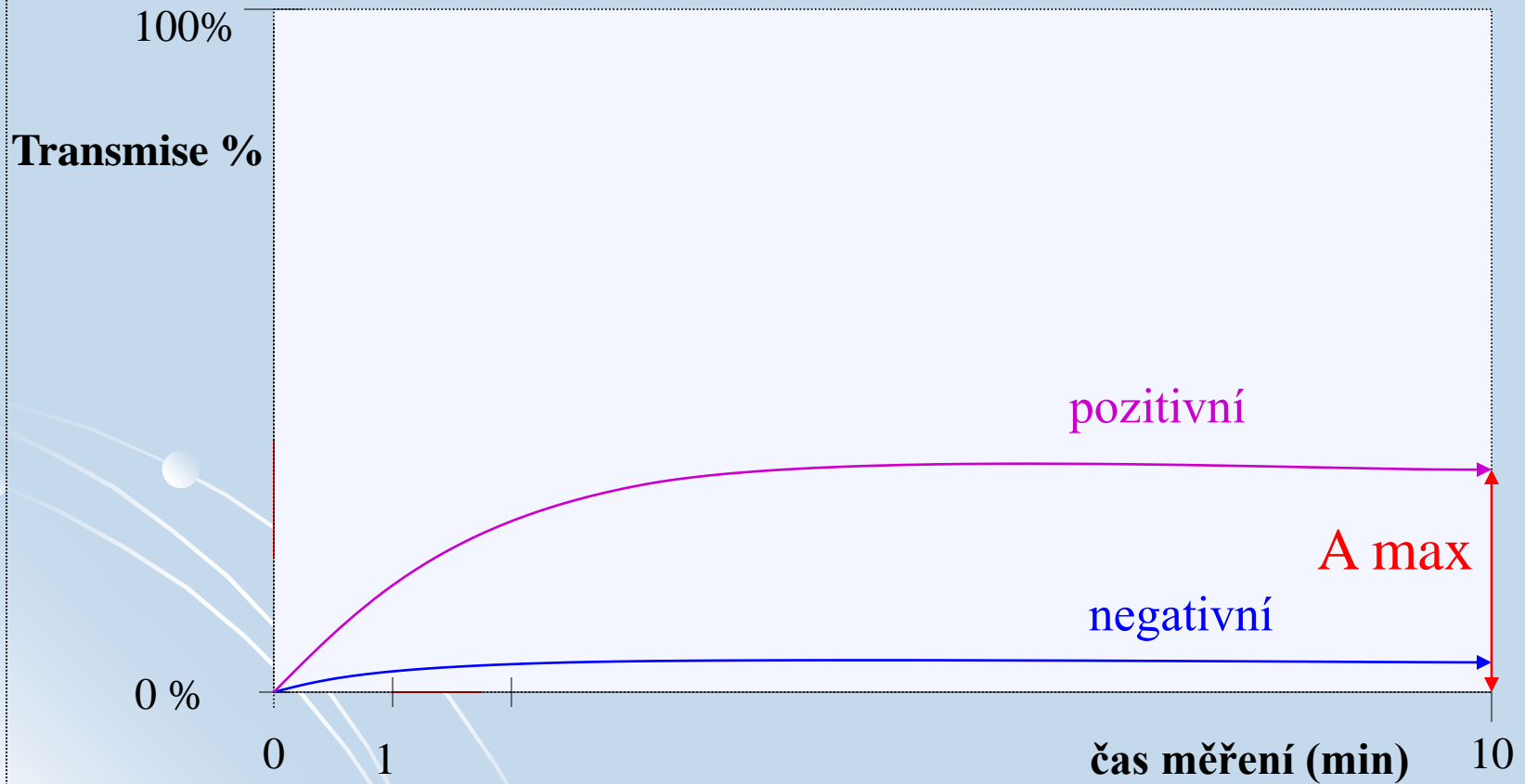
Agregační křivka

Agregace kolagen

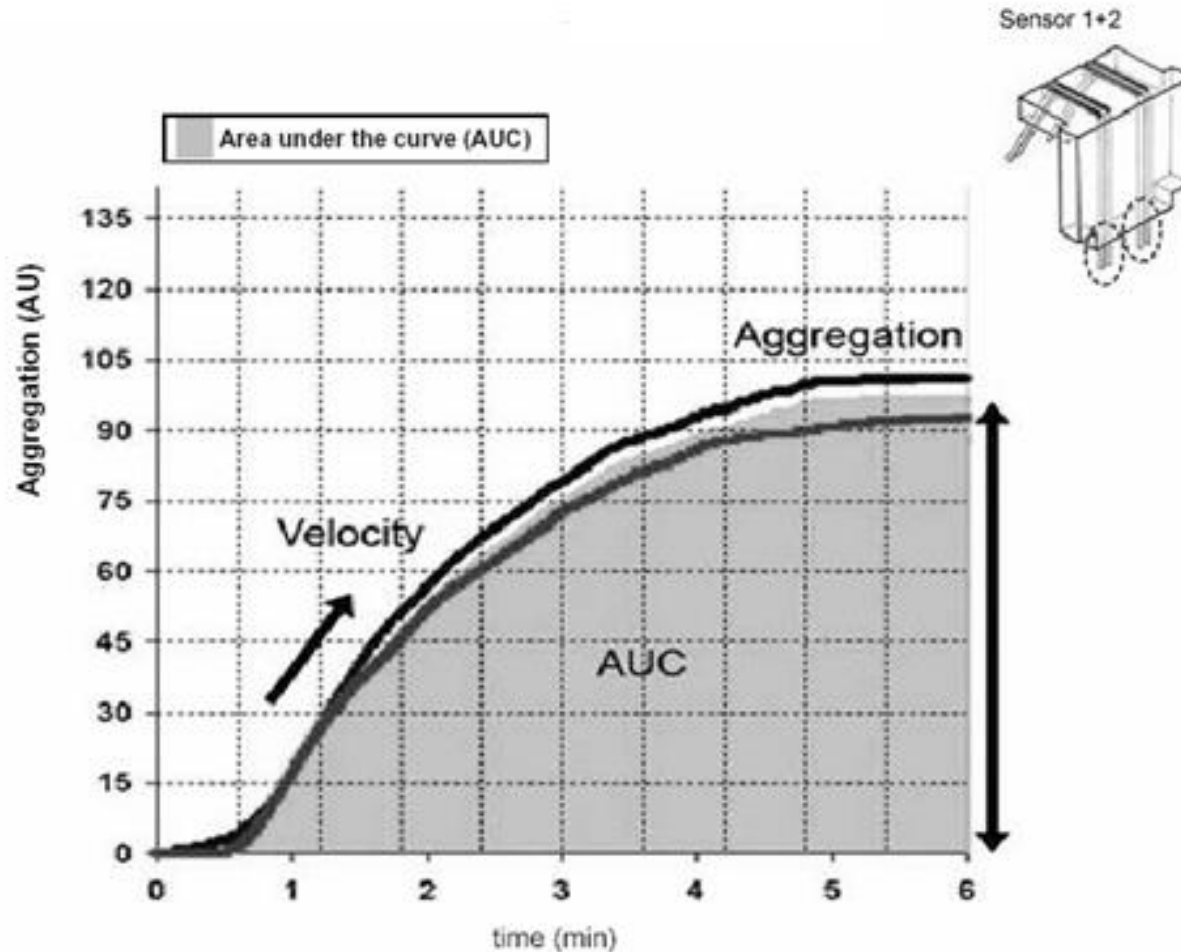


Agregační křivka

Samovolná agregace



Vyhodnocení - impedanční metoda



Klinický význam agregace

→ Snížená agregační odpověď

- trombocytopatie, trombocytopenie
- antiagregační léčba (monitorování)

→ Zvýšená agregační odpověď

- samovolná agregace



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