


# **Speciální koagulační vyšetření II**

# Přirozené inhibitory

 Antitrombin

 Systém PC/PS (ProC Global)

 Protein C

 Protein S

 APC-rezistence

# Antitrombin

## ↳ Vyšetření **funkční aktivity**

↳ fotometricky (IIa, Xa)

## ↳ Klinický význam - **snížení**

## ↳ Normální hodnoty

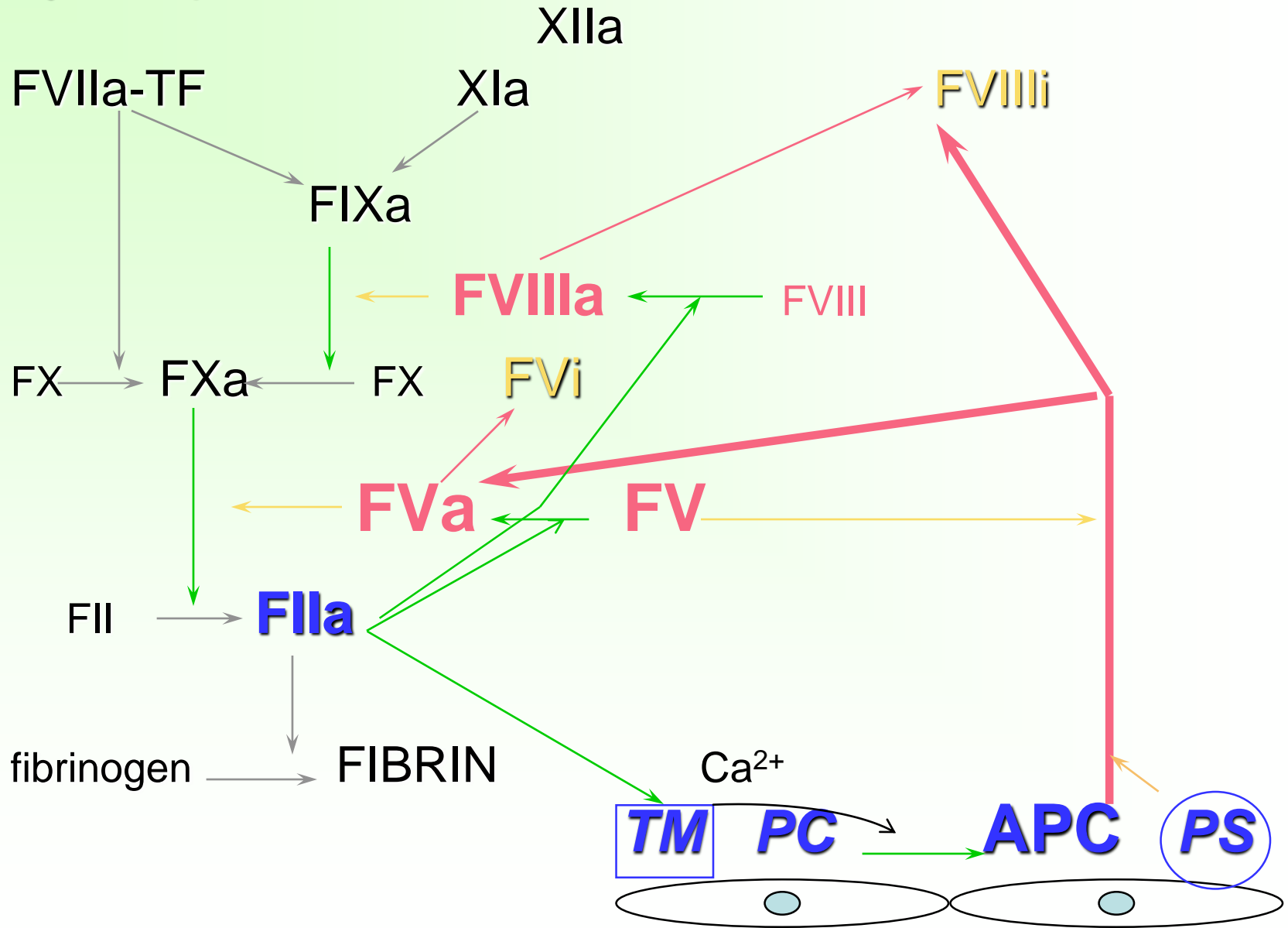
↳ 80 - 120 %

## ↳ Vyšetření antigenu

↳ u vrozených defektů

↳ LIA, EID, ELISA

# System proteinu C



# Protein C

## ↳ Vyšetření **funkční aktivity**

↳ koagulační metody

↳ fotometrické

## ↳ Klinický význam - **snížení**

## ↳ Normální hodnoty

↳ 60 - 130 %

## ↳ Vyšetření antigenu

↳ u vrozených defektů

↳ EID, ELISA

# Protein C – koagulační metoda

↪ Stanovení **prodloužení koagulačního času** (APTT) způsobené **inaktivací F VIIIa a Va aktivovaným proteinem C**.

## ↪ Postup

↪ ředěná vyšetřovaná plazma + **aktivátor proteinu C**

↪ neředěná **protein C deficitní plazma**

↪ APTT reagensie, inkubace

↪  $\text{CaCl}_2$

↪ stanovení koagulačního času

↪ odečtení funkční aktivity z kalibrační křivky

✓ lin/lin závislost

↪ vyjádření výsledku

✓ % normálu

# Protein C- fotometrická metoda

↪ Sledování vzniku zbarvení v důsledku štěpení specifického chromogenního substrátu aktivovaným proteinem C.

↪ Postup

↪ ředěná vyšetřovaná plazma + aktivátor proteinu C

↪ specifický chromogenní substrát

↪ sledování vzniku zbarvení

✓ kineticky (  $\Delta A/\text{min}$  )

✓ „end point“ (A)

↪ odečtení funkční aktivity z kalibrační křivky

✓ lin/lin závislost

↪ vyjádření výsledku

✓ % normálu

# Protein S

## ↳ Vyšetření **funkční aktivity**

↳ koagulační metody

## ↳ Klinický význam - **snížení**

## ↳ Normální hodnoty

↳ muži 65 - 140 %

↳ ženy 50 - 140 %

## ↳ Vyšetření antigenu - volný, celkový

↳ LIA

↳ ELISA

↳ EID



# Protein S – koagulační metoda

↳ Stanovení **prodloužení koagulačního času (PT)** způsobené **inaktivací Va** systémem PC (**PS + aktivovaný PC**).

## ↳ Postup

↳ ředěná vyšetřovaná plazma

↳ neředěná **protein S deficitní plazma**

↳ **aktivovaný PC**

↳ PT reagencie

↳ stanovení koagulačního času

↳ odečtení funkční aktivity (%) z kalibrační křivky

✓ lin/lin závislost

# Rezistence na aktivovaný PC

= snížená antikoagulační odpověď na aktivovaný PC (APC)

↪ Příčinou **vrozené APC-R** je ve většině případů Leidská mutace faktoru V (FVL)

↪ Příčinou **získané APC-R**

↪ zvýšení F VIII

↪ LA

↪ těhotenství, hormonální substituce (včetně HAK)

↪ antikoagulační léčba

↪ významné defekty PC a PS

↪ nesprávné zpracování vyšetřované plazmy

# Možnosti vyšetření APC - rezistence

## Vyšetření fenotypu

 koagulačními metodami

✓ průkaz vrozené i získané APC-R

## Vyšetření genotypu

 molekulárně genetické stanovení FVL

# Koagulační vyšetření APC - R

↪ Vyšetření prodloužení koagulačních časů po  
přídavku APC

## 1. Vyšetření dvou koagulačních časů

- ✓ s přídavkem a bez přídavku APC
- ✓ vyjádření výsledku
  - poměr  $R = t_{s\text{ APC}} / t_{\text{bez APC}}$  (norma např. > 2,0)

## 2. Vyšetření jednoho koagulačního času

- ✓ s přídavkem APC
- ✓ vyjádření výsledku
  - koagulační čas (norma: časy > cut off (např. 120 s))

# ProC Global

↳ globální funkční test

↳ stanovení antikoagulační kapacity systému PC nejen APC-R

↳ Použití

↳ ke screeningu vrozených i získaných poruch

↳ Princip

↳ test na bázi APTT s použitím aktivátoru proteinu C - hadího jedu (Agkistrodon contortrix), který aktivuje endogenní PC přítomný v testovaném vzorku

↳ sleduje se prodloužení APTT indukované aktivovaným endogenním PC

# ProC Global - výsledky

↪ Vyšetření dvou koagulačních časů

↪ aPTT v přítomnosti aktivátoru proteinu C

↪ aPTT bez aktivátoru proteinu C

↪ Výsledek - normalizovaný poměr (NR)

↪ vztažení poměru časů R ke standardě

↪ Normální hodnoty  $NR > 0,8$

↪ Předpokládá se, že snížení poměru je v závislosti na riziku trombózy

# ProC Global

- ↪ Test je citlivý na defekty v systému proteinu C (95 %)
  - ↪ Leidenská mutace faktoru V (100 %)
  - ↪ defekt proteinu C (85 %)
  - ↪ defekt proteinu S (56 %)
- ↪ Zachycuje **vrozenou i získanou APC-R**
- ↪ I samotná pozitivita PCG (bez známé příčiny) zvyšuje riziko VT (4x)
- ↪ Vhodný test pro **screening trombofílie** nikoli jako diagnostický test

# Testy k diagnostice VWF

- ↪ doba krvácení
- ↪ PFA
- ↪ APTT
- ↪ F VIII:C (funkční aktivita)
- ↪ funkční aktivita VWF (VWF:RC<sub>0</sub>, VWF:Ac)
- ↪ antigen VWF (LIA, ELISA, EID)
- ↪ agregace po ristocetinu
- ↪ kolagen vazebná kapacita VWF
- ↪ F VIII vazebná kapacita VWF
- ↪ multimerní struktury VWF
- ↪ molekulární diagnostika



# Vyšetření aktivity VWF

↪ Metody stanovení schopnosti vazby VWF na GPIIb

↪ vyšetření ristocetin kofaktorové aktivity (VWF:RCO)

↪ metody ristocetin nezávislé (VWF:Ac)

# Metoda VWF:RCo

## ↪ Reagencie

↪ lyofilizované **normální** promyté **trombocyty + ristocetin**

↪ Využívá antibiotikum **ristocetin**, který **indukuje vazbu plazmatického VWF na GPIb** cílových trombocytů a jejich **aglutinaci**

↪ detekce metodou

- ✓ agregační
- ✓ turbidimetrickou na koagulačních automatech
- ✓ aglutinační

# Metoda VWF:RCo

## ↪ Agregáčn metoda

↪ sledování změn transmise světla ve směsi trombocytů a ristocetinu po přidavku vyetrovan plazmy (PPP)

- ✓ vyhodnocení změny transmise/min z agregační křivky
- ✓ vyjdren výsledku v % odečtenm z kalibrační křivky


## ↪ Turbidimetrick metoda

↪ sledování změn turbidity ve směsi trombocytů a ristocetinu po přidavku vyetrovan plazmy (PPP)

- ✓ vyhodnocení změn absorbance z kinetického měření
- ✓ vyjdren výsledku v % odečtenm z kalibrační křivky

# Metoda VWF:RCo

## Aglutinační metoda

 sledování aglutinace v suspenzi trombocytů a ristocetinu po přidavku titrované vyšetřované plazmy (PPP) na skleněné desce

- ✓ makroskopické odečtení posledního titru při kterém ještě nastává aglutinace, vynásobení titru udanou citlivostí
- ✓ vyjádření výsledku v % semikvantitativně např. >16% a < 32%)

# Metoda ristocetin nezávislá

↪ Kvantitativní automatizovaná metoda

↪ standartizovaná

↪ Princip

↪ vyhodnocení vazby VWF na rekombinantně připravený GPIb s mutacemi, která nevyžaduje přítomnost antibiotika ristocetinu

↪ detekce aglutinace latexových částic

✓ metodou imunoturbidimetrickou na koagulačních automatech

# Agregace po ristocetinu (RIPA)

## ↪ Princip

- ↪ destičkový **agregační test v plazmě bohaté na trombocyty** (PRP) pacienta v přítomnosti antibiotika ristocetinu
- ↪ použití různých koncentrací ristocetinu
  - ✓ z důvodu detekce zvýšené citlivosti vWF pacienta na nízkou koncentraci u typu 2B vWF choroby

## ↪ Vyhodnocení

- ↪ maximální amplituda A max (%)
- ↪ strmost křivky (%/min)

## ↪ Korekce normální PPP **při ↓ RIPA**

- ↪ 4 díly PRP pacienta + 1 díl PPP normálu

# Testy fibrinolytického systému

## ↪ Rutinní testy

- ↪ euglobulinová lýza
- ↪ trombelastografie
- ↪ D-Dimery
- ↪ FDP

## ↪ Speciální testy (aktivita - fotometricky, antigen - ELISA, EID)

- ↪ plazminogen (↓)
- ↪  $\alpha$ -2-antiplazmin (↓)
- ↪ PAI-1 (↑)
- ↪ tPA (↑)

# Diagnostika krvácivých stavů

## ↳ Screening

- ↳ poruch primární hemostázy a vWF
- ↳ v systému koagulačních faktorů
- ↳ v systému fibrinolýzy





## ↳ Speciální testy

- ↳ primární hemostáza
- ↳ vWF
- ↳ systém koagulačních faktorů
- ↳ systém fibrinolýzy



# Trombofilní markery

## Defekty systémů

-  Přirozených inhibitorů krevního srážení
-  Koagulačních faktorů
-  Fibrinolýzy
-  Trombocytů

## Přítomnost protilátek

-  Nespecifických (LA)
-  Specifických (inhibitor PC, PS, F V, AT..)