

Principy vyšetření hemostázy

RNDr. Jiřina Zavřelová
OKH FN Brno

Trombóza - Hemostáza - Krvácení



Fyziologie krevního srážení

- Základní homeostatický mechanismus
- Spolupůsobení různých systémů včetně regulačních zpětných vazeb
 - cévní stěny
 - trombocytů
 - plazmatické koagulační faktory
 - plazmatické inhibitory
 - systém fibrinolytický

Dělení testů

- Testy **globální**
 - postihují celý systém (i více)
- Testy **skupinové** (screening)
 - postihují určitou část koagulačního systému
 - umožňují odlišení poruch vnitřní a vnější cesty a přeměny fibrinogenu
- Testy **speciální**
 - vyšetřují jednotlivé složky systémů

Dělení testů dle principu

- **Koagulační**
- **Fotometrické**
- **Imunochemické**

- Turbidimetrické (jiné než koagulační, imunochemické)
- Sledování času rozpuštění koagula
- Sledování rozpustnosti koagula
- Jiné

Dělení testů dle principu

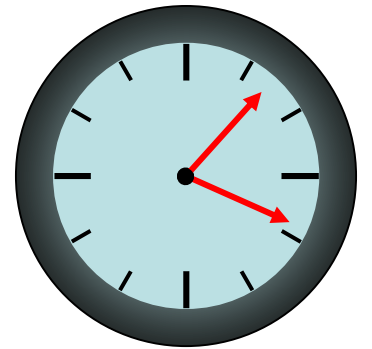
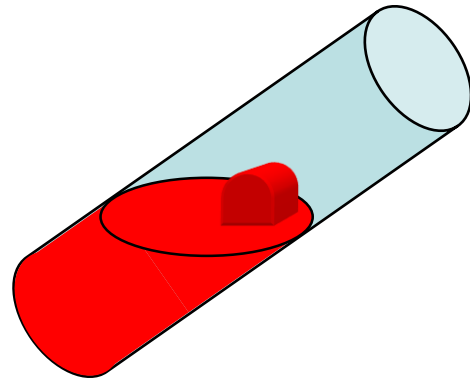
- **Koagulační**

- **sledování času srážení** (srážlivá plná krev)
 - bez přídavku aktivátoru/aktivovaná doba srážení (ACT)
 - **manuálně** (kývání)
 - **POCT** (přenosné přístroje point of care)
- **sledování času vytvoření fibrinového vlákna** (plasma)
 - manuálně (háčkování)
 - **koagulometr** (poloautomat, automat)
 - **mechanické**
 - » **kuličkové** (sledování změn pohybu kuličky)
 - » háčkové
 - » vibrační
 - **optické**
 - » **nefelometrie** (sledování rozptylu světla)
 - » turbidimetrie (sledování průchodnosti světla)

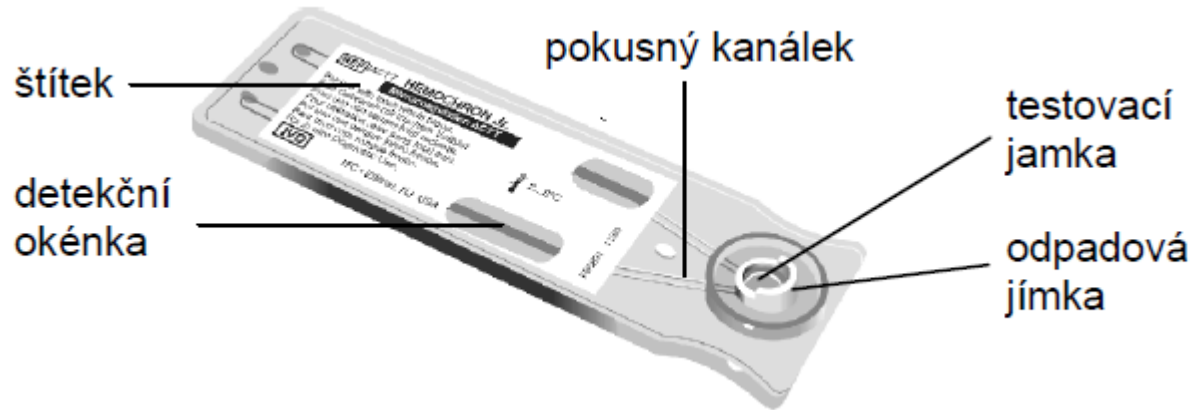
 - » limitace – chylózní vzorky

Doba srážení - kývání

- Naklánění zkumavky
- První metoda detekce času srážení
 - vizuálně pozorujeme vznik sraženiny



POCT –ACT (HEMOCHRON)

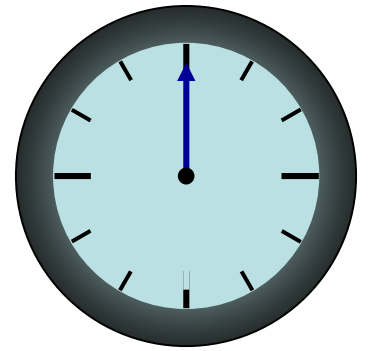
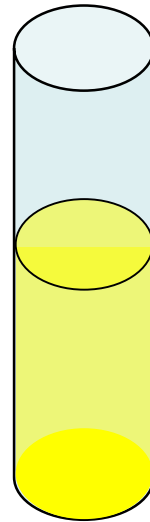


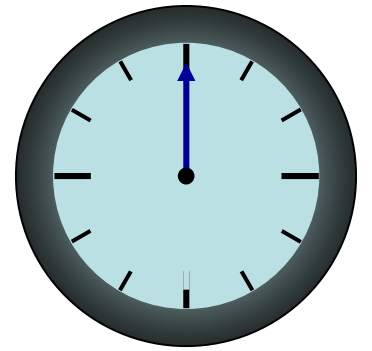
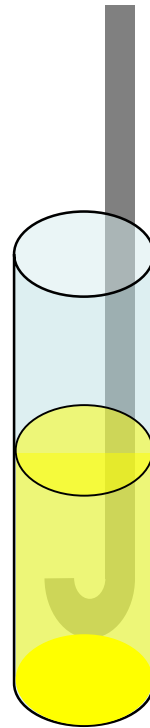
- Odkápnutí krve do testovací jamky jednorázové květy s reagenčími (aktivátory) a vložení do pokusné komory
- Pohyb vzorku po smíchání vzorku s reagenčími v pokusném kanálku předurčenou rychlostí
- Začátek tvorby koagula je detegován na základě zpomalení toku vzorku v pokusném kanálku mezi optickými detektory LED

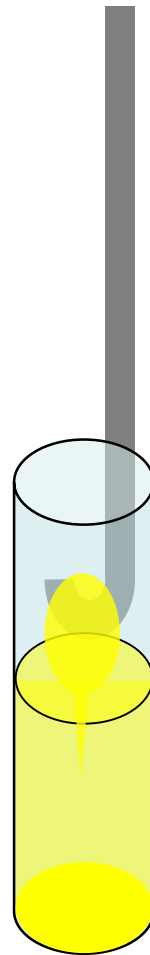


„Háčkování“

- První skutečně použitelná metoda
- Protahujeme háček reakční směsí a pozorujeme vznik koagula
- Dostatečně přesná, dostatečně citlivá
- Výhody
 - jednoduché a levné vybavení
 - velmi zkušená laborantka je přesná
- Nevýhody
 - potřeba velmi zkušeného personálu
 - subjektivní ovlivnění
 - velký vliv koncentrace fibrinogenu
 - velká spotřeba reagensů

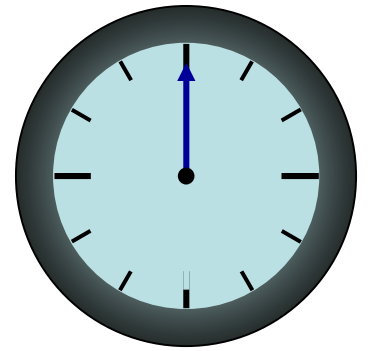
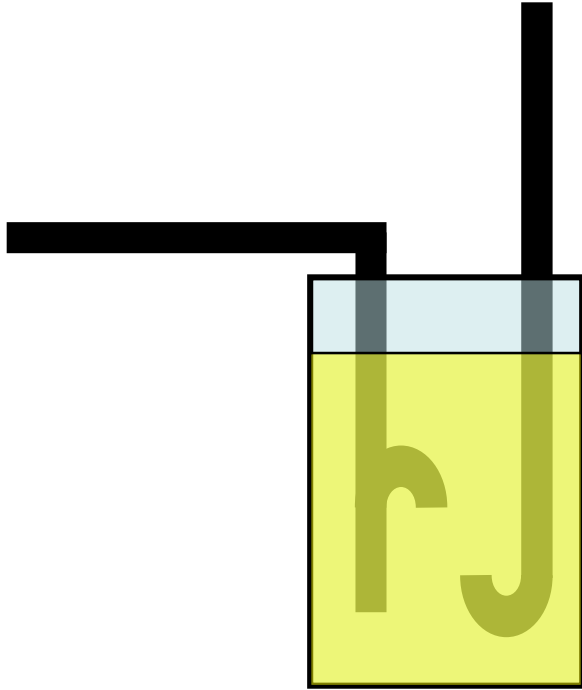


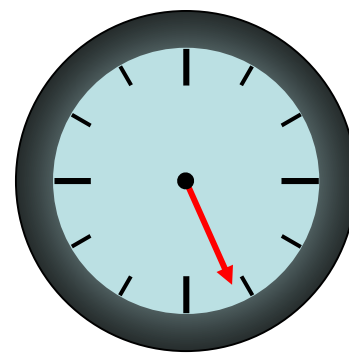
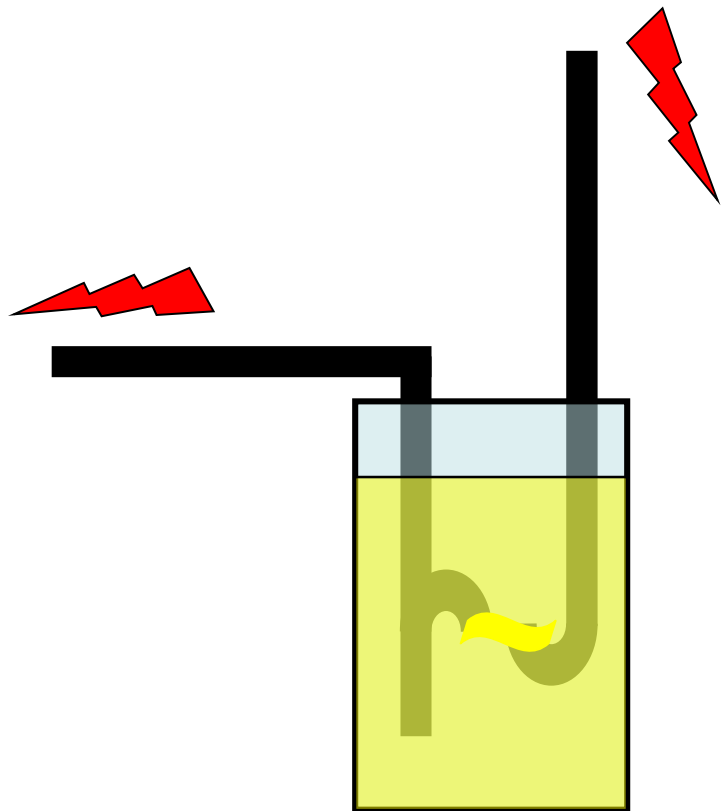




Háčkové koagulometry

- Využívají vyšší vodivosti fibrinového vlákna
- Dvě elektrody, alespoň jedna ve tvaru háčku
- Vzniklé fibrinové vlákno vodivě spojí elektrody – zaznamená se čas
- Výhody:
 - relativně přesné
 - málo citlivé na koncentraci fibrinogenu
 - detekují opravdu první fibrinové vlákno
- Nevýhody:
 - komplikovaná jemná mechanika
 - pracné čištění
 - velký objem reagensů





Koagulometry vibrační

- Princip

- v kyvetě umístěn vibrující plátek s elektromagnetickou detekcí
- Při tvorbě fibrinu dochází ke zvýšení viskozity a zpomalení vibrace kovového plátku
- Vyhodnocení změny frekvence vibrací se současným zastavením ukazatele času

- Výhody

- poměrně citlivý, není prakticky citlivý na koncentraci fibrinogenu

- Nevýhody

- obtížná manipulace s vibr. plátkou a možnost kontaminace vzorku

Koagulometry kuličkové

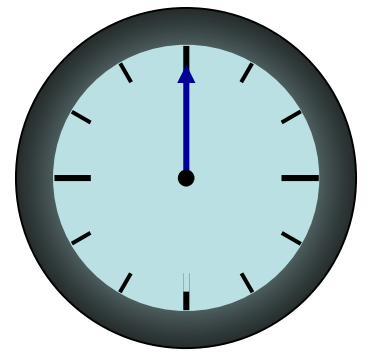
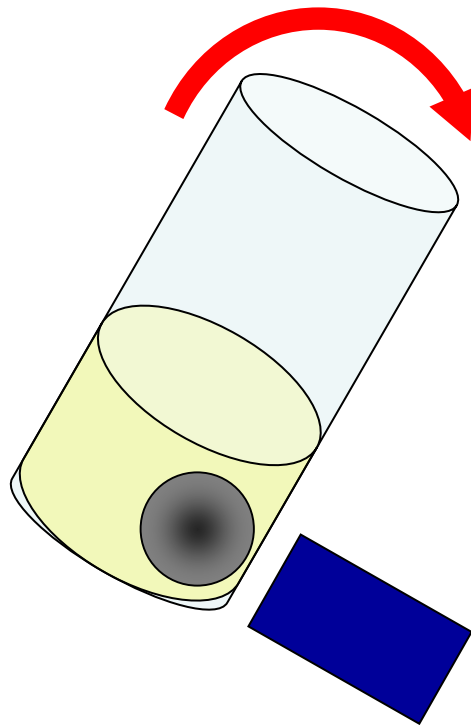
- Kuličkové
- Měří se změna viskozity
 - Viskozita reakční směsi ovlivňuje pohyb detektoru
- Detektor je kulička
 - většinou ocelová, někdy se specifickým potahem na povrchu
 - riziko zmagnetizování kuliček - nereprodukovatelné výsledky
- Po startu mají mrtvý čas
 - nutné k nastavení přístroje pro příslušný vzorek

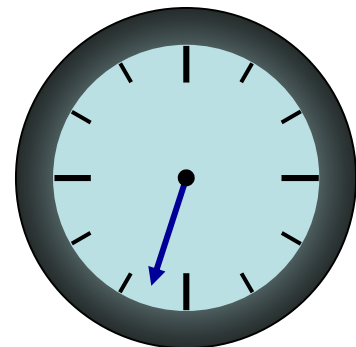
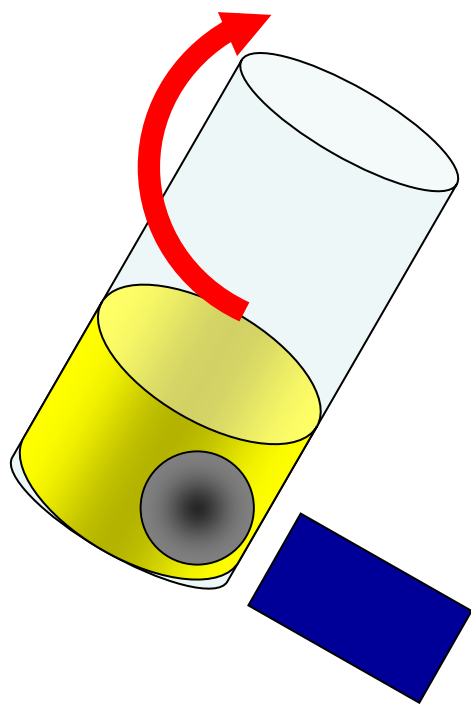
Viskozitní koagulometry

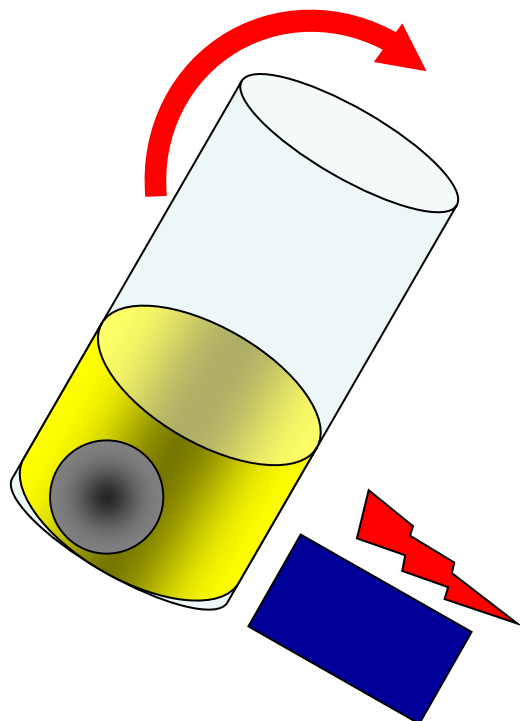
- **Citlivost**
 - Je nepřímo úměrná momentu hybnosti detektoru $p = m * v$
(m =hmotnost, v =rychlost)
- **Přesnost**
 - Je přímo úměrná frekvenci pohybu detektoru
 - frekvence pohybu je úměrná rychlosti
- **Zvýšení citlivosti** - snížení momentu hybnosti detektoru
 - **Snížení hmotnosti**
 - má limity, příliš nízká hmotnost detektoru znamená větší možnost rušení
 - **Snížit rychlost**
 - menší rychlost znamená menší přesnost

Koagulometr Amelung

- **Rotující kyveta** s kuličkou
- **Magnetický senzor**
- Poměrně **velká kulička**
- Poměrně pomalý pohyb
- Výhody
 - kulička prochází většinou objemu
- Nevýhody
 - velký objem reagentů
 - nižší citlivost
- První masově rozšířený koagulometr

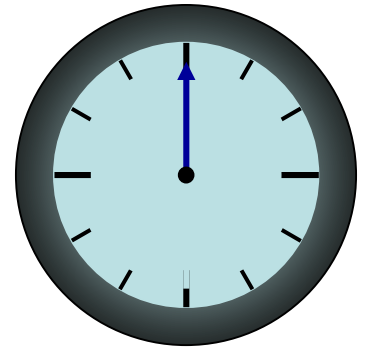
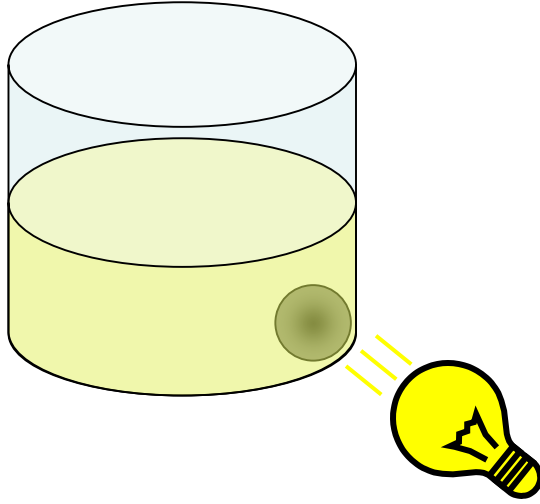


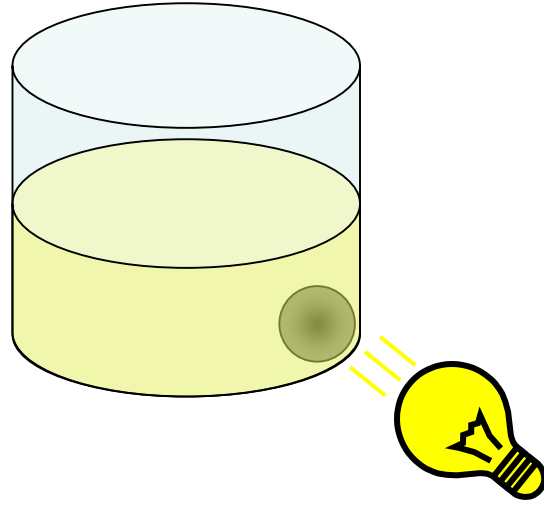


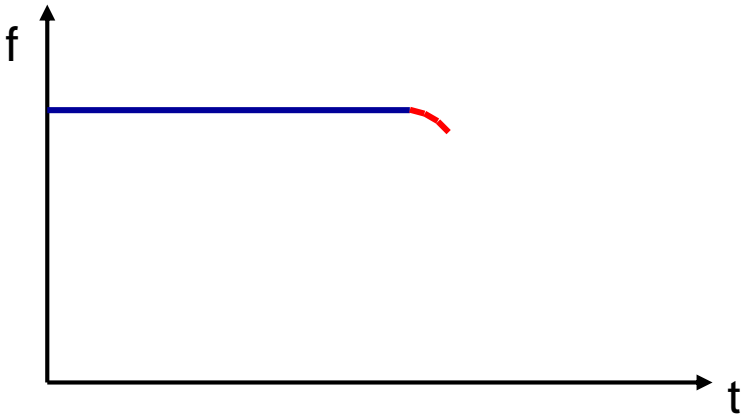
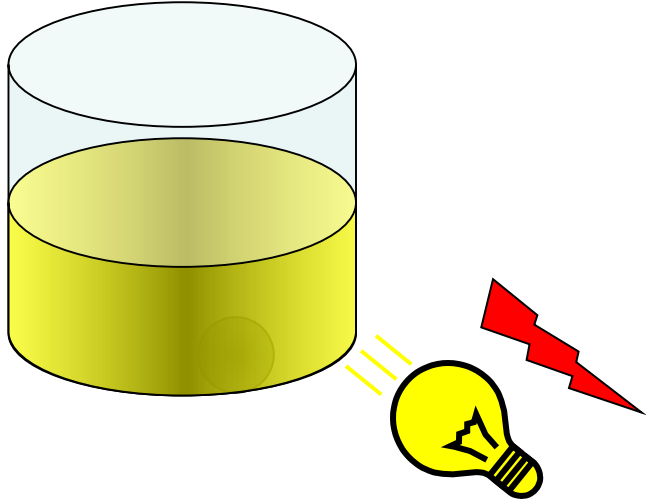


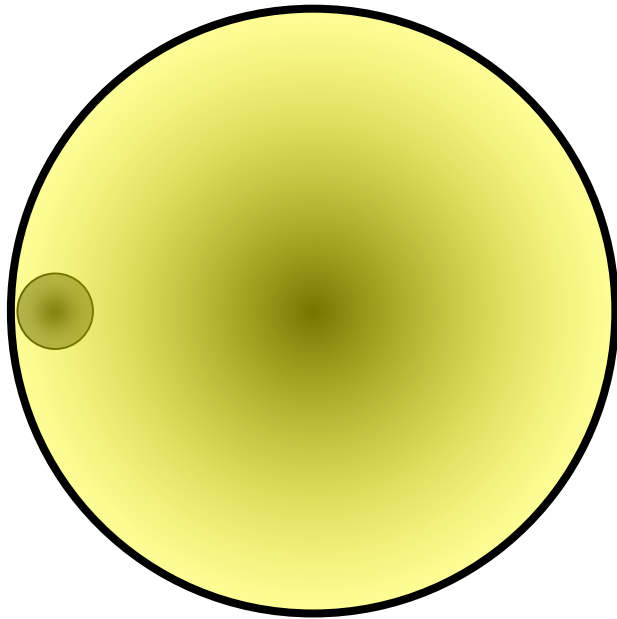
Koagulometr Benck CL

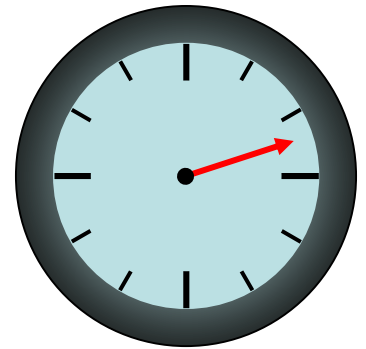
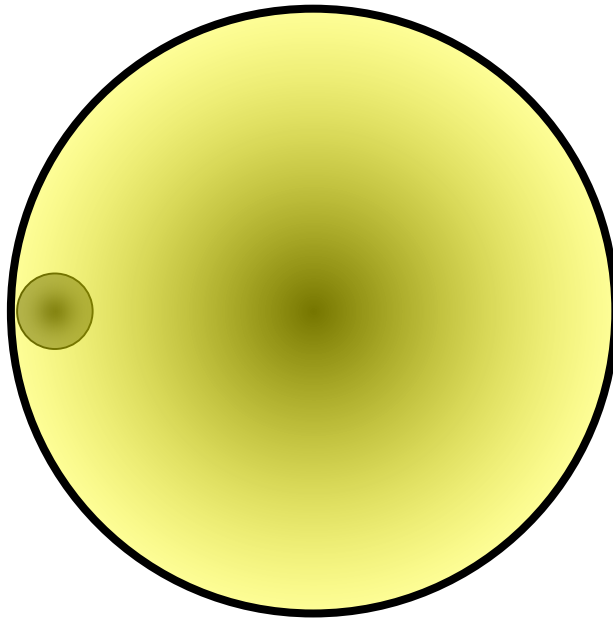
- Kuličkový koagulometr
- **Malá kulička, rychlá rotace**
- **Optický senzor**
- Měří změnu frekvence průchodů kuličky před detektorem
- Výhody
 - Malý objem reagensů
 - Průměrná citlivost
- Nevýhody
 - problémy se vzorky s dlouhým nebo velmi krátkým koagulačním časem
 - kulička tuneluje











Koagulometr Stago

- Kuličkový koagulometr
- Malá kulička, kývavý pohyb
- Elektromagnetický senzor
- Měří změnu frekvence a amplitudy kuličky
- Zpomalení, zastavení pohybu kuličky je detekováno jako koagulační čas



Koagulometry Stago

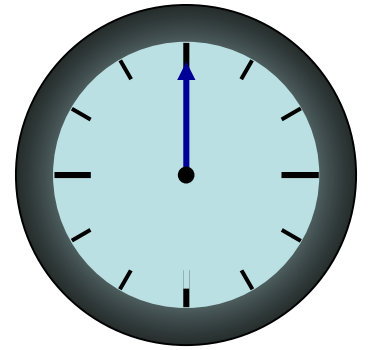
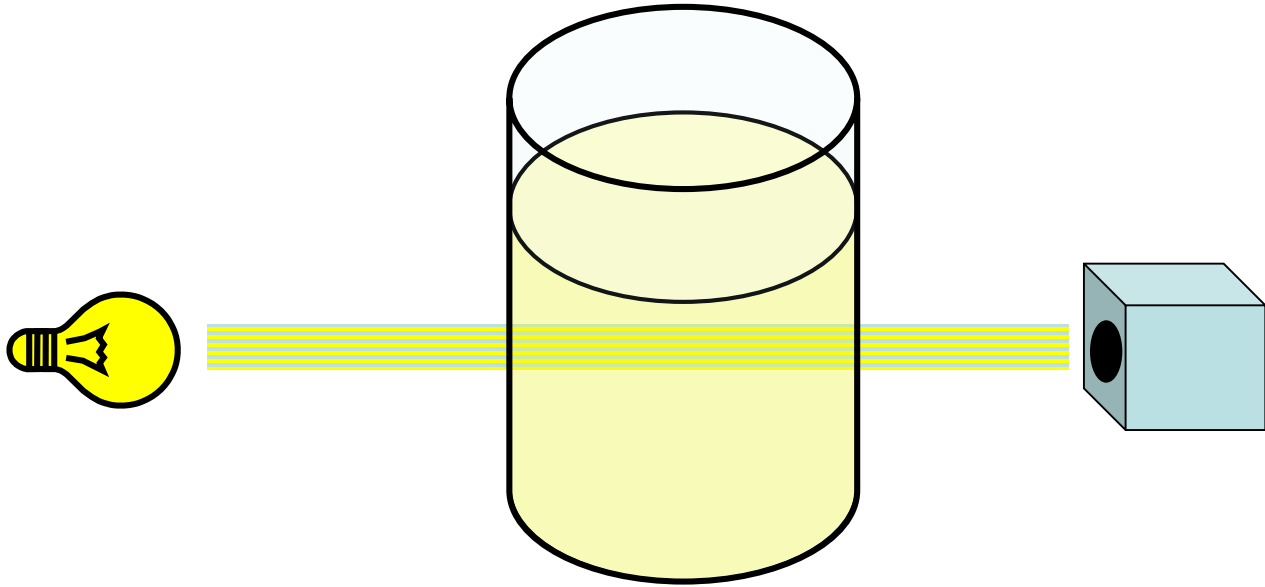
- Výhody
 - kývavý pohyb kuličky – mění se rychlost
 - v úvratích má kulička nulovou rychlost
 - velice vysoká citlivost
 - měření fibrinogenu od 0,2 g/l
 - chylózní, ikterické, hemolytické vzorky
- Nevýhody
 - velký objem reagensí pro fotometrické testy z důvodu přítomnosti kuličky

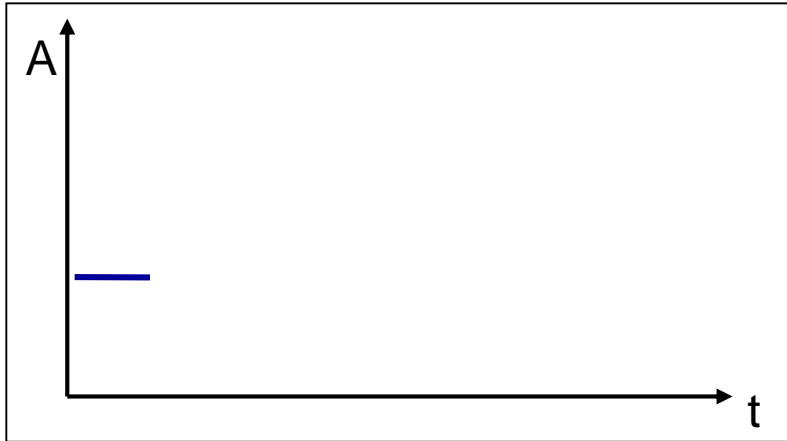
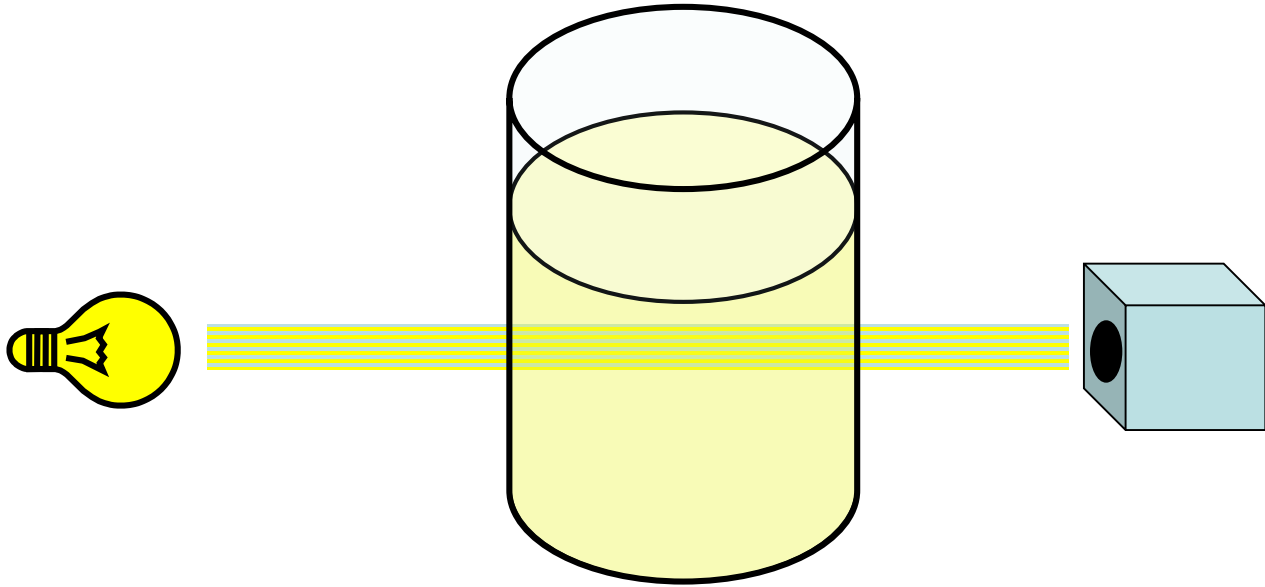
Optické koagulometry

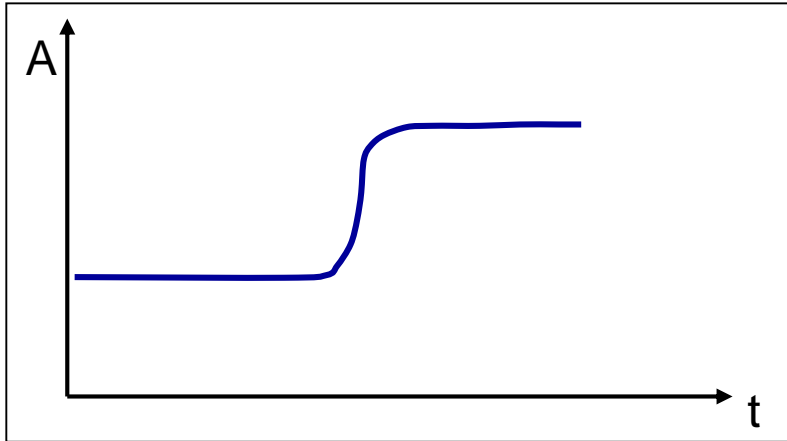
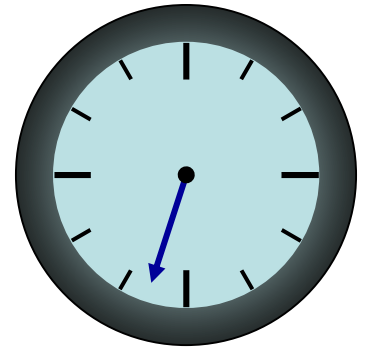
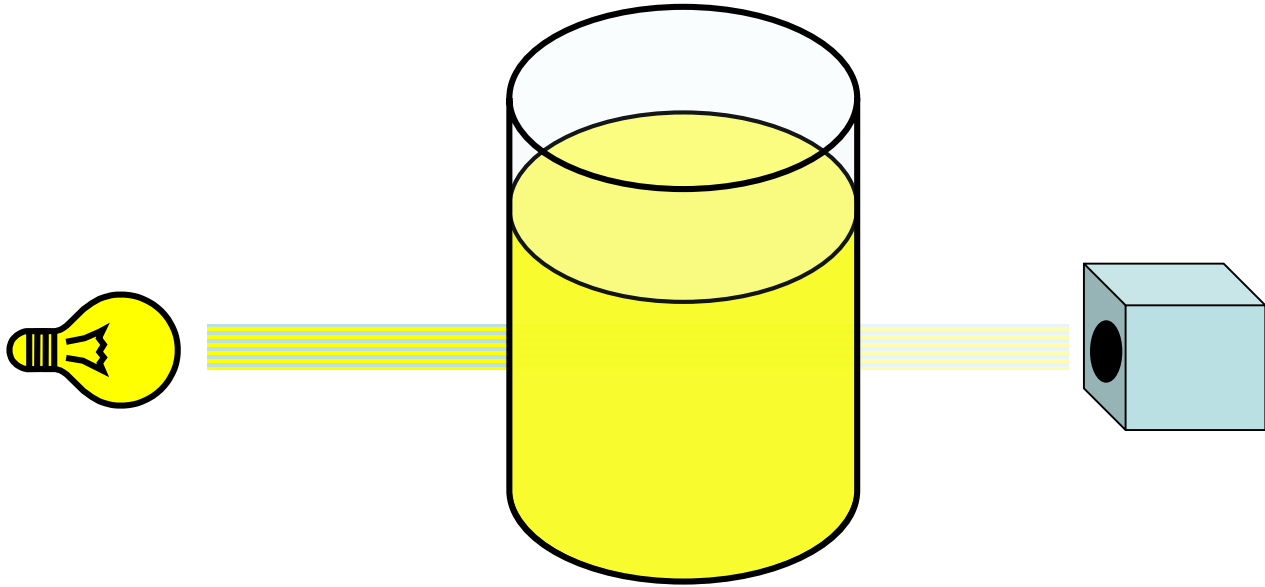
- Měří vznik zákalu nikoli přímo koagula
 - Problém vyhodnocení naměřené reakční křivky
 - Různí výrobci mají rozdílné řešení
 - určení rozdílu před a po koagulaci
 - derivace koagulační křivky
 - určení počáteční rychlosti

Optické koagulometry

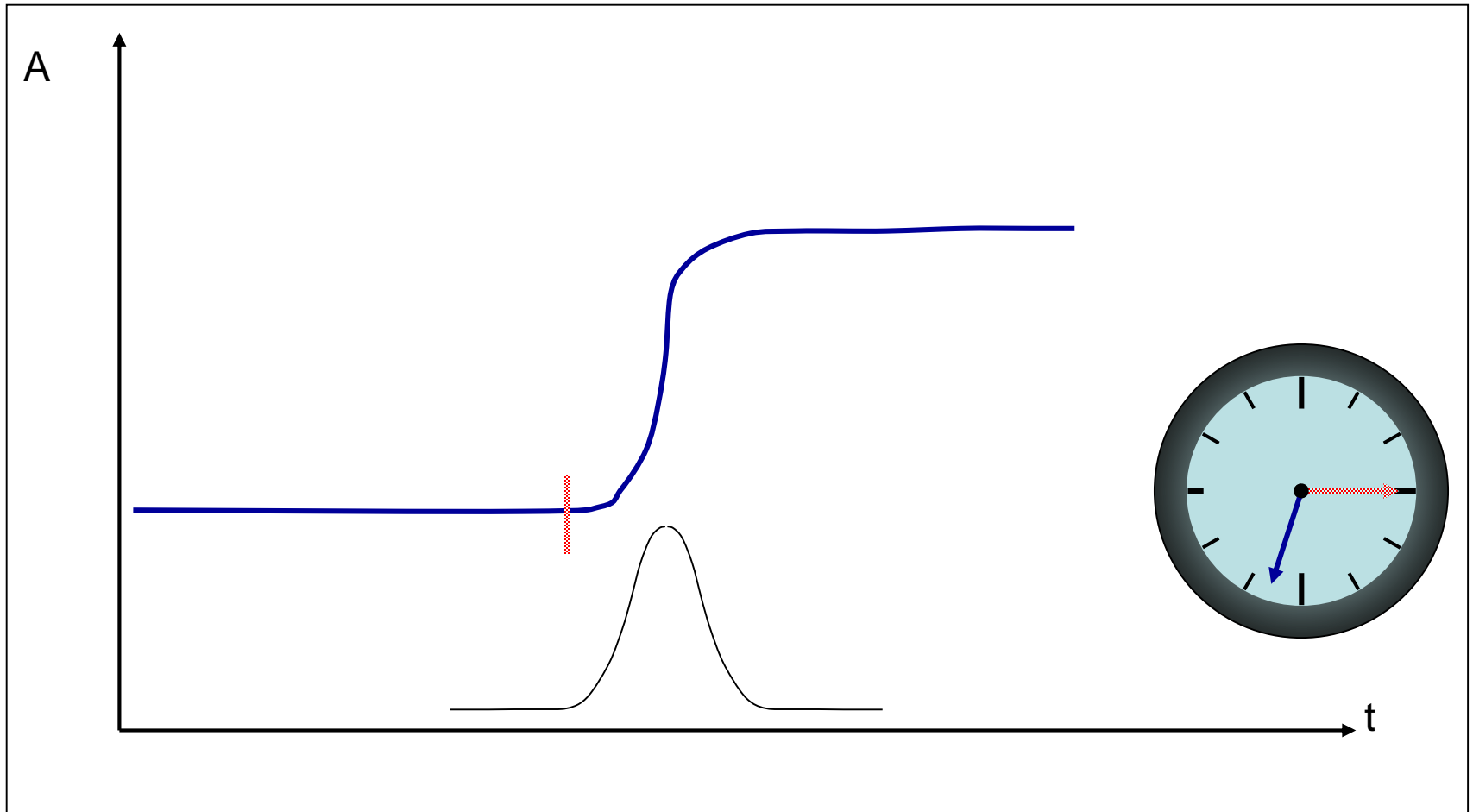
- Citlivé na rychlost tvorby koagula
 - nízký fibrinogen
 - přítomnost inhibitorů (heparin)
- Citlivé na zabarvení plasmy
 - ikterická plasma
 - chylózní plasma
 - hemolytická plasma



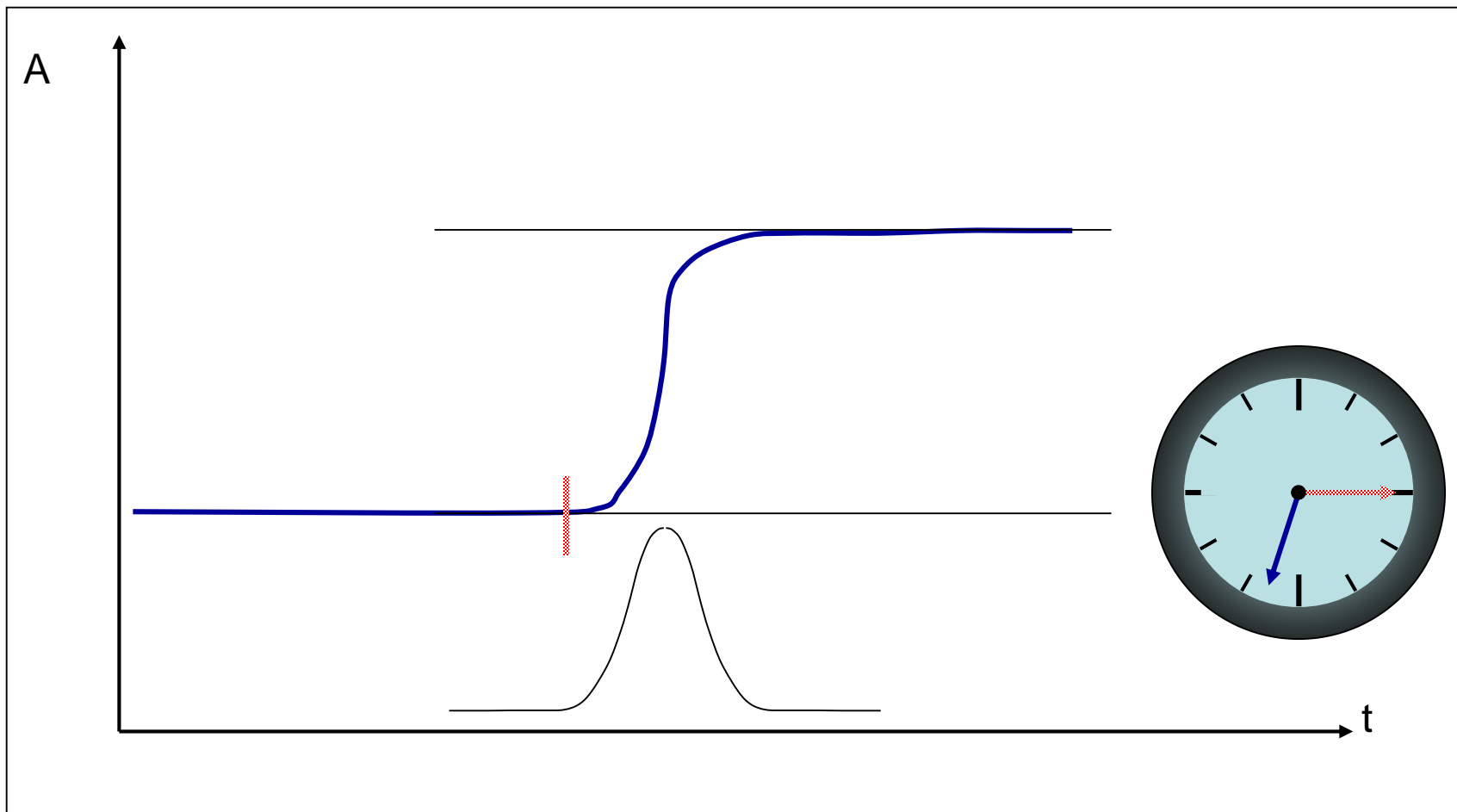




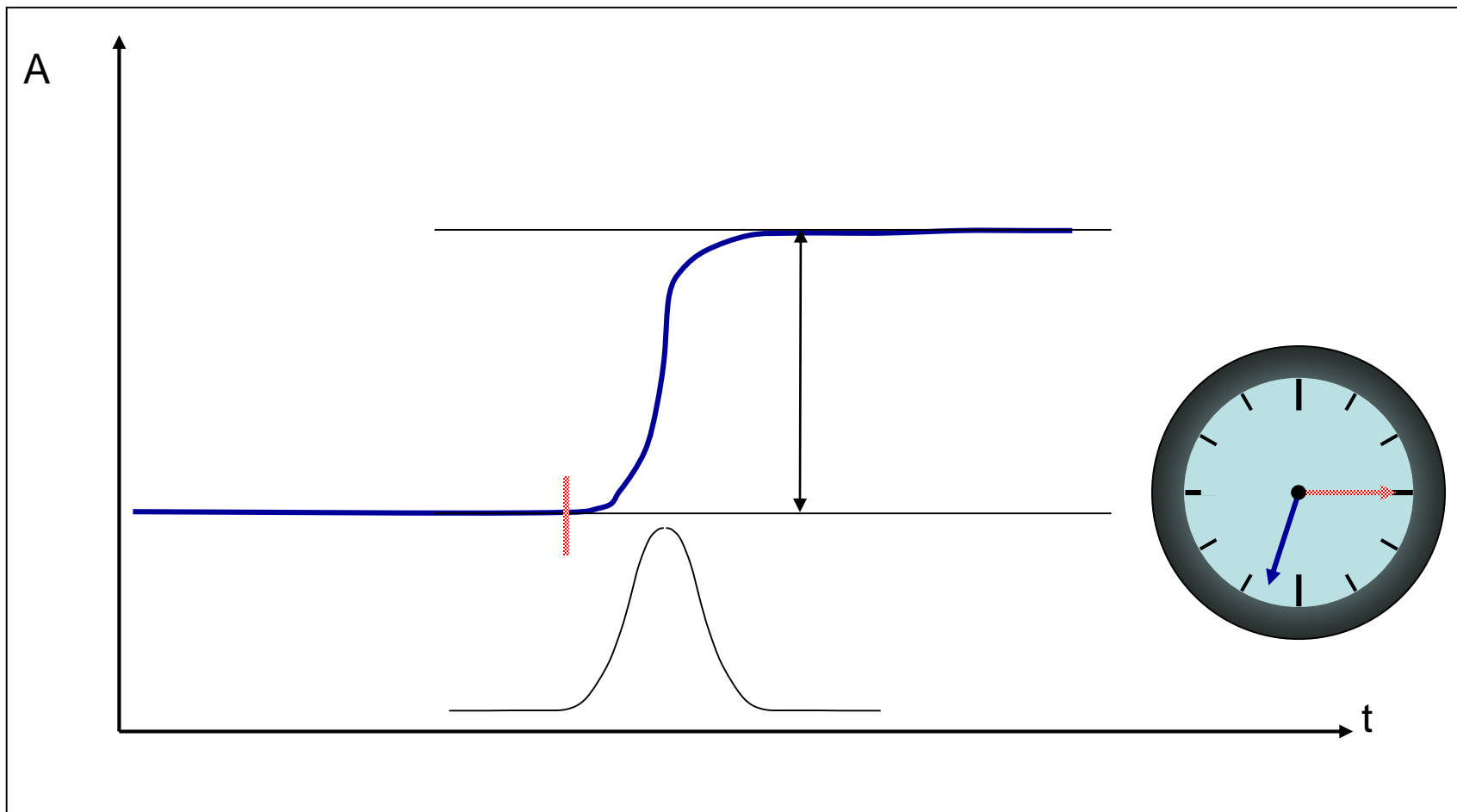
Derivace



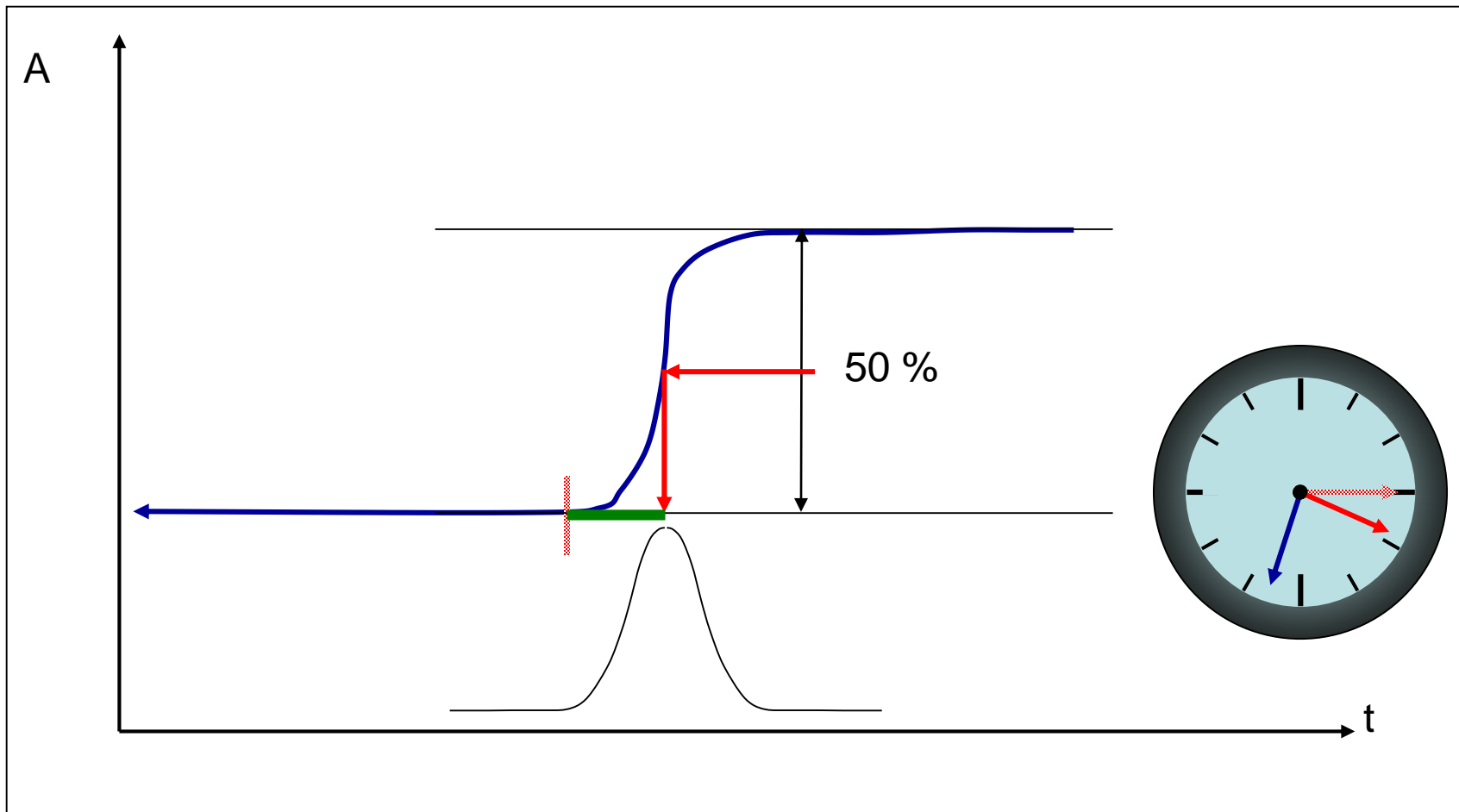
Rozdíl



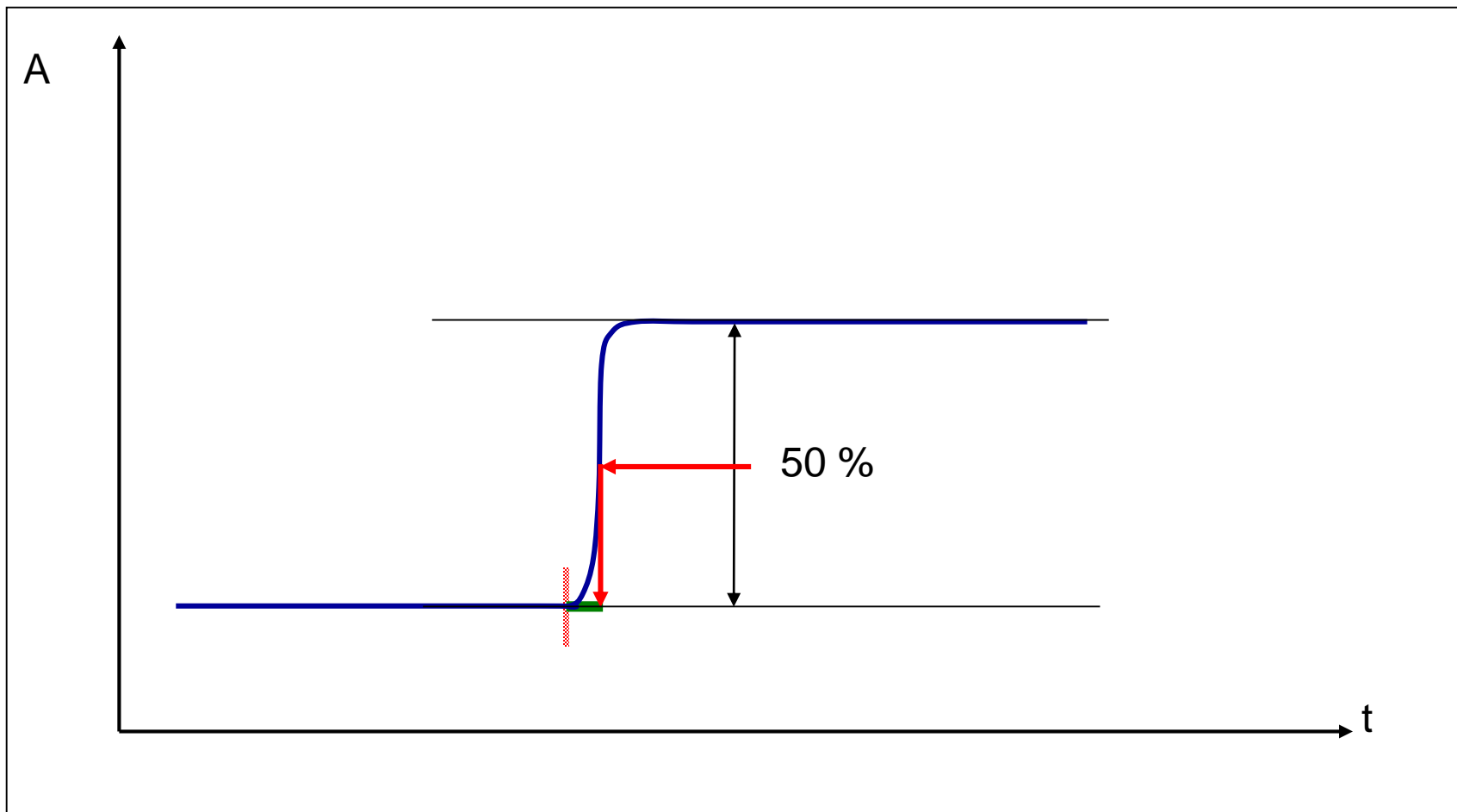
Rozdíl



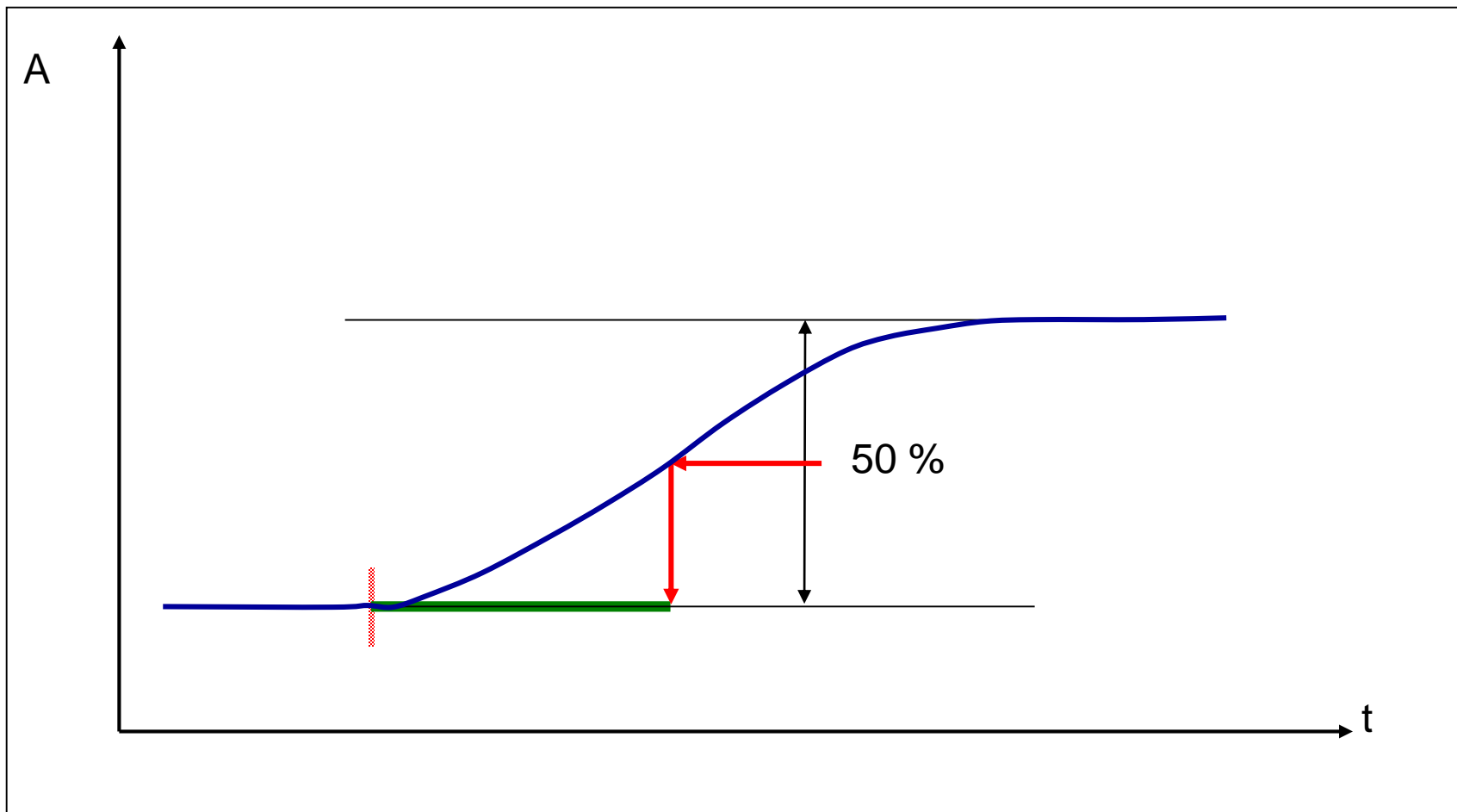
Rozdíl



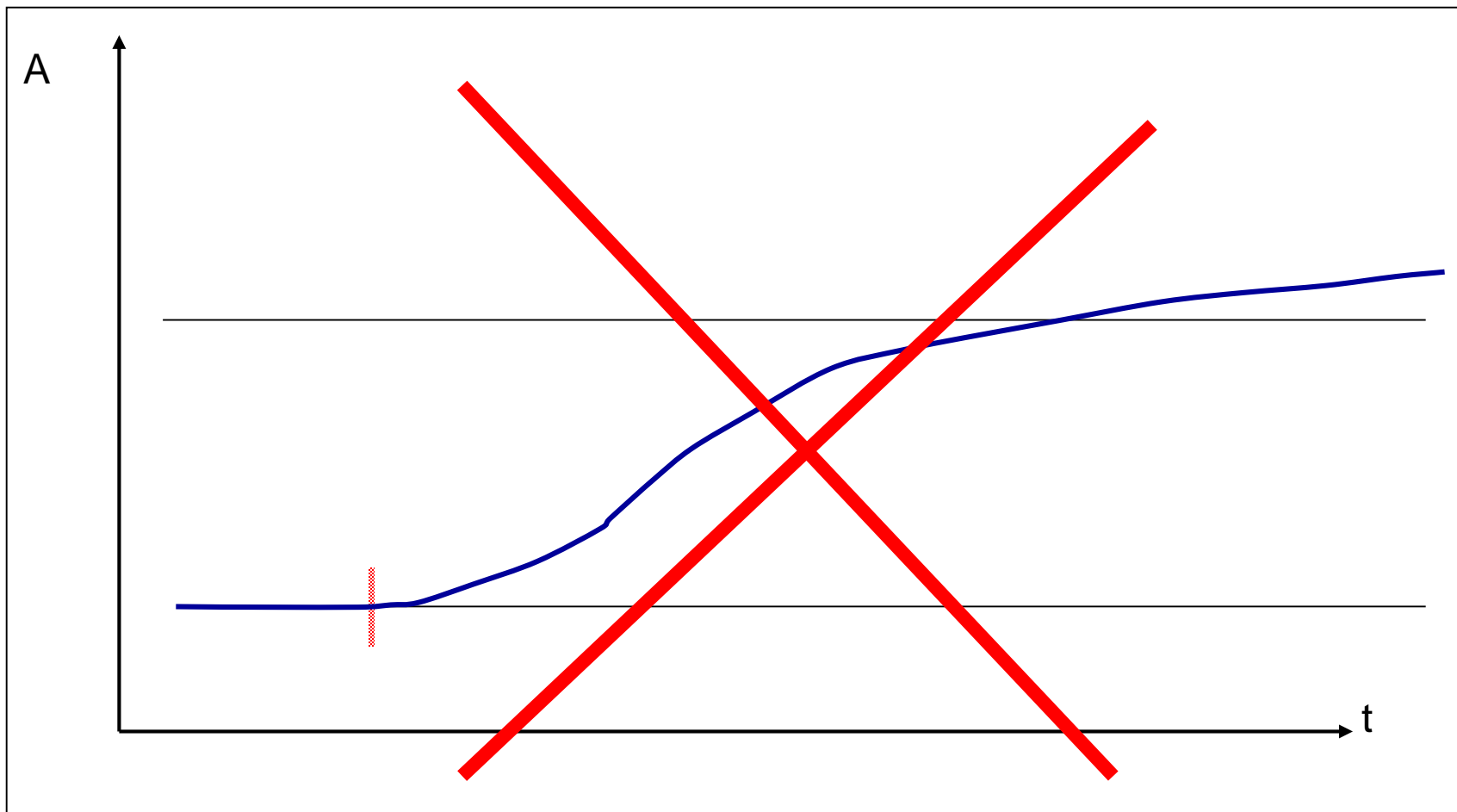
Rozdíl



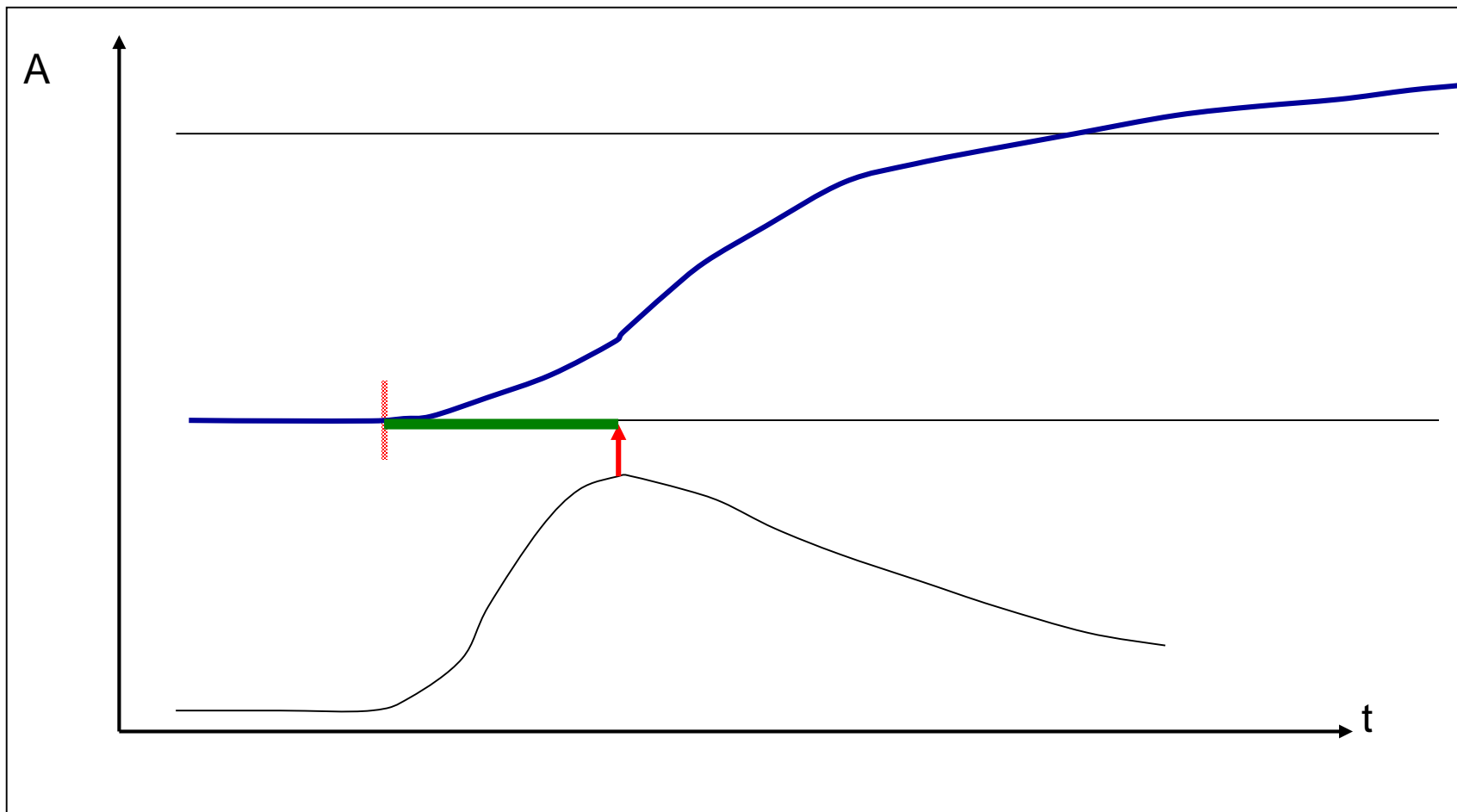
Rozdíl



Rozdíl



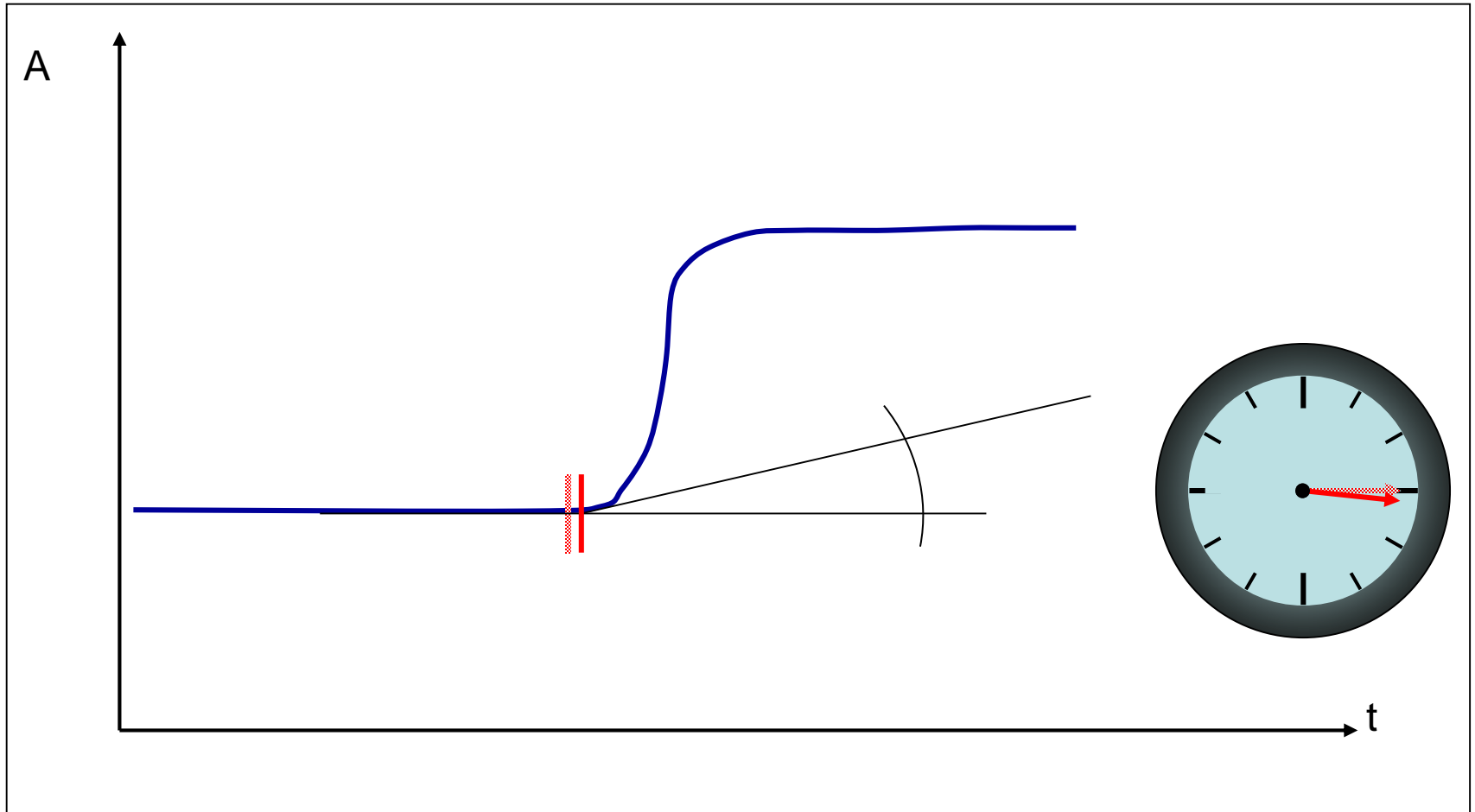
Derivace



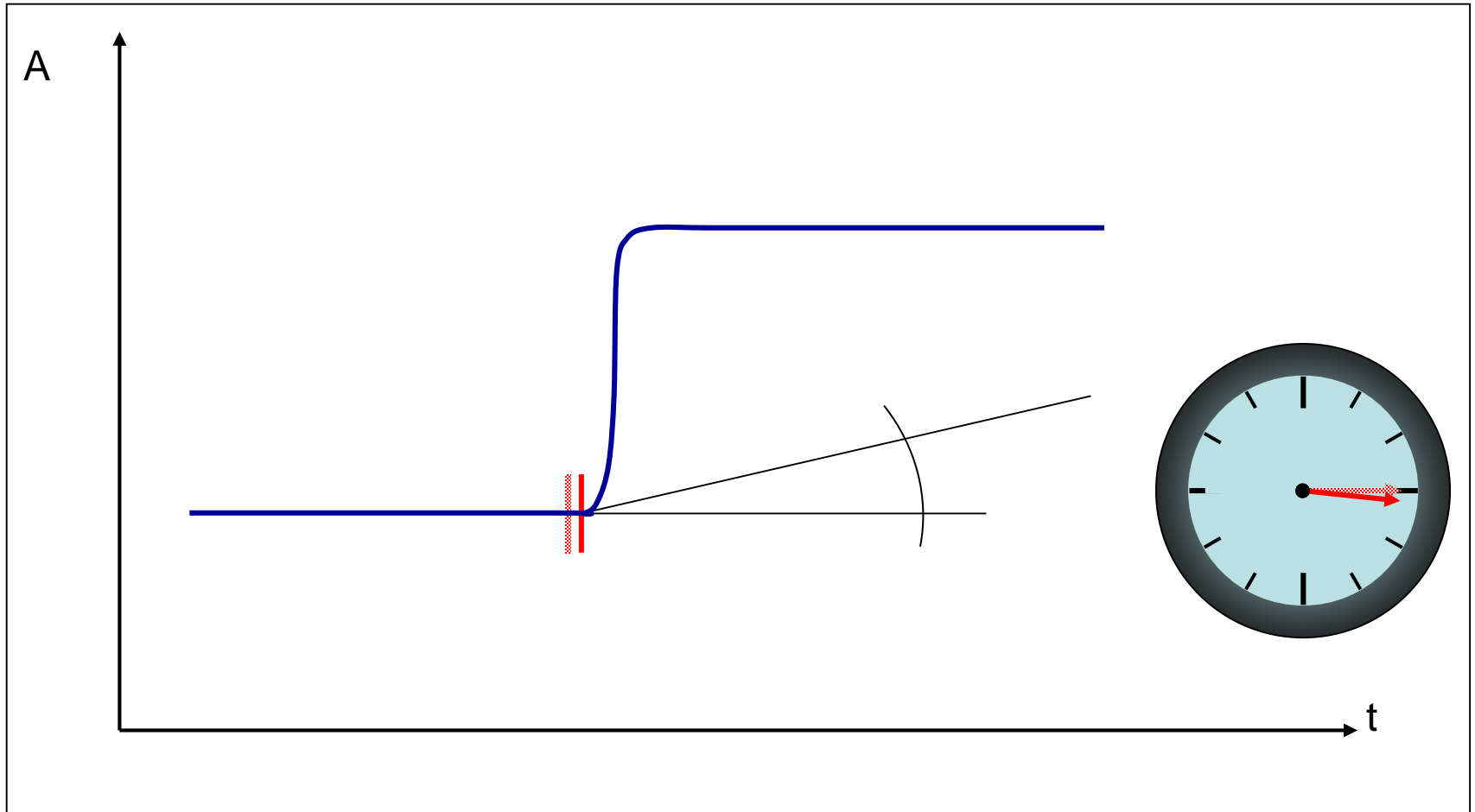
Rozdíl a Derivace

- Není problém u normálních vzorků
- U pomalu koagulujících vzorků významně prodlužují koagulační časy

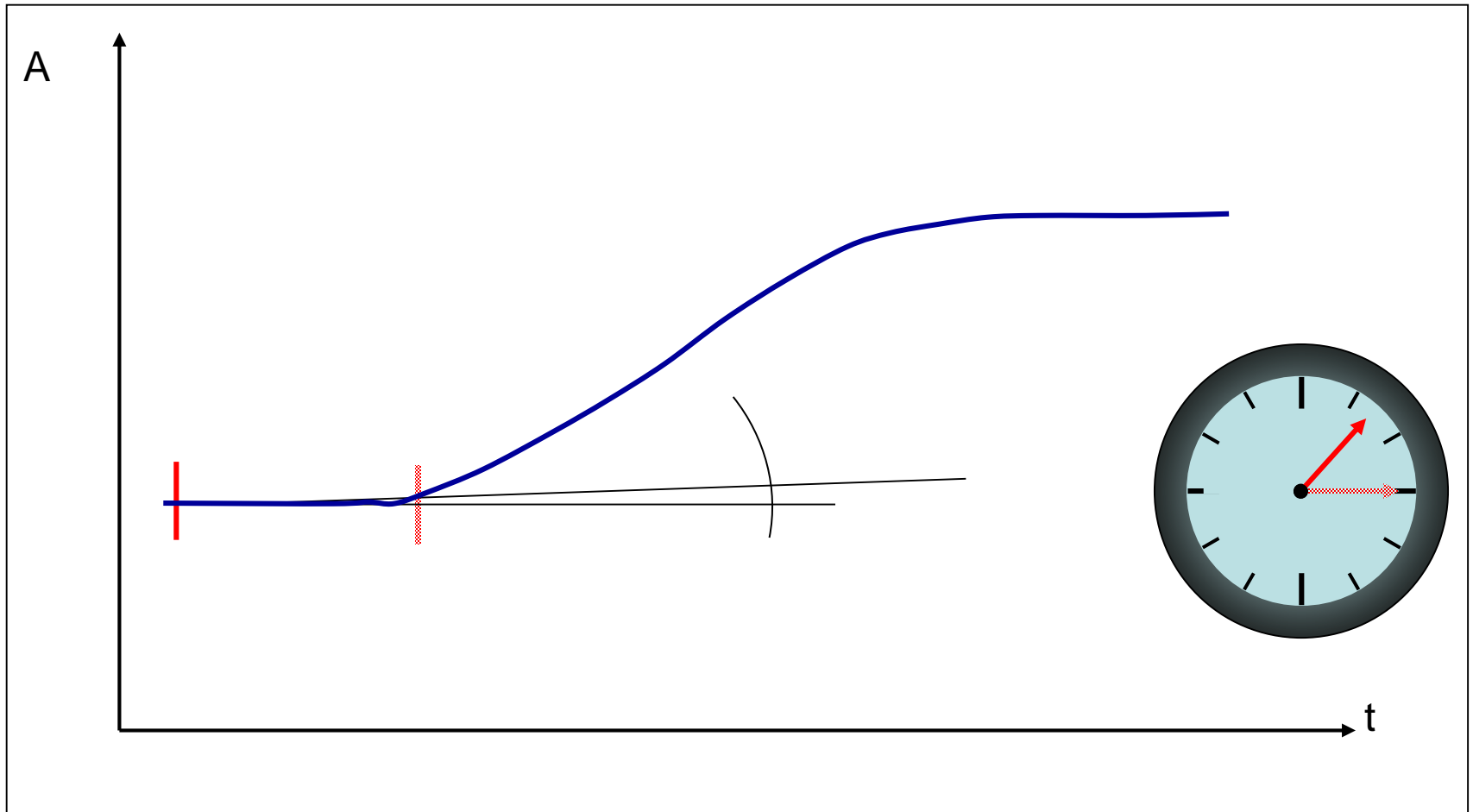
Počáteční rychlost



Počáteční rychlost



Počáteční rychlost



Počáteční rychlost

- Není problém u normálních vzorků
- Pomalu koagulující vzorky
významné zkrácení času

Optické koagulometry

- Výhody
 - Jednodušší konstrukce
 - Snadná implementace do automatů
- Nevýhody
 - Nelze analyzovat zabarvené vzorky
 - Problémy při pomalém vzniku koagula
 - Nutno udržovat optiku v perfektní čistotě

Dělení testů dle principu

- **Fotometrické**

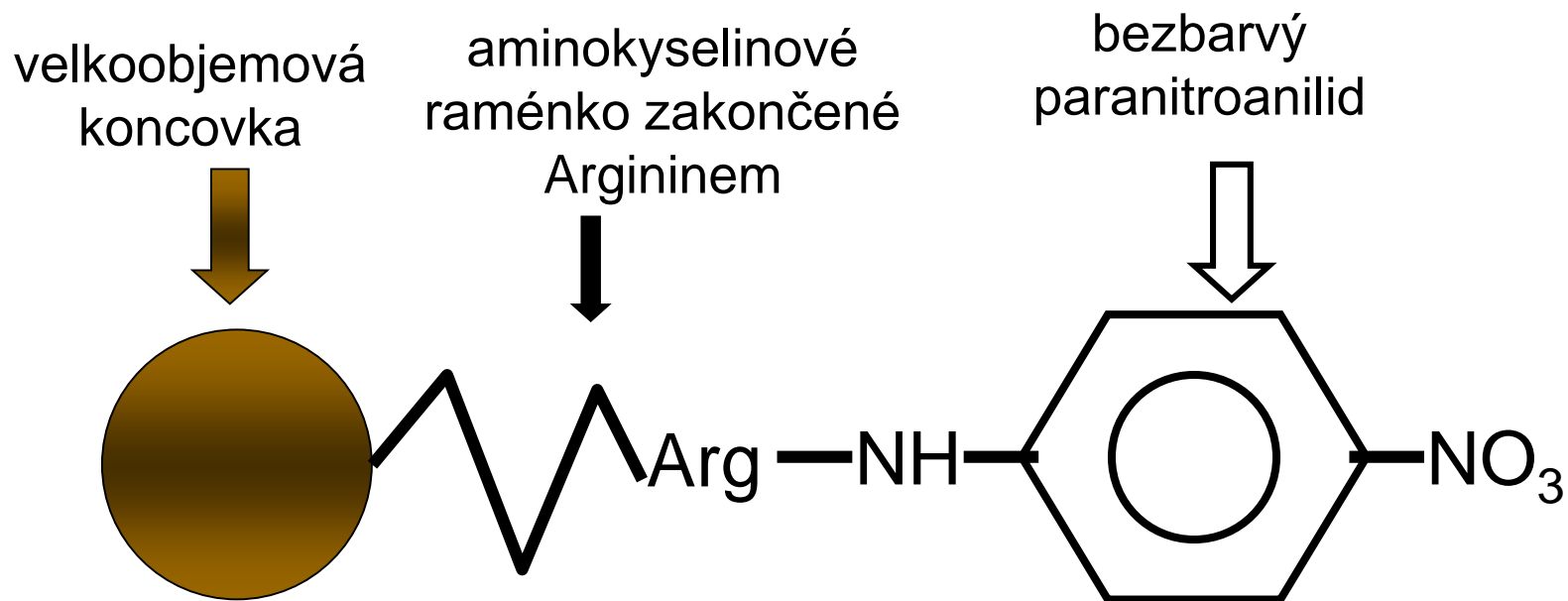
- sledování změn zbarvení v důsledku štěpení specifického chromogenního substrátu - detekce absorbance (A)
 - end point“ (A)
 - **kinetické ($\Delta A/\text{min}$)**
- limitace -hemolytické a ikterické vzorky

- **Turbidimetrické** (jiné než koagulační, imunochemické)

- sledování změn zakalení
 - detekce změn transmise (propustnosti T)
 - detekce změn absorbance
- limitace- chylózní vzorky

Chromogeny

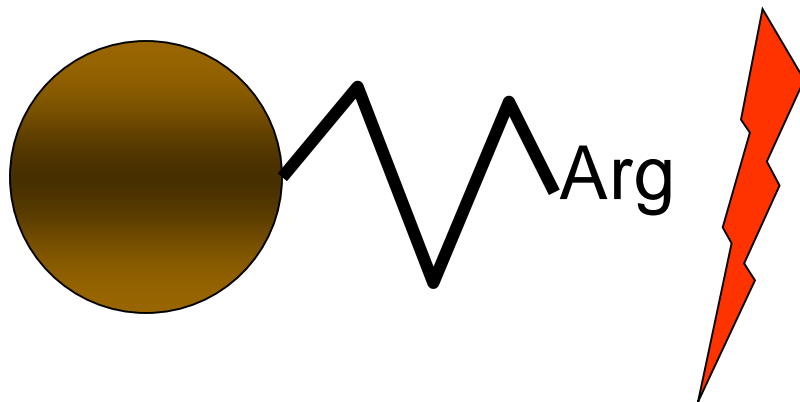
- **Chromogenní substrát**
– uměle připravený



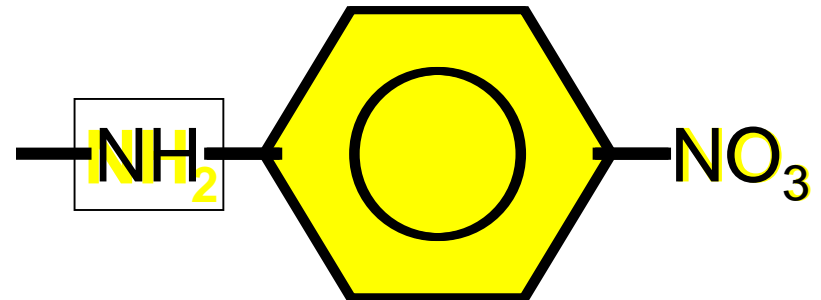
Chromogeny

- **Princip**

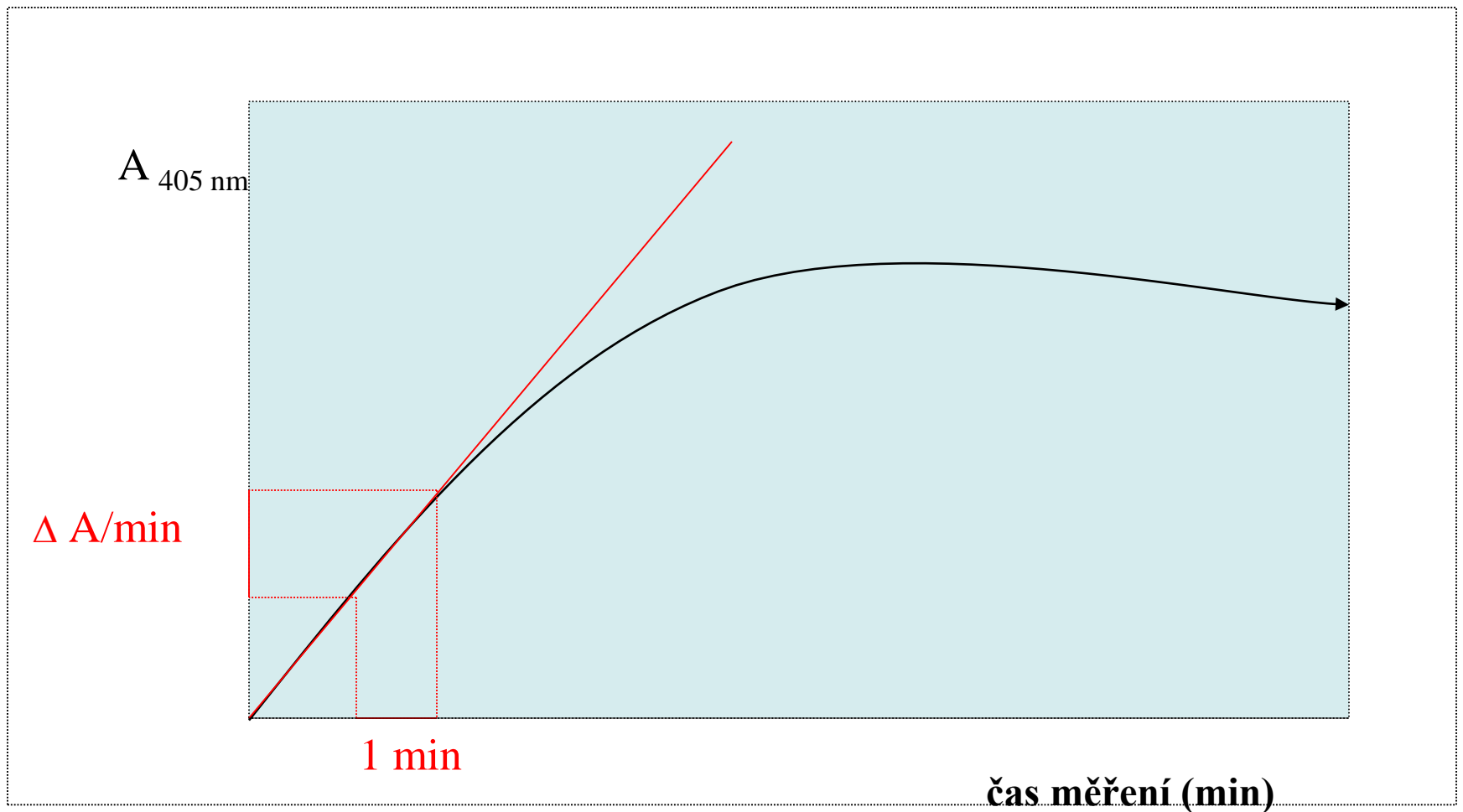
- enzymy štěpí substrát – vzniká žluté zbarvení
- měříme při 405 nm



paranitroanilin



Kinetické měření

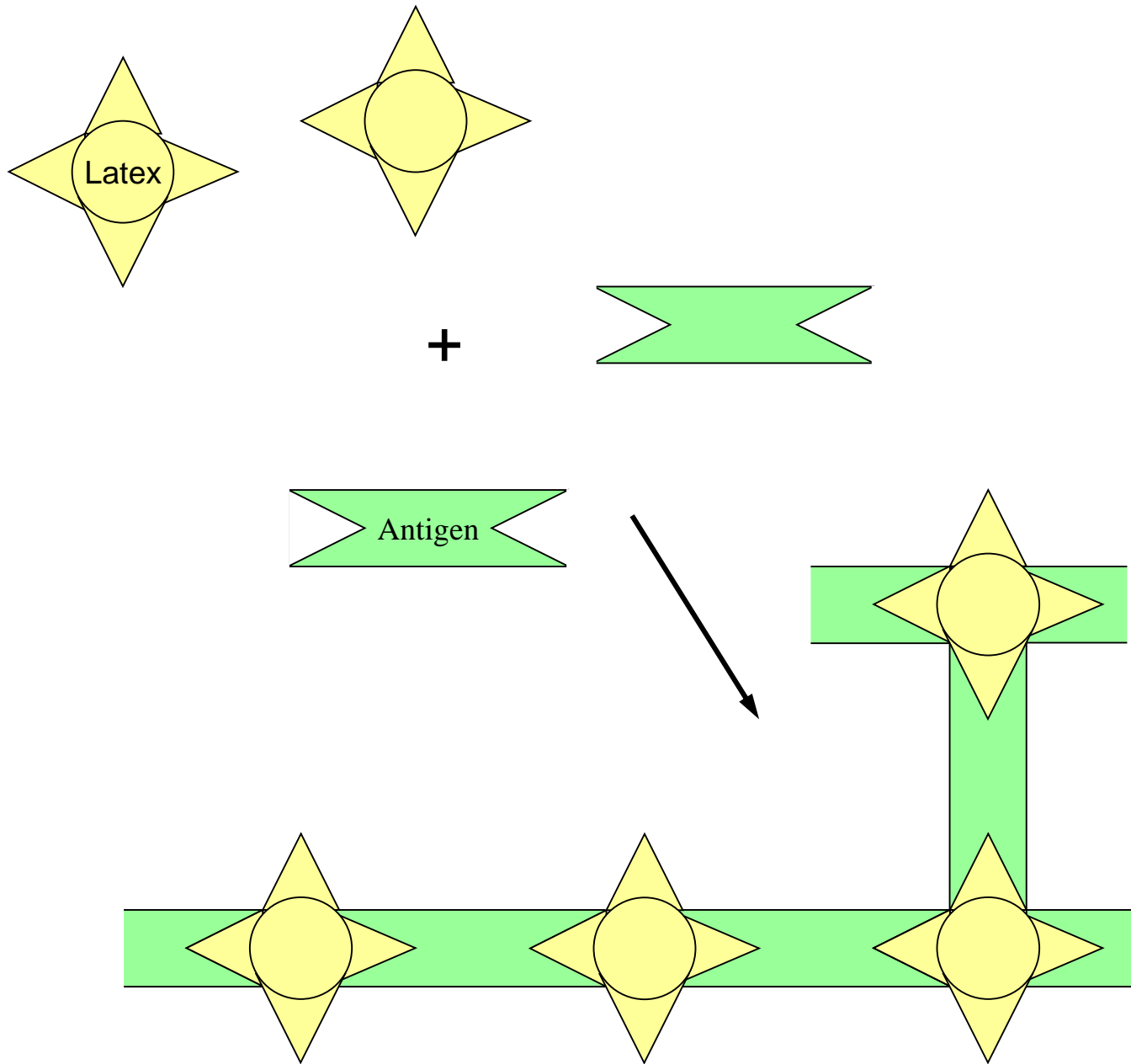


Dělení testů dle principu

- **Imunochemické**
 - **sledování reakce antigenu s protilátkou**
 - aglutinace
 - LIA
 - ELISA
 - EID

Aglutinační metody

- **sledování aglutinace viditelných částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu**
- **odečítání makroskopicky**
 - pozitivní(+, ++, +++)/negativní
 - **semikvantitativní metody** (udaná mez detekce)
- **metody**
 - latexaglutinační (např. FDP, D-Di)
 - hemaglutinační (např. FM)



Příklad vyšetření D-Dimerů – semikvantitativní výsledek

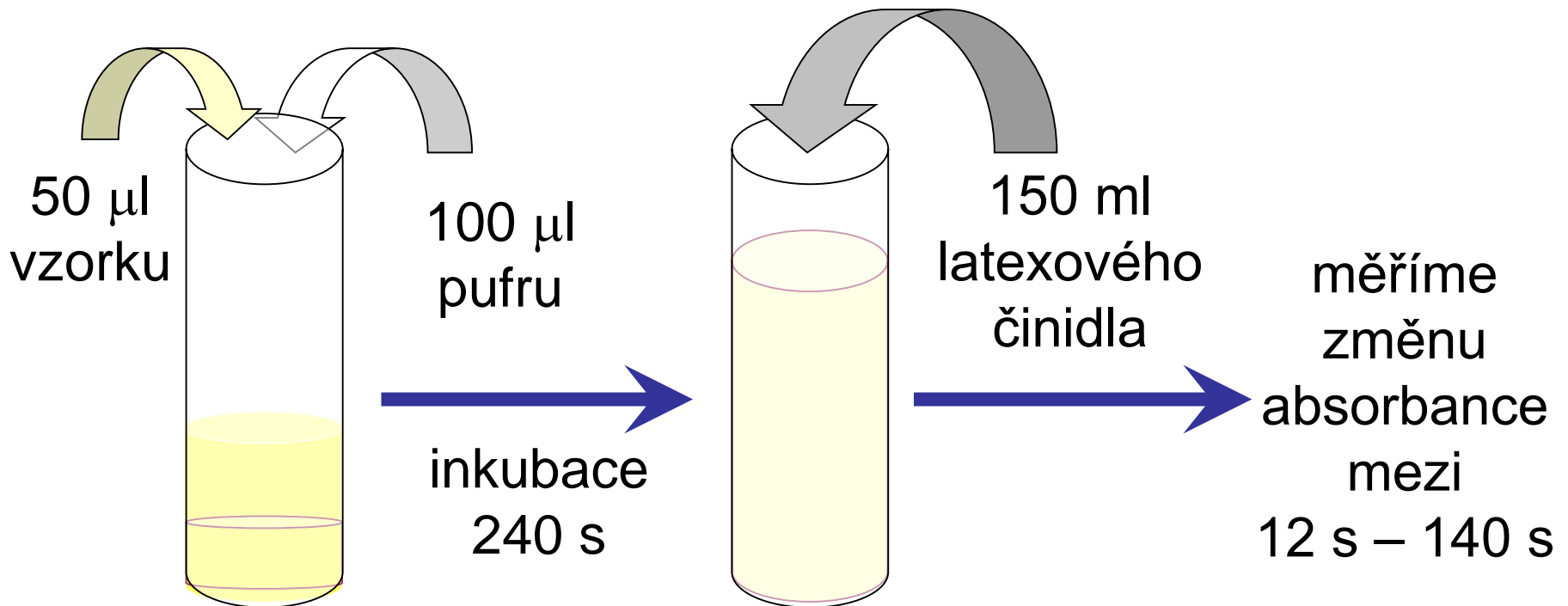
Mez detekce = 0,5 mg/l	Neřaděný vzorek	Vzorek řaděný 1:6	Výsledek
aglutinace	-	-	< 0,5 mg/l
aglutinace	+	-	> 0,5 mg/l a < 3,0 mg/l
aglutinace	+	+	> 3,0 mg/l

Liquid immunoassay - LIA metody

- sledování aglutinace mikrolatexových částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu
- odečítání optickým systémem koagulometru
 - změna zakalení ($\Delta A/\text{min}$)
- kvantitativní metody (např. D-Di, vWF:Ag...)
- Limitace
 - Chylozita vzorku
 - Hookův jev (vysycení protilátky antigenem)

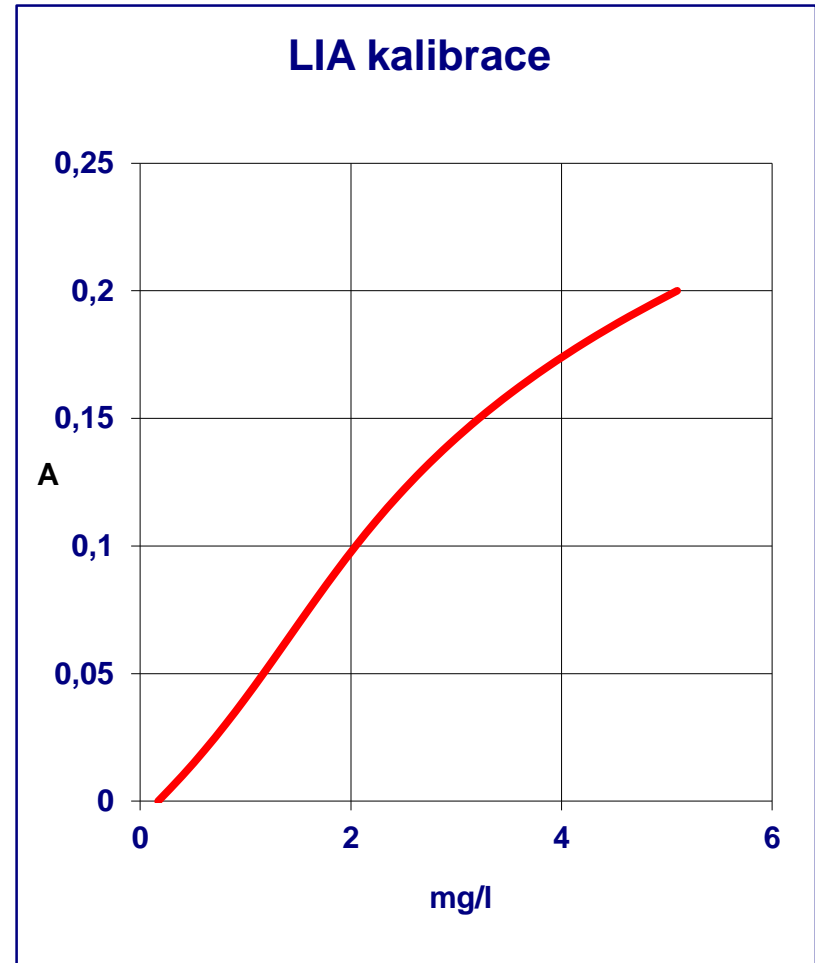
LIA testy

- **Provedení (STA© Liatest© D-Dimer)**



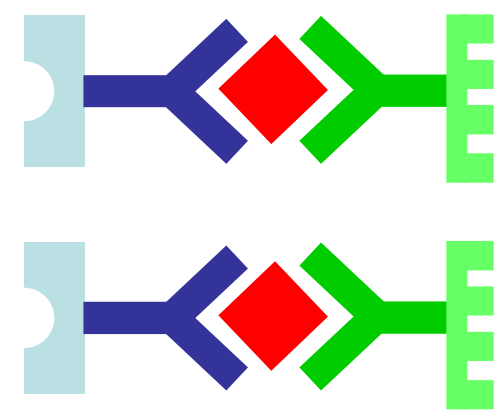
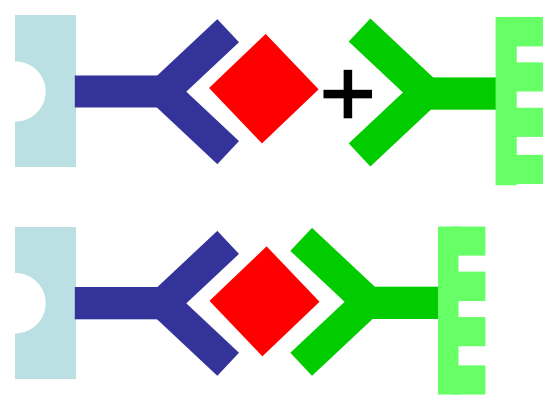
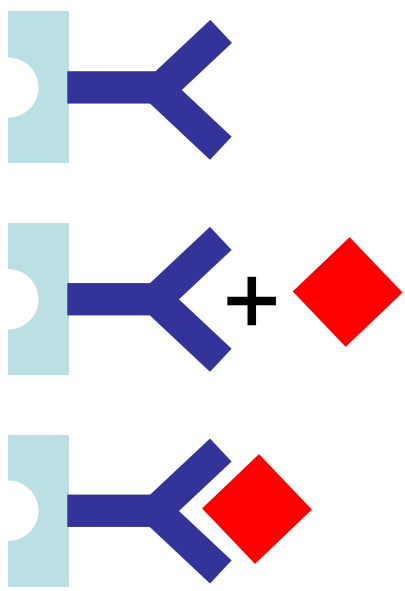
LIA testy

- **kalibrace**
 - sigmoidní
 - polynom 3. řádu
 - minimálně 5 bodů
 - platí pro celou šarži



ELISA metody

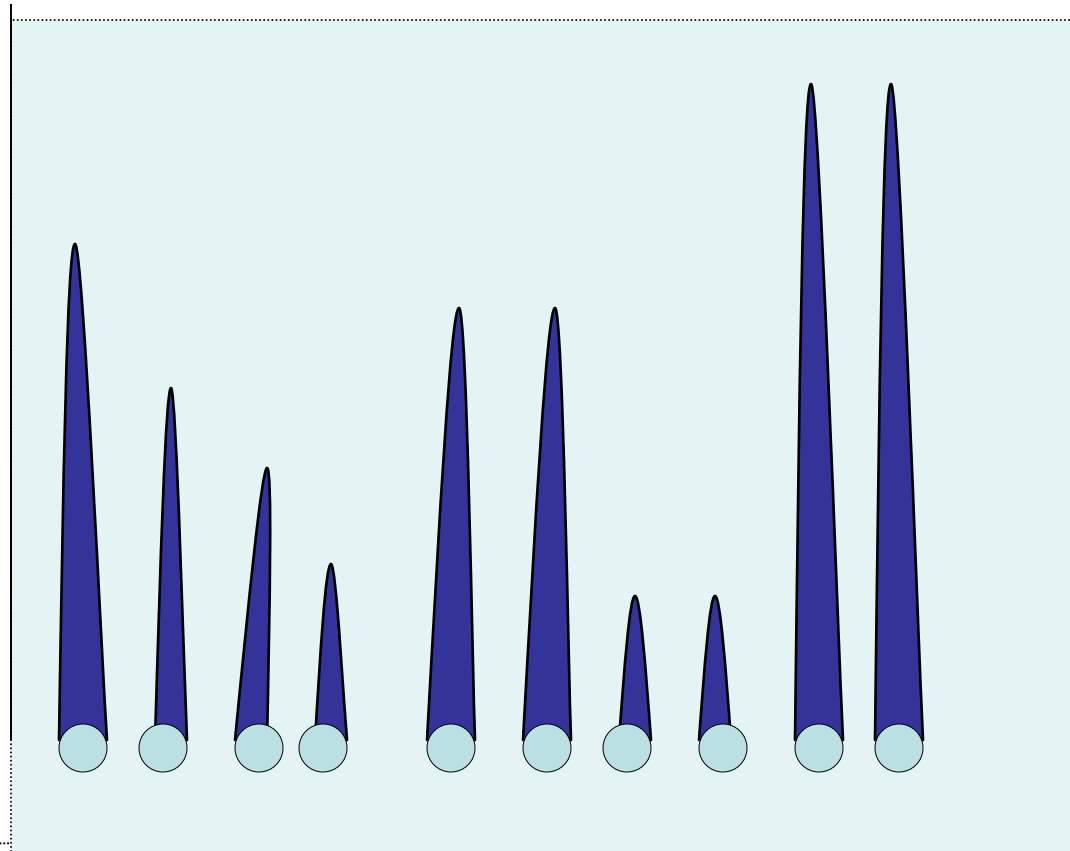
- **stanovení antigenu(Ag)pomocí protilátky (Ab) značené enzymem (AbE)**
- **kvantitativní metoda**
 - inkubace vzorku v mikrotitračních jamkách s navázanou Ab proti vyš. Ag - vazba Ag na Ab
 - odsátí vzorku + promytí
 - inkubace AbE v jamkách - vazba na Ag
 - odsátí AbE a promytí
 - detekce enzymatické aktivity komplexu Ab-Ag -AbE po přidavku chromogenního substrátu (A)
 - **přímá úměra: enzym. aktivita x množství Ag**



Elektroimmunodifúze - EID metody

- **vyšetřovaný antigen reaguje s protilátkou přítomnou v agarózovém gelu při elektroforéze za vzniku precipitačního píku**
 - délka píku je přímo úměrná koncentraci antigenu
- **kvantitativní metoda**

Princip EID



kalibrace

vzorky pacientů

Vyšetření plazmatických proteinů

- Vyšetření funkční aktivity
 - koagulační metody
 - fotometrické metody
- Vyšetření antigenu
 - imunochemické metody
 - umožňují odlišení defektů
 - kvalitativních
 - kvantitativních