


Speciální koagulační vyšetření II

Testy k diagnostice VWF


Screeningové testy

-  doba krvácení


-  PFA


-  APTT

Specifické testy


-  F VIII:C (funkční aktivita)


-  funkční aktivita VWF (VWF:RCo, VWF:Ac)


-  antigen VWF (LIA, ELISA, EID)

-  kolagen vazebná kapacita VWF

Diskriminační testy

-  agregace po ristocetinu

-  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 agregáční křivky
- ✓ vyjadren výsledku v % odečtením 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adren výsledku v % odečtením 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 reagencie
- ✓ 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 s navázanou protilátkou proti GPIb

✓ metodou imunoturbidimetrickou na koagulačních automatech

Kolagen vazebná kapacita vWF

↪ Princip

- ↪ vazba vWF na koňský kolagen navázaný na stěnách mikrotitrační desky
- ↪ následná detekce vázaného vWF enzymatickou imunochemickou reakcí (EIA)

↪ Vyhodnocení

- ↪ odečtení absorbance

↪ Vyjádření výsledku

- ↪ v % normálu odečtením z kalibrační křivky

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

Faktor VIII vazebná kapacita vWF

↪ Princip

- ↪ vazba vWF na stěny mikrotitrační desky potažené monoklonální protilátkou
- ↪ eluce F VIII pacienta
- ↪ inkubace s definovaným množstvím rekombinantního faktoru VIII
- ↪ detekce vázaného F VIII na vWF fotometrickou metodou

↪ Vyhodnocení

- ↪ odečtení absorbance

↪ Vyjádření výsledku

- ↪ v % normálu odečtením z kalibrační křivky

Multimerní analýza

↪ Princip detekce multimerní struktury vWF

↪ elektroforéza vzorku v SDS-agarózovém gelu

↪ specifická detekce

✓ autoradiograficky

✓ Western blot

↪ Význam vyšetření

↪ odlišení různých typů a podtypů vWF choroby

Molekulární analýza

- ↪ detekce specifických genetických defektů vWF
 - ↪ řetězovou polymerázovou reakcí a mutační analýzou

Testy fibrinolytického systému

↪ Rutinní testy

↪ euglobulinová lýza

↪ D-Dimery

↪ FDP

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

↪ plazminogen (↓)

↪ α -2-antiplazmin (↓)

↪ PAI-1(↑)




↪ tPA (↑)

↪ Molekulární markery (ELISA)





↪ komplex PAP

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

Diagnostika trombofilních stavů


Vyšetření hyperkoagulace

 nutné provedení speciálních testů k vyšetření jednotlivých trombofilních markerů

 zkrácení časů APTT (málo citlivé)

✓ v porovnání s předchozím výsledkem

✓ za vyloučení arteficiálního ovlivnění při odběru

 vyšetření molekulárních markerů

✓ D-Dimery - aktivace koagulace i fibrinolýzy





– sledování dynamiky změn kvantitativně

✓ FPA, F1+2, TAT - aktivace koagulace

– metody ELISA nejsou dostupné statim

Trombofilní markery

Defekty systémů


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


Přítomnost protilátek


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


Přirozené inhibitory

 Antitrombin

 Systém PC/PS

 Protein C

 Protein S


 APC-rezistence

Antitrombin

Vyšetření funkční aktivity

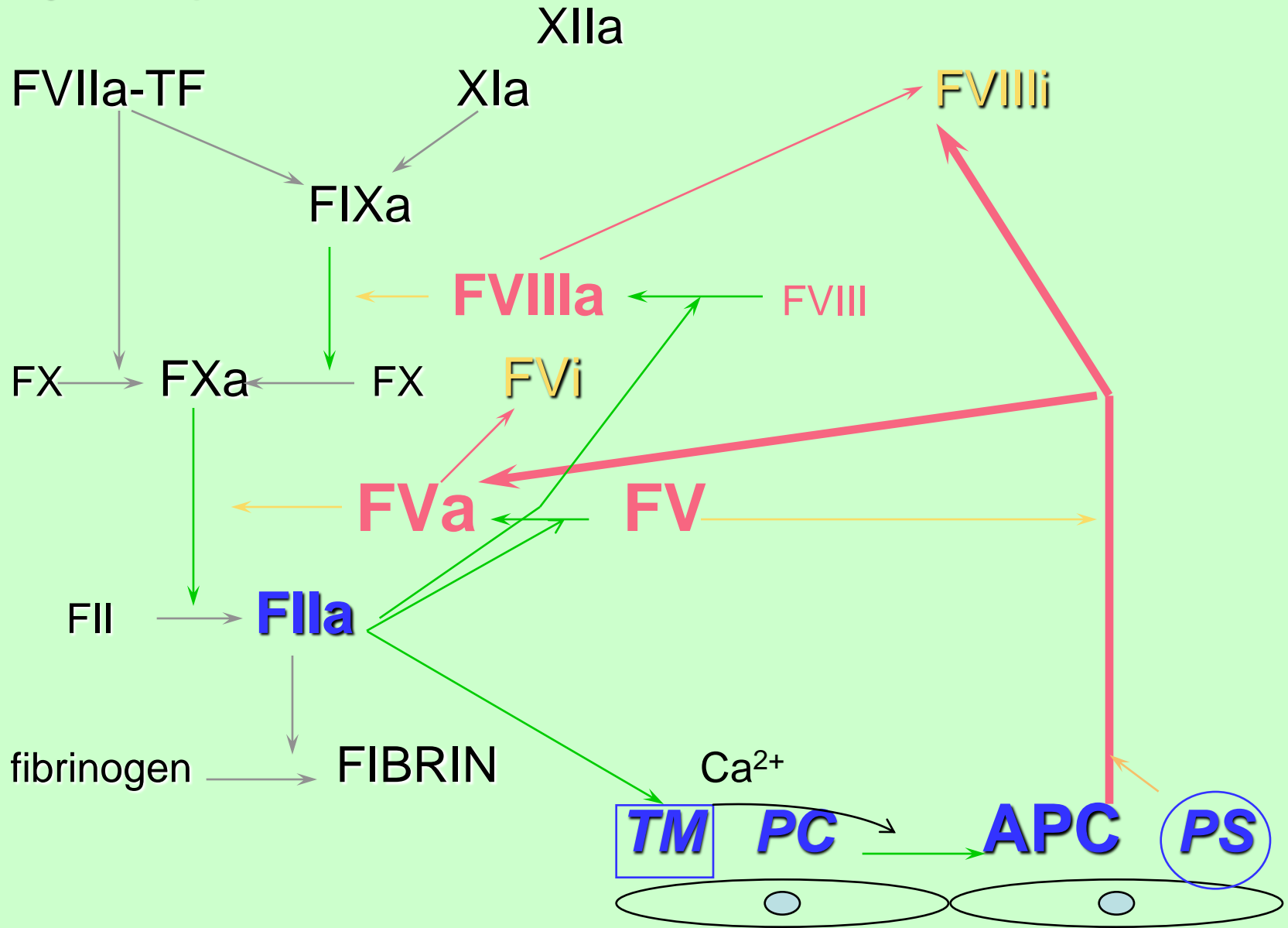
 fotometricky (IIa, Xa)

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 reagencie, inkubace

↪ 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 (PCAT)

↪ aPTT bez aktivátoru proteinu C (PCAT0)

↪ 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 - výpočet

$$NR = \frac{PCAT}{PCATO} \times KF$$


$$KF = SV / \frac{PCAT \text{ stand.plazmy}}{PCATO \text{ stand.plazmy}}$$

KF - kalibrační faktor SV - citlivost standardní plazmy


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


Defekty koagulačních faktorů

 Zvýšená hladina

 Faktor VIII

 Faktor XI, IX, II, VII, fibrinogen

 Dysproteinemie

 Fibrinogen,...

Defekty fibrinolýzy

↪ PAI

↪ Plazminogen

↪ Faktor XII

↪ Dysfibrinogenémie

↪ TAFI

↪ Molekulární markery (D-Di, PAP)

Defekty trombocytů

Syndrom lepivých destiček

Hyperagregabilita trombo

✓ po Epi + ADP - typ I

✓ po Epi - typ II

✓ po ADP - typ III

Aktivace trombocytů

samovolná agregace

molekulární markery

✓ PF4, β TG - ELISA