

Speciální koagulační vyšetření II

Zavřelová J.

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 GPIb**

↪ 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rdavku vyetrovan plazmy (PPP)

- ✓ vyhodnocení změny transmise/min z agregáční křivky
- ✓ vyjdren výsledku v % odečtením z kalibrační křivky

↪ Turbidimetrick metoda

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

- ✓ vyhodnocení změn absorbance z kinetického mren
- ✓ vyjdren výsledku v % odečtením z kalibrační křivky

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
 - vyhodnocení **změn absorbance** z kinetického měření
 - vyjádření výsledku v **%** odečtením z kalibrační křivky

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 proti VWF
- ↳ 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 (klinický význam↓, riziko trombózy)
- ↳ α -2-antiplazmin (klinický význam↓, riziko krvácení)
- ↳ PAI-1 (klinický význam↑, riziko trombózy)
- ↳ tPA (klinický význam↓, riziko trombózy)

↳ 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 času **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


- ↳ Přírodních 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

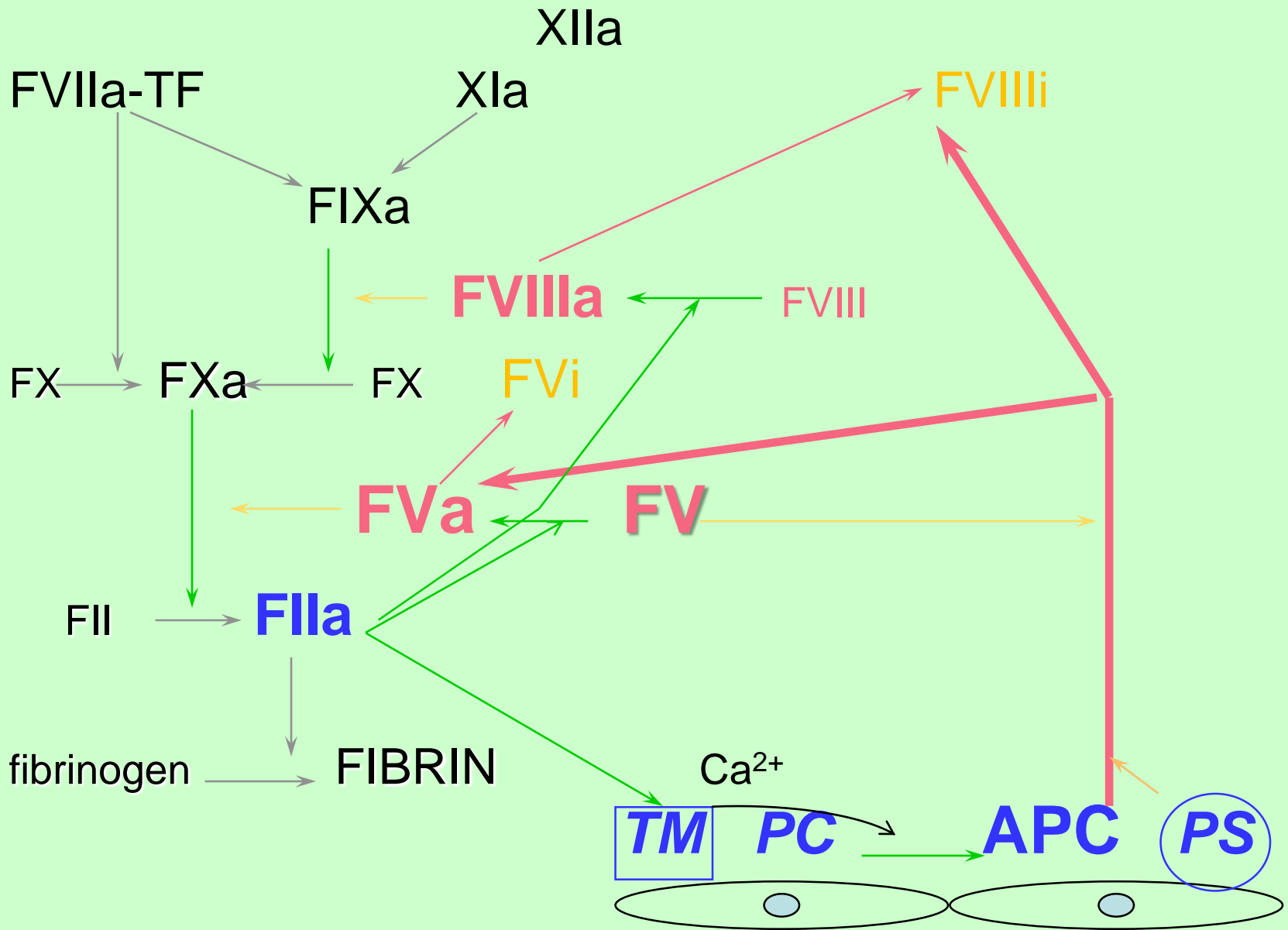
↳ fotometricky (IIa, Xa)

↳ 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

↳ řaděná vyšetřovaná plazma

↳ neřaděná 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 %)
 - ↪ Leidská 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

↳ Dysproteinémie

↳ 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

Diagnostika HIT

↳ Trombocytopenie

↳ aplikace heparinu je provázena nevysvětlitelným poklesem počtu trombocytů

✓ < $150 \times 10^9/l$ nebo o více než 50 %

↳ v časovém úseku odpovídajícím imunizaci heparinem

↳ Vyloučení trombocytopenie z jiných příčin

↳ DIC, LA, TTP, HUS, AITP

↳ potransfúzní purpura

↳ dřeňový útlum

↳ Průkaz přítomnosti protilátek

Laboratorní testy HIT

↳ Testy imunologické

↳ vyšetření protilátek proti Heparin/PF4

- ✓ kvalitativní testy - průkaz přítomnosti/nepřítomnost
- ✓ ELISA - průkaz protilátek různých tříd IgG, IgM a IgA

↳ Testy funkční

↳ vyšetření schopnosti HIT protilátek aktivovat normální trombocyty jen v přítomnosti heparinu (ne v nepřítomnosti a při vysoké koncentraci)

- ✓ destičkový agregační test
- ✓ test uvolnění serotoninu (referenční metoda)
- ✓ exprese destičkových membránových glykoproteinů (flowcytometrie)
- ✓ uvolnění destičkových mikropartikulí (flowcytometrie, ELISA)
- ✓ uvolnění ATP (chemiluminiscence)
- ✓ prokoagulační aktivita MP pomocí trombingeneračního testu

Destičkový agregační test

↳ Vyšetření agregace trombocytů normálu (PRP) v přítomnosti heparinu a inaktivovaného séra/plazmy (PPP) pacienta

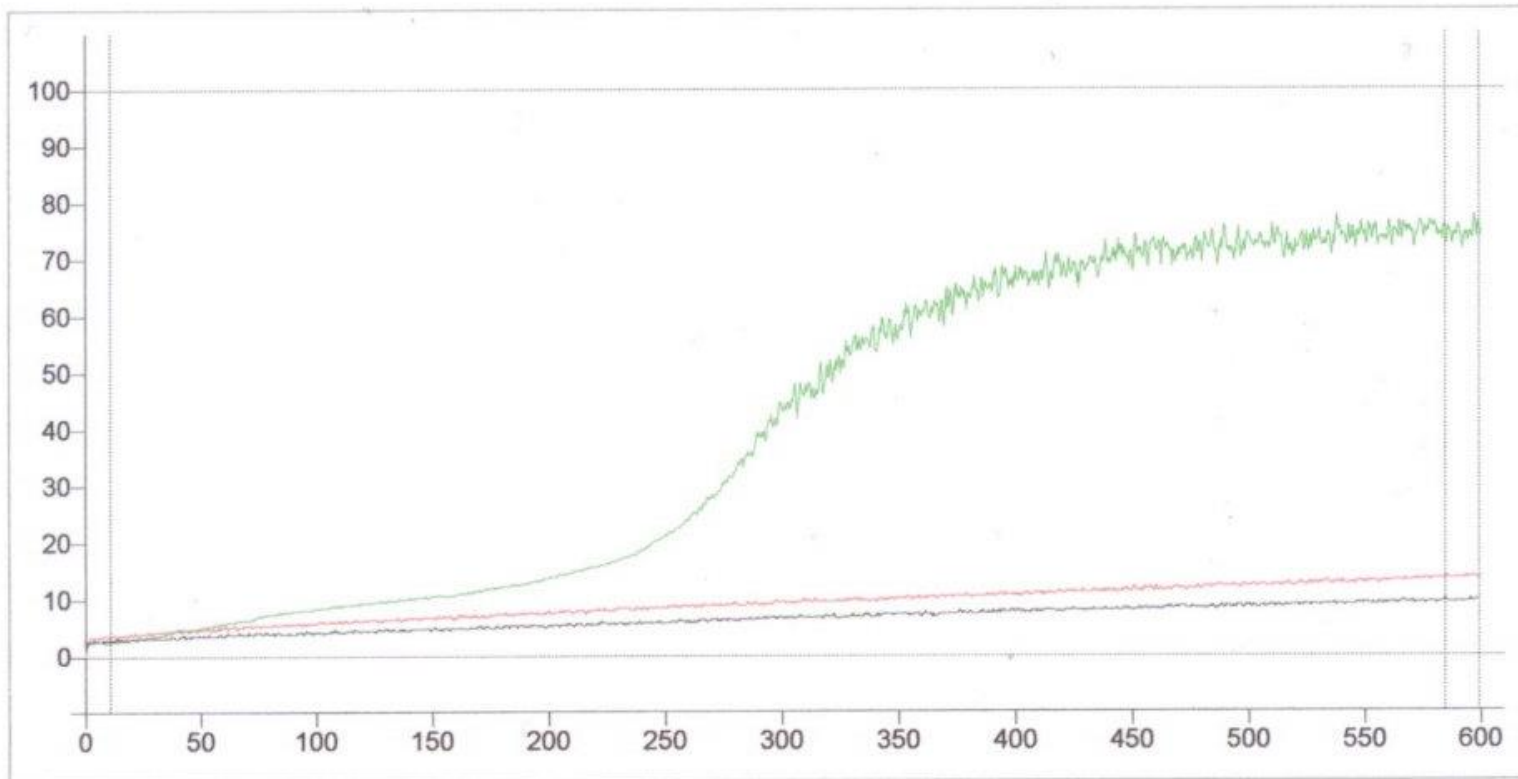
↳ porovnání agregační odezvy

✓ v přítomnosti heparinu

- v terapeutické koncentraci (1 U / ml)
- a vysoké koncentraci (100 U / ml)
 - » vyloučení falešné positivity
 - » štěpení imunokomplexů při vysoké koncentraci heparinu

✓ v nepřítomnosti heparinu (fyziologický roztok)

OKH FN Bohunice



*	Date	Time	Inductor	Sample ID	Aggregation	Slope	Desaggregation	Remark
✓ !	2/1/08	9:37:38 AM	FYZ.ROZ.	SMES II	9.6 %	3.0 %/min		
✓ !	2/1/08	11:26:37 AM	FRAGMIN 100	SMES II	13.8 %	6.2 %/min		
✓ !	2/1/08	9:48:04 AM	FRAGMIN	SMES II	74.7 %	35.3 %/min		