

Laboratorní diagnostika – krevní srážení

Jiřina Zavřelová

Fyziologie krevního srážení

- Základní homeostatický mechanismus
- Spolupůsobení různých systémů včetně regulačních zpětných vazeb
 - ↘ cévní stěny
 - ↘ trombocytů
 - ↘ plazmatických koagulačních faktorů
 - ↘ plazmatických inhibitorů
 - ↘ systému fibrinolytického

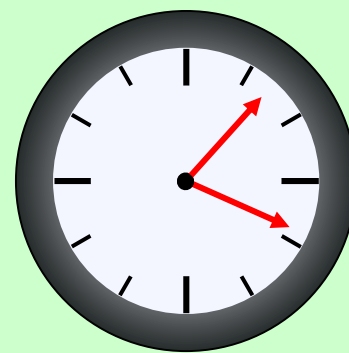
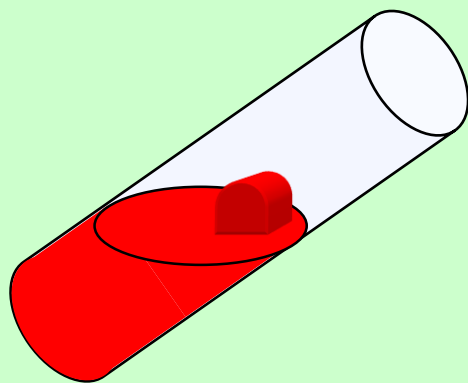
Dělení testů dle principu

- Koagulační
 - Chromogenní (spektrofotometrické s chromogenními substráty)
 - Imunochemické
-
- Optické - zákalové (jiné než koagulační, imunochemické)
 - Sledování času rozpuštění koagula
 - Sledování rozpustnosti koagula
 - Jiné

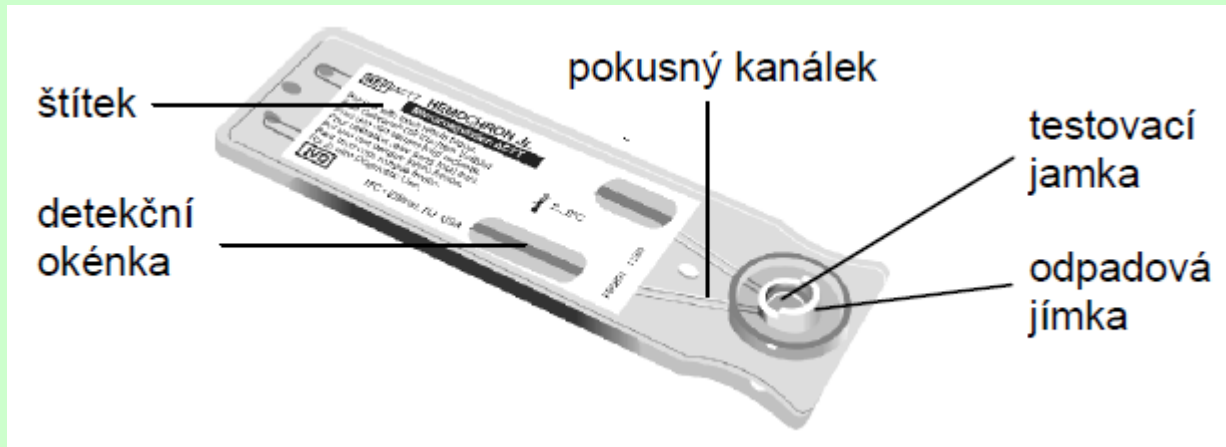
Dělení testů dle principu

- 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 (plazma)
 - koagulometr (poloautomat, automat)
 - mechanické
 - kuličkové (sledování změn pohybu kuličky)
 - optické
 - nefelometrie (sledování rozptylu světla)
 - turbidimetrie (sledování průchodnosti světla)
 - limitace- chylózní vzorky

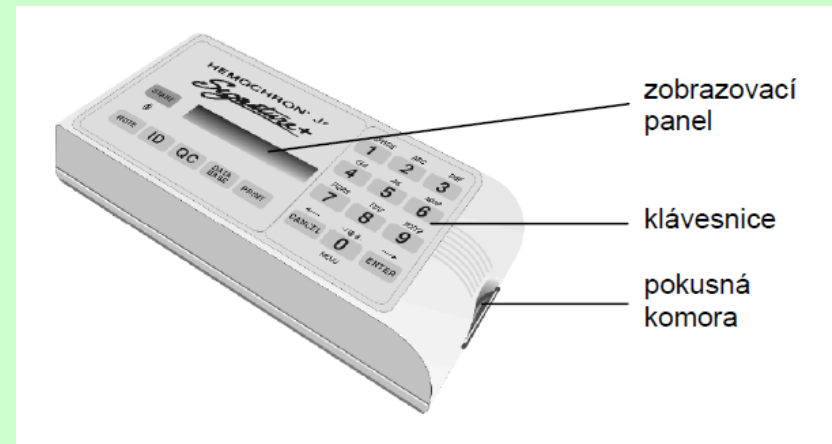
Doba srážení- manuální metoda



POCT –ACT (HEMOCHRON)

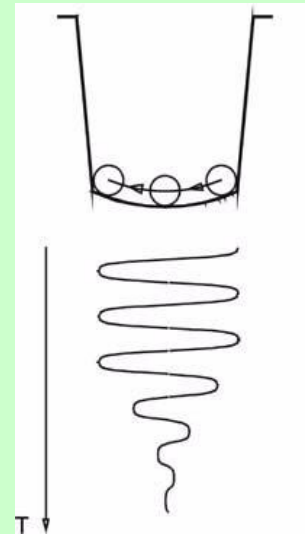
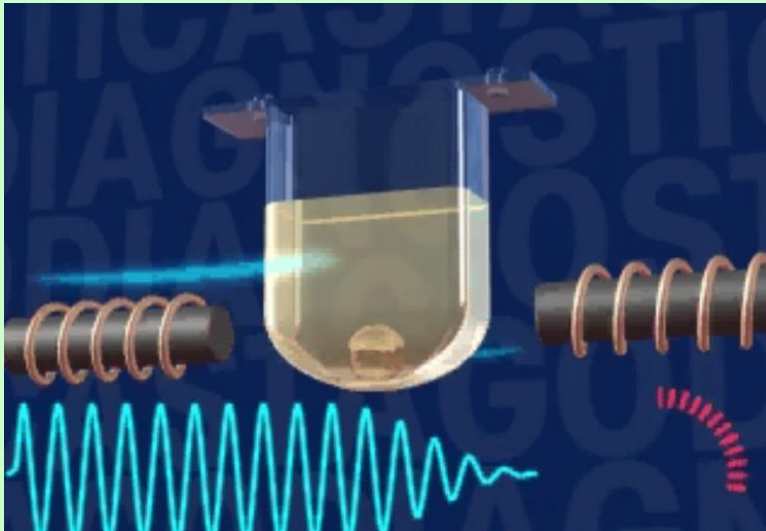


- ➔ Odkápnutí krve do testovací jamky jednorázové kyvety s reagensii (aktivátor) a vložení do pokusné komory
- ➔ Pohyb vzorku po smíchání vzorku s reagensii v pokusném kanálku předurčenou rychlostí
- ➔ Začátek tvorby koagula je detegován na základě zpomalení toku vzorku v pokusném kanálku mezi optickými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



Mechanické koagulometry Stago

- Měření odchylky oscilační amplitudy kuličky
- Při stálé viskozitě – stálé kyvadlové houpání kuličky díky dvěma zahnutým kolejničkám na dně kyvet a elektromagnetickému poli vytvářenému na obou stranách (cívky)
- Zmenšení amplitudy – nárůst viskozity – jev koagulace. Na základě změny amplitudy se stanovuje koagulační čas.



Optické koagulometry

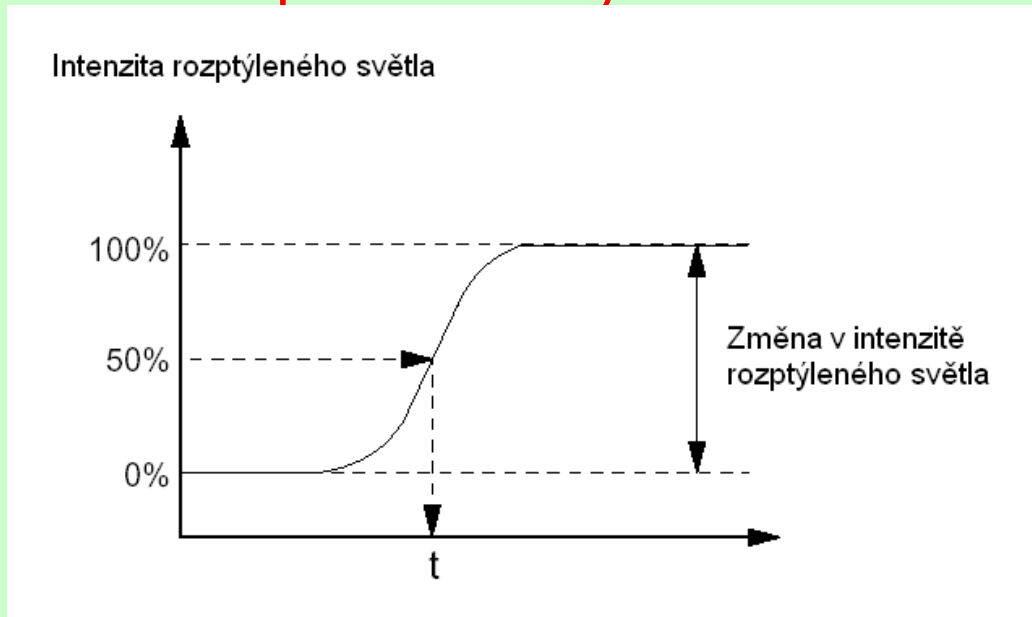
→ Detekce koagulačního času

↘ Procentuální detekce

- koagulační čas odpovídá procentuálně definované intenzitě rozptýl. světla (např. 50 %)

↘ Derivace křivky

↘ Vyhodnocení počáteční rychlosti



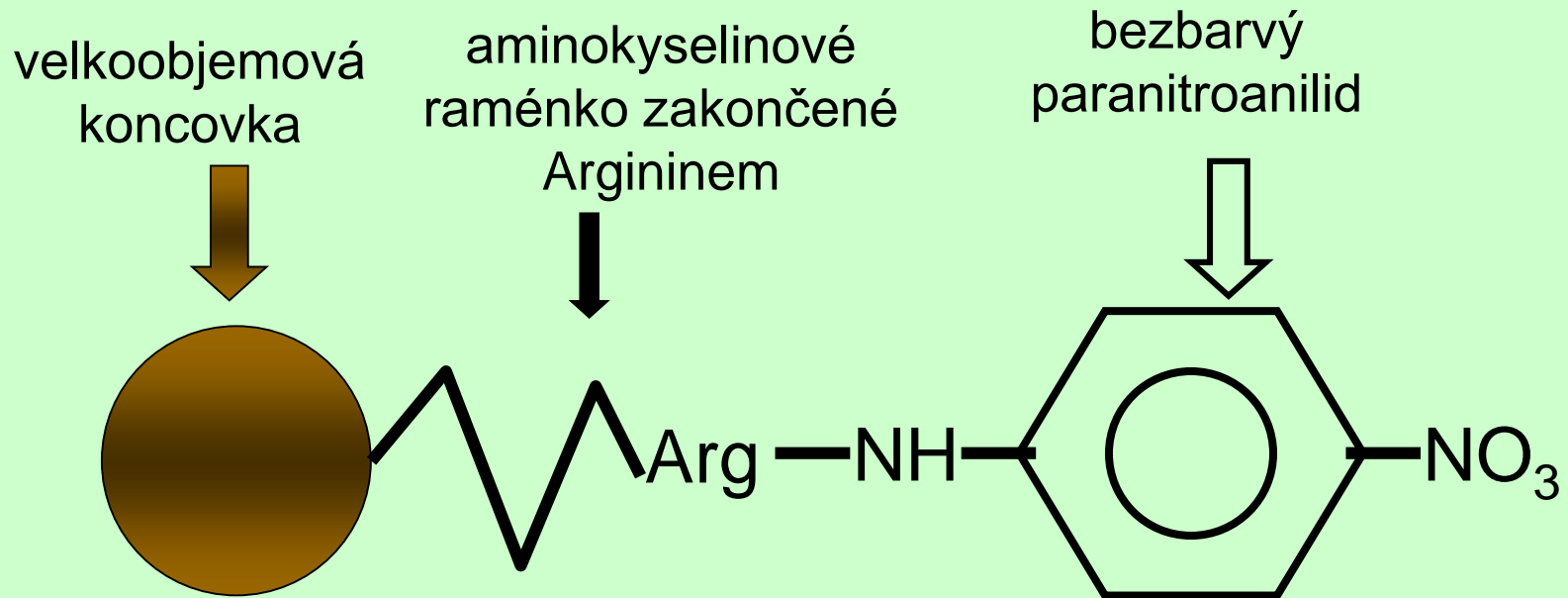
Dělení testů dle principu

- **Chromogenní - kolorimetrické**
 - 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
- **Optické -zákalové** (jiné než koagulační, imunochemické)
 - sledování změn zakalení
 - detekce změn transmise (propustnosti T)
 - detekce změn absorbance (A)
 - limitace- chylózní vzorky

Chromogenní testy

→ Chromogenní substrát

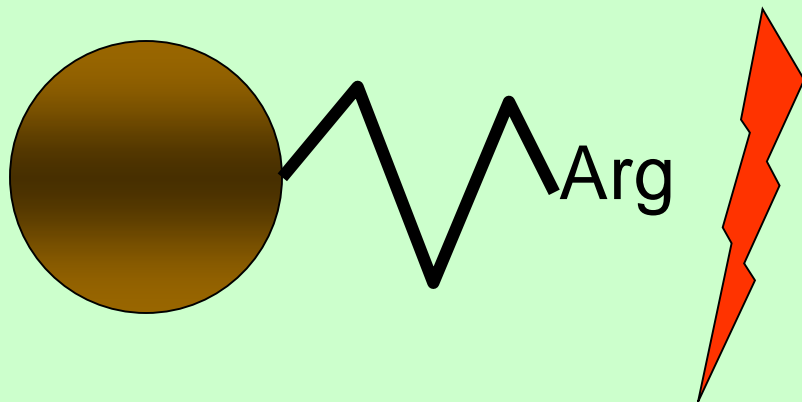
↘ uměle připravený



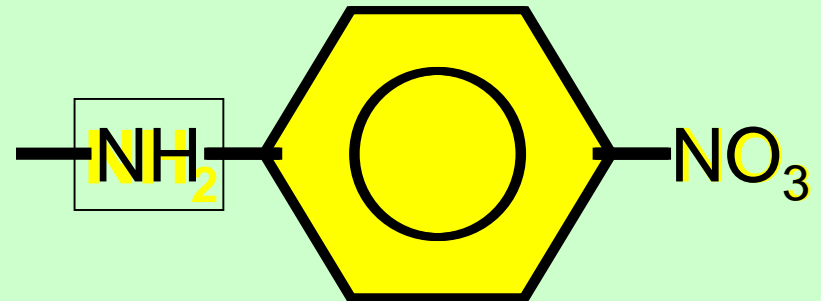
Chromogenní testy

→ Princip

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



paranitroanilin



Dělení testů dle principu

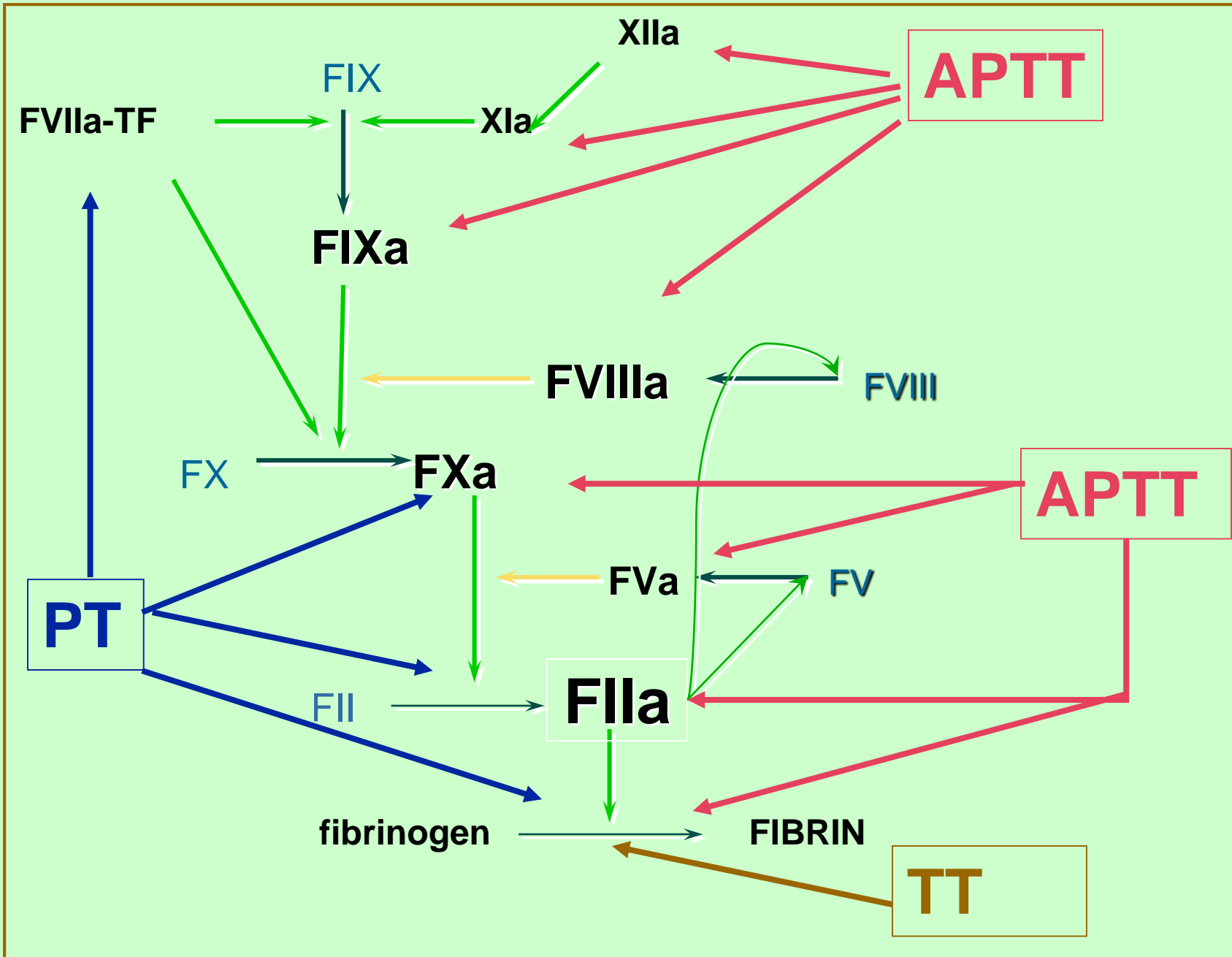
- **Imunochemické**
 - sledování reakce antigenu (Ag) s protilátkou (PL)
 - **Aglutinace** (latexaglutinační, hemaglutinační)
 - makroskopický odečet, semikvantitativní výsledek, např. D-Di, FM
 - **LIA** (Liquid immuno assay)
 - optické vyhodnocení $\Delta A/\text{min}$, kvantitativní výsledek, např. VWF:Ag..
 - **ELISA** (Enzym linked imunosorbent assay)
 - pomocí protilátky značené enzymem, kvantitativní výsledek

Vyšetření plazmatických proteinů

- **Vyšetření funkční aktivity**
 - koagulační metody
 - fotometrické metody
- **Vyšetření antigenu**
 - imunochemické metody
- **Odlišení defektů**
 - kvalitativních
 - kvantitativních

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



Protrombinový test - PT

- tromboplastinový test dle Quicka
- **monitoruje zevní koagulační systém** - FF VII, X, II, V a fibrinogen
- **sledování času tvorby fibrinu po přidavku Ca^{2+} tromboplastinu (TF, PL, Ca^{2+}) k vyšetřované plazmě**

Aktivace kontaktem

XII, PK HMWK

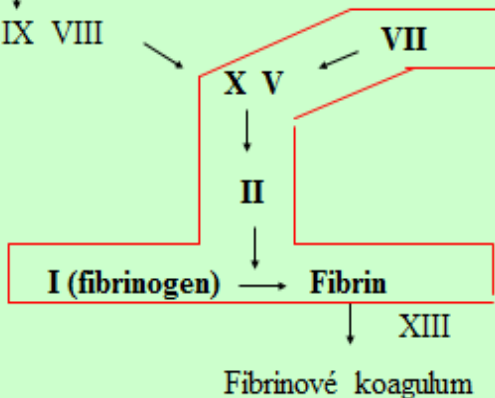


XI



IX VIII

Tkáňový tromboplastin + Ca^{2+}



Fibrinové koagulum

Vyjadřování výsledků PT

- koagulační čas v sekundách (čas normálu)
- poměr $R = \text{čas vyš. plazmy} / \text{čas normálu}$
- $INR = R^{ISI}$ (mezinárodní normalizovaný poměr)
 - pouze při léčbě kumariny (Warfarin)
 - ISI = mezinárodní index citlivosti
 - citlivost daného tromboplastinu stanovena vůči mezinárodnímu standartnímu tromboplastinu
 - hodnota ISI stanovena pro každou šarži reagentie výrobcem reagentie – měla by být $ISI < 1,5$
 - INR standartizace testu a porovnatelnost výsledků
- % koagulační aktivity odečtením z kalibrační křivky

Protrombinový test

Indikace PT

- základní koagulační test
- předoperační vyšetření
- krvácivý stav
- léčba kumariny
- podezření na patol. inhibitor

Referenční rozmezí

- 11 -17s, liší se dle reagentie
- poměr R = 0,8 – 1,2
- 70 – 120 %

Terapeutický rozsah

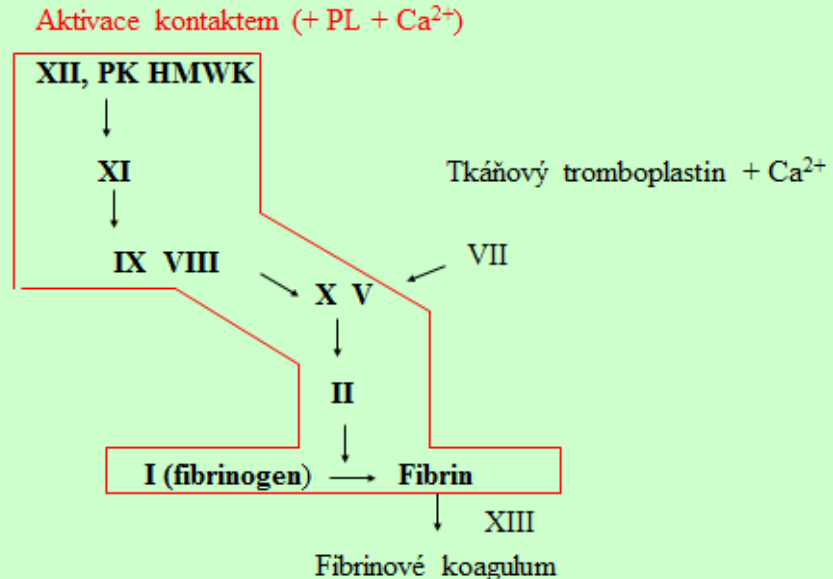
- INR = 2,0 – 4,0 (dle klinické indikace)

Klinický význam prodloužení času

- defekt faktorů vnějšího systému
 - vrozený a získaný
- patologický inhibitor
 - specifický, nespecifický -LA
- nedostatek vit. K
- kumariny
- heparin
 - dle typu a dávky, citlivosti reagentie
- FDP
- novorozenec

Aktivovaný parciální tromboplastinový test - APTT

- **monitoruje vnitřní koagulační systém** – PK, HMWK, FF XII, XI, IX, VIII ale i II, V, X a fibrinogen
- **sledování času tvorby fibrinu po přidavku aktivátoru , parciálního tromboplastinu** (kefalin = fosfolipidy) a Ca^{2+} (CaCl_2) k vyšetřované plazmě
- **vyjadřování výsledků** - koagulační čas (s) / poměr R



Aktivovaný parciální tromboplastinový test

Indikace APTT

- základní koagulační test
- předoperační vyšetření
- krvácivý stav
- léčba heparinem (UFH)
- podezření na patol. inhibitor

Referenční rozmezí

- 28 -40s, liší se dle reagentie
- poměr R = 0,8 – 1,2

Terapeutický rozsah

- R = 1,5 – 3,0
- R = 2,0 – 4,5 (dle citl. reag.)

Klinický význam prodloužení času

- defekt faktorů vnitřního systému
 - vrozený a získaný
- patologický inhibitor
 - specifický, nespecifický -LA
- von Willebrandova choroba
- heparin (UFH)
- kumariny
- FDP
- novorozenec
- arteficiálně (odběr, zpracování)

Trombinový test - TT

- **monitoruje třetí fázi koagulace** – vyšetření poruch přeměny fibrinogenu na fibrin –
- **sledování času tvorby fibrinu po přidavku trombinu (nízká koncentrace) k neředěné** vyšetřované plazmě
- **vyjadřování výsledků** - koagulační **čas (s)** / poměr R

Aktivace kontaktem

XII, PK HMWK



XI



IX VIII



X V



VII



II



I (fibrinogen) → Fibrin



XIII

Fibrinové koagulum

Tkáňový tromboplastin + Ca²⁺

Klinický význam – TT **prodloužení časů**

- hypo-, afibrinogenémie
- dysfibrinogenémie
- heparin
- FDP
- jiné patologické inhibitory (myelom, revmatoidní artritida)
- novorozenec
- **Reptilázový test** – test s trombinu podobným enzymem
 - není ovlivněn heparinem

Fibrinogen (Fbg)

- základní koagulační test
- metody stanovení fibrinogenu
 - funkční - vyšetření schopnosti přeměny na fibrin (metoda dle Clause)
 - sledování času tvorby fibrinu po přidavku nadbytku trombinu k ředěné vyšetřované plazmě
 - vyšetření množství (imunochem. LIA, ELISA)
- Vyjádřování výsledků - v g/l (odečet z kalibrační křivky)
- Referenční rozmezí – 1,8 – 4,2 g/l

Fibrinogen

▪ Klinický význam snížení

- vrozené hypo-, afibrinogenémie
- těžké poruchy jater (syntéza)
- zvýšená spotřeba
- zvýšené ztráty
- trombolytická léčba
- dysfibrinogenémie

▪ Klinický význam zvýšení

- těhotenství
- záněť
- nádorová onemocnění
- stavy po operaci, zpracování)

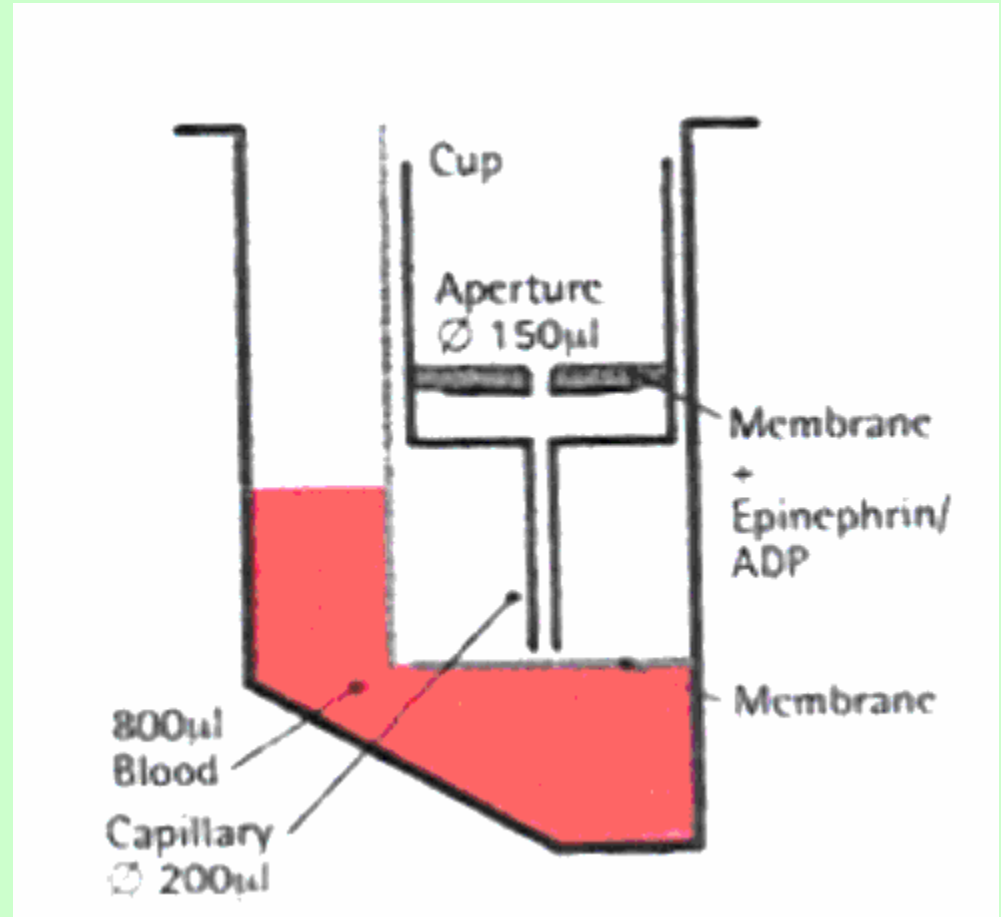
Diagnostika krvácivých stavů

- **Screening**
 - poruch primární hemostázy a vWF
 - v systému koagulačních faktorů
 - v systému fibrinolýzy
- **Speciální testy**
 - primární hemostáza
 - vWF
 - systém koagulačních faktorů
 - systém fibrinolýzy

Testy primární hemostázy

- počet trombocytů (+ morfologie)
- doba krvácení (Duke, Ivy)
- PFA
 - kvantitativní měření primární hemostázy v plné citrátové krvi - čas potřebný ke kompletnímu uzávěru membrány potažené Col/Epi nebo Col/ADP
- agregace trombocytů (indukovaná , samovolná)
 - turbidimetrická nebo impedanční metoda
- retrakce koagula
 - schopnost smršťovat krevní/plazmatické koagulum

Vyšetření PFA



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**

Testy systému koagulačních faktorů

- **Základní koagulační testy**
- **Korekční testy** sledování korekce (zkrácení) APTT/PT po přidavku normální plazmy NP (**směs 1:1**)
 - prodloužení se **koriguje** - defekt faktorů
 - **vyšetření funkční aktivity faktorů**
 - jednofázovou koagulační metodou na principu APTT/PT
 - dvoufázovou fotometrickou metodou
 - prodloužení se **nekoriguje** - přítomnost inhibitoru
 - **vyšetření specifického inhibitoru**
 - **vyšetření nespecifického inhibitoru (LA)**
- **Faktor XIII** – funkční aktivita chromogenně

Testy fibrinolytického systému

- **Rutinní testy**
 - **euglobulinová lýza** (↓, globální test, měří se čas rozpuštění koagula)
 - **D-Dimery** (specifické štěpné produkty fibrinu, marker aktivace koagulace i fibrinolýzy, ↑, rutinní test, imunochemicky µg/l)
- **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)
- **Molekulární markery** (ELISA)
 - komplex PAP

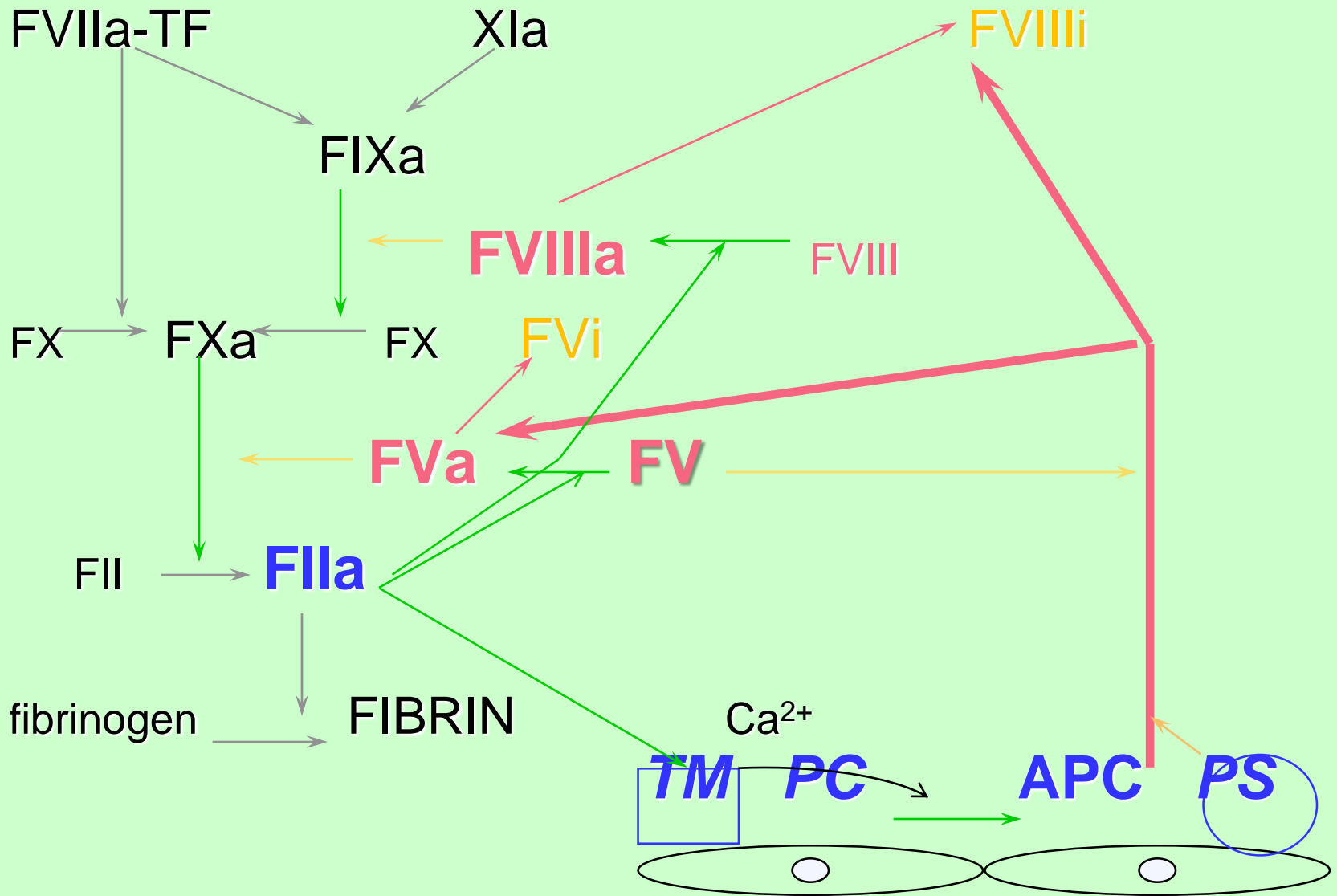
Trombofilní markery

- Defekty systémů
 - přirozených inhibitorů krevního srážení
 - koagulačních faktorů (↑FVIII, dysproteinémie)
 - fibrinolýzy
 - trombocytů
- Přítomnost protilátek
 - Nespecifických (LA)
- Trombofilní mutace
 - FV Leiden G1691A
 - Protrombinu G201210A

Přirozené inhibitory

- **Antitrombin** (rutinní test, aktivita chromogenně)
 - inhibitor serinových proteáz FF IIa, Xa...
- **Systém PC/PS (ProC Global)** — inaktivace FF Va, VIIIa
 - **Protein C** (aktivita koagulačně/chromogenně)
 - **Protein S** (aktivita koagulačně)
 - **APC-rezistence** (koagulačně)
- Klinický význam snížení aktivity AT, PC, PS
- Vyšetření antigenu u vrozených defektů

System proteinu C XIIIa



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

Monitorování léčby

- Antikoagulační léčba
 - kumariny - PT (INR)
- Antitrombotická
 - UFH - APTT (R)
 - LMWH - anti Xa (chromogenní)
 - DOAC - antiXa, antilla (chromogenní/koagulační)
- Antiagregační
 - agregace
 - PFA