



Speciální koagulační vyšetření II

Přirozené inhibitory

 Antitrombin

 Systém PC/PS (ProC Global)

 Protein C

 Protein S

 APC-rezistence


Antitrombin

Vyšetření funkční aktivity

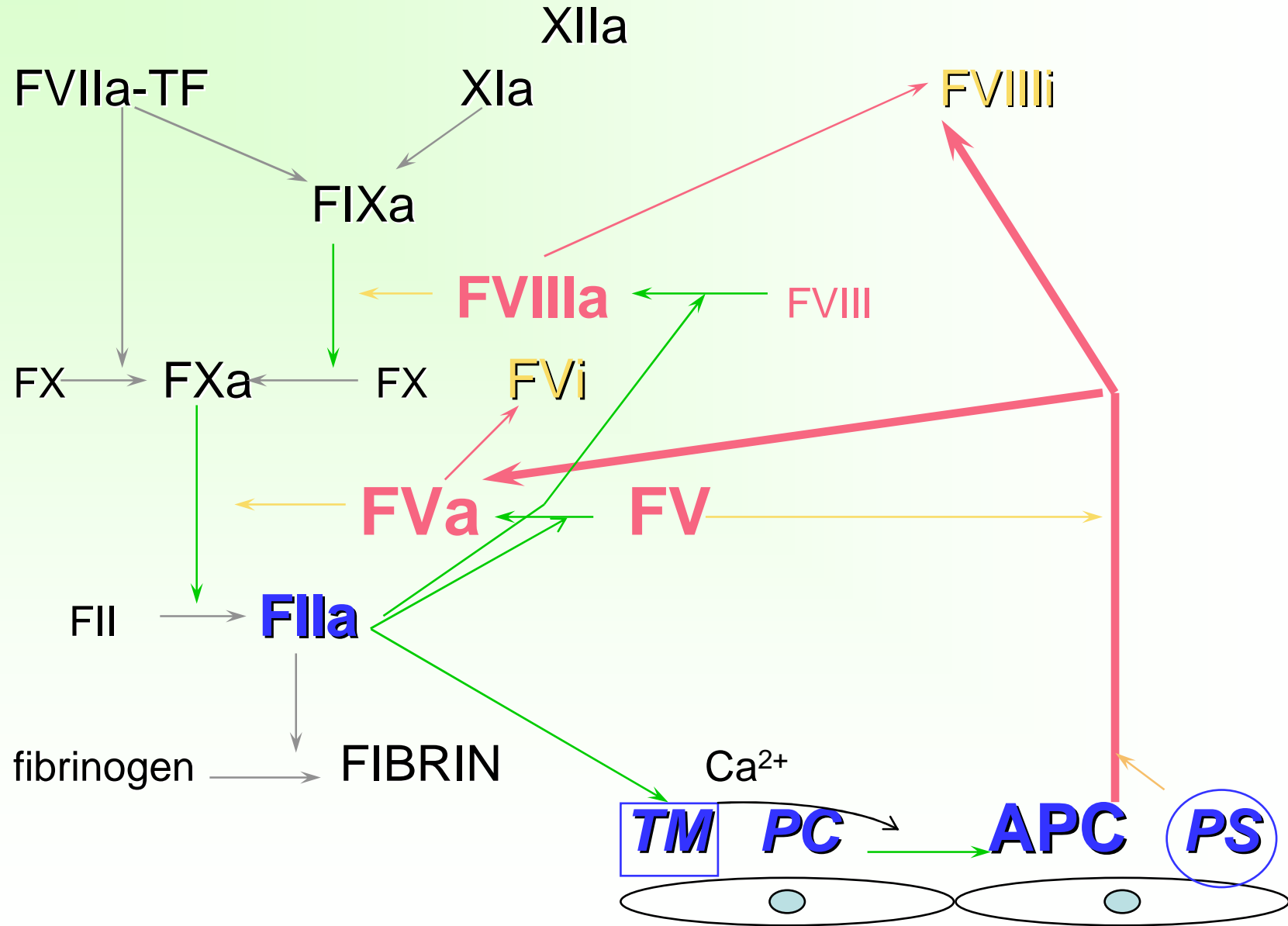
 fotometricky (IIa, Xa)

Vyšetření antigenu

 u vrozených defektů


 EID, ELISA


System proteinu C



Protein C


Vyšetření funkční aktivity

-  koagulační metody

-  fotometrické

Klinický význam - snížení

Normální hodnoty

-  70 - 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)

↪ Popsána v r. 1993 Dahlbäckem

↪ Příčinou vrozené APC-R je ve většině případů Leidenská mutace faktoru V (FVL) - Bertina 1994

Rezistence na aktivovaný PC

↪ Příčiny získané APC-R mohou být

↪ zvýšení aktivity faktoru VIII

↪ lupus antikoagulant


↪ těhotenství, hormonální substituce (včetně HAK)


↪ antikoagulační léčba


↪ významné defekty proteinu C a S

↪ nesprávné zpracování vyšetřované plazmy

Možnosti vyšetření APC - rezistence

 Vyšetření fenotypu

 koagulačními metodami

 Vyšetření genotypu

 molekulárně genetické stanovení FVL

Koagulační vyšetření APC - R

↪ Vyšetření prodloužení koagulačních časů po přidavku APC

↪ vyšetření dvou koagulačních časů na principu aPTT nebo RVVT

✓ s přidavkem a bez přidavku APC

✓ (+ korekce FV deficitní plazmou)

↪ vyšetření jednoho koagulačního času s využitím jiných aktivátorů (hadí jedy)

✓ s přidavkem APC, F V deficitní plazmy

APC-R (APTT, RVVT)

↳ umožňují průkaz vrozené i získané APC-R

↳ Vyjádření výsledku

↳ poměr R

$$R = \frac{t \text{ (s APC)}}{t \text{ (bez APC)}} \quad (\text{norma např. } > 2,0)$$

↳ normalizovaný poměr nR

$$nR = \frac{R \text{ vzorku}}{R \text{ normálu}}$$

↳ Koagulační stanovení ovlivněné celou řadou faktorů

APC-R (APTT,RVVT)

diluce F V deficitní plazmou

↪ V poměru 1:5

(1 díl vyš. plazmy+4 díly F V def. plazmy)

↪ Citlivost testu pouze k vrozeným nebo získaným defektům F V

↪ Diluce a vyjadřování výsledku v nR zajišťuje téměř 100% citlivost pro F V Leiden

APC-R (jiné aktivátory, jeden koagulační čas)

- ↪ využívají hadí jedy (např. *Crotalus viridis* Helli, který je přímým specifickým aktivátorem faktoru X)
- ↪ výsledek je vyjadřován pouze jako koagulační čas
- ↪ normální hodnoty: časy > cut off (např. 120 s)
- ↪ test je citlivý pouze k F V Leiden a event. jiným vrozeným, případně získaným defektům faktoru V
- ↪ test není ovlivněn
 - ↪ antikoagulační léčbou,
 - ↪ defekty proteinu C/S,
 - ↪ přítomností LA, zvýšením F VIII

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 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

↪ PCAT

✓ aPTT v přítomnosti aktivátoru proteinu C

↪ PCAT0

✓ aPTT bez aktivátoru proteinu C

↪ Výsledek - normalizovaný poměr (NR)

↪ vztažení poměru časů R ke standardě

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

- ↪ Normální hodnoty NR > 0,8
- ↪ Předpokládá se, že snížení poměru je v závislosti na riziku trombózy
- ↪ v důsledku inhibitoru heparinu ve reagentii je test necitlivý na přítomnost heparinu < 0,8 j./ml v plazmě
- ↪ test je však ovlivněn kumariny

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

Diagnostika APC-R - závěr

Diagnostika APC-R musí zahrnovat

- ↪ Nejen mol. biologické vyšetření F V Leiden,
- ↪ Ale také vhodná koagulační vyšetření k průkazu získané APC-R a ostatních vrozených APC-R, které se dosud běžně nevyšetřují

Testy k diagnostice vWF

- ↪ doba krvácení
- ↪ PFA
- ↪ APTT
- ↪ F VIII:C (funkční aktivita)
- ↪ funkční aktivita vWF (vWF:RCo)
- ↪ antigen vWF (LIA, ELISA, EID)
- ↪ agregace po ristocetinu
- ↪ kolagen vazebná kapacita vWF
- ↪ F VIII vazebná kapacita vWF
- ↪ multimerní struktury vWF
- ↪ molekulární diagnostika

Ristocetin kofaktorová aktivita vWF

- ↪ vWF:RCo slouží k posouzení na tromboocytech vázaných funkcí vWF v primární hemostáze
- ↪ využívá schopnosti vWF shlukovat tromboocyty v přítomnosti antibiotika ristocetinu
 - ↪ detekce metodou
 - ✓ agregační
 - ✓ aglutinační
 - ✓ optickou na koagulometrech

Ristocetin kofaktorová aktivita vWF

↪ Použití komerčních setů (většinou)

↪ obsahující lyofilizované normální promyté trombocyty + ristocetin

Agregační metoda vWF:RCo

↪ Princip

↪ sledování změn transmise světla v agregační kyvetě, obsahující suspenzi trombocytů a ristocetinu, po přidavku bezdestičkové vyšetřované plazmy (zdroj VWF), registrované v podobě agregační křivky

↪ Vyhodnocení

↪ maximální změny transmise/min a odečtení hladiny VWF:RCo z kalibrační křivky (lin/log závislost)

↪ Vyjádření výsledků

↪ v % normálu

Agregační metoda vWF:RCo

↪ Destičkový agregační test využívající suspenzi zdravých promytých destiček v přítomnosti antibiotika ristocetinu a vWF pacienta v podobě plazmy chudé na destičky (PPP)

Aglutinační metoda vWF:RCo

↪ Princip

↪ sledování aglutinace v suspenzi trombocytů a ristocetinu po přidavku titrované bezdestičkové vyšetřované plazmy (zdroj VWF) na skleněné desce

↪ Vyhodnocení

↪ makroskopické odečtení posledního titru při kterém ještě nastává aglutinace, vynásobením titru udanou citlivostí

↪ Vyjádření výsledků

↪ v % normálu (semikvantitativně např. >16% a < 32%)

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

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

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 chromogenní 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 (↑)

↳ TAFI (↓)