

Speciální koagulační vyšetření I



Koagulační faktory

→ Vyšetření funkční aktivity

↘ jednofázová metoda na principu APTT

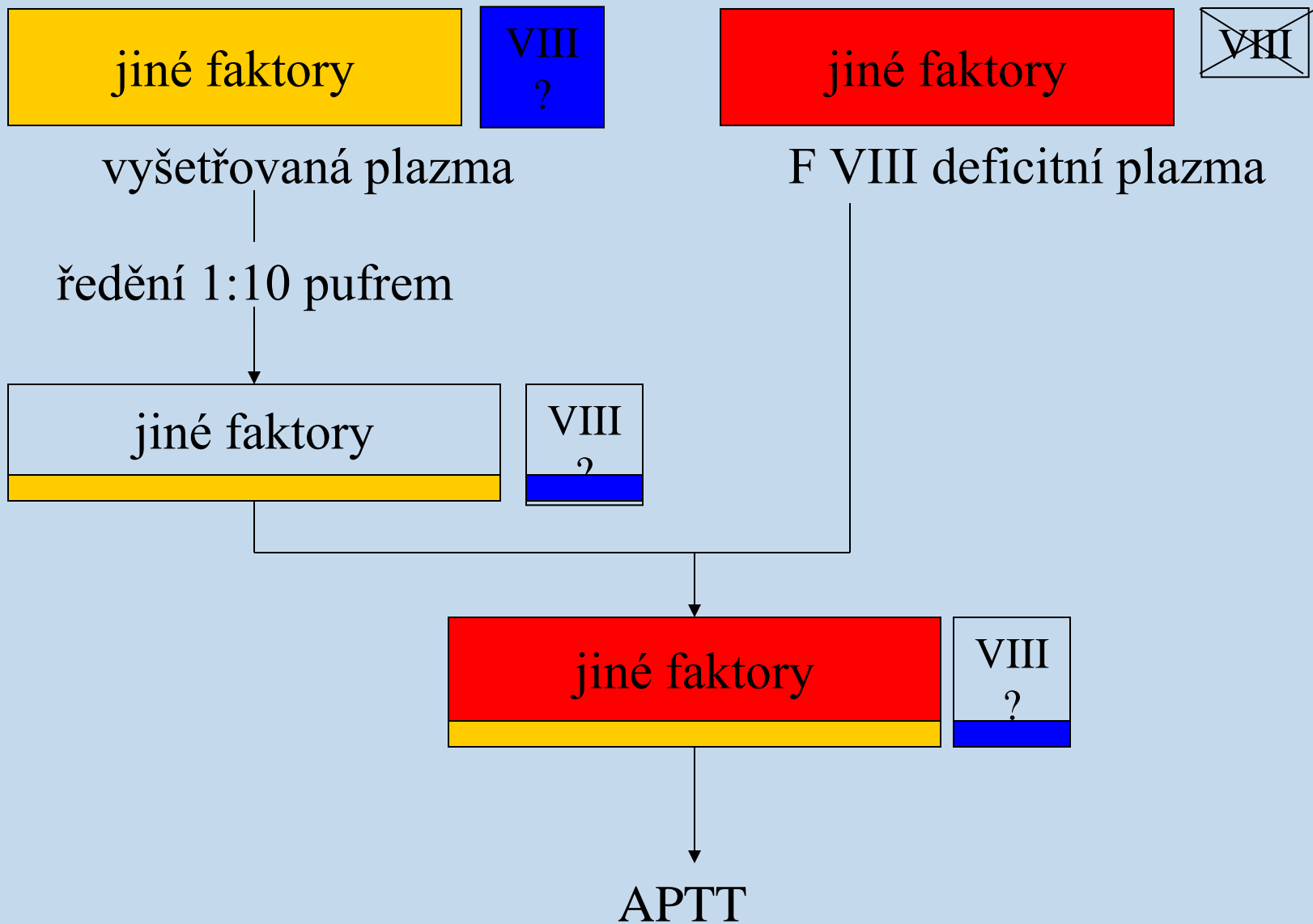
- FF VIII, IX, XI, XII, PK, HMWK

↘ jednofázová metoda na principu PT

- FF II, V, VII, X

→ Vyšetření antigenu

↘ EID, ELISA



koagulační čas závisí na aktivitě F VIII

Vyšetření funkční aktivity koagulačních faktorů

→ Postup:

1 díl ředěné vyšetřované plazmy

1 díl neředěné deficitní plazmy

→ FF vnitřního systému

1 díl APTT reagencie, inkubace

1 díl CaCl_2

→ FF vnějšího systému

inkubace, 2 díly Ca^{2+} -tromboplastinu

→ stanovení koagulačního času APTT/PT

→ odečtení % z kalibrační křivky

Koagulační faktory - kalibrace

→ Kalibrační materiál

→ komerční

→ Vyšetření

→ různých ředění výchozí kalibrační plazmy s udanou hladinou FF: 100%, 50 %, 25 %, 12,5% ,
(pro F VIII, IX 6,25 %, ...)

→ Kalibrace čtyř...více bodová

→ Závislost log/log (lin/log)

→ Klinický význam - zejména ↓ FF , ↑ F VIII

Defekty faktorů

→ Vrozený

- ↘ hemofílie A, hemofílie B, defekt FF XII, XI, PK, HMWK, vWF, defekt FF II, V, VII, X

→ Získaný

- ↘ snížená syntéza
- ↘ zvýšená spotřeba
- ↘ zvýšené ztráty

Snížení faktorů

- Snížení - mimo kalibrovanou oblast ($< 10\%$)
- Výchozí ředění vyšetřované plazmy 1 : 10
 - opakování vyšetření s nižším ředěním plazmy 1 : 5
 - odečtení a vydělení výsledku dilučním faktorem (:2)
- Kalibrační křivka Low
 - kalibrovaná oblast cca 1,0 – 25,0 %
 - výchozí ředění vyšetřované plazmy 1:5

Zvýšení F VIII

- Zvýšení $> 100 \%$
- Výchozí ředění vyšetřované plazmy 1 :10
 - ↘ opakovat vyšetření s vyšším ředěním plazmy 1 : 20
 - ↘ odečíst a vynásobit výsledek dilučním faktorem (x2)
- Pro F VIII $> 200 \%$
 - ↘ opakovat s ředěním 1:40
 - ↘ odečíst a vynásobit 4x
- Pro F VIII $> 400 \%$
 - ↘ opakovat s ředěním 1:80
 - ↘ odečíst a vynásobit 8x

FVIII -fotometrická metoda

- Tvorba enzymatického komplexu- tenázy
 - ↘ F VIIIa aktivovaný trombinem v přítomnosti konstantního množství F IXa, PL a Ca^{2+}
- která aktivuje F X dodávaný v konstantním nadbytku na F Xa
- Měření tvorby F Xa pomocí chromogenního substrátu

Korekční testy

- sledování korekce (zkrácení) APTT/PT po přidavku normální plazmy (**směs 1:1**)
- prodloužení se koriguje - defekt faktorů
- prodloužení se nekoriguje nebo jen částečně - přítomnost inhibitoru
 - ↘ specifického
 - ↘ nespecifického

Korekční test

→ korekce

Vzorek	APTT (s)
NP	35,0
1NP + 1 PP	38,0
PP	75,0

Korekční test

→ není korekce

Vzorek	APTT (s)
NP	35,0
1NP + 1 PP	60,0
PP	65,0

Korekční test

→ jen částečná korekce

Vzorek	APTT (s)
NP	35,0
1NP + 1 PP	50,0
PP	65,0

Identifikace specifického inhibitoru

- screening (prodloužení APTT/PT)
- průkaz inhibitoru (cirkulující antikoagulans)
- průkaz specifity inhibitoru (vyšetření faktorů)
- kvantifikace inhibitoru (Bethesda metoda)



Identifikace specifického inhibitoru

Inhibitor namířený proti FF, časově závislý

Orientačně tzv. „**cirkulující antikoagulans**“

→ Vyšetření APTT/PT u vzorků plazmy pacienta, normálu a směsí PP+NP (**1+4, 1+1, 4+1**) před a po 2 hodinové inkubaci při 37 °C

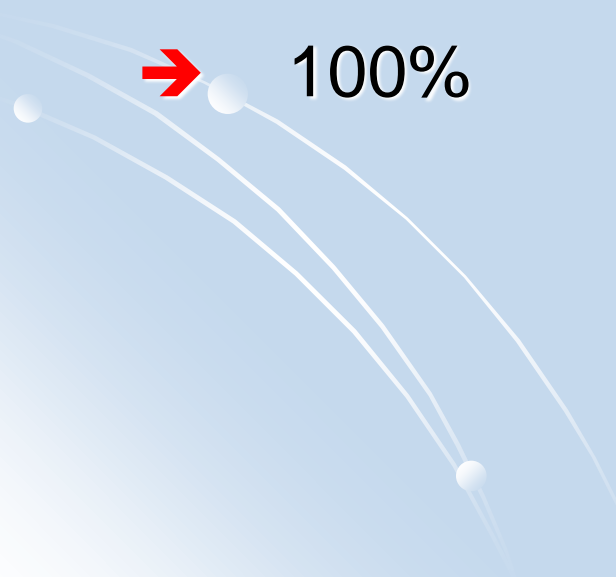
Cirkulující antikoagulans

vyhodnocení výsledků

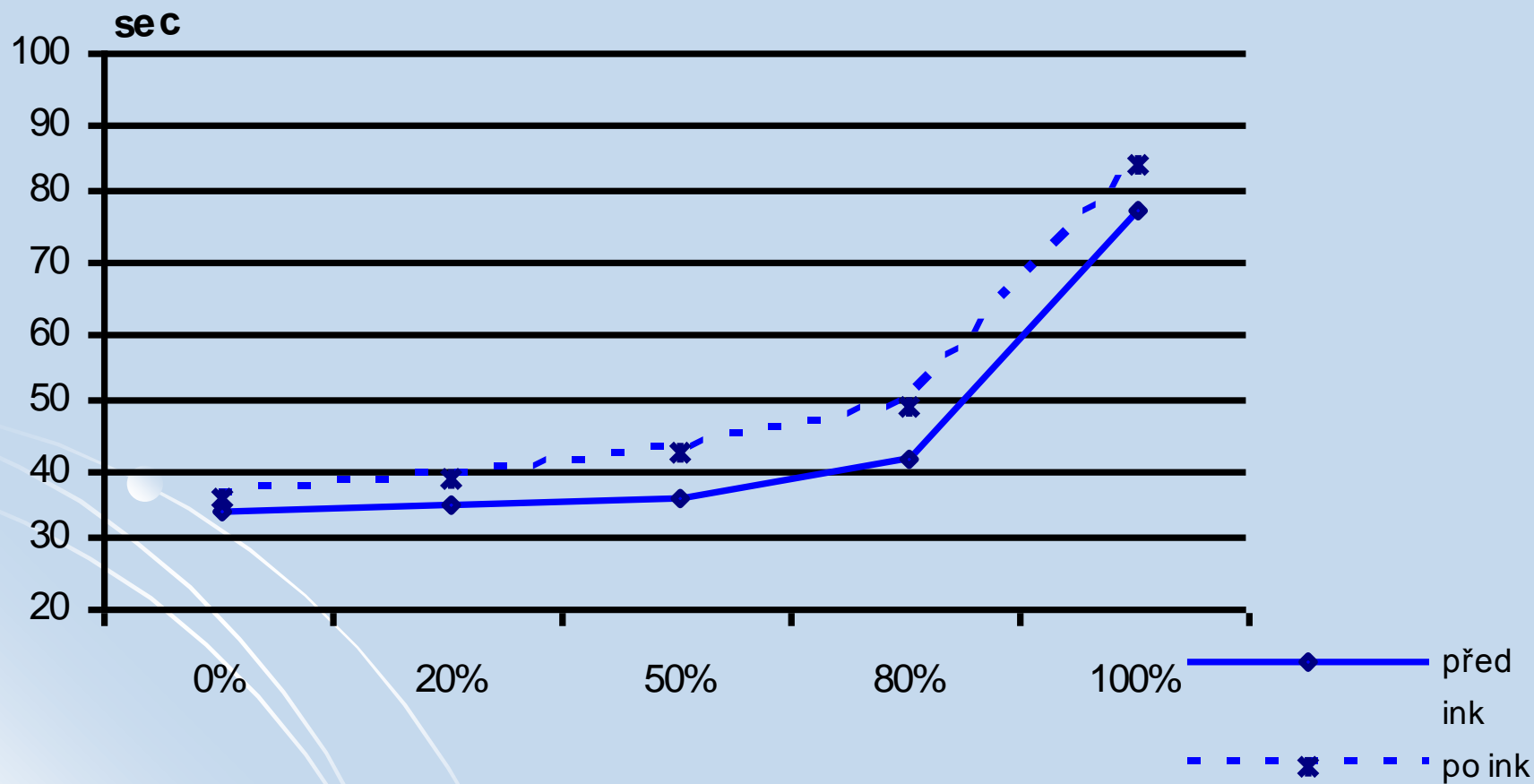
- Porovnání naměřených koagulačních časů jednotlivých směsí PP + NP s časy PP a NP
 - před inkubací
 - po inkubaci
- Průkaz inhibitoru
 - příměs 1/5 PP výrazně prodlužuje čas NP (směs 1+4)
 - silný inhibitor
 - není žádná/částečná korekce (směs 1+1)
 - příměs 1/5 NP nezpůsobí korekci časů PP pacienta (směs 4+1) - slabý inhibitor

Cirkulující antikoagulans

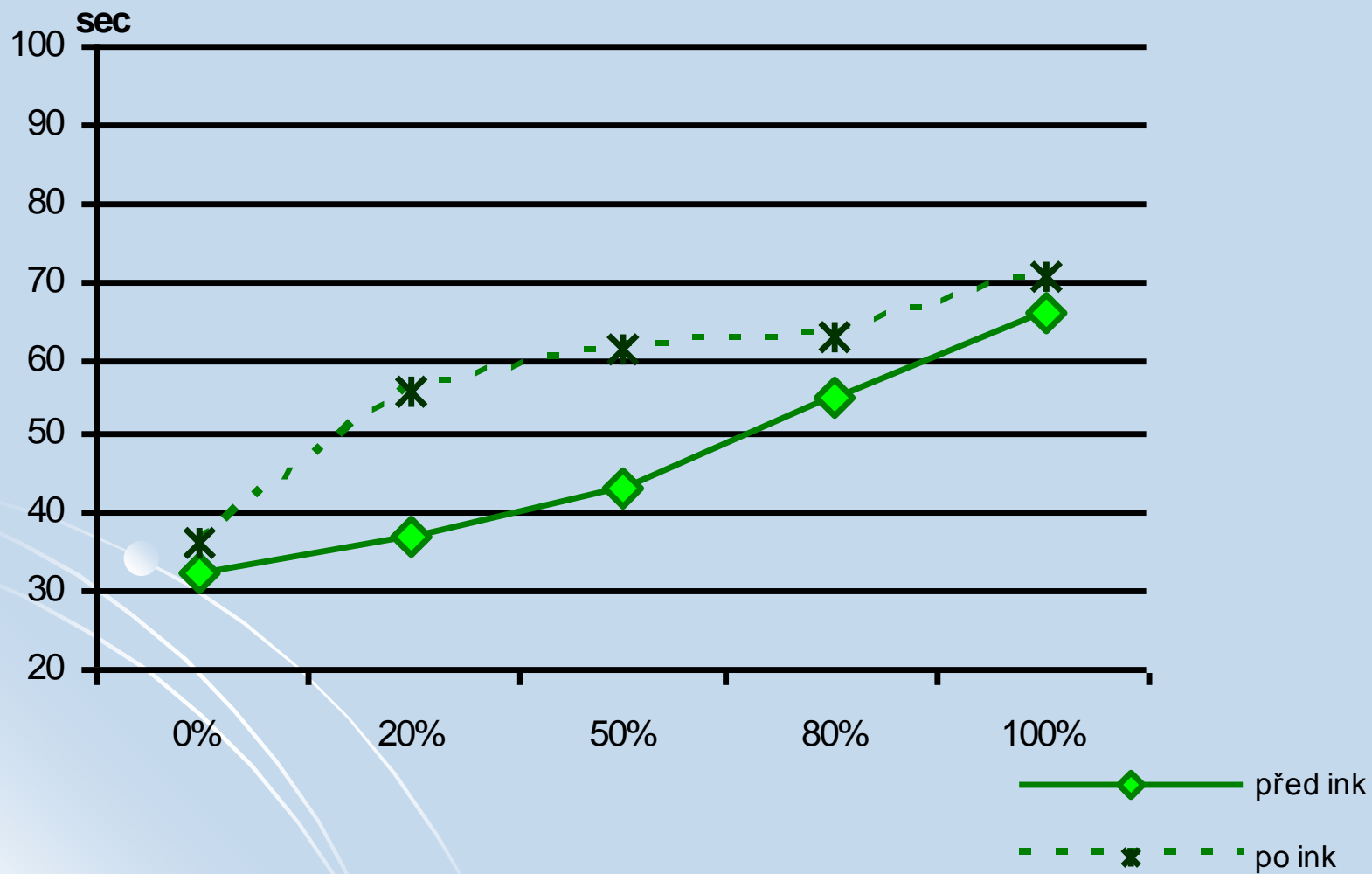
grafické znázornění

- 0% = NP
 - 20% = směs PP+NP 1+4
 - 50% = směs PP+NP 1+1
 - 80% = směs PP+NP 4+1
 - 100% = PP
- 

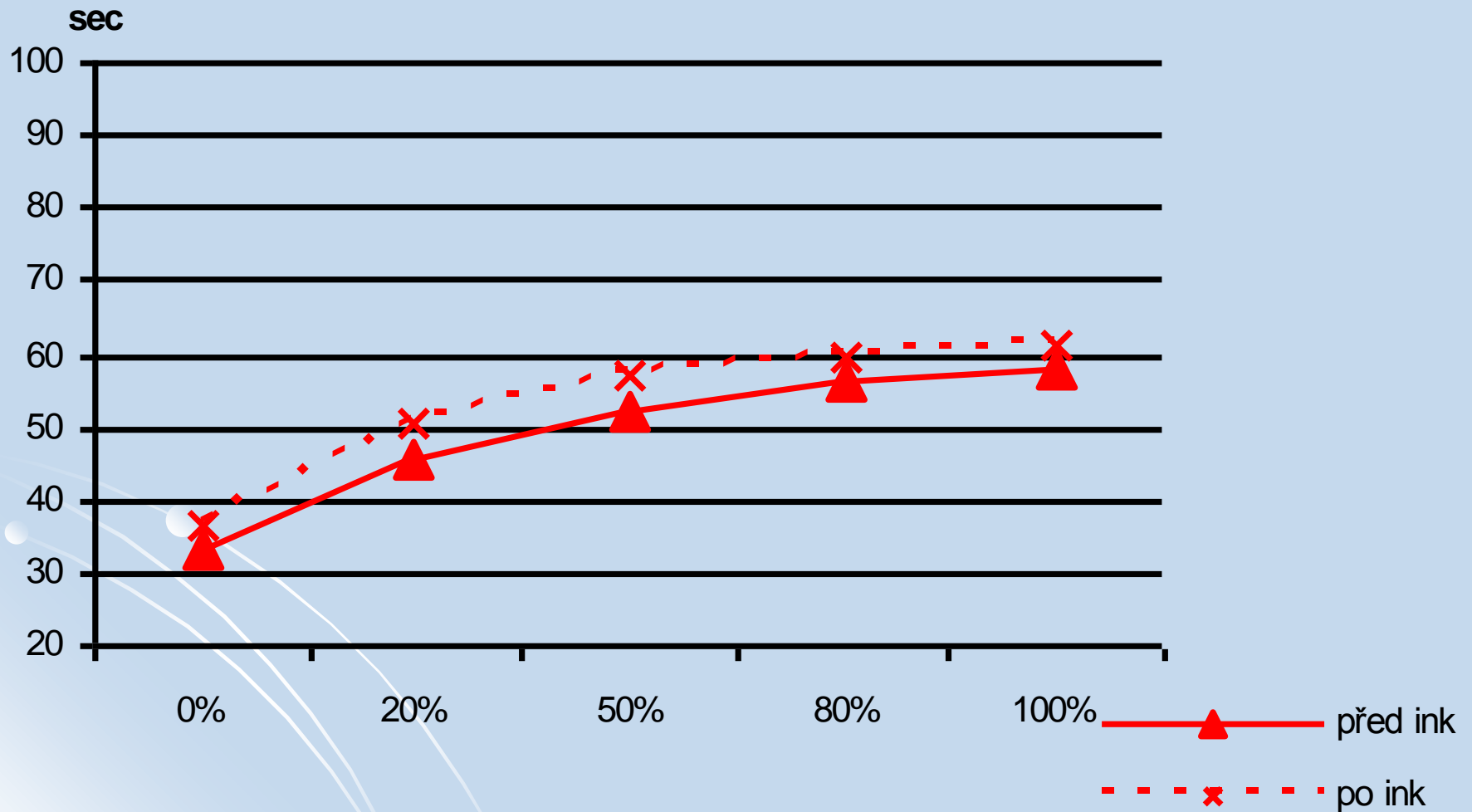
Cirkulující antikoagulans APTT - defekt faktorů




Cirkulující antikoagulans APTT - specifický inhibitor



Cirkulující antikoagulans APTT - lupus antikoagulans



Identifikace specifického inhibitoru

- Test „cirkulující antikoagulans“
 - orientační vyšetření, kterým pouze prokazujeme
 - ↘ přítomnost/ nepřítomnost inhibitoru
 - ↘ časovou závislost/ nezávislost inhibitoru
- 

Identifikace specifického inhibitoru

Kvantitativně **Bethesda metoda**

→ stanovení zbytkové aktivity faktoru po dvou hodinové inkubaci různých ředění pacientovy plazmy PP s normální plazmou NP (zdroj faktoru)

→ 1 Bethesda jednotka (B.U.)

množství inhibitoru, které během inkubace inaktivuje 50 % nabídnutého faktoru

→ přítomnost inhibitoru $\geq 0,6$ B.U.

Bethesda metoda - postup

- Titrace vyšetřované plazmy (neř, 1:2, 1:4, 1:8...)
a příprava směsí (1 díl PP a 1 díl NP)
- Příprava kontrolní směsi (1 díl pufru + 1 díl NP)
- Inkubace směsí PP a kontrolní 2 hod při 37 °C
- Vyšetření faktoru v směsích PP a kontrolní
- Výpočet zbytkové aktivity faktoru (A_{zb})
 - $= (\text{aktivita směsi PP} / \text{aktivita kontrolní směsi}) \times 100$
- Odečtení B.U. (graf závislosti A_{zb} na B.U.)

Příklad vyšetření inhibitoru Bethesda metoda

→ Kontrolní směs:	40%
→ neř.:	0%
→ 1:2	1%
→ 1:4	2%
→ 1:8	6%
→ 1:16	20%
→ 1:32	28%
→ 1:64	32%
→ 1:128	39%
→ 1:256	40%

Inhibitor 16 B.U.

→ Kontrolní směs:	60%
→ neř.:	0%
→ 1:2	0%
→ 1:4	0%
→ 1:8	7%
→ 1:16	22%
→ 1:32	38%
→ 1:64	51%
→ 1:128	54%
→ 1:256	59%

Inhibitor 21 B.U.

Příklad vyšetření inhibitoru

Bethesda metoda – pacient 1,2

→ Kontrolní směs: 48%

→ neř.: 40%

→ 1:2 43%

→ 1:4 44%

→ 1:8 45%

→ 1:16 42%

→ 1:32 46%

→ 1:64 48%

→ 1:128 47%

→ 1:256 49%

Inhibitor 0,24 B.U. - nepřítomen

→ Kontrolní směs: 54%

→ neř.: 55%

→ 1:2 54%

→ 1:4 55%

→ 1:8 56%

→ 1:16 57%

→ 1:32 57%

→ 1:64 59%

→ 1:128 58%

→ 1:256 59%

Inhibitor nepřítomen

Identifikace LA dle SSCC ISTH

- průkaz prodloužení fosfolipid závislého testu (dAPTT, dRVVT) = screening
- průkaz inhibitoru (negativní korekční testy)
- průkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru (neutralizační testy)
- Použití **bezdestičkové plazmy** (PFP)
 - dvojnásobná centrifugace (ultracentrifugace)

Screeningové testy - LA

→ dAPTT

- ↘ snížený obsah fosfolipidů

- ↘ vhodné zastoupení fosfolipidů

→ dRVVT (aktivuje F X v přítomnosti PL a Ca^{2+})

- ↘ snížený obsah fosfolipidů

- ↘ vhodné zastoupení fosfolipidů

Korekční testy - LA

- na principu testů, které ve screeningu prodloužené
 - ↘ $R > 1,2$
- vyšetření PP, NP a směsi PP a NP v poměru 1 : 1 bez inkubace (časově nezávislý inhibitor)

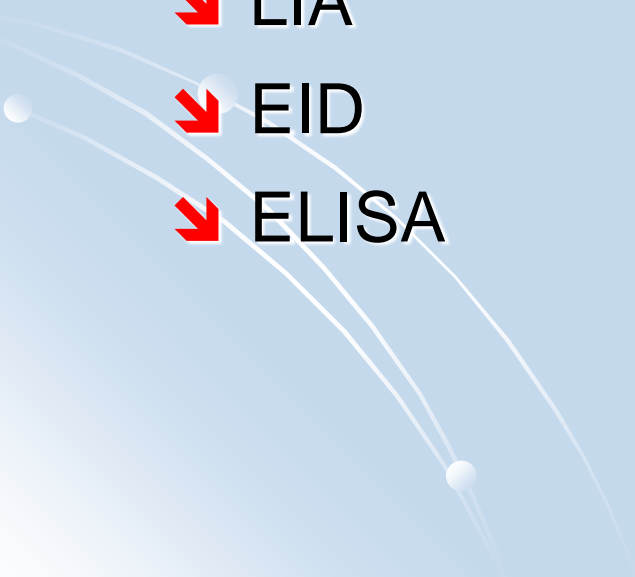


Průkaz fosfolipidové závislosti - LA


Testy se zvýšenou koncentrací fosfolipidů

- na principu testů, které ve screeningu prodloužené a nedošlo ke korekci
- vyhodnocení zkrácení koagulačních časů
 - ↘ v přítomnosti nadbytku fosfolipidů
 - reagencie s ↑PL (APTT i RVVT)
 - po přidavku nadbytku PL (APTT)
 - destičkových -test PNP (*Platelet Neutralisation Procedure*)
 - v hexagonální fázi - test HNP (*Hexagonal Neutralisation Procedure*)

Vyšetření faktoru XIII

- Stanovení funkční aktivity
 - ↘ sledování rozpustnosti koagula
 - ↘ fotometricky
 - Stanovení antigenu
 - ↘ LIA
 - ↘ EID
 - ↘ ELISA
- 

Testy primární hemostázy

- počet trombocytů (+ morfologie)
 - doba krvácení (Duke, Ivy)
 - PFA
 - agregace trombocytů
 - retrakce koagula
- 

Agregace trombocytů

→ Turbidimetrická metoda

↘ sledování změn průchodnosti světla (T) při tvorbě agregátů krevních destiček

→ Impedanční metoda

↘ sledování změn vodivosti vyvolaných tvorbou agregátů krevních destiček



Agregace trombocytů

- Agregace samovolná (spontánní)
- Agregace stimulovaná (indukovaná)
 - ↳ induktory ADP, kolagen, adrenalin, ristocetin
- primární agregace - vlivem vnějšího podnětu
- sekundární agregace - vlastní příspěvek trombo
- reversibilní agregace
- ireversibilní agregace

Agregace trombocytů

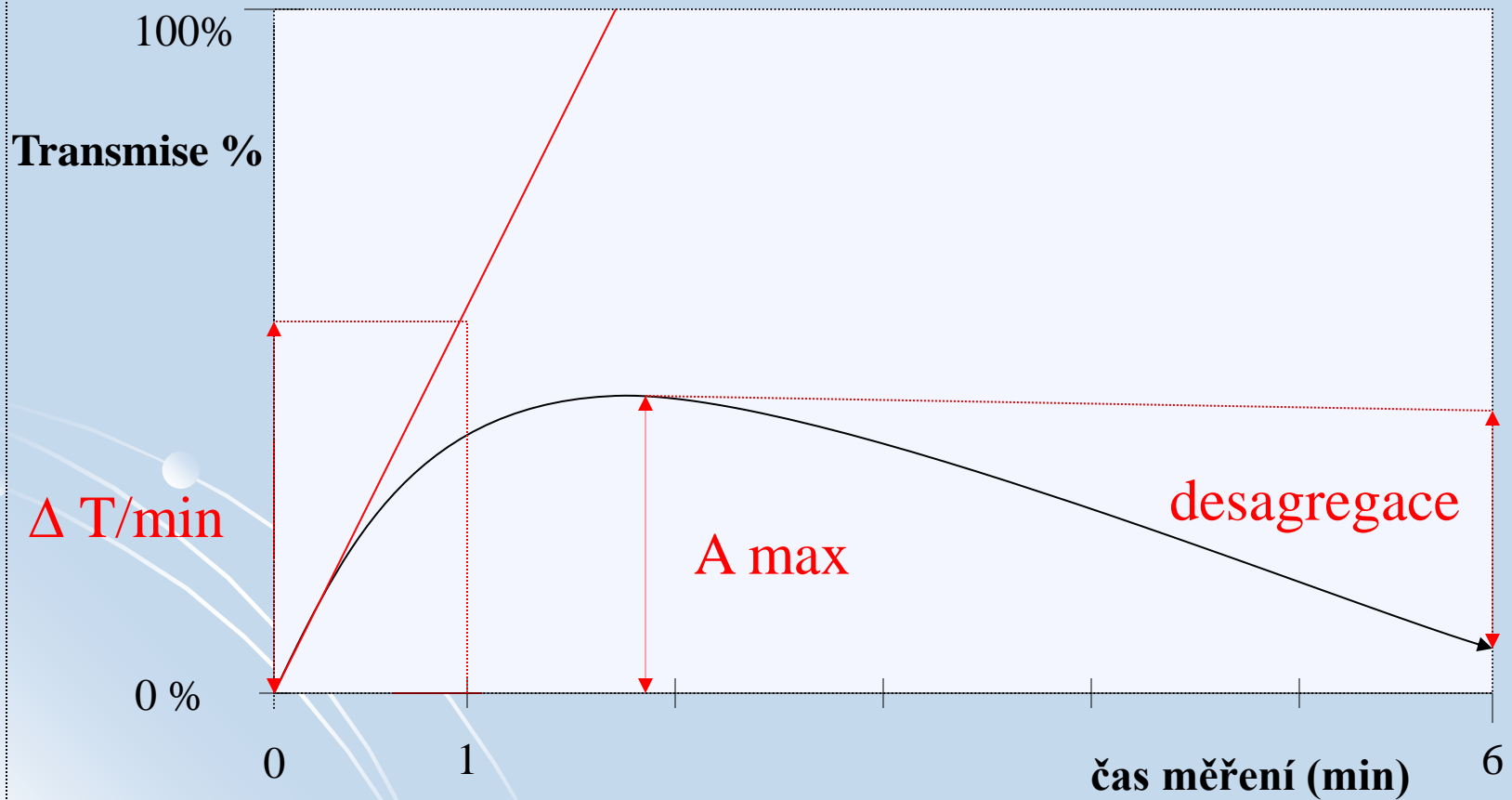
- Postup
- příprava PRP, PPP diferenciální centrifugací
- stanovení počtu trombocytů (event. ředění PRP)
 - ↘ PRP $250 - 300 \times 10^9$, PPP $< 20 \times 10^9$
- vyšetření agregace
 - ↘ vložení kyvety s PPP a PRP (rozdíl T = 100%)
 - ↘ sledování agregační odpovědi v PRP
 - samovolná 10 min
 - po přidavku induktoru 6 min
- vyhodnocení agregační křivky

Vyhodnocení agregační křivky

- Maximální amplituda A_{max} (%)
 - ↘ v maximu (reversibilní křivka)
 - ↘ v 6. minutě (ireversibilní křivka)
- Desagregace (%)
 - ↘ jen u ADP v případě reversibilní křivky
- Doba latence (s)
 - ↘ časová prodleva před agregační odpovědí
 - ↘ jen u kolagenu
- Strmost křivky = slope (%/min)

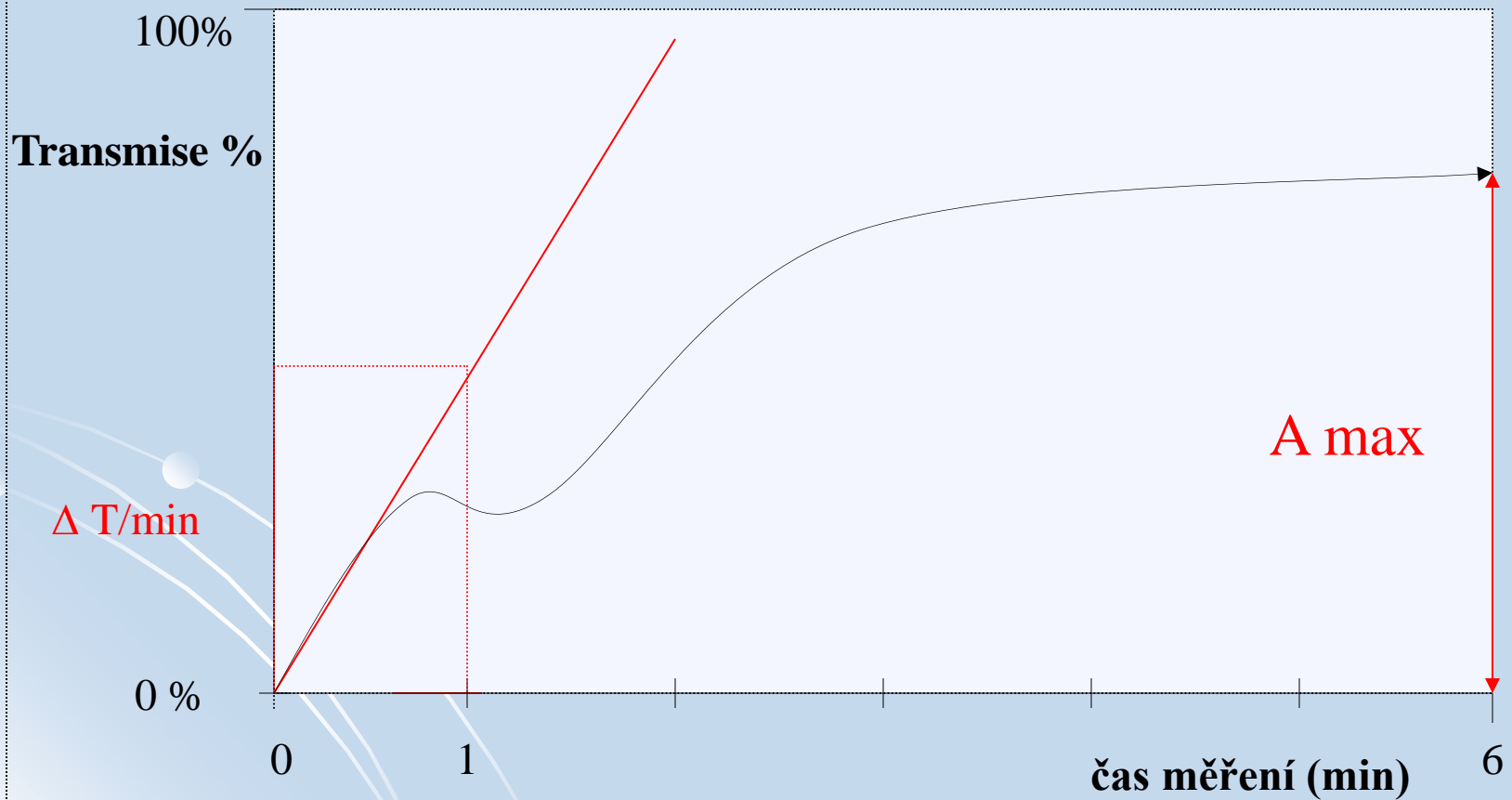
Agregační křivka

Agregace ADP 2,5



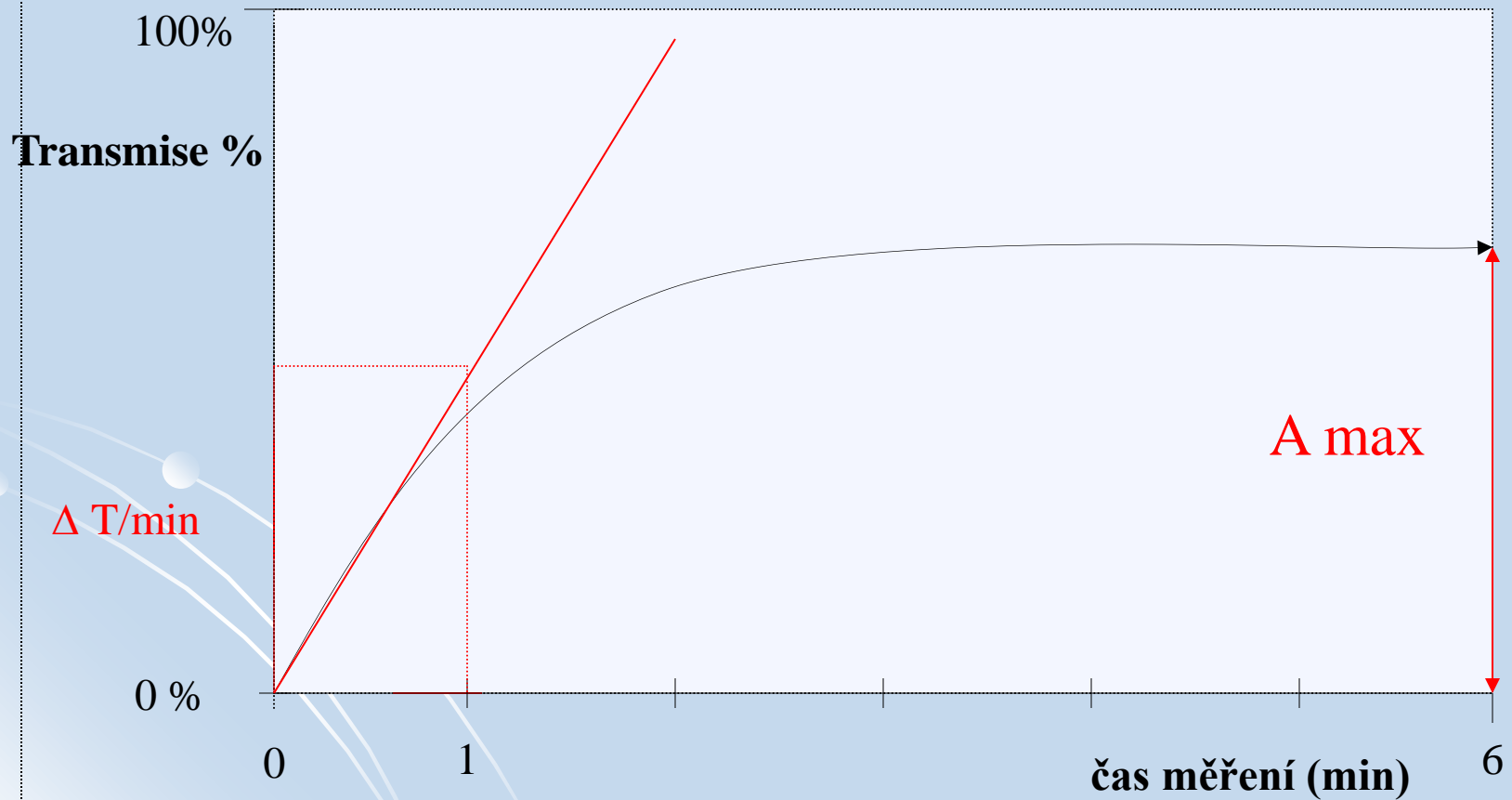
Agregační křivka

Agregace ADP 5



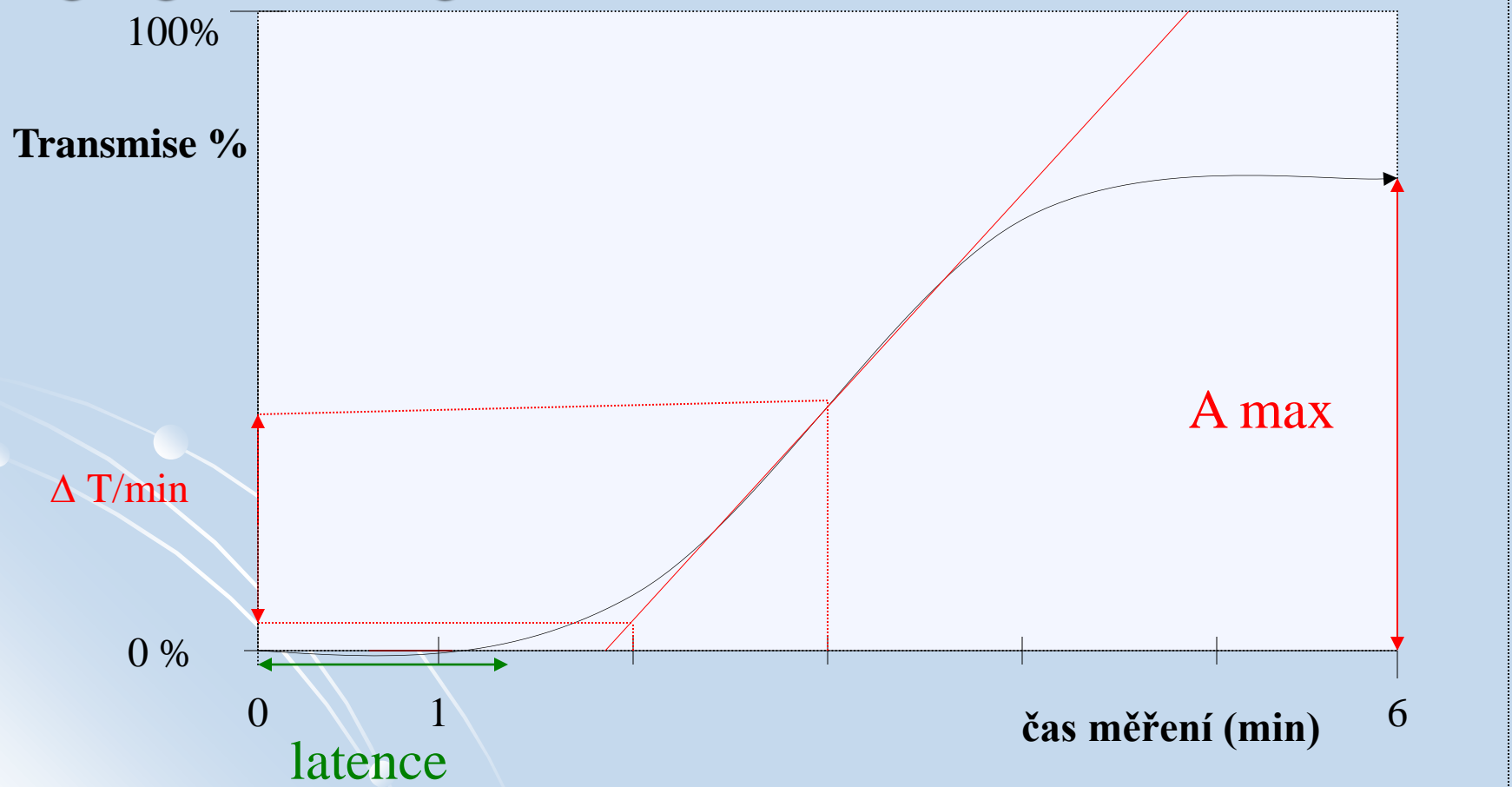
Agregační křivka

Agregace ADP 10



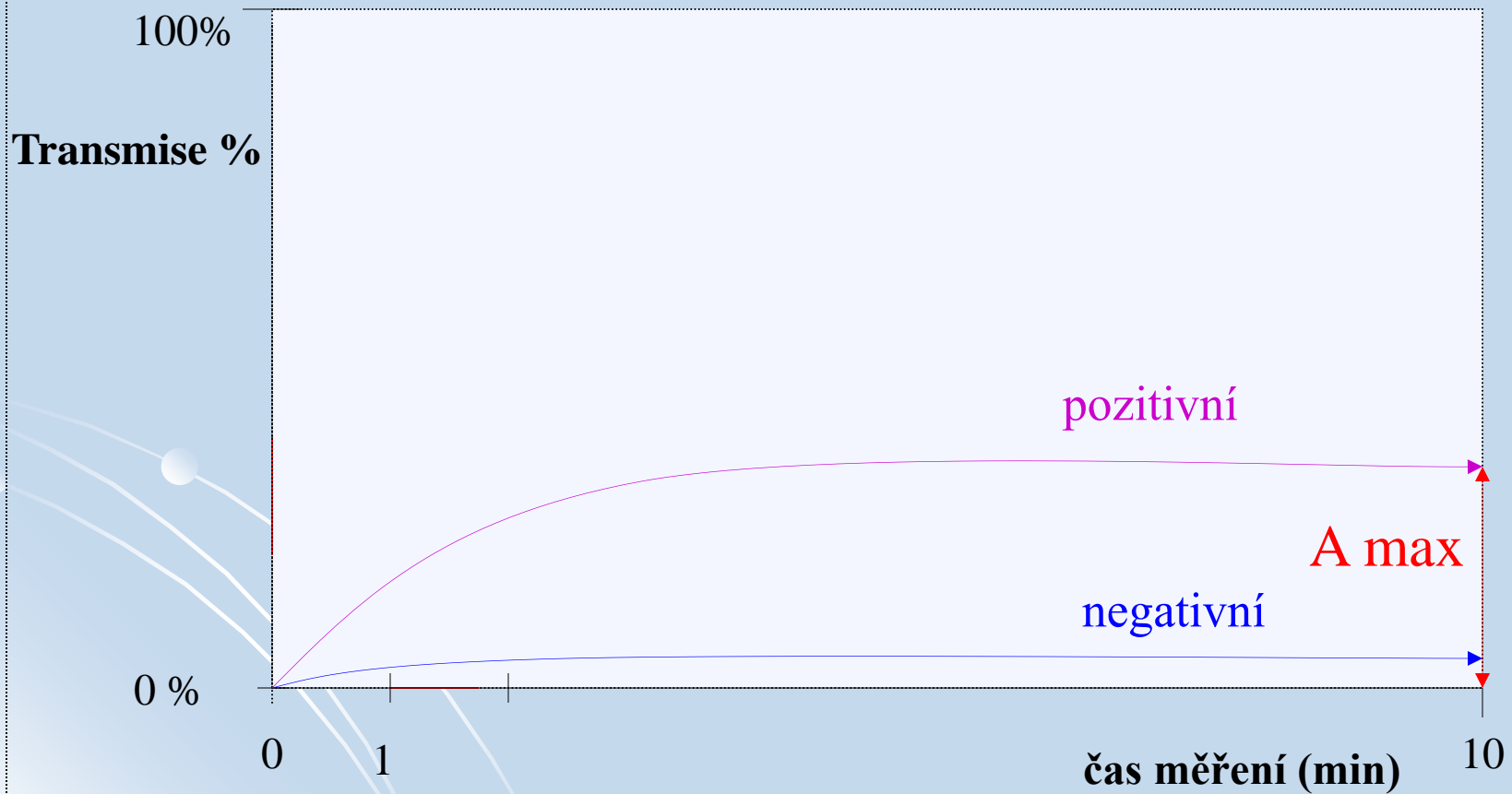
Agregační křivka

Agregace kolagen



Agregační křivka

Samovolná agregace



Retrakce

Schopnost trombocytů smršťovat krevní nebo plazmatické koagulum (metoda dle Bethause)

→ Postup

- získání PRP sedimentací
- ředění PRP + přídavek Ca^{2+} , Ca^{2+} -tromboplastin
- vytvoření plazmatického koagula v graduované zkumavce a oddělení koagula od stěn zkum.
- odečtení délky koagula po 3 hod
- odečtení % retrakce z tabulky