

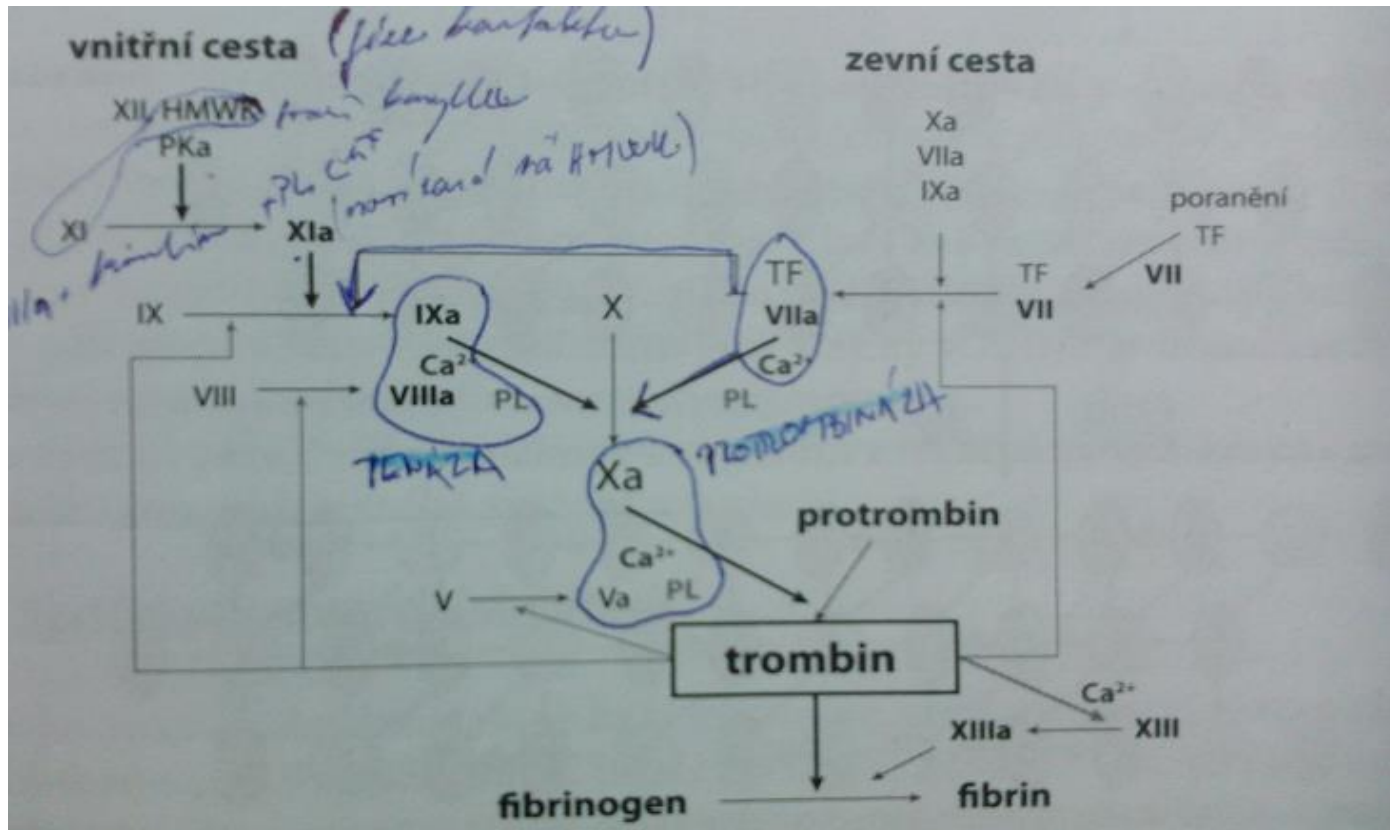


PRINCIPY HEMATOLOGICKÝCH METOD

Jindra Kučerová
Centrální laboratoře



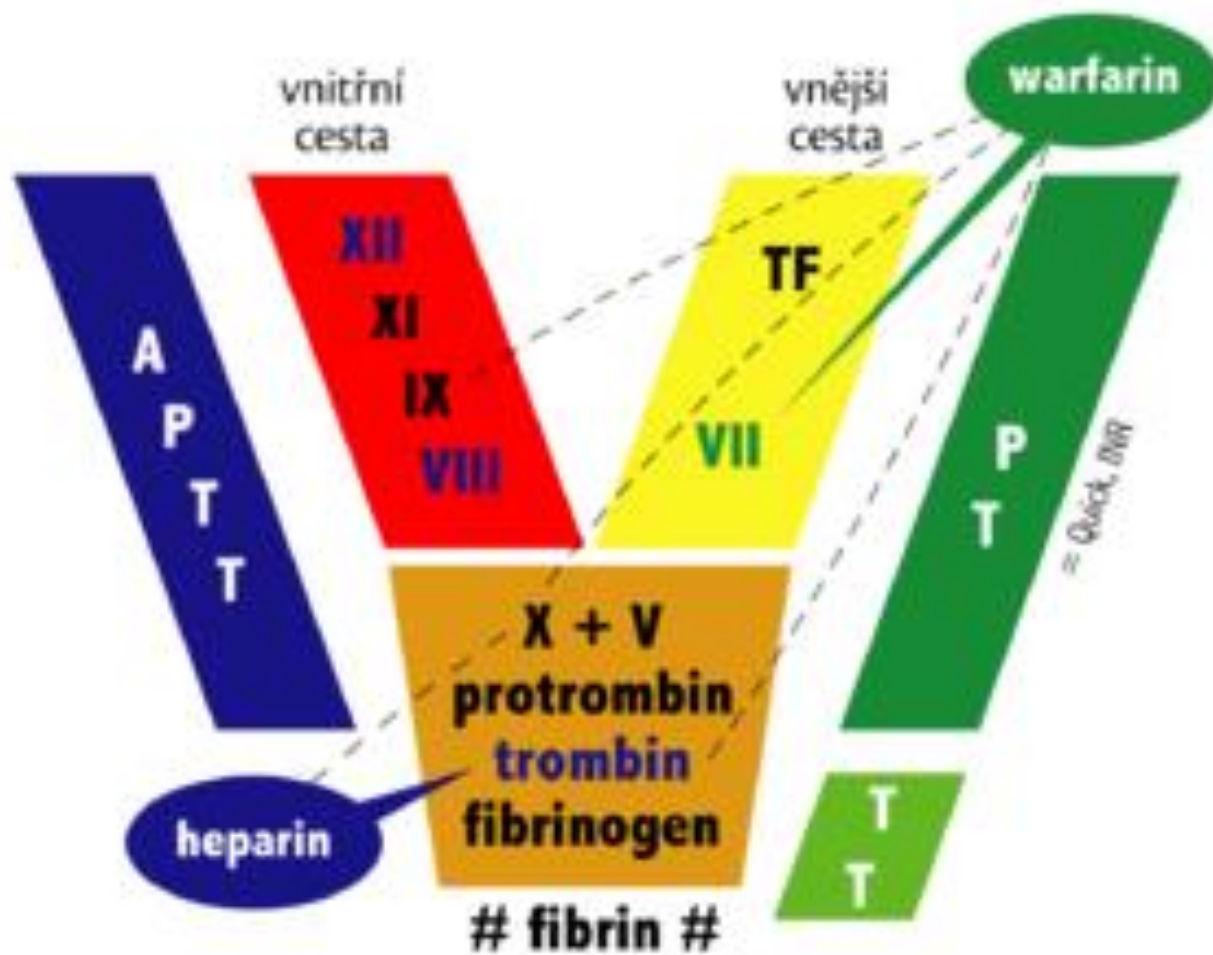
KOAGULACE



Miroslav Penka, Eva Tesařová a kol. Hematologie a transfuzní lékařství I. Praha: Grada Publishing, 2011.



KOAGULACE



PRINCIPY MĚŘENÍ

Koagulační

- PT
- APTT
- TT
- Fibrinogen
- Antitrombin
- F II, V, VII, X
- VIII, IX, XI, XII

Chromogenní

- Antitrombin
- Alfa2 – antiplazmin
- Plazminogen
- Protein C
- Faktor VII

Imunoturbidimetrie

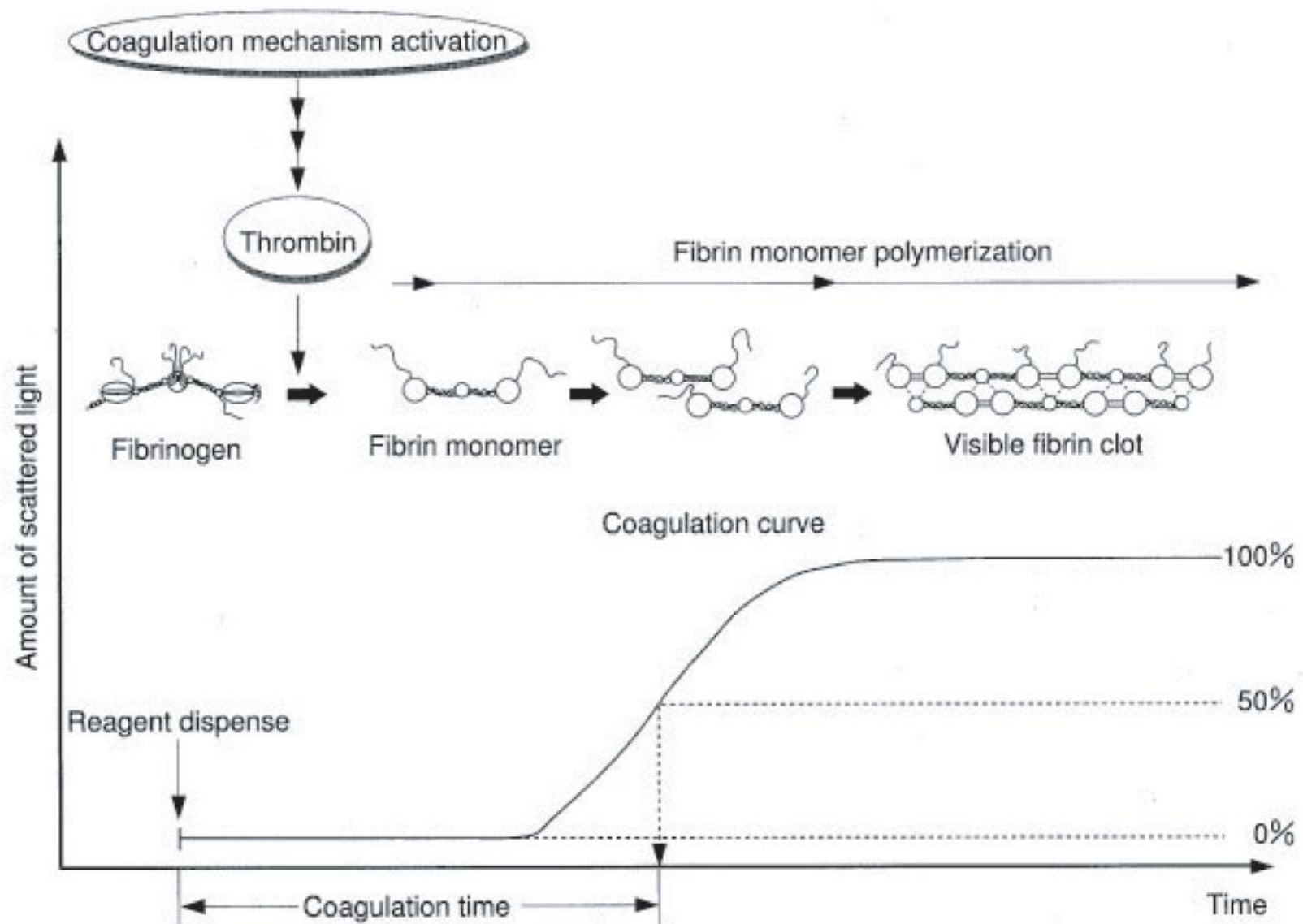
- D-Dimery



KOAGULAČNÍ METODY

Koagulační metody měří čas od přidání startovací reagensie do vzniku fibrinového vlákna ve vzorku plazmy





KOAGULAČNÍ METODY

○ Fyzikální detekce

- Detekce fibrinového vlákna
- Elektromechanické vibrace a rotace

Ize měřit i chylózní plazmu

○ Optická detekce

- Rozptyl světla - nefelometrie
- Propustnost světla – turbidimetrie

○ Manuální metody



PRINCIP – KOAGULAČNÍ (DETEKCE OPTICKY)

- Vzorek plazmy je po přidání startovací reagensie vystaven světelnému záření o vlnové délce 660 nm
- Změny v optické hustotě plazmy při vzniku koagula jsou ve velmi malých časových intervalech monitorovány jako změny v intenzitě světla rozptýleného při průchodu vzorkem
- Rozptýlené světlo dopadá na fotodiodu a indukuje vznik elektrického impulzu, jehož amplituda roste úměrně s intenzitou dopadajícího světla
- Koagulaci přístroj hodnotí jako ukončenou tehdy, když se zastaví nárůst amplitudy impulzů
- Na základě amplitudy elektrických impulzů je vytvořena koagulační křivka



PRINCIP – KOAGULAČNÍ (DETEKCE OPTICKY)

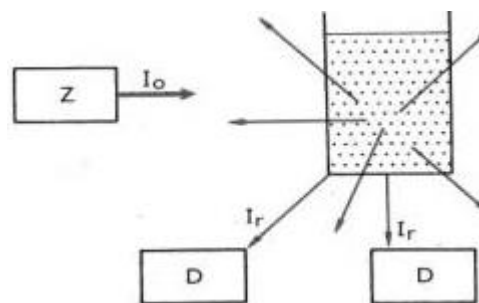
- Koagulační čas je stanoven metodou procentuální detekce
- Intenzita rozptýleného světla je stanovena ihned po přidání startovací reagensie a je definována jako 0 %
intenzita světla po ukončení koagulace jako 100 %
- Bod detekce koagulace je stanoven na koagulační křivce mezi 0 % a 100 %, nejčastěji je užíváno 50 %

Koagulační čas je potom časem, ve kterém bylo dosaženo nastavené intenzity rozptýleného světla



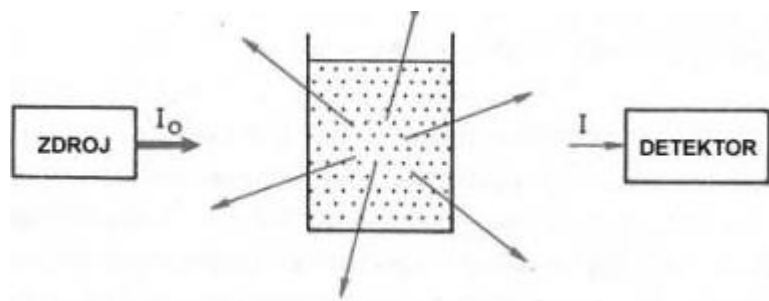
- Nefelometrie

zabývá se měřením intenzity difúzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích. Pro tyto účely slouží buď nefelometrický nástavec k fotometru, u nichž se difúzně rozptýlené světlo sleduje pod úhlem 90° , nebo jsou vyvinuty speciální přístroje - nefelometry



- Turbidimetrie

sleduje pokles intenzity záření procházejícího absorbující a rozptylující vrstvou. Na částicích dochází k rozptylu záření a částečně i jeho absorpci. Prošlé záření má tedy vždy nižší intenzitu než záření dopadající (světelný zdroj).



PRINCIP – KOAGULAČNÍ (DETEKCE-VISKOZITA)

- vzrůstající viskozita plasmy během její koagulace
- Tento růst viskozity je měřen pohybem **nerezové ocelové kuličky**, která se pohybuje mezi dvěma drážkami v kyvetě s plazmou
- Pohyb kuličky je tvořen elektromagnetickým polem, které působí na kuličku střídavě ze dvou stran.
Jakmile je nastartována koagulace (přidáním startovací reagentie) viskozita plasmy začne vzrůstat, což má vliv na pohyb kuličky
- Oscilační amplituda kuličky se zmenší
- Této změny se využívá k určení koagulačního času



SYSMEX CA 1500



SYSMEX CA 1500

- je plně automatický
- volně programovatelný
- propustnost cca 120 analýz za hodinu

- diagnostika koagulačních abnormalit
- sledování antikoagulačních terapií

Principy měření:

- koagulační metody (opticky - turbidimetrie, 660 nm)
zdroj LED, detektor fotodioda
- chromogenní metody (405, 575, 800 nm)
zdroj halogenová lampa
- imunoturbidimetrické metody



APTT

- APTT je základní koagulační test monitorující vnitřní koagulační systém (F XII, XI, IX, VIII,
- PK, HMWK, při současně prodlouženém PT rovněž F X event. V, II a Fbg).
- V přítomnosti fosfolipidů, kalcia a povrchového aktivátoru (kyselina ellagová) dochází v plazmě chudé na destičky k aktivaci mediátorů vnitřní cesty přeměny protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje následně přeměnu fibrinogenu na fibrin a posléze na nerozpustný fibrin.
- Actin® FS je reagensie vysoce citlivá k heparinu a defektům faktorů, málo citlivá k Lupus antikoagulans.

Po přidání parciálního tromboplastinu – kefalínu (náhrada destičkového faktoru 3 = PF3) a Ca^{2+} k testované citrátové plazmě závisí rychlost tvorby fibrinového vlákna na faktorech vnitřního koagulačního systému (PK, HMWK, F XII, XI, IX, VIII ale i X, V, II a I). K urychlení aktivace je přidáván aktivátor (křemičitany).



PT

- Po přidání tkáňového tromboplastinu s Ca^{2+} k testované citrátové plazmě závisí rychlost tvorby fibrinového vlákna (protrombinový čas PT) na faktorech zevního koagulačního systému (F II, V, VII, X i F I).



PT

- Protrombinový čas je základní screeningový koagulační test používaný k detekci vrozených či získaných nedostatků faktorů vnějšího koagulačního systému (FF II,V,VII,X).
- Příčiny prodloužení PT:
- -vrozený defekt výše uvedených koagulačních faktorů
- - fyziologicky u novorozence
- - získaný defekt:
- - přítomnost inhibitorů
- - nedostatek vitamínu K a léčba antagonisty vitamínu K- choroby jater
- - DIC
- Test PT se používá k monitorování orální antikoagulační terapie při níž dochází ke snížení hladiny vitamin K dependentních faktorů (II,VII,IX,X). Výsledky se vyjadřují v INR.
- **Terapeutický rozsah: INR = 2,0 – 3,0**
- Pozn.: Terapeutický rozsah INR může být posunut oběma směry dle klinického stavu pacienta.



TT

- Test postihuje tzv. třetí fázi koagulace, tj. štěpení fibrinogenu trombinem
- Sleduje se čas koagulace po přidavku malého množství trombinu k neředěné vyšetřované plazmě.



AT

- Testovaná plazma je inkubována s přebytem trombinu a heparinu. Vytvoří se trimerní komplex /AT III * heparin * trombin/. Přebytečný trombin v dalším kroku reaguje se substrátem a uvolňuje z něj p-nitroanilin (pNA) – žluté zbarvení. Intenzita zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci AT III v plazmě a je detekována fotometricky při 405 nm.
- Reakční schéma:
- $\text{AT III} + \text{heparin} + \text{trombin} \rightleftharpoons \text{AT III} * \text{heparin} * \text{trombin}$ / + trombin (přebytek)
- $\text{Substrát} - \text{pNA} + \text{trombin (přebytek)} \rightarrow \text{pNA} + \text{tripeptid}$ (žluté zbarvení)



FIBRINOGEN

- Citrátová plazma je ředěna, smíchána s nadbytkem trombinu a je zaznamenán čas koagulace. Ředěním plazmy se snižuje vliv inhibitorů ovlivňujících tzv. třetí fázi koagulace. V systému s nízkou koncentrací fibrinogenu a nadbytkem trombinu je koagulační čas závislý především na koncentraci fibrinogenu. Mezi logaritmem koagulačního času a logaritmem koncentrace fibrinogenu platí lineární vztah.



D-DIMERY

- Kvantitativní stanovení D-dimerů v plazmě imunoturbidimetrickou metodou podle stupně aglutinace latexových částic navázaných s monoklonální protilátkou proti D-dimerové molekule.
- Při průchodu svazku monochromatického světla suspenzí mikrolatexových částic s kovalentně navázanou specifickou protilátkou proti D-dimerům je světlo, za předpokladu vlnové délky světla mnohem větší než rozměry latexových částic, pouze slabě absorbováno. V přítomnosti testovaného antigenu (D-dimerů) aglutinují protilátkou potažené latexové částice za tvorby agregátů rozměrově větších než vlnová délka světla, které je mnohem více absorbováno. Toto zvýšení světelné absorbce je závislé na množství antigenu přítomného v testovaném vzorku.

