

# Principy vyšetření hemostázy, preanalýza



# Trombóza - Hemostáza - Krvácení



# Fyziologie krevního srážení

- Základní homeostatický mechanismus
- Spolupůsobení různých systémů včetně regulačních zpětných vazeb
  - ↘ Cévní stěny
  - ↘ Trombocytů
  - ↘ Plazmatické koagulační faktory
  - ↘ Plazmatické inhibitory
  - ↘ Systém fibrinolytický

# 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

# Dělení testů dle principu

- Koagulační
- Fotometrické
- Imunochemické
  
- Turbidimetrické (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)

- manuálně (háčkování)
- koagulometr (poloautomat, automat)
  - mechanické
    - kuličkové (sledování změn pohybu kuličky)
    - háčkové
  - optické
    - nefelometrie (sledování rozptylu světla)
    - turbidimetrie (sledování průchodnosti světla)

# Dělení testů dle principu

## → Fotometrické

↘ 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

## → Turbidimetrické (jiné než koagulační, imunochemické)

↘ sledování změn zakalení

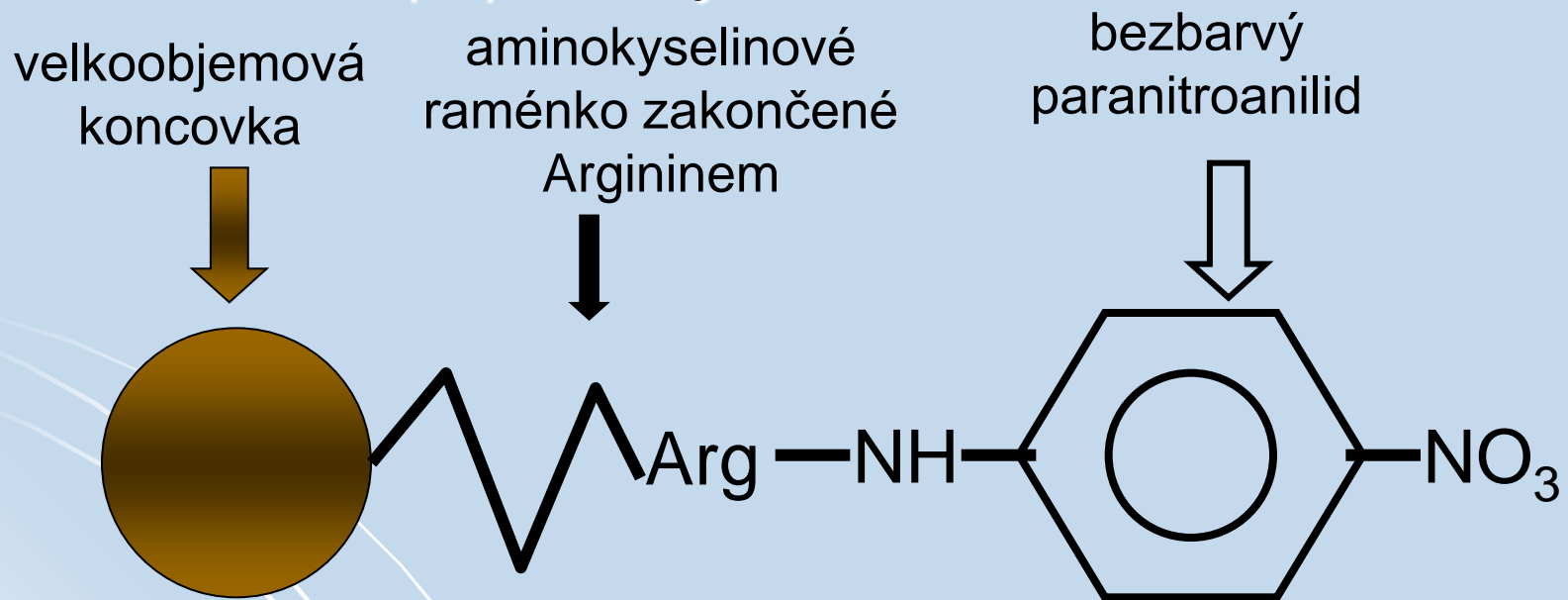
- detekce změn transmise (propustnosti T)
- detekce změn absorbance

↘ limitace- chylózní vzorky

# Chromogeny

## → Chromogenní substrát

↘ uměle připravený

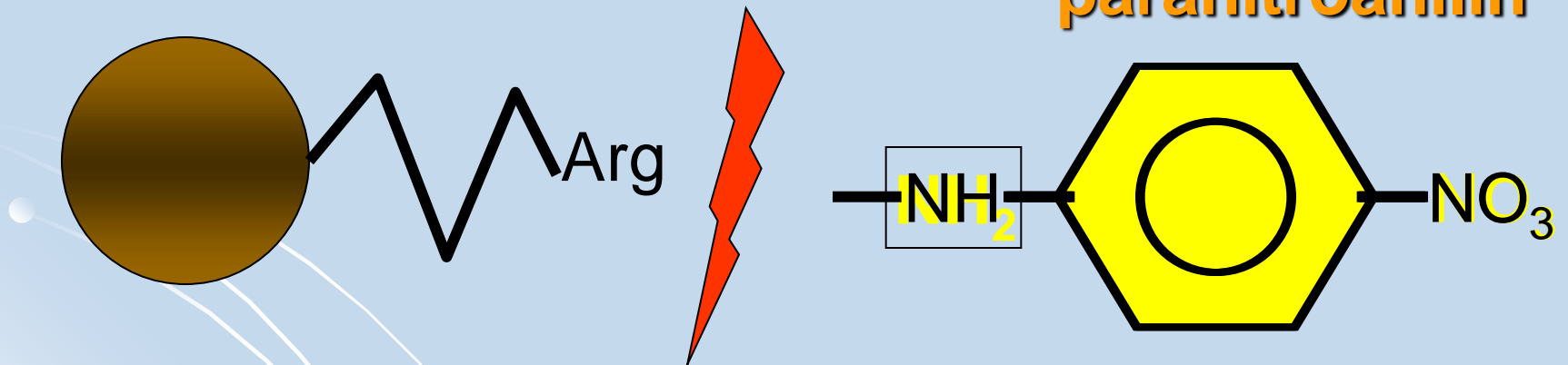




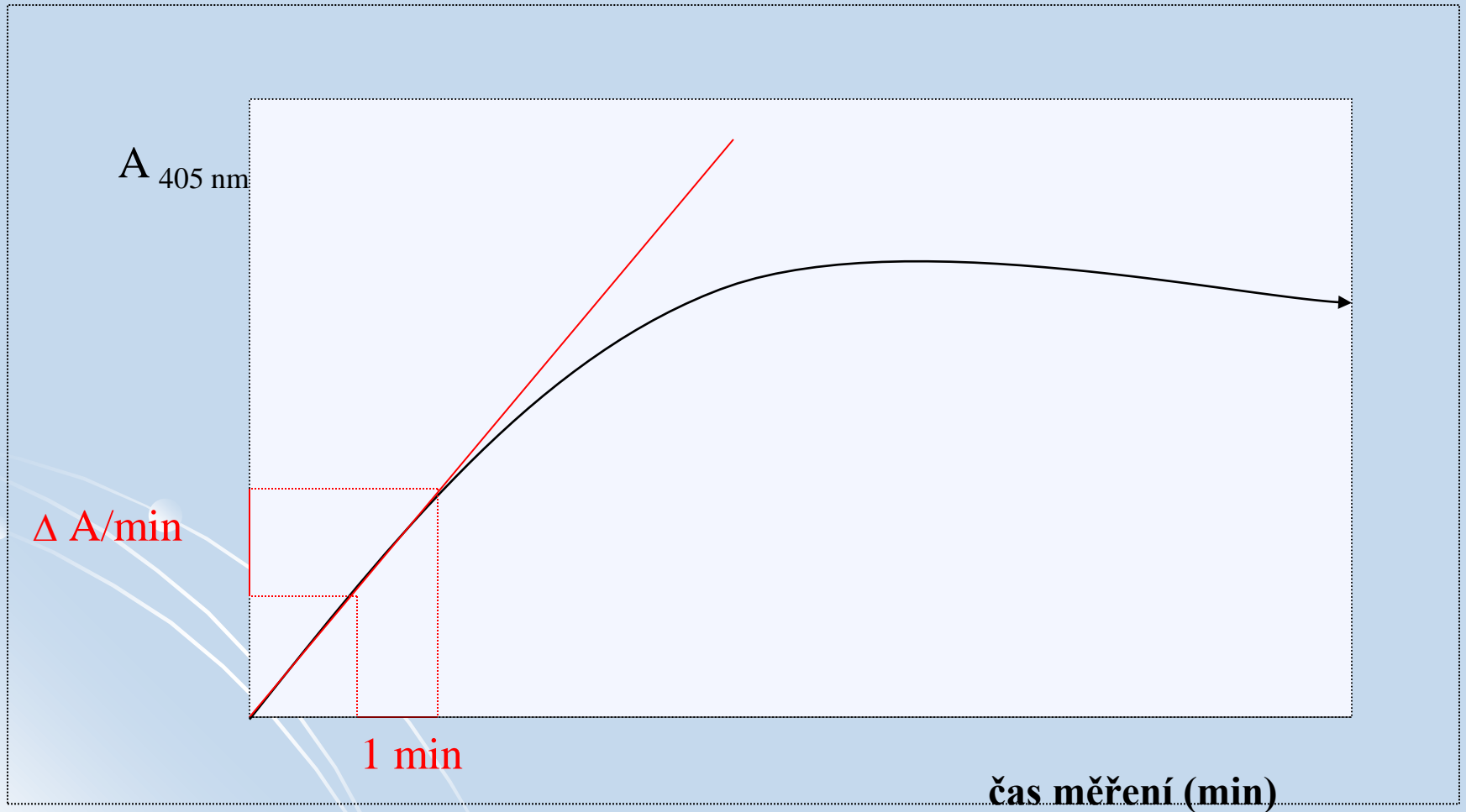
# Chromogeny

## → Princip

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



# Kinetické měření



# Dělení testů dle principu

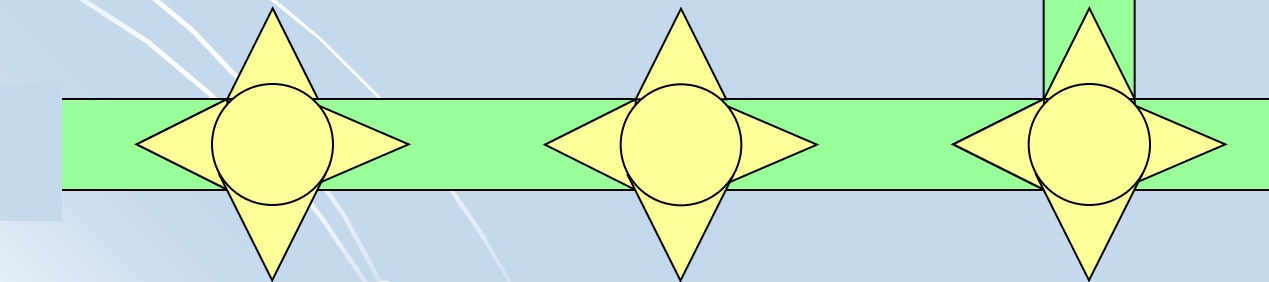
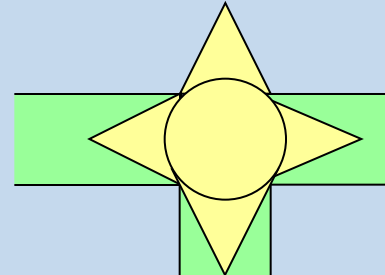
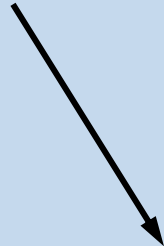
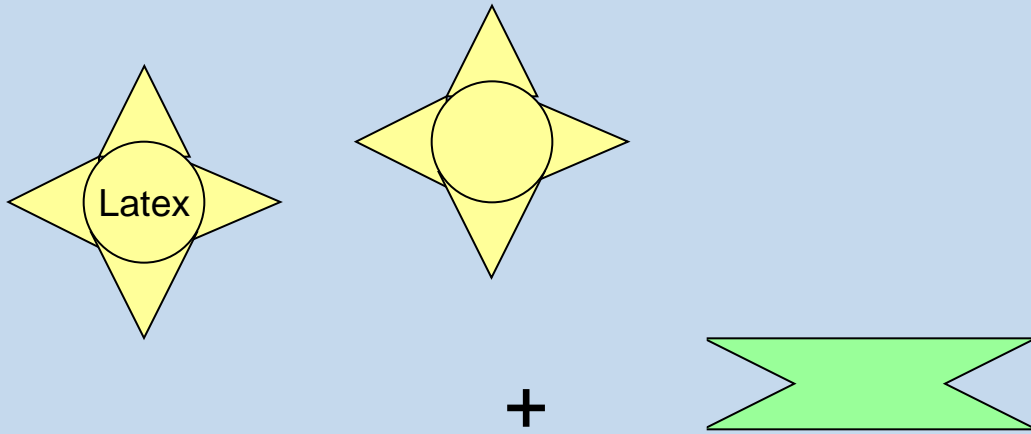
## → Imunochemické

### ↘ sledování reakce antigenu s protilátkou

- aglutinace
- LIA
- ELISA
- EID

# Aglutinační metody

- sledování aglutinace viditelných částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu
- odečítání makroskopicky
  - ↘ pozitivní( +, ++, +++)/negativní
  - ↘ semikvantitativní metody (udaná mez detekce)
- metody
  - ↘ latexaglutinační (např. FDP, D-Di)
  - ↘ hemaglutinační (např. FM)



# Příklad vyšetření D-Dimerů

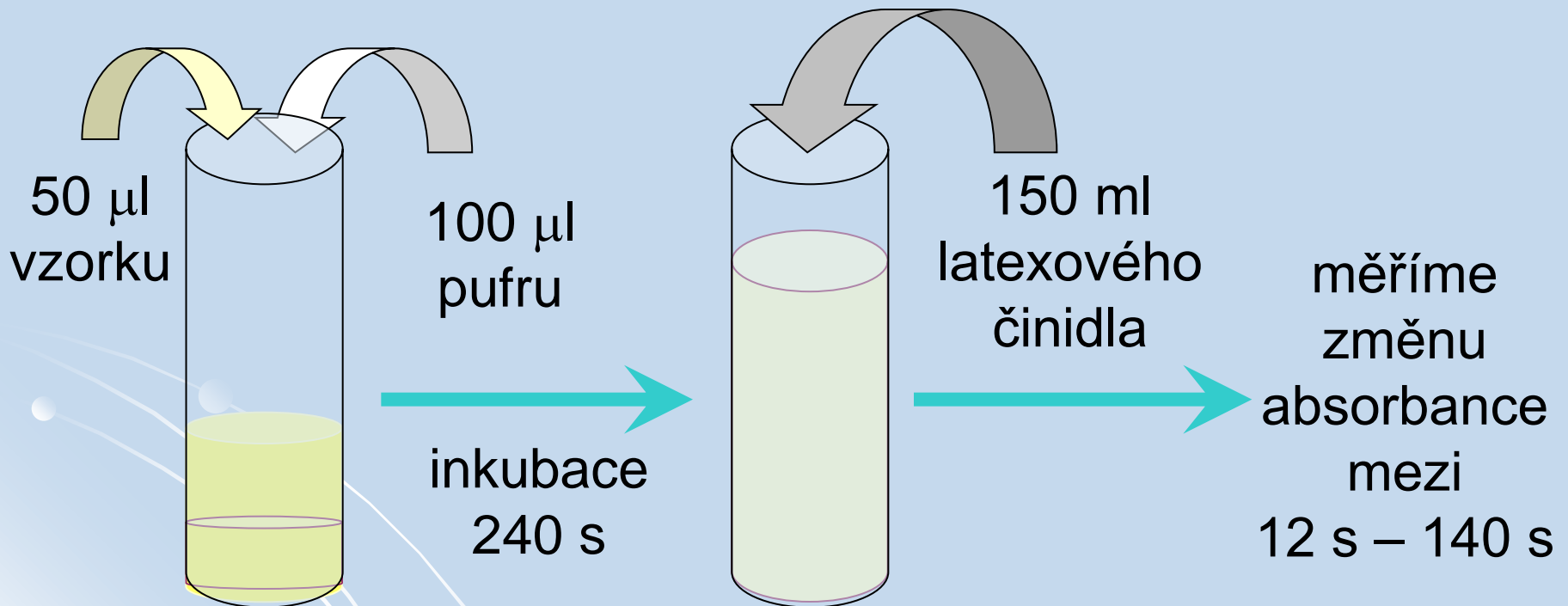
Mez detekce = 0,5 mg/l	neředěný vzorek	vzorek ředěný 1:6	výsledek
aglutinace	-	-	< 0,5 mg/l
aglutinace	+	-	> 0,5 mg/l a < 3,0 mg/l
aglutinace	+	+	> 3,0 mg/l

# Liquid immunoassay - LIA metody

- Sledování aglutinace mikrolatexových částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu
- Odečítání optickým systémem koagulometru
  - Změna zakalení ( $\Delta A/\text{min}$ )
- Kvantitativní metody (např. D-Di, vWF:Ag...)
- Limitace
  - Chylozita vzorku
  - Hookův jev (vysycení protilátky antigenem)

# LIA testy

## → Provedení (STA© Liatest© D-Dimer)

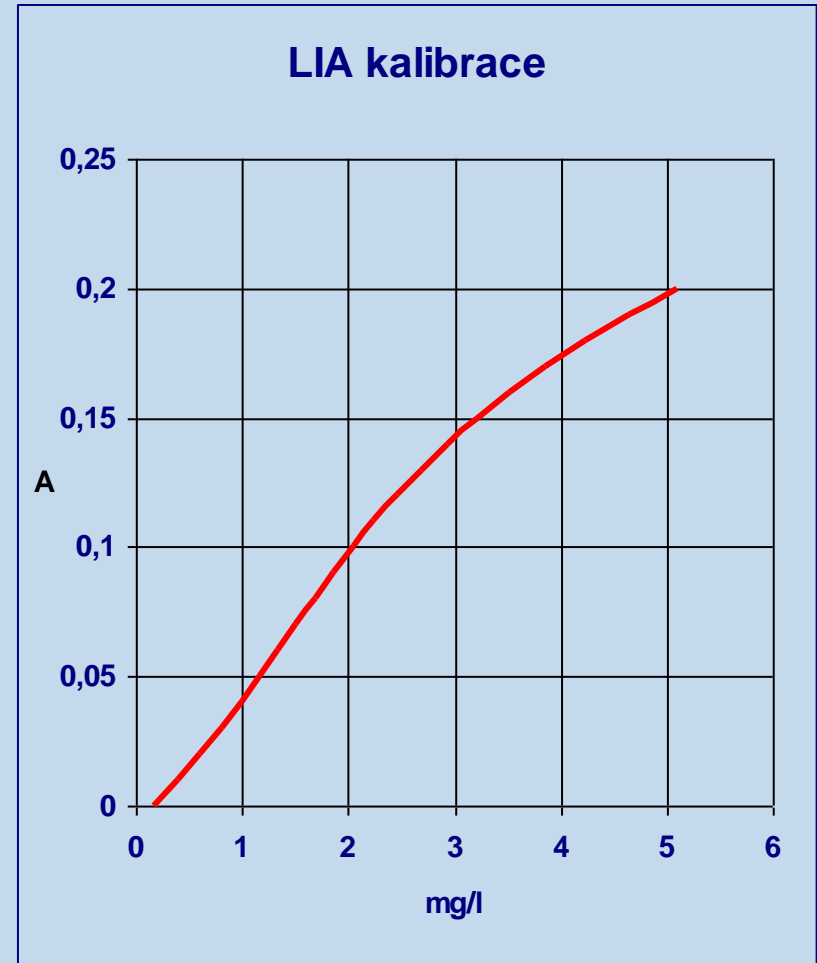




# LIA testy

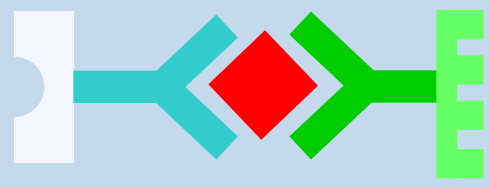
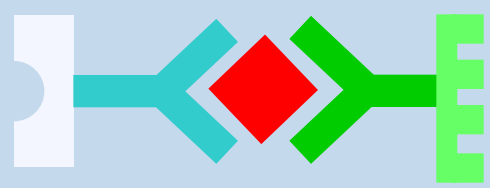
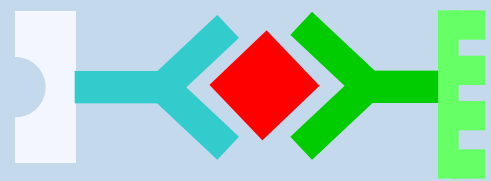
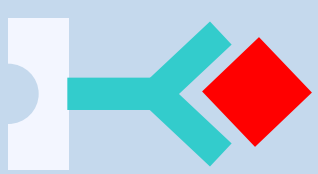
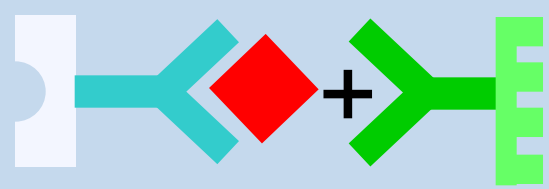
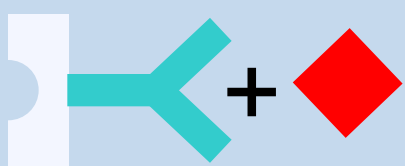
## → Kalibrace

- Sigmoidní
- Křivka 3. řádu
- Minimálně 5 bodů
- Platí pro celou šarži




# ELISA metody

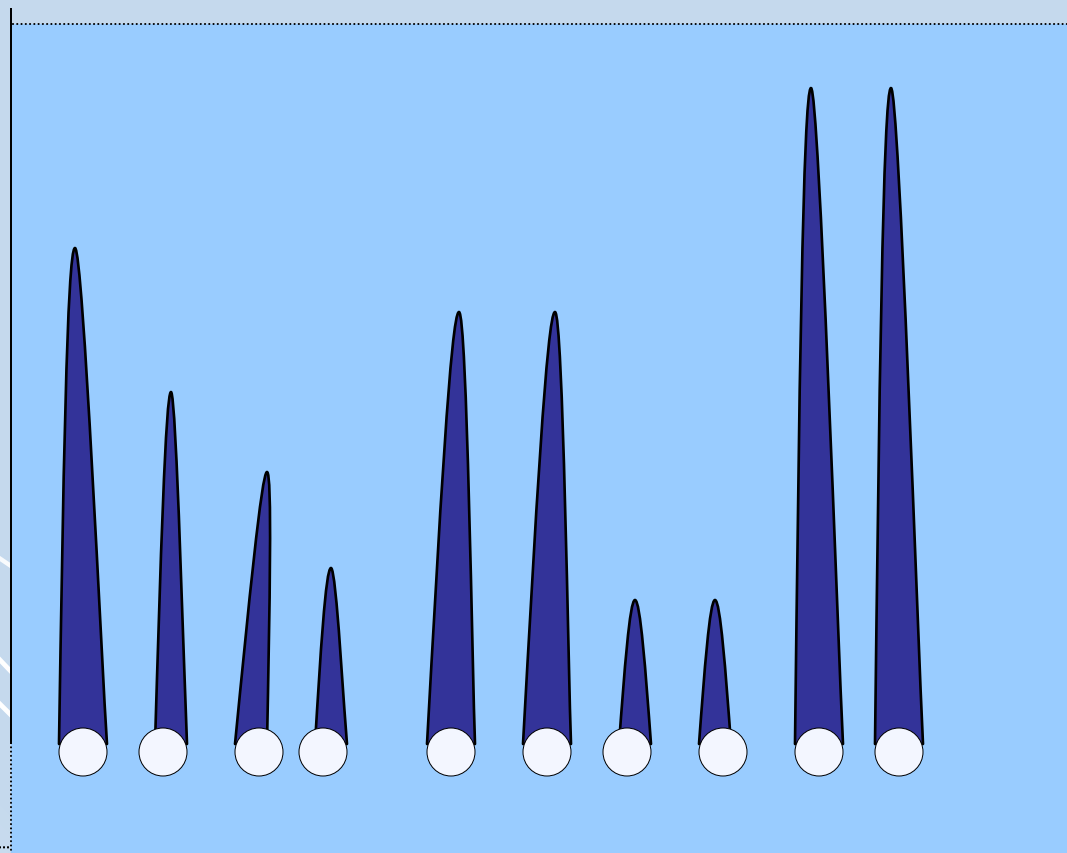
- Stanovení antigenu (Ag) pomocí protilátky (Ab) značené enzymem (AbE) - kvantitativní
  - ↘ inkubace vzorku v mikrotitračních jamkách s navázanou Ab proti vyš. Ag - vazba Ag na Ab
  - ↘ odsátí vzorku + promytí
  - ↘ inkubace AbE v jamkách - vazba na Ag
  - ↘ odsátí AbE a promytí
  - ↘ detekce enzymatické aktivity komplexu Ab-Ag - AbE po přidavku chromogenního substrátu (A)
    - přímá úměra: enzym. aktivita x množství Ag



# Elektroimunodifúze - EID metody

- vyšetřovaný antigen reaguje s protilátkou přítomnou v agarózovém gelu při elektroforéze za vzniku precipitačního píku
  - délka píku je přímo úměrná koncentraci antigenu
  - kvantitativní metoda
- 

# Princip EID



kalibrace

vzorky pacientů

# Vyšetření plazmatických proteinů

- Vyšetření funkční aktivity
  - ↘ koagulační metody
  - ↘ fotometrické metody
- Vyšetření antigenu
  - ↘ imunochemické metody
  - ↘ umožňují odlišení defektů
    - kvalitativních
    - kvantitativních

# Správnost laboratorních výsledků


## → Faktory

- ↘ objektivní
- ↘ subjektivní

## → Faktory


- ↘ preanalytické
- ↘ analytické
- ↘ postanalytické

# Preanalytické faktory

- Příprava pacienta
  - Odběr vzorku
  - Transport vzorku
  - Zpracování vzorku
  - Skladování vzorku
- 



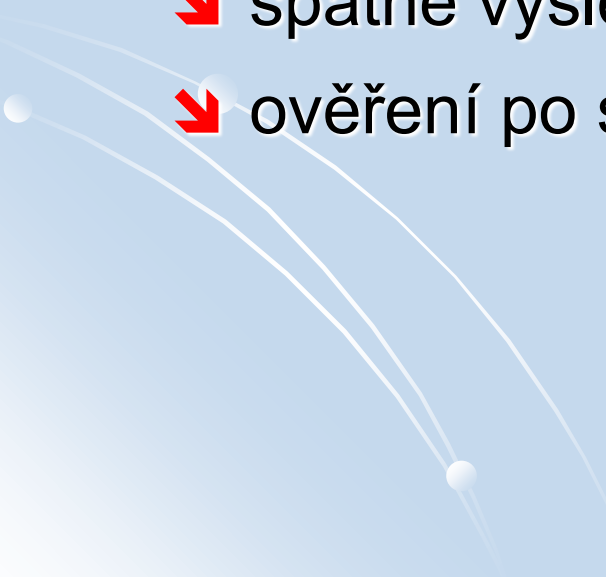
# Příprava pacienta

- Odběr na lačno nebo po lehké snídani bez tuků
  - Dostatečný příjem tekutin
  - Uvedení času odběru
  - Uvedení léčby
  - Uvedení komplikace při odběru
- 

# Odběr vzorku

- Minimální zatažení paže
- Do plastických nebo silikonovaných skleněných zkumavek
- První 2-3 ml nelze použít
- Antikoagulační roztok pro nesrážlivou krev-  
citrát sodný v ředění 1:10
- Šetrné promíchání krve s citrátem (5-10x)

# Nedostatečné promíchání krve s citrátem

- Nebezpečí aktivace a srážení vzorku
  - Koncentrování citrátu u hladiny
    - ↘ automaty pipetují těsně pod hladinou naředěnou plazmu s nadbytkem citrátu
    - ↘ špatné výsledky
    - ↘ ověření po stažení plazmy a promíchání
- 

# Antikoagulancia

## → Citrát sodný

- ↘ 0,109 mol/l (3,2 %)      doporučeno
- ↘ 1,129 mol/l (3,8 %)

## → CTAD zkumavky

- ↘ brání aktivaci trombocytů
- ↘ doporučeno pro testy PAI-1, heparin, PF4...

# Správný odběr vzorku

Vyřadit vzorky

→ Sražené

→ S chybným objemem krve ( rozdíl 10%)

→ Hemolytické, ikterické a chylózní

↘ hemolytický a ikterický vzorek

- ovlivňuje výrazně fotometrická stanovení

↘ chylózní vzorek

- ovlivňuje výrazně koagulační stanovení na optických koagulometrech a imunochemická stanovení vyhodnocovaná opticky

# Správný odběr vzorku

Množství krve

→ Méně

↘ prodloužení koagulačních časů

- APTT citlivé od 90 % objemu
- PT citlivé od 80 % objemu

→ Více

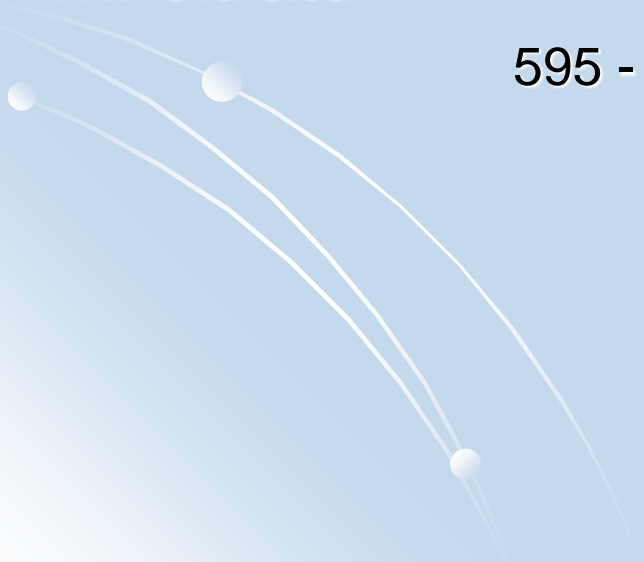
↘ zkrácení koagulačních časů??

# Správný odběr vzorku

→ Hematokrit

→ < 30 % nebo >60 % upravit objem citrátu

$$\text{ml citrátu} = \frac{100 - \text{hematokrit}}{595 - \text{hematokrit}} \times \text{ml plné krve}$$




# Transport vzorku

- Čas (max **2 hod**)
- Teplota (**18-25°C**)
- Mechanické vlivy (potrubní pošta)





# Zpracování vzorku

- Odstranění krevních buněk centrifugací
  - Stažení plazmy
  - Většina testů do 1 - 4 hod po odběru
  - Výjimka EGT, EF (15 - 30 min), heparin, PAI-1, LA, vyšetření fcí trombocytů
- 

# Vyšetřovaný materiál

## → Plazma

### ↘ plazma bohatá na trombocyty

- centrifugace 10 minut 150 - 250 g, sedimentace

### ↘ plazma chudá na trombocyty

- centrifugace 15 minut 2500 g

### ↘ bezdestičková plazma

- dvojnásobná centrifugace (ultracentrifugace)

## → Plná krev

## → Sérum

# Centrifugace

→ Výpočet otáček pro danou centrifugu

→  $g = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times N^2$

$r$  = poloměr otáčení v cm,  $N$  = otáčky/min

Příklad:

$r = 15$  cm,  $2500g$        $3860$  otáček/min

# Skladování primárních vzorků

- Laboratorní teplota 18 - 25 °C
  - ↘ PT 6 hodin
  - ↘ APTT 4 hodiny
  - ↘ APTT (léčba heparinem) 1 hodinu
  - ↘ Ostatní vyšetření: 4 hod
- → Vyšší teplota ne
- Uložení v lednici (aktivace FF VII a XII) ne

# Zamrazování vzorků

- Plazma chudá na destičky/bezdestičková
- Objem > 500  $\mu$ l
- Zkumavka se zátkou
- Správná velikost zkumavky
- Zkumavka naplněná do 3/4
- Rychlé zamrazení (-70 °C, -196 °C)
- Skladování zamrazených vzorků
  - ↘ krátkodobé -20 °C, dlouhodobé: -70 °C

# Rozmrazování vzorků

- Při 37 °C min. 5 minut
- Dobře promíchat
- Opakované zamrazení není možné



# Analytické faktory

- Dodržování metodických postupů
- Správné pracovní návyky
- Správná funkce a kalibrace přístrojů
- Výběr diagnostických setů a reagensů
- Správná volba kalibračních a kontrolních materiálů
- Správně provedená kalibrace a kontroly kvality

# Postanalytické faktory

- Rozmezí fyziologických hodnot
  - Terapeutické rozmezí
  - Vyjadřování výsledků
  - Vyhodnocení výsledků
  - Interpretace výsledků
- 