

Fakulta zdravotnických studií

Západočeské univerzity v Plzni

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Dominika Samková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**Jak si vybrat správnou reagensii pro
screeningové koagulační testy**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Zdeňka Hajšmanová

Plzeň 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovávala sama pod laskavým vedením a v úzké spolupráci se školitelkou MUDr. Evou Havlovou, která byla pověřena vedoucí mé práce, MUDr. Zdeňkou Hajšmanovou.

Prohlašuji, že jsem ve své bakalářské práci uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržela zásady vědecké etiky a práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Plzni dne 25. března 2018

.....

podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat MUDr. Zdeňce Hajšmanové, MUDr. Evě Havlové, Ing. Ivaně Korelusové a Mgr. Janě Palátové za jejich ochotné vedení a podporu při psaní této bakalářské práce. Za jejich pomoc s měřením a provedením praktické části, kterou bych bez jejich pomoci nemohla realizovat v takové míře a za osobní zkušenosti, které mi předaly ze své praxe. Mé velké díky v neposlední řadě patří mojí rodině, která mě po celou dobu studia velmi podporovala.

Anotace

Jméno a příjmení: Dominika Samková

Katedra: Záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Jak si vybrat správnou reagensii pro screeningové koagulační testy

Vedoucí práce: MUDr. Zdeňka Hajšmanová

Pověřená školitelka: MUDr. Eva Havlová

Počet stran: číslované 44, nečíslované 22

Počet titulů použité literatury: 31

Klíčová slova: koagulace, aktivovaný parciální tromboplastinový čas, krevní destičky, koagulační faktor, reagensie

Souhrn:

Bakalářská práce se zabývá výběrem správné reagensie pro stanovení koagulačního screeningového testu aktivovaného parciálního tromboplastinového času (APTT). První část práce zahrnuje problematiku koagulace obecně a možnosti vlivů komplikujících stanovení APTT. V praktické části se zabývám stanovením APTT pomocí různých reagensií a na rozdílných typech koagulometrů. Součástí mé práce je i analýza testu APTT na problematických vzorcích (vyšší chylozita plazmy).

Annotation

Name and surname: Dominika Samková

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health.

Title of thesis: How to choose the suitable reagent for coagulation screenings tests.

Consultant: MUDr. Zdeňka Hajšmanová

Authorized supervisor: MUDr. Eva Havlová

Number of pages: numbered 44, unnumbered 22

Number of literature items used: 31

Key words: coagulation, activated partial thromboplastin time, blood plates, coagulation factor, reagents

Summary:

The bachelor thesis deals with the selection of the correct reagent for the determination of the coagulation screening test by activated partial thromboplastin time APTT. The first part of the thesis includes the problematic of coagulation in general and the possible influences which complicate the determination of APTT test. The practical part is about determination of APTT by different reagents and on different types of coagulometers. The thesis includes the analysis of APTT test on the problematic patterns (higher plasma chylolysis).

Obsah

Poděkování.....	3
Anotace	4
Annotation	5
Úvod.....	9
Teoretická část	10
1 Koagulace	10
1.1 Hemostatická rovnováha.....	10
1.2 Cévní stěna	10
1.3 Krevní destičky	10
1.4 Vznik primární destičkové zátky	11
1.5 Koagulační kaskáda	11
1.6 Přírozené inhibitory.....	14
1.7 Fibrinolýza	15
2 Hemokoagulační screening	16
2.1 Vyšetření hemokoagulačního screeningu	16
2.2 Protrombinový test	16
2.3 Trombinový test	16
2.4 Stanovení koncentrace fibrinogenu.....	17
2.5 Vyšetření antitrombinu.....	17
2.6 Správný odběr vzorku	18
2.7 Preanalytické chyby	19
2.8 Zpracování vzorku	19
3 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas.....	20
3.1 Historie testu aktivovaného parciálního tromboplastinového času.....	20
3.2 Význam testu aktivovaného parciálního tromboplastinového času	20
3.3 Vyjadřování výsledku	21

4	Prodloužený test aktivovaného parciálního tromboplastinového času.....	22
4.1	Patologické příčiny prodlouženého APTT.....	22
4.2	Deficit koagulačních faktorů.....	22
4.3	Vyšetření aktivity koagulačních faktorů vnitřní cesty	23
4.4	Aktivovaný parciální tromboplastinový čas při antikoagulační léčbě	23
5	Lupus antikoagulans a specifické inhibitory koagulačních faktorů	24
5.1	Co je to lupus antikoagulans	24
5.1.1	Vyšetření panelu lupus antikoagulans	24
5.1.2	Laboratorní testování lupus antikoagulans	25
5.2	Prodloužení testů aktivovaného parciálního tromboplastinového času i protrombinového času	25
5.3	Patologicky zkrácený aktivovaný parciální tromboplastinový čas	26
5.4	Panel patologického aktivovaného parciálního tromboplastinového času.....	26
5.5	Směsná normální plazma a její využití v klinických laboratořích	26
5.6	Screeningové vyšetření inhibitoru koagulačních faktorů.....	27
5.7	Vyšetření specifity inhibitoru.....	27
5.8	Kvantifikace inhibitoru	28
6	Fyzikální principy měření koagulačních metod	29
6.1	Možnosti stanovení	29
6.2	Mechanický způsob měření.....	29
6.3	Optický způsob měření	29
	Praktická část	31
7	Princip testu aktivovaného parciálního tromboplastinového času.....	32
7.1	Test aktivovaný parciální tromboplastinový čas - aktin	32
8	Koagulometry použité pro vlastní měření	33
8.1	Analyzátor STA-R Evolution.....	33
8.2	Analyzátor ACL TOP 700	34

8.3	Analyzátor SStart 4	34
9	Reagencie	36
9.1	Reagencie pro test aktivovaného parciálního tromboplastinového času.....	36
	Diskuze	51
	Závěr	53
	Seznam zdrojů.....	54
	Seznam zkratk	57
	Seznam tabulek	59
	Seznam grafů	60
	Seznam obrázků.....	61
	Seznam příloh	62
	Přílohy.....	63

Úvod

V bakalářské práci jsem se zaměřila na konkrétní problematiku jednoho ze screeningových koagulačních testů a to APTT, jeho postavením v hemokoagulačním screeningu a podmínkami, které je třeba zohlednit při výběru ideálního diagnostika pro potřebu dané laboratoře. V teoretické části práce se věnuji nejprve problematice hemostázy obecně, primární hemostáze, koagulační kaskádě, regulačním mechanismům koagulace. Další metody začleněné do hemokoagulačního screeningu jsou jen zmíněny a poté se soustředím cíleně na metodu APTT. Je zde uvedena preanalytická problematika, vyšetřovací metodiky (optický/mechanický princip detekce koagula), interpretace patologických výsledků testu APTT, výčet diagnostik dostupných v České republice a jejich charakteristika.

Praktická část obsahuje porovnání výsledků měření testu APTT na přístrojích s mechanickým i optickým způsobem měření a dále analýzu výsledků při použití různých typů reagensů. Zvláštní pozornost je věnována obtížně hodnotitelným vzorkům s vysokým stupněm chylozity.

Test APTT je stěžejní metoda v hemokoagulačním screeningu, která postihuje vnitřní cestu koagulační kaskády. Hemokoagulační screening se provádí v rámci každého předoperačního vyšetření.

V rámci patologií zachycených hemokoagulačním screeningem je prodloužené APTT jednou z nejčastějších variant. V klinické praxi je pak nutné rozhodnout, zda pacient má zvýšené riziko krvácení a zda před invazivními výkony potřebuje speciální přípravu. Z tohoto důvodu je důležité vybrat správnou reagensii, která bude dostatečně citlivá k deficitu koagulačních faktorů.

Teoretická část

1 Koagulace

1.1 Hemostatická rovnováha

Hemostázu lze definovat jako vybalancovanou rovnováhu udržující krev v krevním oběhu v tekutém stavu a lokalizující proces krevního srážení na místo poškození cévní stěny. K procesu hemostatické rovnováhy musí být dodrženo několik podmínek: neporušená cévní stěna (především její endotel), normální hodnota krevních destiček, fyziologické množství a funkce koagulačních faktorů. Hemostáza je regulována přirozenými inhibitory krevního srážení. Navrácení cévní stěny do původního stavu zajišťuje proces fibrinolýzy. Pokud dojde k vychýlení této rovnováhy, mohou nastat hypokoagulační stavy spojené s krvácením nebo hyperkoagulační stavy spojené se zvýšeným rizikem tromboembolické nemoci. [2]

1.2 Cévní stěna

Cévní stěnu tvoří tři vrstvy – tunica intima, tunica media a tunica adventitia. Zevní obal cév (tunica adventitia) je tvořena kolagenními a elastickými vlákny, které zvyšují pružnost cévy. Vazivem zároveň probíhají autonomní nervy inervující hladkou svalovinu. Střední vrstva (tunica media) se skládá ze spirálně a cirkulárně orientované hladké svaloviny. Tato vrstva umožňuje změnu průsvitu cévy. Vnitřní vrstva (tunica intima) je tvořena výstelkou z plochých endotelových buněk. Endotel zajišťuje nesmáčivý vnitřní povrch cévy a zabraňuje tak styku mezi krví a dalšími vrstvami cévní stěny. [1]

1.3 Krevní destičky

Krevní destičky neboli trombocyty, jsou krevní elementy o velikosti 1 – 2 μm . Vznikají odštěpováním cytoplazmy zralých megakaryocytů v kostní dřeni. Životnost trombocytů v krevním oběhu je 7 - 10 dní. Fyziologický počet destiček je 150 – 400 x 10⁹/l.

Jsou to bezjaderné krevní elementy. Jejich cytoplazmatická membrána je bohatá na fosfolipidy a vchlipuje se do buňky, kde vytváří otevřený kanalikulární systém. Tato oblast destičky se nazývá hyalomera. Centrální oblast trombocytů – tzv. granulomera – obsahuje tři typy granul. Rozlišujeme δ -granula neboli denzní granula, která obsahují ATP, ADP, Ca^{2+} a serotonin. Druhým typem jsou α -granula obsahující fibrinogen, von Willebrandův faktor a fosfolipidy. Třetím typem jsou λ -granula, která skladují lysosomy. Základní funkcí trombocytů je výstavba primární cévní zátky. [3]

1.4 Vznik primární destičkové zátky

Primární destičkovou zátku tvoří krevní destičky a adhezivní proteiny (von Willebrandův faktor, fibronectin). Důležitou roli hraje i cévní stěna. Při poškození cévní stěny dojde k obnažení struktur pod endotelem (zejm. kolagenních vláken). Trombocyty pak nasednou svými receptory ke kolagenním vláknům, zde se uplatní důležitá funkce adhezivních proteinů. Tím dojde k aktivaci trombocytů, nastane změna jejich tvaru a uvolní se proagregační působky z granul (ADP, TXA_2). [17]

Při aktivaci trombocytů dále dochází ke změnám na fosfolipidové membráně. Jedná se o tzv. flip-flop fenomén - proces, při kterém dojde k přesunu negativně nabitých fosfolipidů do vnější vrstvy membrány. [20] Obnažují se glykoproteinové receptory (glykoprotein IIb/IIIa), jejichž prostřednictvím pak dochází k pospojování (agregaci) trombocytů pomocí molekul fibrinogenu a von Willebrandova faktoru. [3] Výsledkem celého procesu je vznik bílého, křehkého, rozpustného trombu. [17]

1.5 Koagulační kaskáda

Koagulační faktory jsou z biochemického hlediska enzymy. V krvi kolují jako neaktivní formy, jedná se o serinové proteázy. V koagulační kaskádě dochází ke štěpení následujícího koagulačního faktoru v pozici, kde je v řetězci aminokyselin lokalizován serin. Koagulační faktor tak aktivuje svůj substrát a ten pak stejným způsobem aktivuje další koagulační faktor lokalizovaný o úroveň níže. [18, 19]

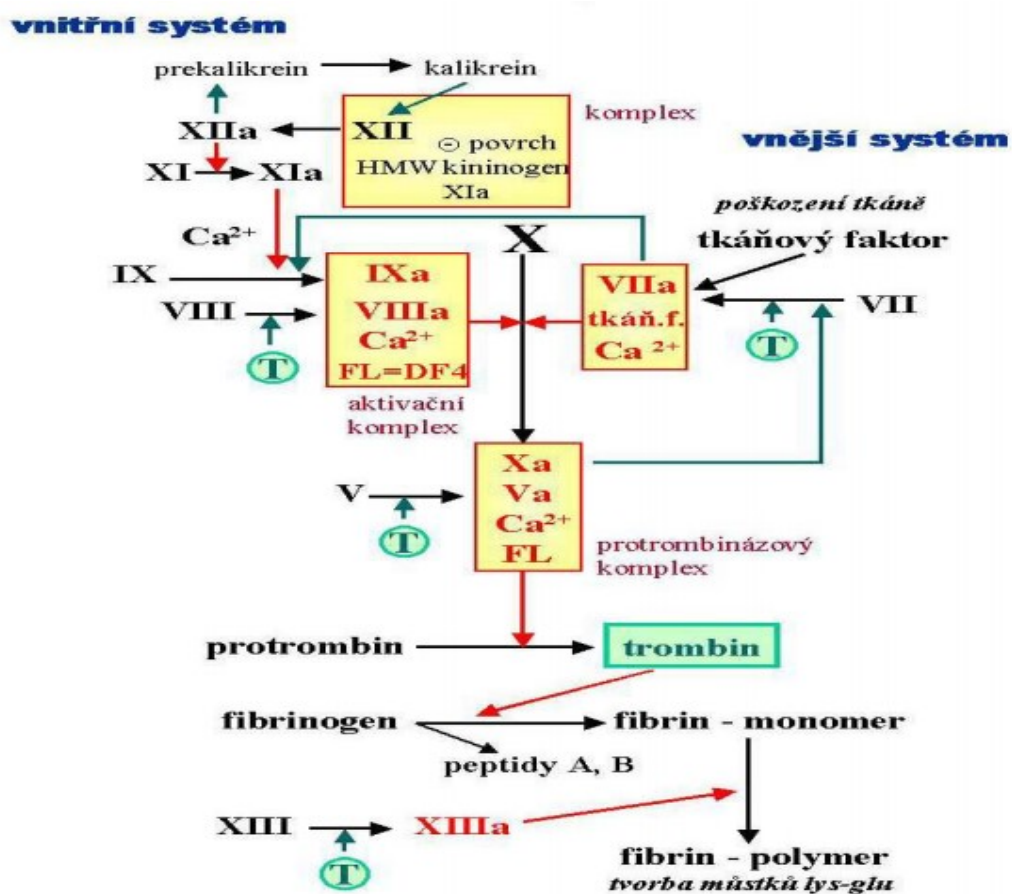
Koagulační faktory jsou syntetizovány převážně v játrech. Vnější cesta koagulace je spouštěna pomocí tkáňového faktoru (TF), který se uvolní do krve při poškození endotelu. Tkáňový faktor se ihned váže na faktor VIIa, který ve stopovém množství cirkuluje v plazmě v aktivované formě. Vznikne komplex tzv. vnější tenáza

(FVIIa-TF-PL-Ca²⁺), který aktivuje FX na FXa. FXa pak spolu s FVa, PL a Ca²⁺ vytvoří tzv. protrombinázu aktivující malé množství protrombinu na trombin. Trombin je schopen zpětné aktivace faktorů XI, IX, kofaktorů V a VIII a dále trombocytů. Koagulační děj je tímto velmi výrazně posílen a urychlen. Tímto je završena iniciační fáze koagulačního děje. [18]

Začleněním a aktivací vnitřní koagulační cesty dojde ke vzniku tzv. vnitřní tenázy (FIXa-FVIIIa-PL-Ca²⁺). Ta zajistí přeměnu velkého množství FX na FXa. Následně vznikne již dostatečné množství trombinu. Tento proces nazýváme amplifikační fáze.

Poslední fází je propagační fáze, kdy vzniká dostatečné množství trombinu. Takto vzniklý trombin rozštěpí fibrinogen na fibrinové monomery, které spontánně polymerizují. Polymery fibrinu jsou pak stabilizovány aktivovaným FXIIIa a vzniká tak nerozpustné fibrinové koagulum. [3]

Obrázek č. 1: Schéma hemostázy



Zdroj: www.lfhk.cuni.cz

„Vnitřní“ cesta koagulace zahrnuje kaskádovitou aktivaci vysokomolekulárního kininogenu (HMWK), prekalikreinu a faktorů XII, XI, IX a VIII.

Prekalikrein je bílkovina tvořená v játrech, která v krvi koluje navázaná na HMWK. Patří mezi faktory kontaktní fáze. Aktivací prekalikreinu vzniká kalikrein. HMWK je plazmatický protein účastnící se zahájení koagulace, aktivuje se po kontaktu s endotelem nebo po vyplavení tkáňového faktoru do krve.

Faktor XII je protein syntetizovaný v játrech. Jeho aktivaci spouští kontakt se subendotelovými strukturami nebo zánětlivé působky. Jeho zvýšenou hladinu najdeme u těhotných žen nebo u žen po menopauze. ^[3] Jeho normální hladina je 50 – 150 % a minimální hemostatická hladina je 20 – 30 %. ^[21, tab. 1]

Faktor XI patří mezi plazmatické glykoproteiny. Jeho aktivace probíhá proteolytickým štěpením. ^[15] Jeho normální hladina je 50 – 150 % a minimální hemostatická hladina je 15 – 20 %. ^[21, tab. 1]

Faktor IX je také glykoprotein syntetizovaný v játrech a jeho syntéza je závislá na vitamínu K. Hraje významnou roli v krevním srážení. Jeho normální hladina je 70 – 120 % a minimální hemostatická hladina je 20 – 30 %. ^[22, tab. 1] Pacienti s hemofilií B mají různě těžký deficit faktoru IX.

Faktor VIII je glykoprotein syntetizovaný v játrech, v menším množství také ve slezině, uzlinách, ledvinách a ve slinivce. Hladina faktoru VIII se zvyšuje u zánětů, stresu a chronických infekcí, jedná se o tzv. bílkovinu akutní fáze. Faktor VIII koluje v plazmě navázan na von Willebrandův faktor. Tato vazba je přerušena v přítomnosti fosfolipidů nebo trombinu. ^[3] Jeho normální hladina je 70 – 150 % a minimální hemostatická hladina je 20 – 30 %. ^[23, tab. 1] Pacienti s hemofilií A mají různě těžký deficit faktoru VIII, dále se deficit FVIII může vyskytovat u závažnějších forem von Willebrandovy choroby.

Tabulka č. 1: Minimální hemostatická aktivita koagulačních faktorů

Faktor	Název	Poločas (hodiny)	Hemostatické minimum
FI	Fibrinogen	72 – 720	0,5 g/L
FII	Protrombin	60 – 96	40 %
FV	Proakcelerin	8 – 24	10 - 15 %
FVII	Prokonvertin	4 – 6	10 %
FVIII	Antihemofilický globulin	8 – 12	20 - 30 %
FIX	Antihemofilický faktor	18 – 30	20 - 30 %
FX	Stuart-Prowerův faktor	30 – 48	20 %
FXI	Rosenthalův faktor	48 – 60	15 - 20 %
FXII	Hagemanův faktor	50 – 70	20 - 30 %
FXIII	Faktor stabilizující fibrin	72 – 160	1 - 2 %

Zdroj: Materiály FN Plzeň

1.6 Přirozené inhibitory

Regulují proces krevního srážení a zabraňují nadměrnému krevnímu srážení. Antitrombin je glykoprotein tvořený v játrech, je hlavním inhibitorem koagulace. Fyziologická hladina je 80 - 120 %. Jedná se o inhibitor serinových proteáz. Nejvíce ovlivňuje trombin a faktor Xa, dále inhibuje IXa, XIa a XIIa. Na faktory se váže pevnou kovalentní vazbou, dojde ke zpomalení procesu krevního srážení. Vrozený nebo získaný nedostatek antitrombinu navozuje hyperkoagulační stav. Heparin vytváří s antitrombinem komplex, čímž mnohonásobně zvyšuje antikoagulační efekt antitrombinu. ^[5]

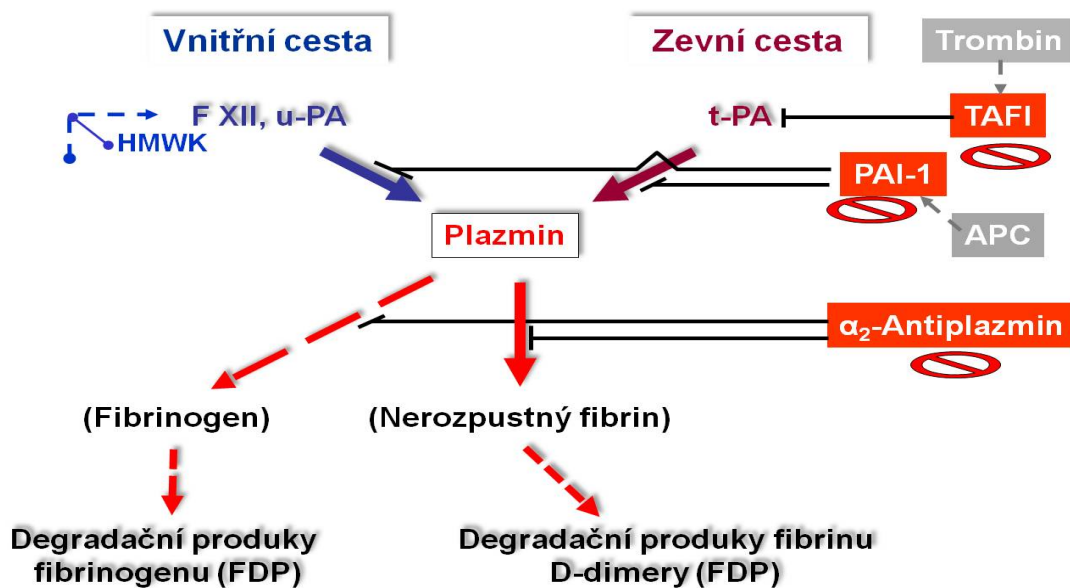
Dalšími inhibitory koagulace jsou protein C a protein S. Protein C se tvoří v játrech. Systém aktivovaného proteinu C spolu s volnou složkou proteinu S štěpí FVIIIa a FVa. Tyto faktory nemají vlastní enzymatickou aktivitu, ale jako kofaktory urychlují tvorbu trombinu. ^[4] Protein S je obsažen v granulech trombocytů. Zhruba 40 % jeho celkového množství koluje volně v krevním oběhu. Další funkcí proteinu S je inhibice aktivity tkáňového faktoru a urychlení fibrinolýzy. ^[3]

1.7 Fibrinolýza

Fibrinolýza je vysoce regulovaný přirozený proces. Zabezpečuje obnovení krevního proudu rozpuštěním koagula. Principem je enzymatické štěpení zasařovaného fibrinu (Fib). Stěžejním enzymem fibrinolýzy je plazminogen. Plazminogen se váže na krevní koagulum a působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (t – PA) z cévního endotelu se aktivuje na plazmin. Plazmin proteolyticky působí na koagulum a nakonec je inaktivován cirkulujícími antiplazminy. Nejmenší štěpný produkt fibrinolýzy je D-dimer. [3, 24]

Přítomnost zvýšeného množství D-dimerů v plazmě je nepřímou laboratorní známkou přítomnosti fibrinového koagula v cirkulaci (nepřímá známka trombózy). [6, 7]

Obrázek č. 2: Schéma fibrinolýzy



Zdroj: <http://pfyziolklin.upol.cz>

2 Hemokoagulační screening

2.1 Vyšetření hemokoagulačního screeningu

Hemokoagulační vyšetření je typ vyšetření, které nám umožňuje komplexně vyšetřit funkčnost koagulačního systému. Zahrnuje vyšetřovací metody, které se používají ke zjištění některých závažných stavů pacienta – vrozené krvácivé stavy, vyloučení možnosti užívání antikoagulační léčby (u akutních stavů), umožňuje monitorování antikoagulační léčby a je součástí předoperačního vyšetření.

Standardně jsou v hemokoagulačním screeningu zahrnuty následující testy: aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT), protrombinový test (PT), trombinový test (TT) a specifické testy stanovení koncentrace fibrinogenu, event. stanovení aktivity antitrombinu. [3]

2.2 Protrombinový test

Protrombinový test (PT) je základní koagulační test, který monitoruje zevní koagulační cestu (FVII, FX, FII, FV a fibrinogen). Měří se koagulační čas po přidání vápenatých iontů k tromboplastinu ve vyšetřované plazmě. Pro zhodnocení tohoto testu využíváme poměr R (PT-R) vypočtený jako podíl času testované plazmy (t_p) a času normálu (t_N). U pacientů léčených deriváty kumarinů slouží k vyjadřování výsledků parametr PT-INR (mezinárodní normalizovaný poměr), který vyjadřuje poměr t_p/t_N stanovený tromboplastinem BCT 67/40 (mezinárodní standarda). Výsledná hodnota INR se pak vypočítá z poměru t_p/t_N umocněnému na ISI (mezinárodní index citlivosti) tromboplastinu používaného v dané laboratoři. Tento způsob vyhodnocování je jednotný v celém světě. [3]

2.3 Trombinový test

Trombinový test (TT) monitoruje tzv. třetí fázi koagulace – tj. štěpení fibrinogenu trombinem na fibrinové monomery. Principem testu je sledování času koagulace po přidání malého množství trombinu k vyšetřované plazmě. Opět se pro hodnocení využívá poměr R (TT-R), což je podíl času testované plazmy a času normálu. Tento test je patologicky prodloužený při poruše štěpení fibrinogenu trombinem, u dysfibrinogenemie, hypofibrinogenemie, dále při léčbě heparinem, vysoké hladině

fibrin-degradačních produktů, při patologických stavech jako je např. mnohočetný myelom, autoimunitní revmatoidní artritida (patologické inhibitory ve vzorku), hypoalbuminémie. [3]

2.4 Stanovení koncentrace fibrinogenu

Nejčastější metodou stanovení koncentrace fibrinogenu je koagulační metoda dle Clause, při které sledujeme koagulační čas po přidání nadbytku trombinu k ředěné vyšetřované plazmě. Výsledek je vyjádřen v jednotkách g/L. Test odhalí patologické stavy hypofibrinogenémii a afibrinogenémii, dysfibrinogenémii, event. zvýšenou koncentraci fibrinogenu. [3]

2.5 Vyšetření antitrombinu

Kvantitativní stanovení funkční aktivity antitrombinu se provádí spektrofotometrickou metodou za přítomnosti chromogenních substrátů. Vyšetřovaná plazma je inkubována při teplotě 37 °C s nadbytkem trombinu nebo FXa v přítomnosti heparinu za vzniku trimerního komplexu. Následně po přidání chromogenního substrátu je stanovena zbytková aktivita trombinu (nebo FXa), která je detekována fotometricky při vlnové délce 405 nm. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech. Snížení inhibiční aktivity antitrombinu představuje zvýšené trombofilní riziko. [3]

Testu APTT je věnována následující kapitola č. 3.

Obrázek č. 3: Schéma vnější a vnitřní cesty koagulace



2.6 Správný odběr vzorku

Aby byly dodrženy podmínky preanalytické fáze, je třeba dbát na správný odběr vzorku krve pro vyšetření hemokoagulace. Při odběru většího množství zkumavek od jednoho pacienta je nutné dodržet správné pořadí odběru. Na vyšetření koagulace se nesmí použít zkumavka odebraná jako první v pořadí. Je zde riziko příměsi tkáňového faktoru z poraněné cévní stěny, což by aktivovalo krevní srážení. ^[8, 9] Paže by při odběru měla být stažena, co nejkratší dobu. ^[10]

Krev se dnes odebírá do jednorázových plastových zkumavek (například od firmy Vacuette). Uvnitř zkumavek je protisrážlivé činidlo a vakuum. Vakuum ve zkumavce zajišťuje správnost odebraného objemu krve a její správný poměr s protisrážlivým činidlem.

Na vyšetření koagulace se odebírá venózní krev nejčastěji z loketní žíly do zkumavky s protisrážlivým činidlem, a to s citrátem sodným (0,109 mol/l) v poměru 1:10 (1 díl citrátu sodného a 9 dílů krve). ^[7] Citrát sodný slouží k vyvázání vápenatých iontů z krve a nahradí je sodnými ionty. Vyvázáním vápenatých iontů dojde k zamezení koagulace. Při odběru je velice důležité zachovat správný poměr krve a protisrážlivého činidla. ^[7]

Při porušení správného poměru krve a protisrážlivého činidla na vyšetření APTT může docházet k naměření falešně patologických výsledků. ^[11] Ihned po odběru musí být krev s protisrážlivým činidlem důkladně promísena. ^[7]

Obrázek č. 4: Zkumavka Vacuette s protisrážlivým činidlem – citrátem sodným



Zdroj: <http://www.dialab.cz/z526-vacuette-9-ml-koagulace>

Na jakékoliv koagulační vyšetření se krev nesmí odebírat ze zavedených kanyl ani ze žilních katetrů, aby nedošlo k naředění krve a tím k naměření nesprávných výsledků.

2.7 Preanalytické chyby

Preanalytické chyby většinou nastávají v době před přijetím vzorku do laboratoře. Preanalytická fáze se týká osoby pacienta, odběru vzorku, transportu, přípravy vzorku na analýzu a uchovávání vzorku. Preanalytické chyby zapříčiněné osobou pacienta rozdělujeme na ovlivnitelné a neovlivnitelné faktory. Mezi ovlivnitelné faktory patří fyzická aktivita, psychický stres, potrava, alkohol a jiné tekutiny, kouření, léky a poloha pacienta při a po odběru krve. Mezi neovlivnitelné faktory patří pohlaví, věk, těhotenství, měsíční cyklické změny a rasová nebo etnická odlišnost.

2.8 Zpracování vzorku

Po příjmu vyšetřované krve následuje její zpracování. Do 2 hodin od odběru se vzorek krve odstředí v centrifuze cca 10 minut při cca 2500 g při 20 °C. Stabilita získané plazmy je 4 hodiny při laboratorní teplotě 15 – 25 °C, ale při monitoraci antikoagulační terapie nefracionovaným heparinem musí být krev centrifugována do 1 hodiny od odběru krve a získaná plazma musí být vyšetřena do 2 hodin. ^[7]

3 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas

Jak už bylo zmíněno v úvodu, dále se práce zabývá už pouze koagulačním testem APTT.

3.1 Historie testu aktivovaného parciálního tromboplastinového času

Princip testu byl navržen v roce 1953. Skupina vědců Brinkhaus, Quick, Warner a Smith vedla výzkum s cílem objevení testu, který umožní detekci hemofilické plazmy (plazma s deficitem faktoru VIII). Výzkum probíhal současně s pokusy o vývoj koncentrátu FVIII. Parciální tromboplastin byl získáván centrifugací syrového králíčího mozku, tento proces totiž umožnil snížit koncentraci tkáňového faktoru v reakční směsi.

V roce 1961 Samuel I. Rapaport a R. R. Proctor test zdokonalili přidáním kaolinu. V takto modifikovaném testu byla optimalizována kontaktní fáze koagulace. Metoda dostala dnešní název APTT neboli aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT – activated parcial tromboplastine time).^[7]

Test APTT následně umožnil detekci řady koagulačních faktorů a objasnil jejich interakce při tvorbě trombinu a fibrinu. Používání APTT se v klinické praxi plně rozšířilo poté, co farmaceutické firmy začaly nabízet komerční kity pro jeho rutinní stanovení. Tento test byl zařazen mezi screeningová vyšetření pro odhalení pacientů s vrozenými a získanými hemoragickými onemocněními.

3.2 Význam testu aktivovaného parciálního tromboplastinového času

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas se řadí mezi základní skupinové koagulační testy. Slouží ke kontrole koagulačních dějů v rámci „vnitřní cesty“ – tj. od aktivace faktorů kontaktní fáze po finální aktivaci protrombinu a tvorbu fibrinového vlákna.^[7]

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas sleduje čas tvorby fibrinu a vypovídá o množství a funkčnosti jednotlivých faktorů - prekalikreinu, HMWK, faktoru XII, XI, IX, VIII ale i faktoru X, II, V a fibrinogenu. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas patří mezi nejrozšířenější testy, které umožňují vyšetření koagulačních abnormalit. Odchytky ve výsledku APTT testu neukazují na jasnou příčinu, ale napomáhají určit lékaři diagnózu.

3.3 Vyjadřování výsledku

Možnosti vyjádření výsledků:

- Naměřený čas je závislý na typu reagentie.

Fyziologické hodnoty: APTT-t 28 – 45 s (sekund)

- V praxi se vydává poměr APTT-R, který se vyjadřuje jako poměr času vyšetřované plazmy a času normálu (APTT-N). Tento krok umožňuje porovnání výsledků mezi různými laboratořemi, které pracují s rozdílnými reagentiemi.
- Fyziologické hodnoty APTT-R: 0,8 - 1,2

4 Prodloužený test aktivovaného parciálního tromboplastinového času

Fyziologicky prodloužený čas APTT můžeme pozorovat u novorozenců z důvodu nezralého jaterního parenchymu a relativního nedostatku vitamínu K.

4.1 Patologické příčiny prodlouženého APTT

- Deficit FVIII, FIX, FXI, FXII.
- Deficit faktorů kontaktní fáze.
- Antikoagulační léčba.
- Lupus antikoagulans.
- Získaný inhibitor koagulačních faktorů.

4.2 Deficit koagulačních faktorů

Patologicky prodloužené APTT pozorujeme u deficitu některého z faktorů „vnitřní“ cesty koagulace (faktor VIII, IX, XI, XII) nebo u deficitů faktorů kontaktní fáze jako jsou prekalkrein a HMWK. U lehkých deficitů může být APTT v normě (zhruba do 60 %). Cílem testu je zachytit všechny středně těžké a těžké deficity koagulačních faktorů.

Deficity faktorů mohou být vrozené nebo získané. Klinicky se projevují prodloužením času vzniku koagula, tj. patologickým prodloužením testu.

Hemofilie je dědičná porucha krevní srážlivosti, která je charakterizovaná deficitem faktoru VIII (hemofilie A) nebo deficitem faktoru IX (hemofilie B). Častější je hemofilie A, tvoří zhruba 85 %. V České republice je výskyt hemofiliků 10 případů na 100 tisíc obyvatel. ^[28]

Gen pro FVIII a FIX je vázán na chromozom X, jedná se tedy o onemocnění s gonozomálně recesivní dědičností. Hemofilie má tři stupně závažnosti. Její závažnost se určuje podle aktivity koagulačního faktoru. Deficit faktoru XI je někdy označován jako hemofilie C. ^[25]

Získané deficity koagulačních faktorů (i antitrombinu) jsou nejčastěji vidány u pacientů s jaterním onemocněním, kde narušení syntézy vede ke globálním poruchám v koagulačním systému. Tito pacienti mohou mít jednak trombocytopenii, prodloužení testu APTT i PT, sníženou hladinu fibrinogenu i antitrombinu. Další příčinou může být

nedostatek vitamínu K vedoucí k defektní syntéze koagulačních faktorů FII, FVII, FIX, FX. Nedostatek vitamínu K je nejčastěji farmakologicky navozený u pacientů užívajících kumarinové deriváty, dále se vyskytuje u onemocnění s porušenou resorpcí živin (zejm. tuků).

4.3 Vyšetření aktivity koagulačních faktorů vnitřní cesty

Pokud z výsledků screeningových vyšetření pomýšlíme na deficit koagulačních faktorů, následuje stanovení jejich aktivity. Ke stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů se v tomto případě používá koagulační jednofázová metoda na bázi APTT. Vyšetřovaná plazma se smíchá s faktor deficitní plazmou, která obsahuje ostatní koagulační faktory v nadbytku. Výsledky koagulační aktivity se odečtou z kalibrační křivky, která odráží závislost koagulačních časů na procentu normální koagulační aktivity. Výsledky se vyjadřují v procentech. Jako druhou možnou metodu lze ke stanovení aktivity koagulačních faktorů použít chromogenní metodu.

4.4 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas při antikoagulační léčbě

Při monitoraci antikoagulační léčby heparinem je test APTT významně prodloužený. Terapeutickým cílem je prodloužit APTT-R na hodnotu 2 - 3.

Test APTT je prodloužený při užívání kumarinových preparátů z důvodu snížené koagulační aktivity faktorů IX, X a II. Test se neuvádí k monitoraci léčby, pro tyto účely slouží protrombinový test a z něj odvozený INR.

Test APTT neslouží ke kontrole léčby nízkomolekulárním heparinem (LMWH). Pro tyto účely slouží stanovení aktivity anti-Xa (LMWH).

Mezi moderní antikoagulancia dnešní doby se řadí přímý inhibitor trombinu rivaroxaban (Xarelto), edoxaban (Lixiana), apixaban (Eliquis), atd.. Souhrnně se označují pojmem DOAC (Direct Oral Anticoagulans).^[12] Test APTT není vhodný pro posouzení účinnosti léčby tímto typem preparátů. V testu typu APTT je dostačující pouze 3 % zbytková aktivita trombinu a z tohoto důvodu testy vůbec neodpovídají skutečnému stavu in vivo. Čas APTT může vyjít nepředvídatelně prodloužený nebo i zcela normální. Z toho vyplývá podcenění rizika krvácení u pacientů. Pro monitorování léčby DOAC slouží speciálně navržené testy.^[30]

5 Lupus antikoagulans a specifické inhibitory koagulačních faktorů

5.1 Co je to lupus antikoagulans

Lupus antikoagulans (LA) je souhrnný název pro stav, při kterém se v krvi vyskytují antifosfolipidové protilátky, které se vážou na struktury fosfolipidových membrán. Fosfolipidy tvoří základní stavební kámen buněčných membrán. Antifosfolipidové protilátky jsou protilátky namířené proti negativně nabitým fosfolipidům (fosfatidylserin, β_2 -glykoprotein, annexin V, atd.). Protilátky jsou třídy IgM, IgG a IgA.

Membrána krevních destiček obsahuje fosfolipidy, které mají stěžejní úlohu v procesu koagulace. Aktivací krevních destiček dojde k transmembránovému přesunu, při kterém se obnažují negativně nabitě fosfolipidy. Negativně nabitě fosfolipidy pak poskytují svůj reakční povrch pro kaskádovité aktivace koagulačních faktorů.

Mezi antifosfolipidovými protilátkami a koagulačními faktory dochází k soutěžení o vazebné místo na negativně nabitých fosfolipidech. Lupus antikoagulans není namířen proti specifickému koagulačnímu faktoru, není spojen se zvýšeným rizikem krvácení. Naopak jeho přítomnost je považována za trombofilní stav.

5.1.1 Vyšetření panelu lupus antikoagulans

Plazma k vyšetření na LA se zpracovává dvojitou centrifugací. Tento proces umožní snížení koncentrace fosfolipidů. Mluvíme pak o tzv. bezdestičkové plazmě. Vzorek krve se centrifuguje 10 min při cca 2550g (4000 ot./min. při 20 °C). Plazma ze všech primárních odběrových zkumavek se centrifuguje podruhé 10 min při cca 2550g (4000 ot./min. při 20°C). Získaná plazma ze všech primárních odběrových zkumavek se sesaje do označených plastových zkumavek a poté se centrifuguje podruhé 10 min při cca 2550g (4000 ot./min. při 20°C).

Takto zpracovaná plazma je stabilní při teplotě 2 - 8 °C po dobu 4 hodin, pro pozdější stanovení je rozpipetována do označených mikrozkušavek a uchovávána v hlubokomrazicím boxu při teplotě -70 až -80 °C. Tato plazma se musí vyšetřit do 6 měsíců.

5.1.2 Laboratorní testování lupus antikoagulans

Problematika testování lupus antikoagulans je velmi komplikovaná, nebyla předmětem zadání bakalářské práce, věnuji se jí proto jen okrajově.

Přítomnost lupus antikoagulans nám potvrdí speciální testy. V laboratorní diagnostice LA se využívá koagulačních testů, které jsou závislé na fosfolipidech. Test je založený na vlastnostech antifosfolipidových protilátek, které tyto testy prodlužují. Neexistuje žádný screeningový test, který by 100 % odhalil přítomnost LA. V diagnostice se proto využívá minimálních kritérií. Test musí být prováděn z bezdestičkové plazmy.

V rámci screeningových testů na LA se používají testy závislé na fosfolipidech, které jsou citlivé na LA. Mezi takové testy řadíme dAPTT, dRVVT, dPT a kaolinový čas. Test dRVVT (dilute Russel viper venom time) je test s hadím jedem ze zmije Russelovy. Tento jed přímo aktivuje faktor X za přítomnosti fosfolipidů a Ca^{2+} .^[12]

V případě pozitivity screeningového testu dRVVT následují konfirmační testy, které jsou založené na zvýšené koncentraci fosfolipidů.

5.2 Prodloužení testů aktivovaného parciálního tromboplastinového času i protrombinového času

Prodloužení obou testů vypovídá o deficitu některého z faktorů společné cesty (FX, FII, FV nebo fibrinogenu). Příčinou může být jaterní dysfunkce, porušené vstřebávání vitamínu K nebo snížená proteosyntéza.

U pacientů léčených kumarinovými preparáty (např. Warfarin), které antagonizují vitamín K, dochází k defektní syntéze faktorů II, VII, IX a X, což se projeví prodloužením zejména PT, ale i APTT.

Další příčinou může být zvýšená spotřeba koagulačních faktorů v případě diseminované intravaskulární koagulopatie. Dále bývají oba testy patologicky prodloužené po masivních krevních transfuzích (tzv. diluční koagulopatie). Při trombolytické léčbě dochází ke snížení hladiny fibrinogenu, což rovněž vede k prodloužení obou testů.^[12]

5.3 Patologicky zkrácený aktivovaný parciální tromboplastinový čas

Zkrácený čas APTT je stav odrážející hyperkoagulační naladění pacienta. Zkrácení testu APTT může být způsobeno zvýšenou hladinou faktoru VIII, IX, XI, XII, fibrinogenu. Tento stav se může vyskytovat u pacientů s nádorovým onemocněním, u infarktu myokardu, u diabetu mellitu nebo např. u hyperfunkce štítné žlázy.

Častou příčinou patologicky zkráceného testu APTT je preanalytická chyba. Může být způsobena obtížným odběrem vzorku nebo chybnou manipulací či skladováním. V případě zkráceného APTT testu je vhodný kontrolní náběr, aby preanalytické chyby mohly být vyloučeny. ^[12]

5.4 Panel patologického aktivovaného parciálního tromboplastinového času

U vzorků s prodlouženým APTT je nutné ověřit, zda pacient neužívá antikoagulační léky. Informace o užívání antikoagulační léčby by správně měla být uvedena na žádance. U pacienta, který nemá žádnou antikoagulační léčbu, se pak přistupuje k provedení korekčního testu, kdy se smíchá pacientova plazma s poolovanou normální plazmou v poměru 1:1. Opět se měří APTT. Pokud dojde ke zkrácení času APTT na normální hodnoty, hovoříme o tzv. korekci APTT a pomýšlíme na možný deficit faktorů XII, XI, IX, VIII.

Pokud korekce neproběhne, může prodloužení způsobit lupus antikoagulans (LA). Je vhodné metodu zkombinovat s vyšetřením na reagentii, která není citlivá k přítomnosti LA (např. test APTT-aktin). Tento test obsahuje fosfolipidy rostlinného původu, tudíž není ovlivněn přítomností LA. Vyjde-li tento test v normě, je vzorek suspektní z přítomnosti LA. Jeho přítomnost pak potvrdíme panelem speciálních testů. Pokud vyjde test APTT-aktin prodloužený, je třeba vyloučit deficit koagulačních faktorů. ^[12]

5.5 Směsná normální plazma a její využití v klinických laboratořích

Poolovaná (směsná) normální plazma používaná v klinických laboratořích může být komerčního původu nebo si ji připravuje sama laboratoř. Laboratoř ve FN Plzeň si směsnou normální plazmu připravuje šaržovitě dle standardního operačního postupu, a to smícháním plazmy od 10 vybraných dárců. Vybrané dárce tvoří skupina zdravých lidí

bez rozdílu pohlaví či věku s neporušenou hemokoagulací. Jejich plazma se vyšetřuje screeningovými koagulačními testy. Směsná normální plazma (NVN – nefiltrovaný vlastní normál) se v laboratoři využívá především u rutinních koagulačních testů APTT, PT, TT, APTT-aktin ke stanovení poměrů R, dále se používá k provádění korekčních testů APTT, PT, ke kvantifikaci specifických inhibitorů FVIII a FIX a v poslední řadě také k interní kontrole kvality rutinních koagulačních testů jako neatestovaná kontrola. S každou novou šarží reagentie je třeba nastavit do LIS (laboratorní informační systém) a do koagulometru nové rozmezí pro danou šarží NVN.

5.6 Screeningové vyšetření inhibitoru koagulačních faktorů

Inhibitor koagulačního faktoru VIII je nejčastěji se vyskytujícím inhibitorem koagulačních faktorů. Známkou podezření na přítomnost specifického inhibitoru je prodloužení hodnoty APTT až na hodnoty 80 - 100 sekund, resp. poměr APTT-R 2 - 3.

Pokud se prodloužený čas APTT normální plazmou nekoriguje, test APTT-aktin je prodloužený a hodnoty protrombinového i trombinového testu jsou v normě, je třeba indikovat další potřebná vyšetření a testy. Jedná se především o směsné testy, které slouží k průkazu inhibitoru a odlišení od deficitu faktorů vnitřní cesty koagulační kaskády. U směsi plazmy pacienta a normální směsné plazmy v poměru 4:1, 1:1, 1:4 se provede stanovení APTT před a po 2 hod inkubaci při 37 °C. Na rozdíl od deficitu faktoru nelze koagulační odchylku korigovat dodáním normální směsné plazmy a tento fakt je ještě více patrný při inkubaci, jelikož specifická inhibiční protilátka proti faktoru VIII je časově závislá. Pokud je rozdíl časů APTT před a po inkubaci větší než 8 sekund, je ve vyšetřovaném vzorku inhibitor přítomen.

5.7 Vyšetření specifity inhibitoru

Dalším krokem je stanovení hladiny faktoru VIII. Výrazný pokles funkční aktivity koagulačního faktoru je způsoben přítomností specifického inhibitoru. Snížená hodnota koagulační aktivity je často pod 1 %, může být i nedetekovatelná. Relativně často se vyskytuje inhibitor při středně nízké hladině FVIII mezi 1 - 5 %. K vyšetření se používá deficitní plazma s příslušným faktorem. Vyšetření je založeno na jednofázové metodě na principu APTT. ^[12]

5.8 Kvantifikace inhibitoru

Ke stanovení množství inhibitoru se využívá schopnosti vyšetřované plazmy inhibovat známé množství koagulačního faktoru. Nejčastěji se používá Bethesda metoda, která umožňuje stanovit zbytkovou aktivitu koagulačního faktoru po inkubaci vyšetřované plazmy s normální plazmou. K vyjádření kvantifikace inhibitoru se používají Bethesda jednotky (BU). 1 BU/ml plazmy odpovídá 50 % zbytkové aktivity faktoru po 2 hodinové inkubaci s normální plazmou při 37 °C.

6 Fyzikální principy měření koagulačních metod

6.1 Možnosti stanovení

Reakce v testu APTT je ukončena vznikem koagula. Vzniklé koagulum můžeme detekovat opticky, magneticky nebo elektricky.

V laboratořích se používají ke stanovení koagulometry, které pracují na základě optického nebo mechanického systému.

6.2 Mechanický způsob měření

Mechanické koagulometry dnes pracují na principu detekce koagula pomocí kuličky. Při vyšetřování koagulace vzrůstá viskozita plazmy. Nárůst viskozity se měří pohybem ocelové, nerezové kuličky, která se pohybuje mezi dvěma drážkami v kyvetě s plazmou. Kulička je rozpohybovaná vlivem elektromagnetického pole, které na kuličku působí z obou stran. Po přidání startovací reagentie se nastartuje koagulace, viskozita plazmy se začne zvyšovat a to má vliv na pohyblivost kuličky a oscilační amplituda kuličky se tím sníží. Tohoto jevu se využívá při měření koagulačního času. [14]

Mezi mechanické analyzátoři patří například STA-R Evolution a SStart 4 (Diagnostica Stago).

6.3 Optický způsob měření

Optické koagulometry jsou vybaveny světelným paprskem, který prochází kyvetou s vyšetřovanou krví a ta propouští paprsek podle hustoty media.

Optické koagulometry fungují na nefelometrickém nebo turbidimetrickém principu. V obou případech se vyšetřuje zakalení testovaného systému, ke kterému dochází při tvorbě koagula. U nefelometrického principu je světelným zdrojem žárovka nebo laser. Měří se rozptýlení světelného toku pod úhlem 45° nebo 90°.

Turbidimetrický princip využívá jako zdroj wolframovou žárovku, kde se měří úbytek světelného toku. Měření probíhá při 405 nm nebo 671 nm. U obou způsobů se využívá monochromatické světlo, které prochází kyvetou se vzorkem. Kyveta odráží nebo propouští jen určité množství záření. Měří se snížení optické hustoty po vytvoření

fibrinového vlákna nebo koagula. Neměří se přímo vzniklé koagulum, ale změna prošlého záření.

Tato metoda má svá omezení zejm. u primárně zakalených vzorků – tj. u vzorků se zvýšenou chylozitou, iktericitou či hemolýzou. Chylózní plazma obsahuje vysokou koncentraci lipoproteinů a chylomikronů. Tyto částice zeslabují intenzitu světelného paprsku, který kyvetou prochází. Velké lipidové částice mohou být z plazmy odstraněny ultracentrifugací, což přináší riziko nežádoucího snížení koncentrace velkých molekul (fibrinogenu, FVIII/von Willebrandova faktoru).

Mezi optické koagulometry patří např. ACL TOP 500, ACL TOP 700 nebo ACL TOP 750.

Praktická část

Cílem mé práce je najít a definovat parametry, dle kterých můžeme vybrat optimální reagentii pro screeningové koagulační testy. Výběr vhodné reagentie jsem demonstrovala konkrétně na APTT testu, který patří mezi stěžejní screeningové testy.

Cílem práce je najít takovou reagentii, která bude citlivá k nedostatku jednotlivých koagulačních faktorů a takovou, která umožní monitoraci léčby heparinem, odhalí vzácné případy získaných inhibitorů koagulačních faktorů a bude umožňovat záchyt vzorků s lupus antikoagulans. Pro práci v laboratoři je dále důležitá snadná reprodukovatelnost výsledků, možnost mezipřístrojového porovnání a možnost správně změřit problematické vzorky (zejm. vzorky s vysokou chylozitou). Zároveň jsem ověřovala stabilitu diagnostik uváděnou výrobcem v příslušných příbalových letáčích.

Pro posouzení vhodnosti dané reagentie jsem porovnávala výsledky měření APTT pomocí dvou typů reagentií. Měření bylo prováděno na mechanickém a optickém typu analyzátoru.

Způsob výběru optimální reagentie budu rozebírat na několika souborech pacientů. V první skupině je zařazeno celkem 21 pacientů, kteří měli normální hodnotu APTT (APTT-R 0,8 – 1,2). Ve druhé skupině je zařazeno 29 pacientů, kteří měli hodnotu poměru APTT-R nad 1,2. Vzorky u obou skupin byly vybrány po změření na analyzátoru STA-R Evolution s reagentií PTT Automate.

Do třetí skupiny jsem zařadila 10 pacientů s vysoce chylózní plazmou, opět jsem porovnávala výsledky měření na dvou typech analyzátorů s rozdílnými reagentiemi. Tento soubor byl vytvořen ze zamražených vzorků uchovaných pro účely mezipřístrojové kontroly.

V poslední části mé práce využívám již naměřených hodnot APTT v rámci mezilaboratorního srovnávání. Měření proběhlo nejprve v hematologických laboratořích ÚKBH FN Plzeň, poté v hematologické laboratoři FN Olomouc. Výsledky byly porovnávány a graficky vyhodnoceny.

Pro porovnávání byla použita metoda regresní analýzy. Pro konkrétní případy je vždy uvedena charakteristika souboru a dále typ přístroje a reagentie, na kterých byly vzorky naměřeny.

7 Princip testu aktivovaného parciálního tromboplastinového času

Plazma chudá na destičky se smísí s povrchovým aktivátorem a fosfolipidy. Povrchový aktivátor se přidává k urychlení aktivace a může jim být např. kaolin, kyselina ellagová, křemičitany, sulfamidy kombinované s kaolinem nebo polyfenoly. Směs se inkubuje při 37 °C zpravidla po dobu 180 sekund, následuje přidání startovací reagensu s vápenatými ionty. Měříme čas, který uplyne do vytvoření prvního fibrinového vlákna. V současné době se pro stanovení APTT používají plně automatické metody.

7.1 Test aktivovaný parciální tromboplastinový čas - aktin

V panelu patologického APTT hraje kromě korekčního testu důležitou roli test APTT bez citlivosti k LA.

Tento test může sloužit jako screeningový, umožňuje sledovat aktivitu koagulačních faktorů vnitřní cesty (FVIII, FIX, FXI a FXII), event. přítomnost heparinu. Není citlivý k přítomnosti LA, čehož se využívá v panelu patologického APTT. Jednotkou testu APTT – aktin jsou sekundy. Hodnota R se vypočítává z poměru času plazmy pacienta a času normálu. Hodnota normálu APTT – aktin (APTT – aktin N) se získává jako průměrná hodnota času APTT – aktin z deseti výsledků testu pro normální směsnou plazmu neboli NVN. Příprava NVN je popsána v kapitole „Směsná normální plazma a její využití v klinických laboratořích“.

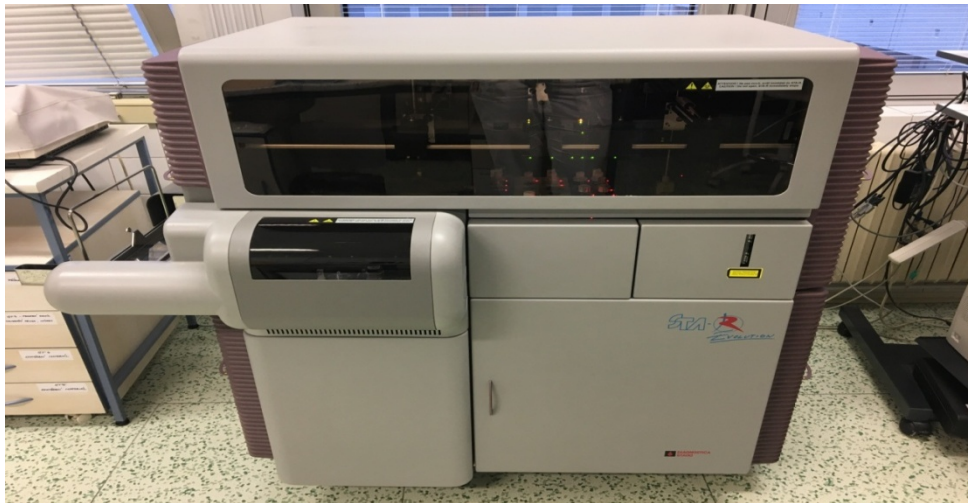
8 Koagulometry použité pro vlastní měření

8.1 Analyzátor STA-R Evolution

Hematologická laboratoř ve FN Plzeň na Lochotíně používá k vyšetření srážlivosti krve koagulometr STA-R Evolution od výrobce Diagnostica Stago. Výrobní číslo tohoto analyzátoru je 7092609 a do provozu byl uveden 14. 12. 2007. Tento analyzátor pracuje na mechanickém principu měření. Měří se odchylka oscilační amplitudy kuličky. Při stejné viskozitě se kulička houpe stále kyvadlově. Toto je způsobeno dvěma zahnutými kolejničkami na dně kyvet a elektromagnetickému poli, které se střídavě vytváří na obou stranách měřicí hlavy. Tímto je způsobeno další houpání do změny viskozity. Frekvence pole je stejná jako vlastní oscilační frekvence kuličky. Toto umožňuje velmi vysokou citlivost analyzátoru. V průběhu koagulačního děje dochází k nárůstu viskozity, amplituda pohybu kuličky se tedy zmenšuje v důsledku tvorby koagula. Algoritmus určující dobu srážení využívá změny amplitudy.

Obrázek č. 5: Analyzátor STA-R Evolution

STA-R Evolution



Zdroj: vlastní pořizení fotografie

Pro měření APTT na analyzátoru STA-R Evolution v Plzni na Lochotíně jsem použila reagentii APTT-SP s exp. 31. 07. 2019 a šarží 252992. Kontroly jsem použila také od výrobce Diagnostica Stago s exp. 28. 02. 2019 a šarží 251778. Hodnota APTT-N (normál) byla 32 sekund.

8.2 Analyzátor ACL TOP 700

Hematologická laboratoř ÚKBH ve FN Plzeň na Borech používá k vyšetření srážlivosti krve ACL TOP 700 od výrobce Siemens. Výrobní číslo tohoto analyzátoru je 050203082 a do provozu byl uveden 30. 05. 2008.

ACL TOP 700 je plně automatický analyzátor. Tento analyzátor je určen pro vyšetření rutinních i speciálních koagulačních testů. Z těchto naměřených údajů, pak analyzátor vypočítává další potřebné údaje. Měření může probíhat koagulační a chromogenní metodou. Nedílnou součástí analyzátoru je počítač a tiskárna. ^[27]

Obrázek č. 6: Analyzátor ACL TOP 700

ACL TOP 700



Zdroj: vlastní pořizené fotografie

Pro měření APTT na analyzátoru ALT TOP 700 v Plzni na Borech jsem použila reagensii APTT-SP s exp. 30. 11. 2018 a s šarží N1166070. Kontroly jsem použila také od výrobce Diagnostica Stago s exp. 30. 09. 2019 a šarží N0965309. Měřené vzorky byly odebrané 02. 01. 2018. Hodnota APTT-N (normál) byla 28,2 sekund.

8.3 Analyzátor STart 4

V hematologické laboratoři FN Plzeň Bory najdeme také analyzátor STart 4 od výrobce Diagnostica Stago. Tento analyzátor byl uveden do provozu dne 06. 02. 2008. Výrobní číslo analyzátoru je BT3 7066829. Na poloautomatickém koagulometru STart 4 lze současně provádět metody ve čtyřech měřicích kanálech. Tento analyzátor je

vhodný pro vyšetření rutinních koagulačních testů. Neumožňuje však provádění chromogenních metod. Princip měření je založen na detekci změny viskozity koagula. Změna viskozity se sleduje pomocí pohybu kovové kuličky umístěné v kyvetě. Kyveta má na svém dně dvojí zakřivení (v příčném i podélném směru). Pohyb kuličky v kyvetě umožňuje elektromagnetické pole, které je tvořeno střídavě na straně měřicí jamky díky dvou nezávislým cívkám.

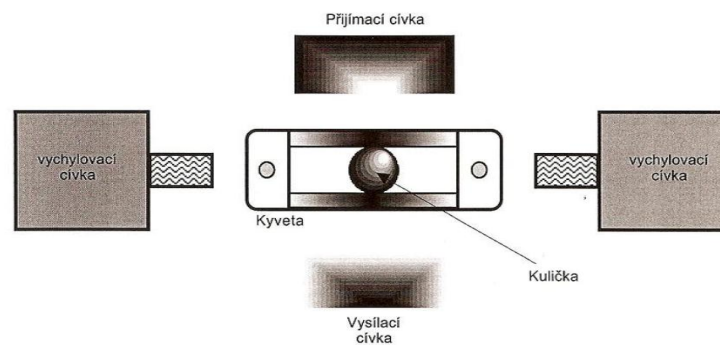
Obrázek č. 7: Analyzátor SStart 4

SStart 4



Zdroj: vlastní pořízení fotografie

Obrázek č. 8: Schéma analyzátoru SStart 4



Zdroj: Manuál k analyzátoru SStart 4

9 Reagencie

9.1 Reagencie pro test aktivovaného parciálního tromboplastinového času

K vyšetření APTT testu se dnes používají komerčně vyráběné reagencie rozdílného složení od různých farmaceutických firem. Součástí každého komerčně vyráběného setu je aktivátor, který se používá k urychlení reakce. Na trhu jsou dostupné fosfolipidy rostlinného, živočišného nebo syntetického původu. Druh použitých fosfolipidů ovlivňuje citlivost reagentie k lupus antikoagulans, heparinu nebo deficitům koagulačních faktorů.

Reagencie dále obsahuje kalciové ionty v $0,025 \text{ M}^4 \text{ CaCl}_2$, který se obvykle dodává s reagentií APTT v komerčním setu.

Od reagentie pro vyšetření APTT se očekává, že bude citlivá k deficitům jednotlivých faktorů, k přítomnosti heparinu, zachytí inhibitory koagulačních faktorů. Samozřejmostí je v dnešní době požadavek na vysokou stabilitu reagentie a jednoduchou manipulaci s ní.

Laboratoře se musí řídit požadavky na kvalitu a způsobilost dle České technické normy „Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost“ ČSN EN ISO 15189:2012 – viz. kapitola 5.3 Laboratorní zařízení, reagentie a spotřební materiály.

Analyzátoři jsou schopni pracovat v tzv. otevřeném systému, což znamená, že jsou schopni pracovat s reagentiemi od různých výrobců. Otevřený systém znamená, že vybranou reagentií je možné použít pro stanovení APTT na mechanickém, ale i optickém koagulometru. Správnost výsledků je pravidelně ověřována systémy interních i externích kontrol kvality.

Tabulka č. 2: Přehled dostupných reagensů pro APTT test na trhu v ČR

Název reagensie	Výrobce	Fosfolipidy	Aktivátor
STA Cephascreen	Diagnostica Stago	kefalin - živočišný původ	oxid křemičitý
PTT Automate 10	Diagnostica Stago	kefalin - živočišný původ	oxid křemičitý
APTT-SP (liquid)	Instrumentation Laboratory	syntetické	křemičitany
SynthASil (APTT-SS)	Instrumentation Laboratory	syntetické	koloidní roztok siliky
SynthAFax	Instrumentation Laboratory	syntetické	kyselina ellagová
APTT-Pathromtin SL	Siemens Healthcare	rostlinné	oxid křemičitý
APTT Actin FS	Siemens Healthcare	rostlinné	kyselina elagová

Tabulka č. 3: Specifika reagensů pro vyšetření APTT a srovnání jejich stability

Název reagensie	Rozdílnost	Stabilita při 2 – 8°C	Stabilita při 15°C
STA Cephascreen	není prodloužení při deficitu prekalikreinu		7 – 10 dní dle typu analyzátoru
PTT Automate 10		7 dní	24 dní při t 20 ± 5 °C
APTT-SP (liquid)	zvýšená citlivost k LA	30 dní	5 dní
SynthASil (APTT-SS)		30 dní	3 dny
SynthAFax	není jasná citlivost k LA	30 dní	3 dny
APTT-Pathromtin SL	není jasná citlivost k LA	14 dní při t 25-25 °C	
APTT Actin FS	není citlivost k LA	7 dní při t 2-15 °C	

Zdroj pro tabulku 2 a 3: Příbalové letáky reagensů

Hlavním rozdílem reagensů je původ fosfolipidů a jejich aktivátorů. Mezi reagensy s nízkou citlivostí k lupus antikoagulans patří např. APTT Actin FS

s rostlinnými fosfolipidy. Jediná reagentie, u které výrobce deklaruje zesílenou citlivost k lupus antikoagulans je APTT-SP.

Obecně lze říci, že v mém přehledu převažují diagnostika se syntetickými fosfolipidy. Diagnostika obsahující živočišné fosfolipidy a rostlinné fosfolipidy jsou v menšině. Diagnostika s fosfolipidy rostlinného APTT aktin a APTT-Pathromtin SL nejsou vhodná pro záchyt přítomnosti lupus antikoagulans.

Obrázek č. 9: Reagentie používané ve FN Plzeň Lochotín



Zdroj: vlastní pořizeni fotografie

Celková definice souboru

Vzorky byly vybrány z denního souboru pacientů měřených na Lochotíně. Po jejich změření jsem vzorky očíslovala, jejich plazmu sesála do zkumavek Eppendorf a bezprostředně je zamrazila v rámci preanalytické fáze. Následně jsem je převezla ve vychlazené termosce s ledem do laboratoře na Borech. Zde jsem je rozmrazila ve vodní lázni při 37,1 °C a přeměřila je.

Soubor pacientů s normálním APTT v rozmezí APTT-R 0,8-1,2 tvoří 21 jedinců (12 mužů a 9 žen), medián věku této skupiny je 57,5 let. 4 pacienti byli léčeni LMWH, 1 byl warfarinizován, 1 vzorek byl označen jako hemolytický.

Soubor pacientů s prodlouženým APTT (APTT-R nad 1,2) tvoří 29 jedinců (17 mužů a 12 žen), medián věku 65,5 let. 10 pacientů bylo léčených LMWH, 6 pacientů užívalo Warfarin, 1 pacient byl léčený heparinem.

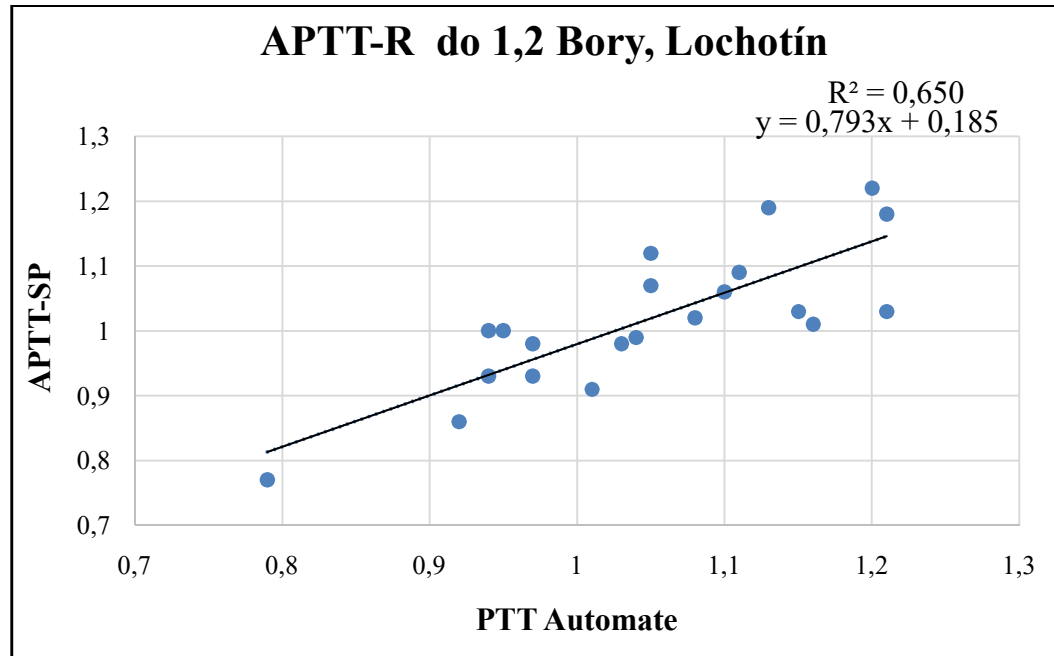
Pro měření APTT na analyzátoru STA-R Evolution v Plzni na Lochotíně byla použita reagentie PTT Automate 10 (šarže 252992, exp. 31. 07. 2019) a kontrolní materiál STA Coag Control N+P (šarže 251778, exp. 28. 02. 2019 – od výrobce Diagnostica Stago). Hodnota normálu APTT-N pro výpočet poměru R byla 32 s.

Pro měření APTT na analyzátoru ACL TOP 700 v Plzni na Borech jsem použila reagentii APTT-SP (šarže N1166070, exp. 30. 11. 2018) a kontrolní materiál IL-N (šarže N0965309, exp. 30. 09. 2019) od výrobce Instrumentation Laboratory. Měřené vzorky byly odebrané 02. 01. 2018. Hodnota normálu APTT-N byla 28,2 s.

Soubor pacientů s normálními hodnotami APTT-R

Naměřené hodnoty viz. příloha č. 1 (tabulka č. 4).

Graf č. 1: Regrese APTT-R s hodnotami 0,8 – 1,2, měřené na Lochotíně a Borech



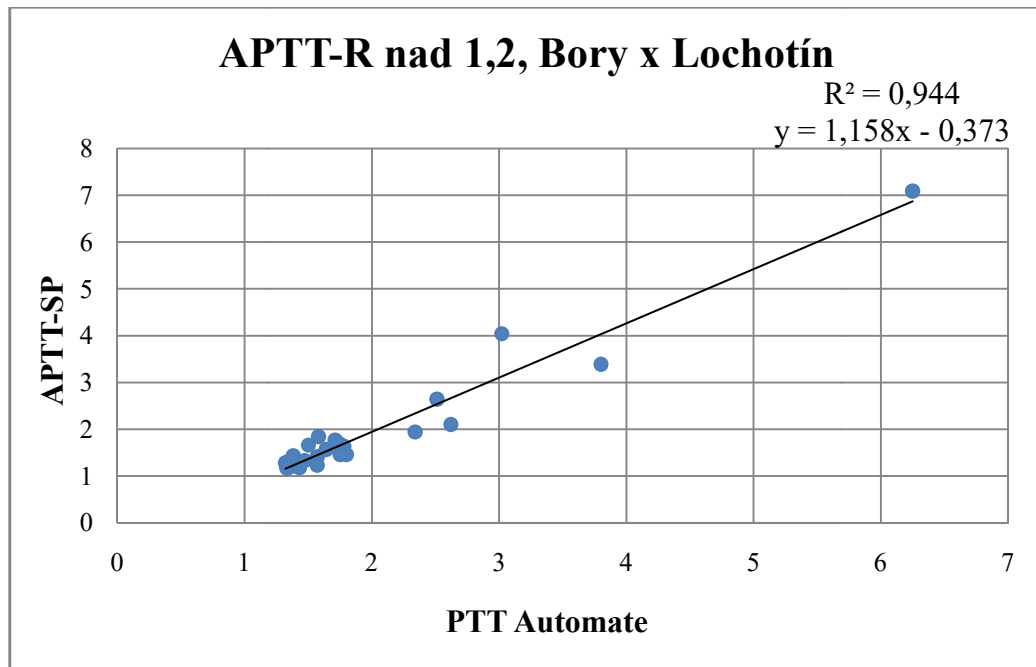
Zdroj: vlastní

Regresní koeficient v tomto grafu svědčí pro poměrně malou shodu výsledků, přesto po podrobné analýze naměřených hodnot lze říci, že pokud APTT-R na reagentii PTT-Automate bylo v normě, tak i po přeměření pomocí APTT-SP se tato hodnota výrazněji neodchýlila a byla také v normálním rozmezí.

Soubor pacientů s prodlouženými hodnotami APTT-R

Naměřené hodnoty viz. příloha č. 2 (tabulka č. 5).

Graf č. 2: Regrese APTT-R s prodlouženými časy, měřené na Lochotíně a Borech



Zdroj: vlastní

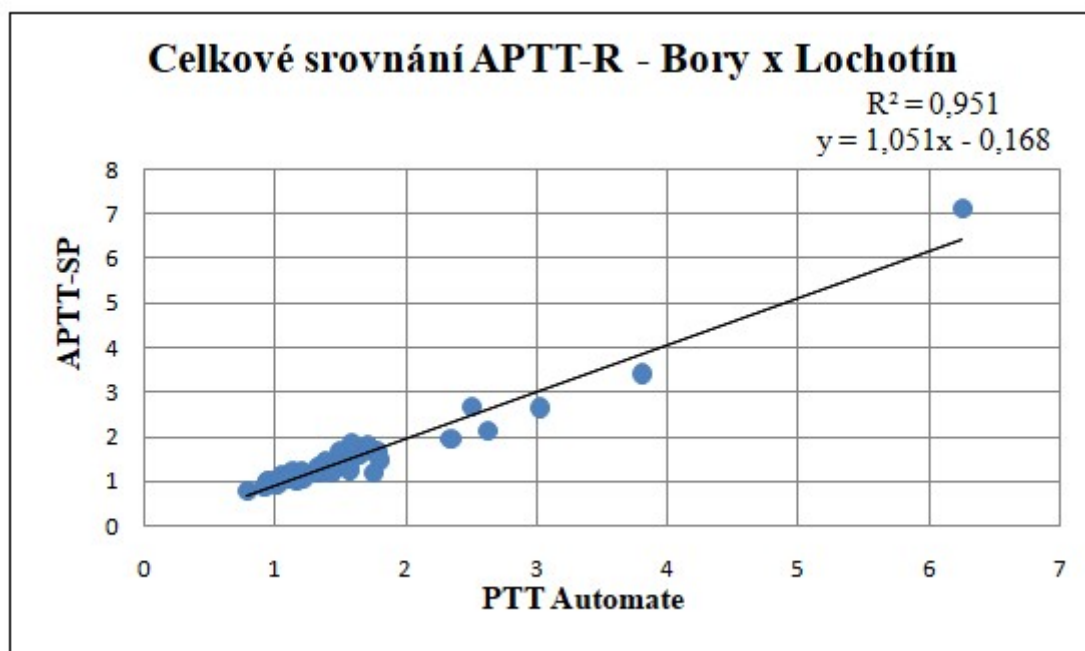
V případě souboru s hodnotami APTT-R nad 1,2 je shoda významně vyšší. Pro laboratorní i klinickou praxi je důležité, aby právě patologické hodnoty vycházely s různými použitými reagensy shodně.

Celkové srovnání souboru pacientů s normálními i prodlouženými hodnotami

APTT-R

Soubor pacientů vybraný z denního souboru měřených vzorků v hematologické laboratoři ÚKBH na Lochotíně. Soubor tvoří celkem 50 pacientů (29 mužů a 21 žen). Medián věku je 65 let.

Graf č. 3: Celkové srovnání APTT-R, Bory x Lochotín



Zdroj: vlastní

V tomto grafu hodnotíme výsledky celého souboru, který zahrnuje jak normální výsledky s APTT-R 0,8-1,2, tak patologické výsledky s APTT-R nad 1,2. Regresní koeficient ukazuje na velmi slušnou shodu pro obě použité reagentie.

Soubor pacientů s chylózní plazmou

Samostatně se v své práci věnuji posouzení výsledků u problematických vzorků s vysokou chylozitou. Chylozita je vyjádřena tzv. indexem chylozity. Jedná se o veličinu změřenou fotometricky na biochemickém analyzátoru Cobas 8000 firmy Roche.

Index chylozity zjednodušeně vypovídá o míře lipémie v séru pacienta, tedy o koncentraci chylomikér a lipoproteinů s nízkou hustotou (tzv. VLDL částic). Lipémie samozřejmě ovlivňuje i metodiky měřené z plazmy. Stupně intenzity indexu chylozity jsou odstupňovány 1 - 5.

Tabulka č. 6: Specifikace chylozity

index chylozity	koncentrace intralipidu g/L
1	0,40-0,99
2	1,00-1,99
3	2,00-2,99
4	3,00-4,99
5	nad 5

Zdroj: Interní materiály ÚKBH FN Plzeň

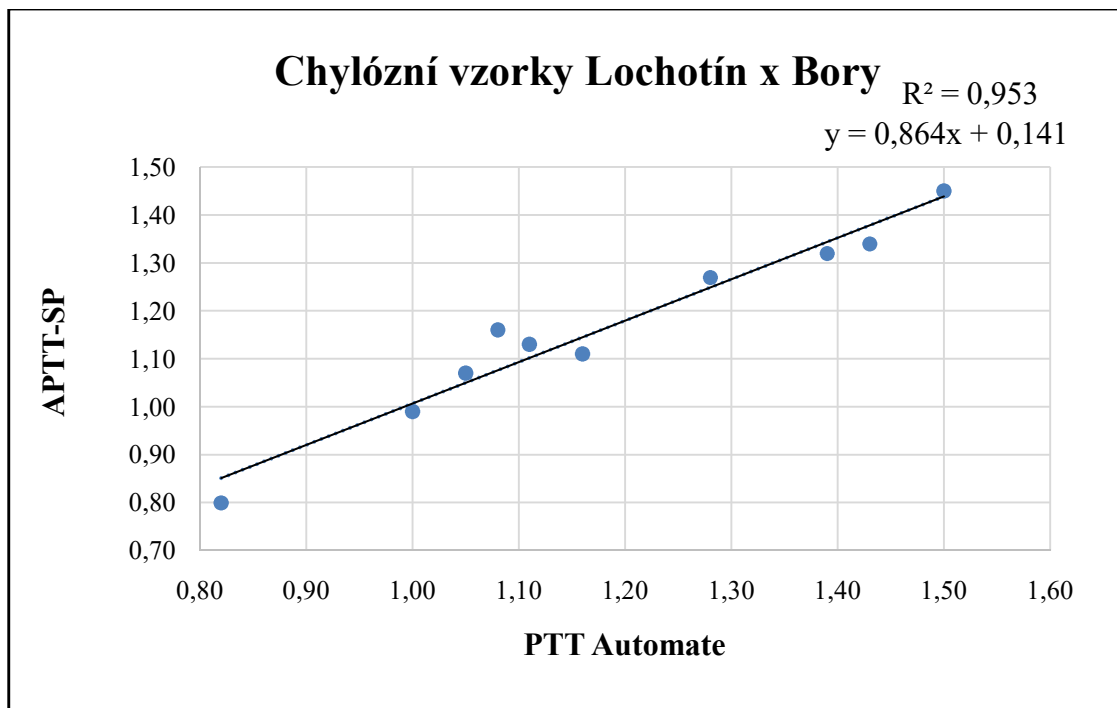
Soubor pacientů s chylózní plazmou tvoří 10 jedinců (3 muži a 7 žen). Medián věku je 43 let.

Hodnoty změřené na Lochotíně jsem získala ze záznamů měření FN Plzeň. Vzorky plazmy těchto pacientů byly hluboce zmrazeny pro účely mezilaboratorní a mezipřístrojové kontroly. Vzorky jsem převezla do hematologické laboratoře na Bory, kde jsem je rozmrazila ve vodní lázni při 37,2 °C po dobu (5 min).

Vzorky číslo 9 a 10 s vysokým indexem chylozity nebyl analyzátor ACL TOP 700 schopen změřit, a proto jsem je přeměřila na analyzátoru STart 4 s mechanickou detekcí, kde chylozita vzorku vlastní měření neovlivnila.

Naměřené hodnoty viz. příloha č. 3 (tabulka č. 7).

Graf č. 4: Regrese APTT-R chylózních vzorků, měřené na Lochotíně a Borech



Zdroj: vlastní

V souboru chylózních vzorků vyšla velmi dobrá shoda vyjádřená regresním koeficientem R, přestože se zároveň jednalo o mezipřístrojové porovnání. Obě reagentie umožňují měření chylózních vzorků.

Soubor pacientů měřených v Plzni a v Olomouci

V další části práce porovnávám výsledky měření APTT na pracovišti FN Plzeň a FN Olomouc. Vzorky byly vybrány po změření daného parametru v hematologických laboratořích ÚKBH FN Plzeň Lochotín a Bory.

V borské laboratoři se měření provádělo na koagulometru ACL TOP 700 s reagensy APTT-SP (šarže N02660875, exp. 28. 02. 2018), v lochotínské laboratoři na koagulometru STA-R Evolution s reagensy PTT Automate 10 (šarže 250842, exp. 31. 01. 2018). Na olomouckém pracovišti se pracovalo na koagulometru ACL TOP 750. Zde byly používány dva typy reagensy APTT-SP (šarže N02660875, exp. 28. 02. 2018) a APTT-SS (šarže N126688312, exp. 31. 12. 2018).

Pro svoji práci jsem využila hodnoty, které již byly naměřeny v srpnu 2017. Ze získaných hodnot jsem pro porovnání výsledků měření sestrojila regresní grafy.

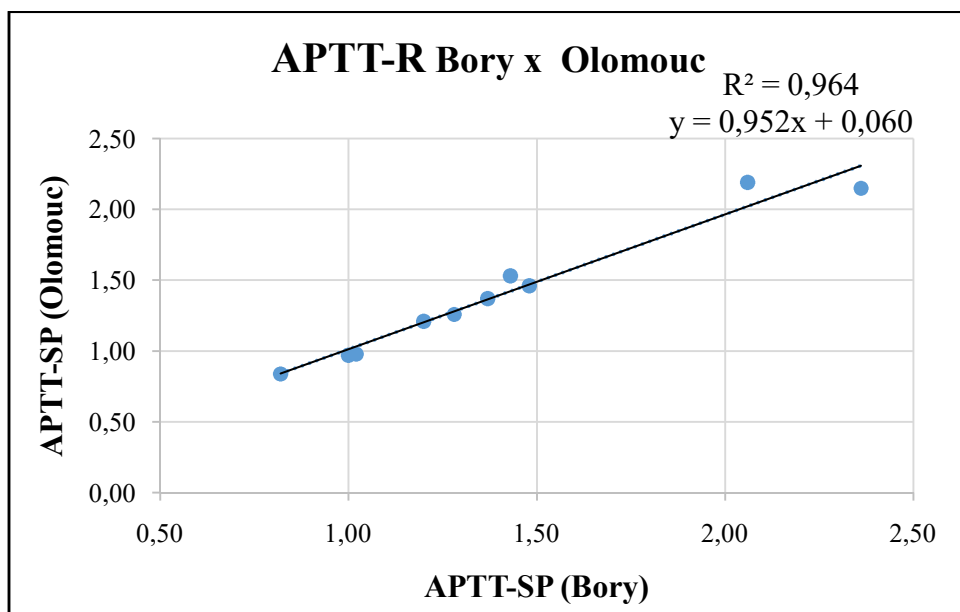
Ve FN Plzeň byly vzorky plazmy změřeny do 4 hodin od náběru. Následně byla plazma sesáta do označených mikrozkušavek Eppendorf po 0,5 ml a zkumavky byly zamrazeny v hlubokomrazicím boxu při teplotě cca -60 °C. Na pracoviště FN Olomouc byly transportovány na suchém ledu. Zde byly rozmrazeny v termostatu při teplotě 37 °C cca 10 min.

Tabulka č. 8: Hodnoty naměřené se stejnou reagentií (APTT-SP) v Plzni a v Olomouci

číslo	APTT-SP	
	APTT-R	APTT-R
	Bory	Olomouc
1	1,37	1,37
2	1,43	1,53
3	1,28	1,26
4	2,36	2,15
5	1,48	1,46
6	2,06	2,19
7	1,20	1,21
8	1,00	0,97
9	0,82	0,84
10	1,02	0,98

Zdroj: vlastní

Graf č. 5: Regrese APTT-R, měřené na Borech a v Olomouci se stejnou reagentií



Zdroj: vlastní

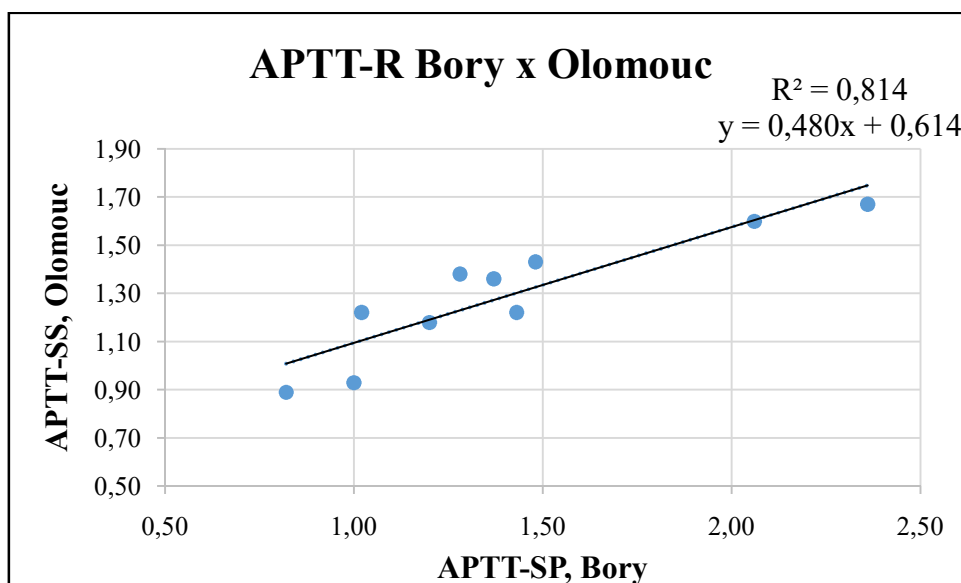
V regresním grafu porovnávám měření na dvou přístrojích pracujících na optickém principu – na přístroji ACL TOP 700 (FN Plzeň Bory) a ACL TOP 750 (FN Olomouc), v obou případech byla použita stejná reagentie APTT-SP. Regresní koeficient R je velmi vysoký (0,964), což ukazuje na velmi dobrou shodu výsledků.

Tabulka č. 9: Hodnoty naměřené s různými reagensii a v Plzni a v Olomouci

číslo	APTT-R	
	APTT-SP	APTT-SS
	Bory	Olomouc
1	1,37	1,36
2	1,43	1,22
3	1,28	1,38
4	2,36	1,67
5	1,48	1,43
6	2,06	1,60
7	1,20	1,18
8	1,00	0,93
9	0,82	0,89
10	1,02	1,22

Zdroj: vlastní

Graf č. 6: Regrese APTT-R, měřené na Borech a v Olomouci s rozdílnou reagensii



Zdroj: vlastní

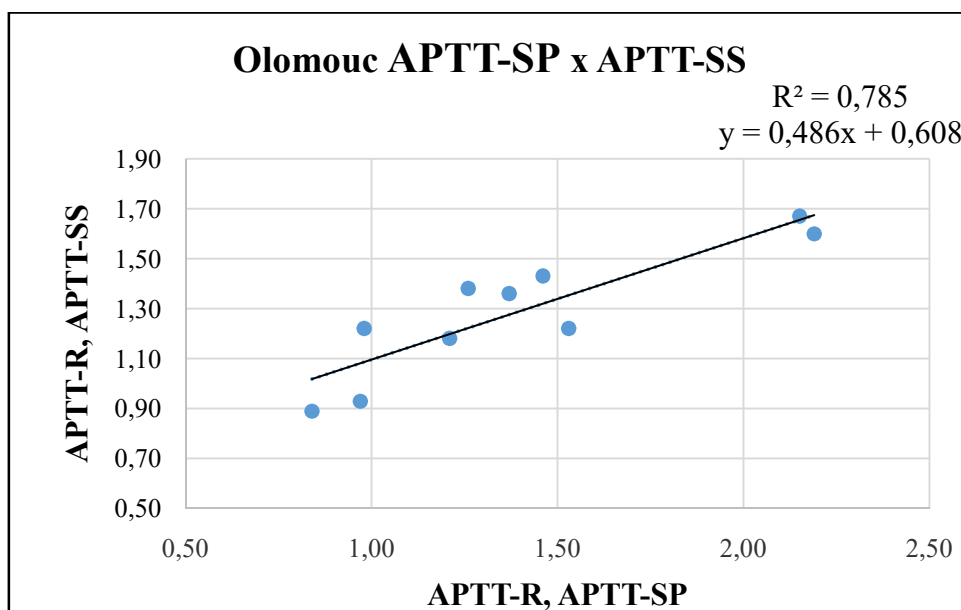
V regresním grafu je znázorněno porovnání měření na analyzátoru ACL TOP 750 reagensii APTT-SS a na analyzátoru ACL TOP 700 s reagensii APTT-SP. Míra shody vyjádřená regresním koeficientem R je z důvodu měření na různých typech reagensii logicky nižší než v předchozím grafu.

Tabulka č. 10: Hodnoty naměřené v Olomouci s rozdílnou reagensí

APTT-R Olomouc		
číslo	APTT-SP	APTT-SS
1	1,37	1,36
2	1,53	1,22
3	1,26	1,38
4	2,15	1,67
5	1,46	1,43
6	2,19	1,60
7	1,21	1,18
8	0,97	0,93
9	0,84	0,89
10	0,98	1,22

Zdroj: vlastní

Graf č. 7: Regresní graf pro hodnoty naměřené v Olomouci s rozdílnou reagensí

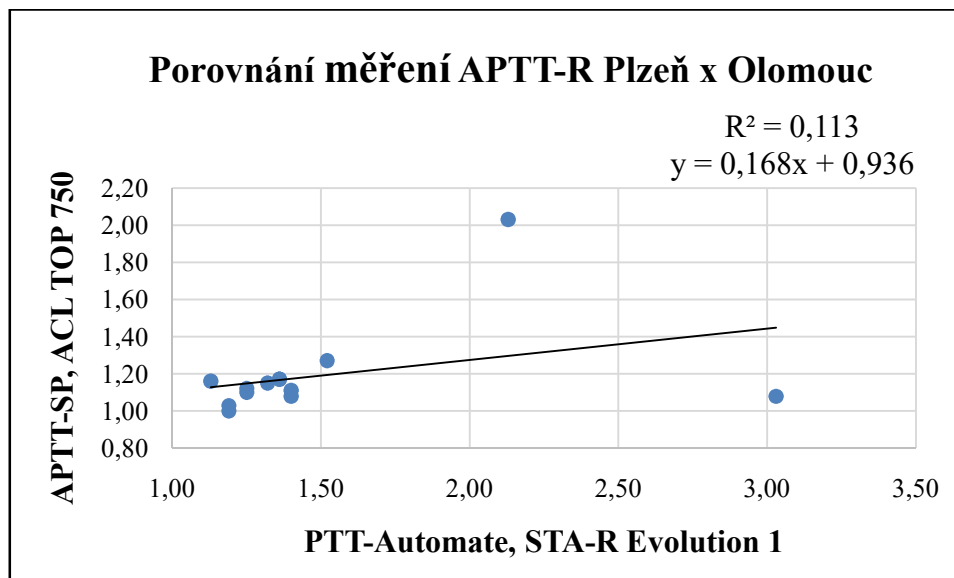


Zdroj: vlastní

Tento regresní graf znázorňuje porovnání měření s rozdílnými reagensími APTT-SP a APTT-SS. Obě měření byla provedena v hematologické laboratoři FN Olomouc na analyzátoru ACL TOP 750. Hodnota regresního koeficientu R (0,7856) je překvapivě nižší než dosažená hodnota R (0,8141) v předchozím grafu, kde se porovnávají výsledky měření na rozdílných typech koagulometrů, ale s identickými reagensími jako v tomto případě.

V poslední analýze jsem zhodnotila výsledky měření převážně chylózních vzorků. Naměřené hodnoty viz. příloha č. 3 (tabulka č. 11).

Graf č. 8: Chylózní vzorky – porovnání různých reagensů i koagulometrů



Zdroj: vlastní měření

Graf porovnává 13 vzorků, z toho 11 se zvýšenou chylozitou. APTT bylo změřeno opět nejprve pomocí reagensie PTT-Automate na analyzátoru STA-R Evolution, následně v olomoucké laboratoři pomocí reagensie APTT-SP na koagulometru ACL TOP 750. Analýza výsledků APTT-R v regresním grafu vyjadřuje velmi nízkou míru shody vyjádřenou indexem R (0,1139). Problematické jsou zejména vzorky č. 9 a 11. Lze říci, že analýza vysoce chylózních vzorků optickým způsobem je velmi komplikovaná, vyžaduje specifickou přípravu vzorku (např. ultracentrifugace nad 10 000g), event. změřeni na jiném typu analyzátoru pracujícím na mechanickém principu. Toto téma je nad rámec zadání mé bakalářské práce (viz kapitoly Diskuze a Závěr).

Tabulka č. 12: Vzorky měřené s reagenční PTT-Automate a s SynthASil

číslo vzorku	APTT-R		index chylozity
	PTT-Automate, analyzátor STA-R Evolution	SynthASil (APTT-SS)	
1	1,4	!!!	2
2	1,36	1,14	1
3	1,25	1,07	3
4	2,13	1,67	0
5	1,32	!!!	4
6	1,48	!!!	3
7	1,13	mm	0
8	1,52	nelze	1
9	1,19	nelze	1
10	3,03	1,24	2
11	1,4	!!!	2
12	1,36	nelze	1
13	1,25	!!!	3
14	1,48	!!!	3
15	1,19	nelze	1

Zdroj: vlastní

V poslední tabulce demonstrují velmi problematické vyšetřování vysoce chylózních vzorků na koagulometru ACL TOP 750 s použitím reagenzie APTT-SS. V mnoha případech měření nebylo možné (vysoká chylozita, porucha vzorkovací jehly Sample Probe, málo materiálu z důvodu několikanásobného opakování měření). Lze tedy říci, že reagenzie SynthASil (APTT-SS) pro účely laboratoře, ve které je častá analýza komplikovaných vzorků, není vhodná pro vyšetřování APTT.

Diskuze

Účelem této bakalářské práce bylo vybrat vhodnou reagenii pro screeningové koagulační testy. Konkrétně jsem se zaměřila na test APTT, protože je velká škála možností, které vedou k prodloužení tohoto testu a je třeba rozsáhlá diferenciální diagnostika k objasnění příčiny, která prodloužení způsobuje. Test APTT je stěžejním vyšetřením při diagnostice závažných poruch koagulace a postihuje zejména vnitřní cestu koagulační kaskády. V rámci diferenciální diagnostiky umožňuje záchyt krvácivých i trombofilních stavů.

Reagencie pro vyšetření APTT se skládá z aktivátoru vnitřní cesty (kyselina elagová, kaolin, křemičitany, aj.) a fosfolipidů z různých zdrojů. Diagnostika pro vyšetření APTT jsou konstruovány tak, aby byla zajištěna zejména citlivost k detekci deficitu faktorů vnitřní cesty a přítomnosti heparinu. Odlišnost je pak v citlivosti k záchytu lupus antikoagulans. Výsledky měření APTT s použitím různých reagií se často významně liší. Porovnávané reagencie jsem použila pro měření poměrně širokého spektra pacientů. K vypracování této práce jsem provedla samostatné měření v hematologické laboratoři FN Plzeň a dále jsem také využila již naměřených hodnot této laboratoře.

Měření vzorků jsem prováděla na dvou typech analyzátorů s odlišnými principy měření a s různými reageniemi s rozdílným složením.

Ukázalo se, že v laboratořích s velkým množstvím problematických vzorků jako je chylozita, iktericita nebo hemolýza je použití některého typu reagií velmi problematické. V současné době je na trhu velký výběr diagnostik, který umožňuje vybrat i pro tyto vzorky vhodný způsob stanovení s použitím spolehlivější reagencie, event. přeměření na jiném typu koagulometru. Lékař stanovuje diagnózu a rozhoduje o léčbě pacienta na základě správných laboratorních výsledků. Proto je nutná dobrá spolupráce mezi klinickými a laboratorními pracovišti.

Velmi dobře ve výzkumu dopadly reagencie APTT-SP a PTT Automate, které s měřením problematických vzorků neměly problém. Jejich srovnání dopadlo uspokojivě i v rámci porovnání měření na různých typech koagulometrů. V porovnání reagií dopadla nejhůře reagencie APTT-SS, která obtížnější vzorky nedokázala změřit.

Při vypracování této bakalářské práce jsem poznala systém práce v hematologických laboratořích, metody umožňující mezipřístrojové a mezilaboratorní

porovnání. Ověřila a rozšířila jsem si své teoretické znalosti a svou manuální zručnost. Výsledek této práce je podle mě užitečný a práce měla význam.

Domnívám se, že jsem splnila svou práci zadání bakalářské práce a při jejím vypracování si prohloubila své vědomosti týkající se koagulace a upevnila si své dovednosti v laboratorní praxi.

Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo porovnat reagenty od různých výrobců pro koagulační test APTT, který monitoruje vnitřní cestu koagulace. Výrobci dostupných reagentů IVD (in vitro diagnostika) pro vyšetřování APTT, se kterými jsem pracovala, garantují správnost dosažení výsledku po ověření metody v systému externí a interní kontroly kvality. Laboratoře disponují pipetovacími protokoly nastavení metody pro konkrétní analyzátory. V pravidelných intervalech se v laboratoři provádí kontrola metody pomocí komerčně dodávaných kontrolních plazem, dále mezipřístrojová kontrola a mezilaboratorní mezipřístrojová kontrola. Nedílnou součástí kontrolní činnosti je provádění verifikace metody (opakovatelnost, správnost) v pravidelných intervalech. Laboratoř je také zapojena do systému externího hodnocení kvality.

V praktické části práce jsem porovnávala výsledky měření APTT rozdílnými reagenty na různých typech přístrojů. Ke srovnání jsem použila metodu regresní analýzy. Výsledky ukázaly, že v současné době reagenty poskytují možnost kvalitního i přesného měření. S ohledem na neúspěšné měření chylózních vzorků na optickém analyzátoru vyšla jako nejméně vhodná reagenty SynthASil (APTT-SS). Tato reagenty však může dobře posloužit jako screeningová v provozu běžných laboratoří. Měření vzorků na analyzátořech s mechanickou i optickou detekcí s reagenty PTT-Automate nebo APTT-SP proběhlo bez větších komplikací.

Pro posouzení výběru reagenty je důležitý samozřejmě typ koagulometru, který laboratoř k měření používá. Výhodou je možnost použití jak optického, tak mechanického principu měření z důvodu možných interferencí biologického materiálu.

Konkrétní laboratoř pak v praxi musí přihlídnout i ke svým interním potřebám. V případě hematologických laboratoří FN Plzeň, nacházejících se ve dvou lokalitách města, se pracuje s odlišnými typy analyzátořů a odlišnými reagenty, takže diagnostika byla zvolena tak, aby při překlady pacientů z jedné lokality na druhou bylo zajištěno správné vydávání výsledků s povolenou odchylkou měření +/- 10 % (vztaženo na daný analyzátoř). Nezbytným předpokladem pro správné vydávání výsledků je tedy také správné provádění mezilaboratorní mezipřístrojové kontroly v pravidelných intervalech.

Seznam zdrojů

1. DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
2. ROKYTA, Richard. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.
3. PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ a kolektiv. *Hematologie a transfuzní lékařství. I, Hematologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
4. MESKO, Dusan a Vincent. MARKS. *Differential diagnosis by laboratory medicine: a quick reference for physicians*. New York: Springer-Verlag, 2002. ISBN 3540430571.
5. DOBROTOVÁ, Miroslava a Peter KUBISZ. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1779-4.
6. BARTŮNĚK, Petr, Dana JURÁSKOVÁ, Jana HECZKOVÁ a Daniel NALOS, ed. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. Praha: Grada Publishing, 2016. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4343-1.
7. PECKA, Miroslav a Milan BLÁHA. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.
8. Preanalytická příručka klinických laboratoří ÚKBLD, VFN a 1. LF Praha, 2009.
9. [online]. [cit. 2018-01-21]. Dostupné z:
http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/files/obecna/Doporuce ni_LS_CHS_CLS_JEP-Poradi_odberu_v01.pdf
10. RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, c1999. ISBN 80-7262-023-1.
11. http://www.dialab.cz/data/sharedfiles/Prednasky_z_odbornych_akci/I_Malikova_2.ppt. [staženo 14.4.2011]
12. PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
13. IMALAB s.r.o., Labortorní příručka, Laboratoř imunodiagnostiky, biochemie, molekulární biologie a cytogenetiky, Zlín Dostupné z:
<http://www.imalab.cz/kategorie/odběr-vzorku.aspx> (14.2.2010)
14. [online]. [cit. 2018-01-19]. Dostupné z:
https://is.muni.cz/el/1411/podzim2015/KBOMII/um/Jelinkova_Biochemici_pris troje.pdf

15. ŠEBLOVÁ, Jana a Jiří KNOR. *Urgentní medicína v klinické praxi lékaře*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4434-6.
16. KVASNIČKA, Jan. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-7169-993-4.
17. *Hemostáza – jak ji možná neznáme* [online]. 2007, 24. 1. 2007, 2007, 97-101 [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702_Slechtova_97.pdf
18. COOK, Nigel S. a David UBBEN. *Fibrinogen as a major risk factor in cardiovascular disease* [online]. 1990, (11), 444-451 [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016561479090125R>
19. *Kinetika enzymatických reakcí* [online]. [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/Kin-teorie/9-EnzymovaKatalyza.pdf>
20. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-86682-02-1.
21. [online]. [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: <http://www.lfp.cuni.cz/patofyziologie/materialy/krev/koagulace.htm>
22. FENCLOVÁ, Eva. *Faktor IX* [online]. [cit. 2018-02-01]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/FIAGD.htm>
23. *Faktor VIII* [online]., 1 [cit. 2018-02-01]. Dostupné z: <http://www.nem-tr.cz/data/editor/5070.pdf>
24. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-86682-03-x.
25. ASAKAI, R., CHUNG, D.W., DAVIE E.W., Factor XI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel, *New England Journal of Medicine*, 6. 4. 2011.
26. ESMON CH. T., Protein S a protein C. *Biochemistry, Trends, Cardiovasc. Med.*, 2, 1992.
27. ACL TOP 700 CTS: Standardní operační postup - technický č. IISOPT_1OKH_393/2013-1. FN Motol - Oddělení klinické hematologie, Praha, 2013.
28. DOLEJŠ, Vladimír. *World Federation of Hemophilia - Annual global survey 2015*. Prague, 2016. Dostupné z: http://cnhp.registry.cz/res/file/WFH_Annual_Global_Survey2015_C_Z.pdf

29. Manuál k analyzátoru STA-R Evolution.
30. ADCOCK, Issue. D. M. a R. C. GOSSELIN. The danger of relying on the APTT and PT in patients on DOAC therapy, a potential patient safety. *US National Library of Medicine National Institutes of Health Search database* Search term Search [online]. 2017, Květen 2017, 1 [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28447415>
31. Interní materiály ÚKBH FN Plzeň.

Seznam zkratek

ADP – adenosindifosfát

APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas

ATP – adenosintrifosfát

Ca²⁺ - vápenaté ionty

CaCl₂ – chlorid vápenatý

DOAC – Direct Oral Anticoagulans

dRVVT – divte Russel viper venom time

exp. - expirace

Faktor VIII – faktor VIII

Fib – fibrin

FIX – faktor IX

FN – Fakultní nemocnice

FVa – aktivovaný faktor V

FVII – faktor VII

FVIIa – aktivovaný faktor VII

FX – faktor X

FXa – aktivovaný faktor X

FXI – faktor XI

FXII – faktor XII

FXIIIa – aktivovaný faktor XIII

HMWK – vysokomolekulární kininogen

IgA – imonoglobulíny třídy A

IgG – imunoglobuliny třídy G

IgM – imunoglobuliny třídy M

INR – mezinárodní normalizovaný poměr

ISI – mezinárodní index citlivosti

LA – lupus antikoagulans

LIS – laboratorní informační systém

LMWH – nízkomolekulární heparin

NVN – nefiltrovaný vlastní normál

PL – fosfolipidy

PT – protrombinový čas

t – PA – tkáňový aktivátor plazminogenu

TF – tkáňový faktor

t_N – čas normální směsné plazmy

t_p – čas testované plazmy

TT- trombinový čas

TXA₂ – tromboxan A₂

ÚKBH – ústav klinické biochemie a hematologie

VLDL – very low density lipoprotein (lipoprotein s velmi nízkou hustotou)

!!! – nezměřeno

mm – málo materiálu

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Minimální hemostatická aktivita koagulačních faktorů	14
Tabulka č. 2: Přehled dostupných reagensů pro APTT test na trhu v ČR	37
Tabulka č. 3: Specifika reagensů pro vyšetření APTT a srovnání jejich stability	37
Tabulka č. 4: Soubor pacientů s normálními hodnotami APTT, APTT-R se pohybuje od 0,8 do 1,2	63
Tabulka č. 5: Soubor pacientů s prodlouženými hodnotami APTT, APTT-R se pohybuje od 1,2 a výše	64
Tabulka č. 6: Specifikace chylozity	43
Tabulka č. 7: Soubor pacientů s chylózním vzorkem	65
Tabulka č. 8: Hodnoty naměřené se stejnou reagensů (APTT-SP) v Plzni a v Olomouci	46
Tabulka č. 9: Chylózní vzorky – porovnání různých reagensů i koagulometrů	47
Tabulka č. 10: Hodnoty naměřené v Olomouci s rozdílnou reagensů	48
Tabulka č. 11: Hodnoty chylózních vzorků měřené s různými reagensů v Plzni a v Olomouci	66
Tabulka č. 12: Vzorky měřené s reagensů PTT-Automate a s SynthASil	50

Seznam grafů

Graf č. 1: Regrese APTT-R s hodnotami 0,8 – 1,2, měřené na Lochotíně a Borech	40
Graf č. 2: Regrese APTT-R s prodlouženými časy, měřené na Lochotíně a Borech ...	41
Graf č. 3: Celkové srovnání APTT-R, Bory x Lochotín	42
Graf č. 4: Regrese APTT-R chylózních vzorků, měřené na Lochotíně a Borech	44
Graf č. 5: Regrese APTT-R, měřené na Borech a v Olomouci se stejnou reagencí	46
Graf č. 6: Regrese APTT-R, měřené na Borech a v Olomouci s rozdílnou reagencí ...	47
Graf č. 7: Regresní graf pro hodnoty naměřené v Olomouci s rozdílnou reagencí	48
Graf č. 8: Chylózní vzorky – porovnání různých reagencí i koagulometrů	49

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Schéma hemostázy	12
Obrázek č. 2: Schéma fibrinolýzy	15
Obrázek č. 3: Schéma vnější a vnitřní cesty koagulace	17
Obrázek č. 4: Zkumavka Vacuette s protisrážlivým činidlem – citrátem sodným	18
Obrázek č. 5: Analyzátor STA-R Evolution	33
Obrázek č. 6: Analyzátor ACL TOP 700	34
Obrázek č. 7: Analyzátor STart 4	35
Obrázek č. 8: Schéma analyzátoru STart 4	35
Obrázek č. 9: Reagencie používané ve FN Plzeň Lochotín	38

Seznam příloh

Příloha č. 1: Tabulka č. 4: Soubor pacientů s normálními hodnotami APTT, APTT-R se pohybuje od 0,8 do 1,2	63
Příloha č. 2: Tabulka č. 5: Soubor pacientů s prodlouženými hodnotami APTT, APTT-R se pohybuje od 1,2 a výše	64
Příloha č. 3: Tabulka č. 7: Soubor pacientů s chylózním vzorkem	65
Příloha č. 4: Tabulka č. 11: Hodnoty chylózních vzorků měřené s různými reagensy v Plzni a v Olomouci	66

Přílohy

Tabulka č. 4: Soubor pacientů s normálními hodnotami APTT, APTT-R se pohybuje od 0,8 do 1,2

Číslo vzorku	Pohlaví	Věk	Lochotín STA-R Evolution, reagencie PTT Automate		Bory ACL TOP 700, reagencie APTT-SP		Poznámka (léčba)
			APTT-t	APTT-R	APTT-t	APTT-R	
1	muž	86	35,60	1,11	30,70	1,09	
2	muž	49	30,10	0,94	26,10	0,93	
3	žena	62	32,40	1,01	25,70	0,91	LMWH
4	muž	52	31,10	0,97	26,30	0,93	LMWH
5	žena	42	30,90	0,97	27,70	0,98	
6	muž	59	35,30	1,10	30,00	1,06	LMWH
7	muž	42	36,10	1,13	33,60	1,19	
8	muž	91	37,00	1,16	28,50	1,01	
9	žena	30	30,40	0,95	28,10	1,00	
10	žena	72	38,30	1,20	34,50	1,22	LMWH
11	žena	32	33,60	1,05	31,50	1,12	
12	žena	20	33,50	1,05	30,30	1,07	
13	muž	86	33,20	1,04	28,00	0,99	
14	muž	54	38,60	1,21	33,40	1,18	hemolytické
15	žena	81	38,60	1,21	29,00	1,03	Warfarin
16	žena	67	30,20	0,94	28,30	1,00	
17	muž	87	32,90	1,03	27,70	0,98	
18	muž	51	25,30	0,79	21,70	0,77	
19	muž	26	36,80	1,15	29,00	1,03	
20	žena	69	29,40	0,92	24,30	0,86	
21	muž	71	34,70	1,08	28,70	1,02	

Zdroj: vlastní

Tabulka č. 5: Soubor pacientů s prodlouženými hodnotami APTT, APTT-R se pohybuje od 1,2 a výše

Číslo vzorku	Pohlaví	Věk	Lochotín STA-R Evolution, reagencie PTT Automate		Bory ACL TOP 700, reagencie APTT-SP		Poznámka (léčba)
			APTT-t	APTT-R	APTT-t	APTT-R	
1	muž	78	121,6	3,80	95,6	3,39	
2	muž	56	42,9	1,34	37,0	1,31	LMWH
3	muž	70	47,9	1,50	46,9	1,66	LMWH
4	muž	44	42,3	1,32	36,1	1,28	LMWH
5	žena	82	42,9	1,34	33,2	1,18	
6	muž	78	50,3	1,57	39,7	1,41	LMWH
7	muž	69	45,8	1,43	33,6	1,19	LMWH
8	žena	37	44,9	1,40	34,6	1,23	
9	žena	95	55,8	1,74	47,6	1,69	
10	muž	66	57,0	1,78	46,3	1,64	Warfarin
11	žena	86	54,6	1,71	49,9	1,77	Warfarin
12	muž	36	57,5	1,80	41,3	1,46	
13	žena	16	200	6,25	200	7,09	
14	muž	77	42,6	1,33	33,0	1,17	Warfarin
15	žena	68	44,6	1,39	34,3	1,22	
16	muž	70	52,4	1,64	44,4	1,57	LMWH
17	žena	84	50,7	1,58	51,9	1,84	LMWH
18	muž	16	45,8	1,43	33,8	1,20	LMWH
19	žena	73	45,1	1,41	34,6	1,23	LMWH
20	muž	51	44,3	1,38	40,3	1,43	LMWH
21	muž	52	50,1	1,57	34,7	1,23	Warfarin
22	žena	81	83,9	2,62	59,1	2,10	
23	žena	65	75,0	2,34	54,7	1,94	Warfarin
24	muž	69	42,8	1,34	34,7	1,23	Warfarin
25	žena	58	80,2	2,51	74,4	2,64	Heparin
26	muž	51	47,1	1,47	37,6	1,33	
27	žena	37	45,7	1,43	33,2	1,18	
28	muž	56	56,1	1,75	41,2	1,46	
29	muž	65	96,5	3,02	113,8	4,04	

Zdroj: vlastní

Tabulka č. 7: Soubor pacientů s chylózním vzorkem

Číslo vzorku	Pohlaví	Věk	Datum náběru	Lochotín STA-R Evolution, reagencie PTT Automate		Bory ACL TOP 700, reagencie APTT-SP		Index chylozity
				APTT -t	APTT -R	APTT -t	APTT -R	
1	muž	34	31. 08. 2017	33,81	1,05	31,5	1,07	4
2	žena	72	03. 09. 2017	30,8	1,0	28,0	0,99	5
3	žena	43	04. 09. 2017	62,8	1,43	37,8	1,34	3
4	žena	61	04. 09. 2017	53,6	1,32	29,1	1,02	3
5	žena	43	06. 09. 2017	69,0	1,50	40,8	1,45	3
6	žena	65	14. 09. 2017	20,6	0,82	22,5	0,80	3
7	žena	43	02. 10. 2017	62,0	1,39	37,1	1,32	3
8	žena	43	05. 10. 2017	52,5	1,28	35,9	1,27	3
*9	muž	41	21. 11. 2017	33,4	1,11	32,0	1,13	3
*10	muž	45	28. 10. 2017	34,5	1,08	35,6	1,21	5

* vzorky měřené na analyzátoru SStart 4

Zdroj: vlastní

Tabulka č. 11: Hodnoty chylózních vzorků měřené s různými reagensy v Plzni a v Olomouci

	APTT-R		Index chylozity
	Lochotín PTT-Automate	Olomouc APTT-SP	
1	1,4	1,11	2
2	1,36	1,17	1
3	1,25	1,1	3
4	2,13	2,03	0
5	1,32	1,15	4
6	1,13	1,16	0
7	1,52	1,27	1
8	1,19	1,03	1
9	3,03	1,08	2
10	1,4	1,08	2
11	1,36	1,17	1
12	1,25	1,12	3
13	1,19	1	1

Zdroj: vlastní