

Vyšetření hemokoagulace

Pro základní vyšetření hemokoagulace se používají **skupinové testy**, zaměřené na určitou část hemokoagulačního systému – vnitřní, vnější a společnou cestu. Skupinové testy mohou být doplněné **speciálními testy**, které zkoumají funkci nebo množství jednotlivých koagulačních, popř. fibrinolytických faktorů. Existují i **globální testy**, které postihují funkci celého systému hemokoagulace a hemostázy.

Podle principu, který je pro hodnocení konkrétních testů využíván, rozlišujeme tři analytické přístupy:

- **funkční** – spočívá v měření doby, která je potřebná pro vytvoření fibrinové sraženiny;
- **biochemický** – většinou jde o měření enzymové aktivity vybraných koagulačních faktorů. Z biochemického hlediska má mnoho faktorů povahu proteolytických enzymů a biochemické testy využívají různých syntetických substrátů (např. chromogenních či fluorogenních). Z nich jsou působením faktorů s proteolytickou aktivitou odštěpovány barevné nebo fluorogenní produkty, jejichž množství se analyzuje spektrofotometricky nebo spektrofluorometricky.
- **imunochemický** – pomocí různých imunochemických metod využívajících specifických protilátek jsou vyšetřovány koncentrace určitých složek hemokoagulačního systému.

V dalším textu se zaměříme na vybrané funkční hemokoagulační testy a jejich hodnocení.

Funkční hemokoagulační testy

Funkční hemokoagulační testy jsou zahajovány aktivací hemokoagulace, jejíž způsob se liší podle toho, jakou složku hemokoagulační kaskády testujeme. Bez ohledu na způsob aktivace následuje monitorování průběhu tvorby fibrinové sraženiny. Její vytvoření je doprovázeno změnou vlastností vzorku (např. viskozity či turbidity), kterou detegujeme různým způsobem:

- vizuálně;
- optickými metodami;
- elektromechanickou detekcí.

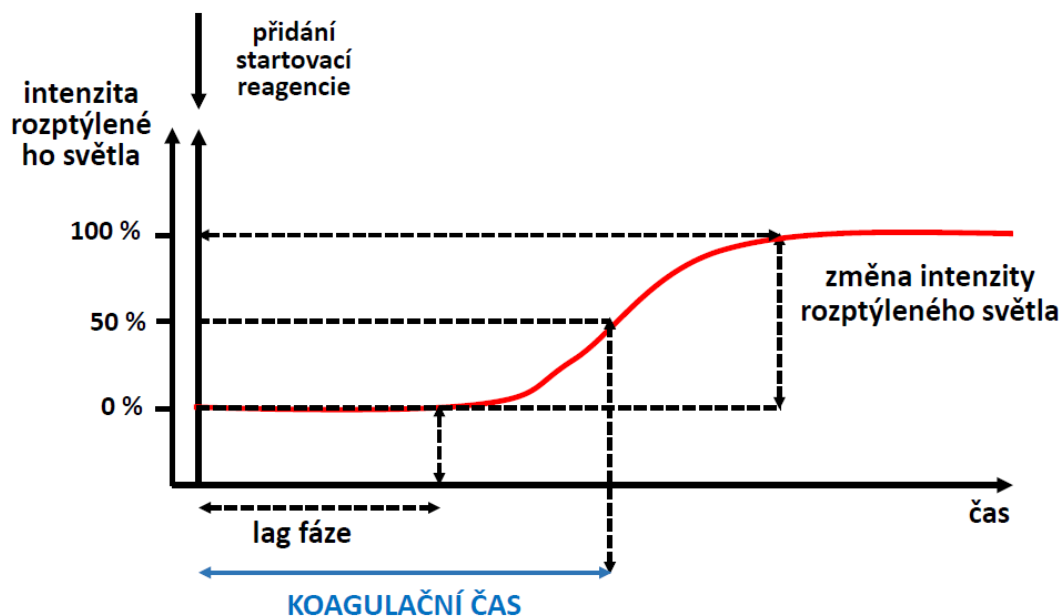
Při manuálním provedení testu lze vznik koagula hodnotit vizuálně, např. při pohybu reakční zkumavkou tam a zpět ve vodní lázni. Vyšetřování hemokoagulace spojené s vizuálním hodnocením vzniku sraženiny je nahrazováno vyšetřováním pomocí koagulometrů, které pracují na různých principech a pro detekci vytvoření sraženiny využívají elektromechanické nebo optické metody.

Elektromechanická detekce může zaznamenávat změnu viskozity vzorku, kterou lze hodnotit např. měřením pohybu ocelové kuličky v kyvetě s plazmou pod vlivem elektromagnetického pole.

Změna optických vlastností se sleduje zpravidla pomocí turbidimetrie (měření absorbance po průchodu monochromatického světla kyvetou v přímém směru) nebo nefelometrie (měřením intenzity

rozptýleného světla). Při nefelometrické detekci se intenzita rozptýleného světla v průběhu koagulačních testů mění charakteristickým způsobem. Zpočátku jsou změny minimální (lag fáze). Poté, co se vytvoří dostatečné množství trombinu umožňujícího přeměnu fibrinogenu na fibrin, je pozorován vzestup intenzity rozptýleného světla. Po vyčerpání fibrinogenu se hodnota intenzity rozptýleného světla ustálí a měření je ukončeno. Ze změřených hodnot intenzity rozptýleného světla se sestrojí koagulační křivka, pomocí níž lze s využitím různých algoritmů určit koagulační čas. Jedna z možností odečtu koagulačního času je procentuální detekční metoda znázorněná na obr. 1. Hodnota rozptýleného světla bezprostředně po přidání startovacích reagensů do reakční směsi je definována jako 0 % a po dosažení ustáleného stavu jako 100 %. Přesný koagulační čas se obvykle odečítá při definované hodnotě intenzity rozptýleného světla, často při 50%.

Obr. 1 Určení koagulačního času procentuální detekční metodou

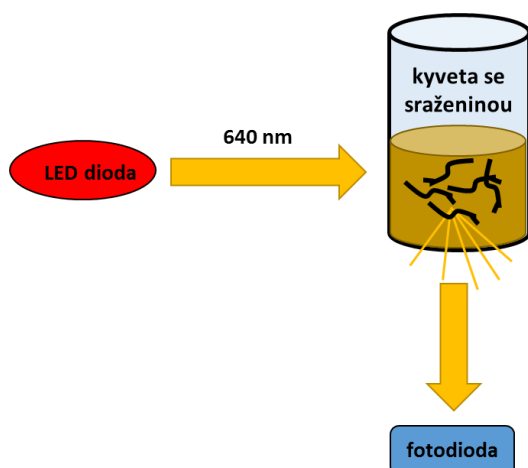


Při použití turbidimetrie nebo nefelometrie mohou být výsledky koagulačních testů ovlivněny, pokud bychom analýzu prováděli v chylózní a v menší míře i hemolytické nebo ikterické plazmě.

Na výsledky níže uváděných testů mohou mít dopad i další faktory v preanalytické fázi i vlastní provedení testu (použitá reagensie v činidle, technika). Proto je doporučováno, aby si každá laboratoř stanovila své vlastní referenční hodnoty. Je preferováno uvádět výsledky jako poměr hodnot získaných vyšetřením plazmy pacienta k normální plazmě.

V praktickém cvičení se seznámíme s poloautomatickým koagulometrem (typ ECL 105m, Erba Lachema, s.r.o., Brno, ČR), který vznik sraženiny sleduje nefelometricky. Přístroj je vybaven diodou emitující světlo při 640 nm. Světlo směřuje ke kyvetě, ve které probíhá hemokoagulace. Intenzita světla rozptýleného sraženinou je vyhodnocována pomocí fotodiody umístěné pod úhlem 90° vůči reakční kyvetě (obr. 2).

Obr. 2
koagula



Nefelometrická detekce vzniku

Vybrané koagulační testy

Zmíníme základní koagulační testy, které lze provádět na poloautomatickém koagulometru ECL 105m. Krev se na uvedené koagulační testy odebírá do zkumavek s obsahem citrátu, který na sebe váže vápník. Tím se zabrání sražení krve. Je doporučen poměr 9 dílů krve a 1 díl citrátu (3,2%). Po oddělení krvinek centrifugací získáme dekalciifikovanou plazmu.

1. Protrombinový čas (PT – protrombin time, tromboplastinový čas, Quickův test)

Princip

Protrombinový čas patří k základním koagulačním testům, který sleduje funkci faktorů **vnější** (faktor VII) a **společné cesty** (faktory X, V, II a fibrinogen) hemokoagulační kaskády. Hodnotí tedy koagulační děje zahrnující aktivaci protrombinu (faktor II) na trombin (faktor IIa) až po přeměnu fibrinogenu na fibrin při zapojení vnější cesty. Klíčový děj hemokoagulace, štěpení protrombinu na trombin, je výsledkem působení protrombinázy. Ta je tvořená komplexem aktivovaných faktorů Xa a Va, které se usazují na záporně nabitých fosfolipidových površích (např. trombocytů, endotelu) v přítomnosti Ca^{2+} iontů.

Činidlo

Hlavní součástí činidla pro PT jsou **tromboplastin a vápenaté ionty**. Tromboplastinem rozumíme tkáňový faktor, který se váže na faktor VII a iniciuje koagulaci, a fosfolipidy nahrazující funkci destičkových trombocytů. Jako tromboplastin mohou být použity extrakty z tkání bohatých na tyto dvě složky (např. extrakty z králičího mozku nebo lidské placenty). Jinou možností je lidský rekombinantní

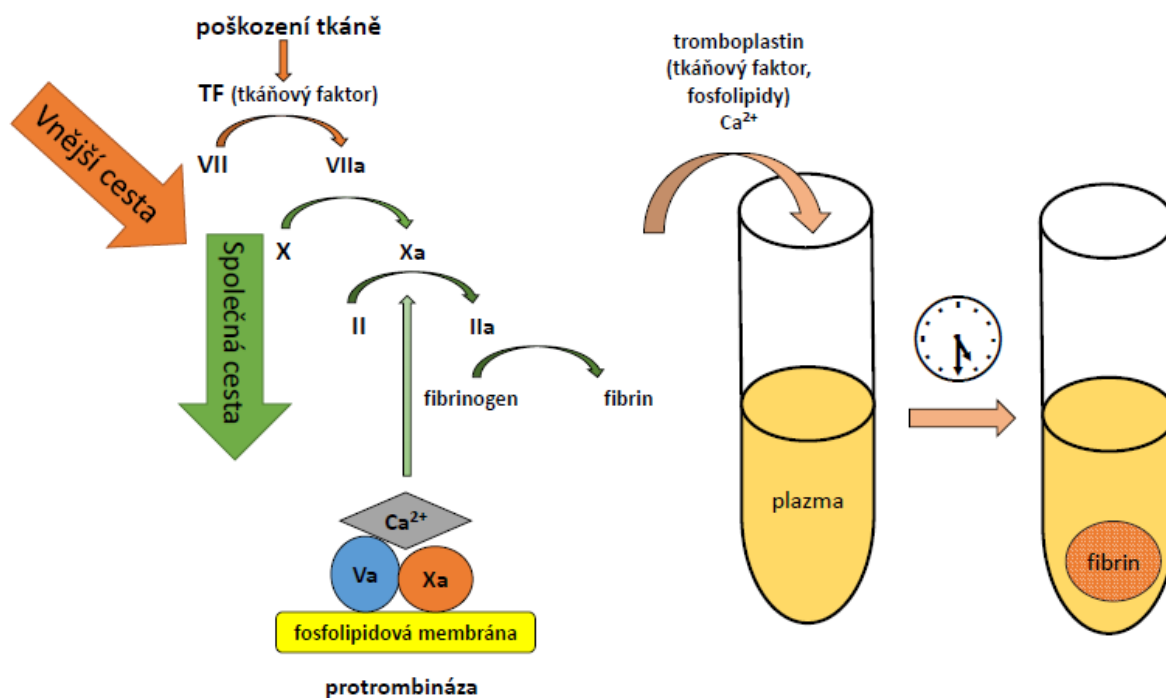
tkáňový faktor doplněný o fosfolipidy. Vápenaté ionty jsou nezbytné pro rekalifikaci plazmy. Činidla některých souprav obsahují i látky neutralizující heparin, které eliminují vliv heparinu na výsledek testu. Další součástí činidla jsou stabilizátory a pufry.

Provedení testu

Aktivace vnější cesty vyžaduje přítomnost Ca^{2+} iontů a kompletního tromboplastinu. Při jednostupňovém provedení testu se k dekalifikované plazmě chudé na destičky¹ přidá činidlo. Hodnotí se čas potřebný ke vzniku koagula způsobu popsanými v úvodní části (vizuálně, optickými metodami, elektromechanickou detekcí). Koagulační čas je udáván v rozmezí 15 – 20 sekund. Reakce probíhá při 37 °C. Sled postupné aktivace faktorů vnější a společné cesty v průběhu testu je na obr. 3.

Při nález prodlouženého protrombinového času se provádí korekční test. K vyšetřované plazmě se přidá stejný díl normální plazmy. Normalizace času po přidání normální plazmy svědčí o nedostatku koagulačních faktorů II, V, VII, X nebo fibrinogenu. Jestliže ale nedojde ke změně, je prodloužení protrombinového času způsobeno přítomností inhibitorů prokoagulačních faktorů, které lze dalšími testy odlišit.

Obr. 3 Průběh a provedení protrombinového času



¹ Pro získání plazmy chudé na destičky se doporučuje delší centrifugace – 15 min při 2000–2500g

Hodnocení testu

Způsob vyjadřování výsledků se liší u pacientů léčených kumarinovými preparáty a pacientů bez této terapie. Údaj o léčbě pacienta by měl být uveden v žádance o vyšetření.

- **Pomocí R**

U pacientů, kteří nejsou léčeni kumariny, se protrombinový čas hodnotí pomocí R, což je poměr koagulačního času získaného vyšetřením plazmy pacienta v sekundách a koagulačního času normální plazmy v sekundách:

$$R = \frac{\text{koagulační čas plazmy pacienta v s}}{\text{koagulační čas normální plazmy v s}}$$

Normální plazmu lze získat buď jako směsnou plazmu od minimálně 20 normálních dárců nebo je komerčně dostupná.

- **Výpočet INR**

Výsledky u pacientů léčených kumarinovými preparáty jsou vyjadřovány pomocí mezinárodně normalizovaného poměru (INR – international normalized ratio). Umožňuje srovnávání výsledků z různých laboratoří používajících různá reagentie (zejména tromboplastin) i přístroje.

Základem výpočtu INR je již zmíněný poměr naměřeného koagulačního času v sekundách u vzorku pacienta a koagulačního času u normální plazmy v sekundách (R). Tento poměr je umocněn tzv. indexem senzitivity tromboplastinu (ISI). Hodnota ISI je uvedena u každé diagnostické soupravy. Stanovuje se srovnáním tromboplastinu použitého v soupravě s referenčním tromboplastinem.

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{koagulační čas plazmy pacienta v s}}{\text{koagulační čas normální plazmy v s}} \right)^{\text{ISI}}$$

- **Referenční rozmezí**

R: 0,8 – 1,2

INR: Referenční meze se neuvádějí – ošetřující lékař posuzuje INR u konkrétních pacientů s ohledem na jejich stav a diagnózu. Hodnota u léčených pacientů by se měla pohybovat v rozmezí 2–3. Vyšší hodnota INR znamená, že koagulační čas je prodloužen a koagulace probíhá tedy pomaleji.

Protrombinovým testem je monitorována především **léčba kumarinovými preparáty (antagonisté vitamínu K** – např. warfarin). Dále může být použit u poruch faktorů ve vnější koagulační cestě, u nedostatku vitamínu K a u jaterních onemocnění k **posouzení proteosyntézy**, neboť většina koagulačních faktorů je syntetizována v játrech. U těchto stavů zjišťujeme prodloužení PT.

2. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT – activated partial thromboplastin time)

Princip

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas je dalším základním koagulačním testem. Na rozdíl od protrombinového času APTT testuje skupinu faktorů účastnících se **vnitřní** (faktory XII, XI, IX, VIII, vysokomolekulární kininogen – HMWK a prekallikrein – PK) **cesty** a v návaznosti na ni i **společnou cestu** (faktory X, V, II a fibrinogen) přeměny protrombinu na trombin.

Činidlo

Činidlo pro stanovení APTT obsahuje **kontaktní aktivátory** a **parciální tromboplastin**, což je tromboplastin zbavený tkáňového faktoru. Jako aktivátory slouží negativně nabitě povrchy ve formě křemičitanů, koalinu, elagové kyseliny (polyfenolická struktura), popř. další látky. Aktivátory jsou potřebné pro aktivaci faktoru XII a XI. Zvětšují kontaktní povrch a tím urychlují test. Jako parciální tromboplastin, který plní funkci destičkových fosfolipidů, jsou využívány fosfolipidy buď syntetické, nebo živočišného či rostlinného původu (např. kefalin z králíčích mozků či sójové fosfolipidy). Součástí činidel jsou i stabilizátory a pufry.

Provedení testu

Přidáním kontaktních aktivátorů společně s parciálním tromboplastinem k vyšetřované dekalcifikované plazmě chudé na destičky je zahájena aktivace vnitřní cesty hemokoagulace. Další postup aktivace vyžaduje **přidání Ca^{2+} iontů** (chlorid vápenatý), které nastartují koagulaci. Čas potřebný pro tvorbu fibrinové sraženiny (25 – 40 sekund) se měří až od přidavku Ca^{2+} iontů. Vytvoření sraženiny je možno detekovat podobně jako u PT (obr. 4).

V případě nálezu prodlouženého testu je doplňován korekční test tak, jak byl popsán u PT. Pokud se test po přidání normální plazmy normalizuje, znamená to deficit koagulačních faktorů vnitřní cesty a pacient je ohrožen zvýšeným rizikem krvácení. Pokud normalizace nenastane, prodloužení času je způsobeno přítomností inhibitoru.

Hodnocení

- **Pomocí R**

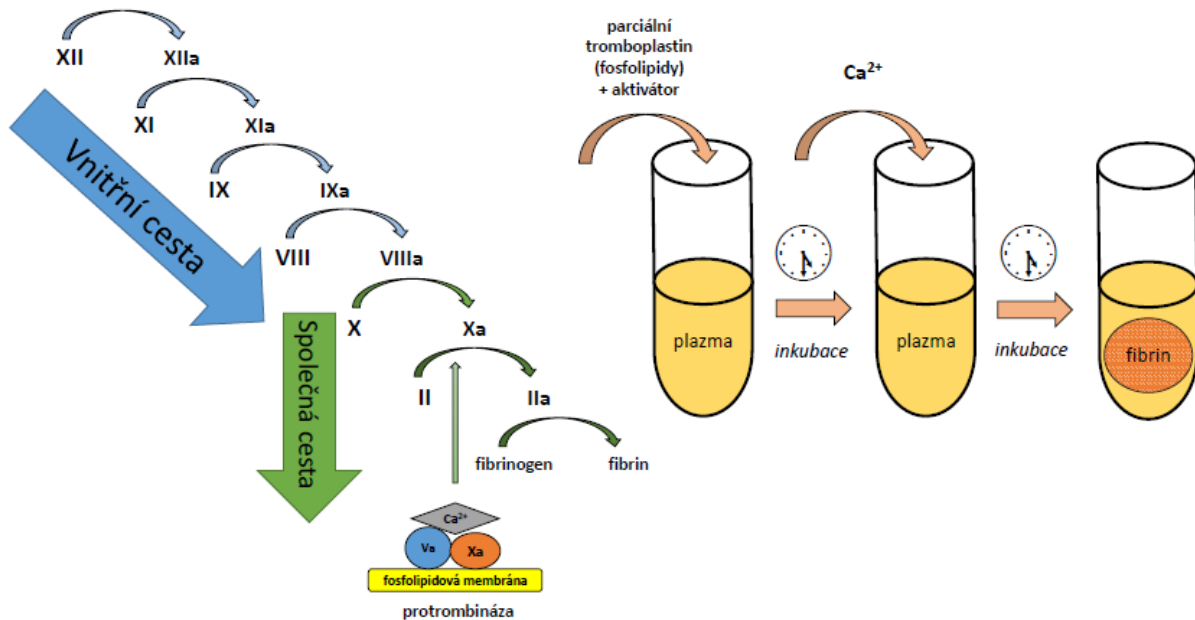
Výsledky APTT jsou vyjadřovány v podobě poměru koagulačních časů testované plazmy a plazmy normální (R):

$$R = \left(\frac{\text{koagulační čas plazmy pacienta v s}}{\text{koagulační čas normální plazmy v s}} \right)$$

- Referenční rozmezí:

R: 0,8 – 1,2

Obr. 4 Průběh a provedení aktivovaného parciálního tromboplastinového času



Prodloužení APTT nastává u pacientů léčených **nefrakcionovaným heparinem**, ale nikoliv nízkomolekulárními hepariny, a v menší míře doprovází i léčbu kumarinovými preparáty. Jinou příčinou prodloužení APTT může být nedostatek faktorů vnitřní koagulační cesty, ať vrozený (hemofilie A, B nebo C) nebo získaný (snížená syntéza v játrech nebo zvýšené ztráty či zvýšená spotřeba), popř. přítomnost patologického inhibitoru. K prodloužení APTT je zapotřebí, aby některý z participujících faktorů poklesl obvykle pod 40 %.

3. Trombinový čas (TT – trombin time)

Princip

Trombinový čas je rutinně prováděný test hodnotící **poslední fázi koagulace měřením rychlosti přeměny fibrinogenu na fibrin** za účasti trombinu. Ten odštěpuje z řetězců fibrinogenu fibrinopeptidy A a fibrinopeptidy B, po jejichž oddělení vznikají fibrinové monomery. Jejich spontánní polymerací se vytváří rozpustný fibrin, který je dále stabilizován faktorem XIII v přítomnosti Ca²⁺. Proces zpevnění fibrinu trombinový čas již nepostihuje. Trombinový čas není ovlivněn nedostatkem koagulačních faktorů, účastnících se koagulační kaskády před trombinem, ani endogenním trombinem.

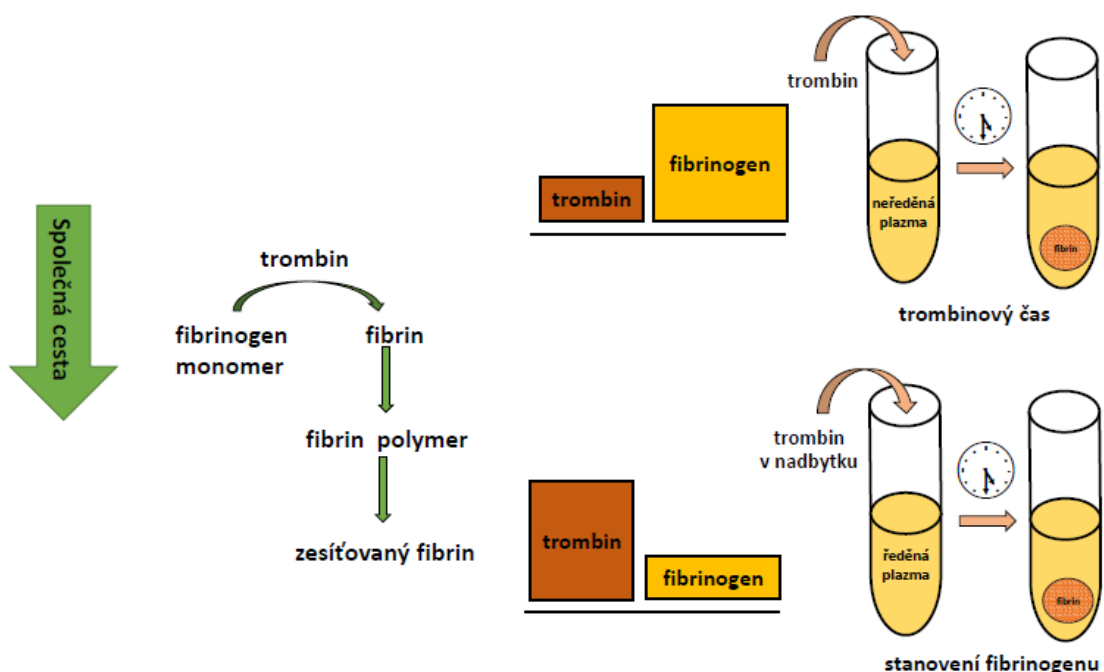
Činidlo

Činidlo obsahuje hovězí nebo lidský trombin. Součástí činidla mohou být i Ca²⁺ ionty, ale rekalifikace plazmy není nezbytná.

Provedení testu

K **neředěné** citrátové plazmě je přidán trombin v nízké koncentraci. Sleduje se čas potřebný k vytvoření koagula, jehož normální hodnoty jsou mezi 14–18 (až 23) sekundami (obr. 5).

Obr. 5 Průběh a provedení trombinového času a stanovení fibrinogenu



Hodnocení

Hodnoty závisí na použitém trombinu. Výsledky se vyjadřují jako u předchozích testů ve formě poměru času zjištěného u pacienta a času normální plazmy.

- **Referenční rozmezí**

Poměr R: 0,8 – 1,2

Trombinový čas slouží pro vyhledávání abnormalit fibrinogenu – získaného nebo vrozeného nedostatku fibrinogenu (hypofibrinogémie) či kvalitativních změn fibrinogenu spojených s narušením jeho funkce (dysfibrinogémie). Trombinový test reaguje na přítomnost heparinu, zejména nefrakcionovaného, nebo přímých inhibitorů trombinu (např. dabigatran) prodloužením koagulačního času. Prodloužení nastává i v přítomnosti dalších inhibitorů s antitrombinovým účinkem jako jsou

fibrin-degradační produkty, které navíc omezují polymeraci fibrinových monomerů. Test je proto možné využít pro sledování pacientů na trombolytické léčbě.

4. Stanovení fibrinogenu

Princip

Fibrinogen je koagulační faktor glykoproteinové povahy, jehož koncentrace v plazmě dosahuje ze všech koagulačních faktorů nejvyšší hodnot. Štěpení fibrinogenu na fibrinové monomery trombinem uzavírá celou koagulační kaskádu. Polymery fibrinových monomerů jsou základem definitivní hemostatické zátky. Fibrinogen se chová jako pozitivní reaktant akutní fáze.

Činidlo

Jako činidlo je používán hovězí nebo lidský trombin se stabilizátory. Mohou být přidány i Ca^{2+} ionty.

Provedení testu

Fibrinogen, který plní v koagulačním systému funkci substrátu, lze stanovovat funkčním testem a hodnotit schopnost jeho přeměny ve fibrin – metoda podle Clause. K **naředěné** plazmě se přidává vysoká koncentrace trombinu, narozdíl od trombinového testu, v němž je používán trombin v nízké koncentraci (obr. 5). Podmínky, kdy je v reakční směsi koncentrace fibrinogenu několikanásobně nižší než fyziologicky, zajistí, že koagulační čas nebude ovlivněn koncentrací trombinu a že **čas nutný ke vzniku koagula bude nepřímo úměrný množství fibrinogenu**.

Jinou možností je vyšetření fibrinogenu jako antigenu imunochemickými metodami pomocí specifických protilátek. Tento způsob neodliší funkční molekuly fibrinogenu od molekul s narušenou funkcí (dysfibrinogenémie). U dysfibrinogenémie, která může být spojena jak se sníženou srážlivostí krve, tak i se zvýšenou náchylností ke vzniku trombózy, budou koncentrace fibrinogenu stanovené imunochemickou metodou dosahovat obvykle vyšších hodnot ve srovnání s funkčním testem. Naopak u hypofibrinogenémie získáme shodně snížené výsledky při analýze fibrinogenu jako antigenu i při použití funkčního testu.

Hodnocení

Výsledky se uvádějí v g/l a odečítají se z kalibrační křivky sestavené z několika ředění komerční kalibrační plazmy.

- **Referenční rozmezí:**

1,8–4,2 g/l

Snížené hodnoty fibrinogenu mohou upozornit na získanou či vrozenou hypofibrinogenémii či dysfibrinogenémii. Při hodnocení koncentrace fibrinogenu je zapotřebí brát v úvahu, že patří k pozitivním proteinům akutní fáze. Jako reakce na akutní fázi (např. zánět, chirurgický zákrok) se zvýší syntéza fibrinogenu v játrech a koncentrace stoupne 3–5×. Zvyšuje se i v těhotenství. Zvýšené koncentrace fibrinogenu jsou považovány za jeden z rizikových faktorů pro vznik trombózy.

V tab. 1 jsou shrnuty základní údaje o uvedených koagulačních testech.

Tab. 1 Vybrané koagulační testy – základní informace

Test	Reagencie	Testovaná fáze hemokoagulace	Poznámka
Protrombinový čas – PT (Quick)	tromboplastin (tkáňový faktor, fosfolipidy) Ca ²⁺	vnější a společná cesta	kontrola léčby kumarinovými antikoagulancii (warfarin), orientačně ke kontrole účinnosti inhibitorů faktoru Xa (např. rivaroxaban)
Aktivovaný parciální tromboplastinový čas - APTT	parciální tromboplastin (fosfolipidy) Ca ²⁺ kontaktní aktivátory (např. křemičitany, kaolin, kys. elagová)	vnitřní a společná cesta	kontrola léčby nefrakcionovaným heparinem, orientační kontrola účinnosti přímého inhibitoru trombinu dabigatranu
Trombinový čas – TT	trombin (nízká koncentrace)	přeměna fibrinogenu na fibrin	vyhledávání hypofibrinogenémie nebo dysfibrinogenémie
Fibrinogen	metoda dle Clausse: trombin (vysoká koncentrace)	přeměna fibrinogenu na fibrin	dtto reaktant akutní fáze

Literatura

1. Investigation of Haemostasis. [cit. 2020-06-02]. Dostupné na: <https://oncohemakey.com/investigation-of-haemostasis-2/>
2. PECKA, Miroslav. Laboratorní hematologie v přehledu. [Díl. 3], Fyziologie a patofyziologie hemostázy. [1. vyd.]. Český Těšín: FINIDR, 2004. ISBN 80-86682-01-3.
3. Vyšetření krevní srážlivosti. [online] [cit. 2020-06-02]. Dostupné na: <https://www.wikiskripta.eu/index.php?oldid=434166>
4. ZIMA, Tomáš. laboratorní diagnostika. In PACÍK, Dalibor. Laboratorní diagnostika. 2, doplněné, přepracované. Praha: Galén, 2007. s. 490-493. Galén. ISBN 978-80-7262-372-3.