

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra farmakologie a toxikologie

**Laboratorní diagnostika protilátek typu lupus antikoagulans**

(bakalářská práce)

**Hradec Králové, 2007**

Marie Kozlíková

Poděkování Ing. Elišce Peškové za odborné vedení, poskytnutí informací a pomoc při stylizaci bakalářské práce.

# OBSAH

1.	Úvod a cíl .....	4
2.	Teoretická část .....	5
3.	Experimentální část .....	7
3.1.	Materiál a metody .....	7
3.1.1.	Sreening .....	7
3.1.2.	Směsné testy.....	8
3.1.3.	Diluční konfirmační testy .....	8
3.1.4.	Neutralizační konfirmační test s hexagonální strukturou fosfolipidů .....	8
3.1.5.	Použitý materiál .....	10
3.1.5.1.	Soubor pacientů .....	10
3.1.5.2.	Odběr primárního vzorku a transport.....	10
3.1.5.3.	Manipulace se vzorky .....	10
3.1.5.4.	Přístroje a pomůcky .....	11
3.1.5.5.	Spotřební materiál .....	11
3.1.6.	Testy použité pro laboratorní diagnostiku lupus antikoagulans.....	12
3.1.6.1.	Aktivovaný parciální tromboplastinový test citlivý na lupus antikoagulans .....	12
3.1.6.2.	Test s jedem Russelovy zmije – ředěný .....	15
3.1.6.3.	Protrombinový test .....	18
3.1.6.4.	Aktivovaný parciální tromboplastinový test .....	21
3.1.6.5.	Trombinový test .....	24
3.1.6.6.	Směsné (korekční) testy .....	27
3.1.6.7.	Diluční konfirmační testy .....	29
3.1.6.8.	Neutralizační konfirmační test .....	32
3.2.	Výsledy .....	36
3.2.1.	Tabulky ..	36
3.2.2.	Grafy .....	40
4.	Diskuse .....	43
5.	Závěr .....	46
6.	Zkratky .....	47
7.	Literatura .....	48

# 1. ÚVOD A CÍL

Protilátky typu lupus antikoagulans představují významné riziko pro vznik tromboembolické nemoci. Jejich laboratorní diagnostika je značně komplikovaná a mnohdy bývá podceňována.

Cílem této práce je ucelená laboratorní diagnostika protilátek typu lupus antikoagulans. Práce je zaměřena především na podrobný popis jednotlivých testů používaných v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu lupus antikoagulans, na problematiku odběru a zpracování biologického materiálu, včetně skladování vyšetřovaného materiálu a jeho přípravy k vyšetření. K názorné ukázce laboratorní diagnostiky protilátek typu lupus antikoagulans byl použit soubor 26 pacientů vyšetřených v hematologické laboratoři II. Interní kliniky Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

Protilátky typu lupus antikoagulans patří mezi získané nespecifické protilátky. Jedná se o tzv. antifosfolipidové protilátky (APA). Je to skupina autoprotilátek namířených proti plazmatickým proteinům vázaných na negativně nabitě povrchy. APA mohou být zjišťovány v plazmě na základě jejich schopnosti prodlužovat koagulační testy závislé na fosfolipidech – protilátky typu lupus antikoagulans (LA) a nebo v séru v jednotlivých třídách imunoglobulinů (IgG, IgM, IgA nebo jejich směs) jako tzv. antikardiolipinové protilátky (ACLA) RIA nebo ELISA metodami. Jde zřejmě o různé druhy autoprotilátek a proto jejich výskyt u daného pacienta nemusí být současný. Působení APA není jednoznačně známé, v systému krevního srážení působí zřejmě na více úrovních, především na endotelu, na systému proteinu C a na primární hemostázu (Matýšková a kol., 1999). Protilátky typu LA vstupují do koagulačního děje na různých úrovních koagulačního procesu, reagují s prokoagulačními fosfolipidy a soutěží o místa na nich s faktory koagulačního systému. Tím omezují vázání těchto faktorů do koagulačně aktivních komplexů a způsobují abnormální nálezy koagulačních testů (Pecka, 2004).

Přestože in vitro nacházíme prodloužené koagulační testy (tj. laboratorní známky hypokoagulace), in vivo je naopak výrazný sklon k trombofilii. Krvácivé projevy se objevují zřídka, spíše u nemocných, kde je výskyt protilátek spojen s těžkou trombocytopenií.

Laboratorní stanovení LA by měla provádět specializovaná laboratoř. Pokud dojde ke špatnému zpracování vzorků, existuje riziko vysokého procenta falešně negativních výsledků (plazma na toto vyšetření se musí zpracovávat odlišným způsobem). K laboratorní diagnostice LA se využívá schopnosti antifosfolipidových protilátek in vitro prodlužovat koagulační testy závislé na fosfolipidech. Diagnostika LA je problematická, protože jednak neexistuje 100% citlivý screeningový test, jednak je také nutné v případě prodloužení vyloučit jiné možné příčiny. Z těchto důvodů byla vypracována následující minimální kritéria k identifikaci lupus antikoagulans (doporučení SSC ISTH dle Tripleta):

1. Průkaz patologie testů závislých na fosfolipidech (screening).
2. Průkaz inhibitoru - směsné testy (vyloučení defektu faktoru, ovlivnění heparinem apod.).

3. Průkaz charakteru tohoto inhibitoru (proti fosfolipidům nebo fosfolipid-proteinovým komplexům) – diluční konfirmační testy (Kolde, 2004) a neutralizační konfirmační testy (Matýšková a kol., 1999).

Protilátky typu LA se převážně vyskytují u pacientů, kteří mají systémový lupus erythematoses (asi u 30 % nemocných) nebo jiné systémové onemocnění pojiva, zejména pak u žen. Mohou být však vyvolány i některými léky. Často se nacházejí také u pacientů s maligními lymfomy a mohou se objevit (většinou jen laboratorně) i v průběhu některých infekčních chorob.

Klinické projevy antifosfolipidového syndromu jsou značně heterogenní. LA protilátky mohou jevit i určitou specifitu vůči koagulačním faktorům - např. proti faktoru VIII, vWF, faktorům protrombinového komplexu aj., a podporovat tak sklon ke krvácení. Diagnostikuje se pseudohemofilie, porucha protrombinového komplexu (s prodloužením protrombinového testu) nebo pseudo von Willebrandův syndrom.

Většinou se však při antifosfolipidovém syndromu vyskytují trombotické příhody (asi v 60 % jde o žilní trombózy, ve 30 % o cévní mozkové příhody a v 10 % o jiné arteriální trombózy). LA zde reagují s fosfolipidy destiček a endotelu, jež aktivují, a dále s vrstvou heparanů, které mají na povrchu endotelu mimo jiné inhibovat trombin a rušit ochranný štít annexinu V. LA zde však způsobí i snížení tvorby prostacyklinu. Aktivované endotelie při ataku antifosfolipidových protilátek typu LA dále ve zvýšené míře exprimují adhezivní molekuly, které z cirkulující krve vychytávají a zachycují leukocyty (granulocyty, monocyty). Ty se pak aktivují, což opět zvyšuje trombofilii. Reakcí s LA mohou být navíc inaktivovány i další inhibitory krevního srážení – protein C, protein S, trombomodulin nebo antitrombin.

V graviditě se projevy antifosfolipidového syndromu vždy zhorší. Tento syndrom se zde může také poprvé manifestovat. U těhotných žen však při výskytu LA dochází k trombotizaci nejen v jejich žilním nebo arteriálním řečišti, ale i v placentě. LA jsou také velmi často nepoznanou příčinou spontánních potratů (Kvasnička, 2003).

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Materiál a metody

#### 3.1.1. Screening

- Ve screeningu prokazujeme patologii testů závislých na fosfolipidech, dále je nutné vyloučit případnou antikoagulační léčbu pomocí rutinních koagulačních testů (viz obr. č. 1).
- U vyšetřované plazmy provedeme následující vyšetření: protrombinový test (PT), aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT), APTT citlivý na LA (APTT-LA), diluční test s jedem Russelovy zmije (dRVVT) a trombinový test (TT).
- V případě, že jsou výsledky testů v rozmezí normálních hodnot, dále již v laboratorní diagnostice LA nepokračujeme.
- Je-li některý z testů prodloužený (viz dále), provedeme směsné testy
  - PT:  $R > 1,30$
  - APTT:  $R > 1,20$
  - APTT-LA:  $R > 1,40$
  - dRVVT:  $R > 1,20$
- Je-li současně prodloužený trombinový čas ( $R > 1,20$ ), provedeme test s toluidinovou modří – test slouží pro průkaz přítomnosti heparinu v plazmě.
- Zjistíme-li přítomnost heparinu ve vyšetřovaném vzorku (dojde ke korekci testu po přidání toluidinové modří), ve vyšetření dále nepokračujeme – výsledky vyšetření by pravděpodobně byly ovlivněny antikoagulační léčbou heparinem (falešně pozitivní nález).

Mezi screeningové testy bývá v některých laboratořích také zařazován kaolinový čas, který je obzvláště citlivý na množství krevních destiček v plazmě a je vhodný k použití zejména u těhotných žen (Kmeřová, 2006). Součástí screeningu mohou být také testy využívající hadí jedy - textarinový a taipanový čas (Matýšková, 1999).

### **3.1.2. Směsné testy**

- Pomocí směsných testů vyloučíme defekty koagulačních faktorů, ovlivnění výsledků vyšetření heparinem apod. (viz obr. č. 1).
- Smísíme jeden objemový díl vyšetřované plazmy s jedním objemovým dílem normální směsné plazmy, necháme 1 hod inkubovat při 37 °C a poté provedeme ty testy, které byly ve screeningu prodloužené. Zamrazíme plazmu na konfirmační neutralizační test s hexagonální strukturou fosfolipidů.
- Dojde-li ke korekci testů (LCA index  $\leq 15$ ), dále ve vyšetřování nepokračujeme. V případě, že ke korekci nedošlo, inkubujeme směs 2 hod při 37 °C a opět provedeme příslušný test.
- V případě, že dojde ke korekci, v testování dále nepokračujeme. Pokud ke korekci nedojde ani po 2 hodinové inkubaci pokračujeme vyšetřením dilučních konfirmačních testů.

### **3.1.3. Diluční konfirmační testy**

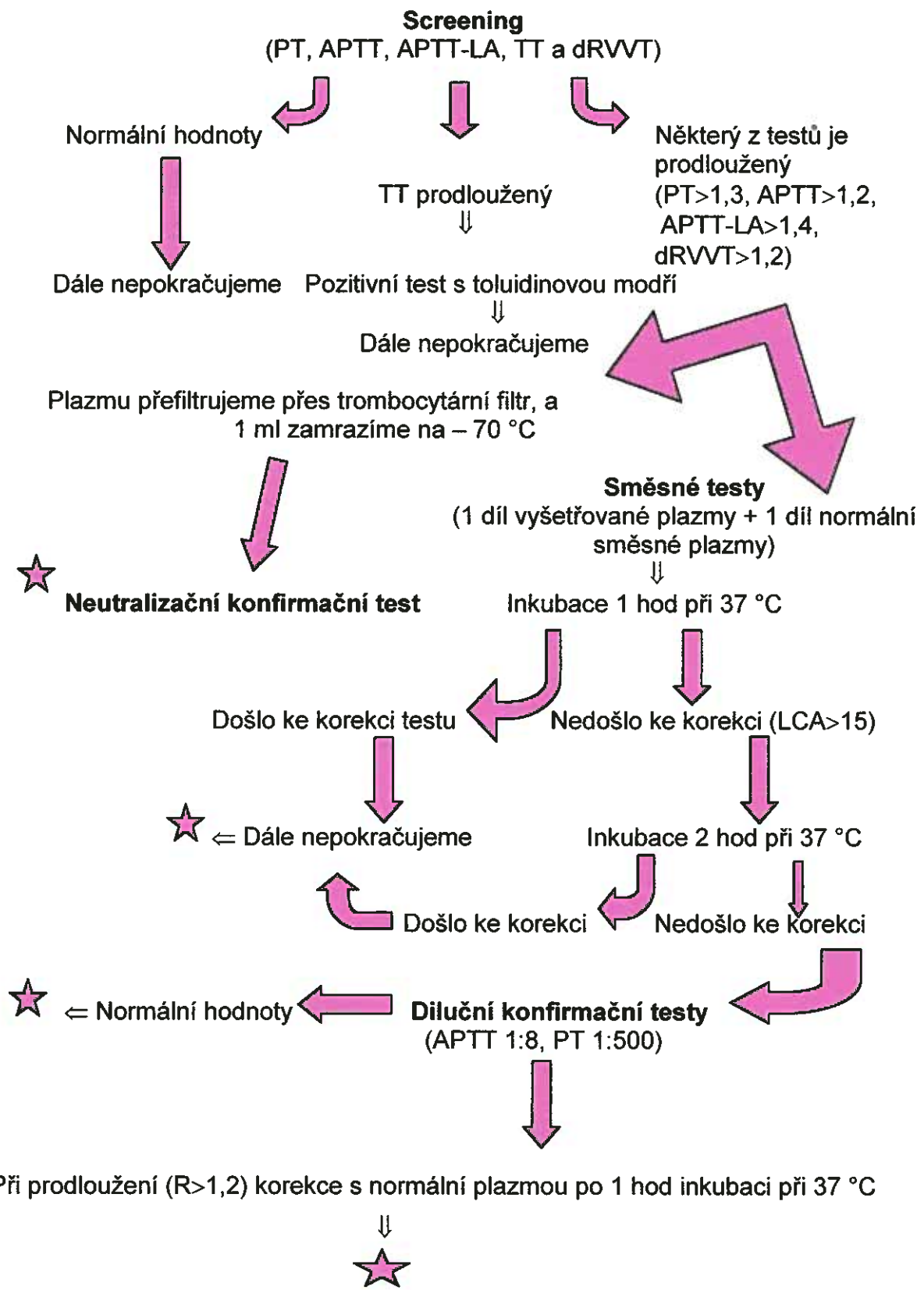
- U vyšetřované plazmy provedeme test s ředěnou PT a APTT reagensií (viz obr. č. 1).
- V případě, že je koagulační čas prodloužený ( $R > 1,20$ ), inkubujeme 1 díl vyšetřované plazmy s 1 dílem normální plazmy 1 hodinu při 37 °C a poté znovu vyšetříme daný diluční konfirmační test.
- Pokračujeme vyšetřením destičkového neutralizačního konfirmačního testu.

### **3.1.4. Neutralizační konfirmační test s hexagonální strukturou fosfolipidů**

- Vyšetření slouží k průkazu charakteru inhibitoru (viz obr. č. 1).
- Test se provádí pouze v tzv. sériích, tedy až po nashromáždění určitého počtu vzorků.



Obr. č. 1  Vyšetřovací schéma laboratorní diagnostiky protilátek typu LA



### **3.1.5. Použitý materiál**

#### **3.1.5.1. Soubor pacientů**

Soubor pacientů tvoří 26 vzorků plazem pacientů vyšetřovaných v hematologické laboratoři II. Interní kliniky – Oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové pro různé diagnózy.

Tuto skupinu tvořilo:

- 15 žen ve věku od 17 do 71 let, průměrný věk 44 let
- 11 mužů ve věku od 37 do 66 let, průměrný věk 56 let

#### **3.1.5.2. Odběr primárního vzorku a transport**

Odebere se 9 dílů krve do zkumavky z umělé hmoty s 1 dílem 0, 109 mol/l (3,2%) citrátu sodného.

Počet zkumavek: 3

Minimální objem odběrové zkumavky: 3 ml

Odebraný materiál je nutné co nejrychleji transportovat do laboratoře při teplotě 18-25 °C, nejdéle do 2 hodin po odběru.

Z důvodů poměrně náročné přípravy materiálu (viz manipulace se vzorky) se nedoporučuje dodávat do laboratoře zmraženou plazmu připravenou běžným způsobem (riziko falešně negativních výsledků)!

#### **3.1.5.3. Manipulace se vzorky**

Příjem vzorků laboratoří: identifikace materiálu, zadání do LIS (přiřazení identifikačního čísla).

Dvojnásobná centrifugace: centrifugovat citrátovou krev 15 min při 3000 g (přibližně 4000 otáček/min). Plazmu stáhnout a znovu centrifugovat 15 min při 3000 g. Množství krevních destiček v plazmě po dvojnásobné centrifugaci by mělo být nižší než  $10 \cdot 10^9/l$  (Brandt, 1995).

Pokud se plazma nepoužije ihned nebo se použije jen její část, je nutné plazmu přefiltrovat přes trombocytární filtr a zamrazit při -70 °C.

Plazma je stabilní 2 hodiny při 18-25 °C, 3 měsíce při -70 °C.

#### **3.1.5.4. Přístroje a pomůcky**

Centrifuga JOUAN C3i, automatický koagulometr STA Compact (STA-R), poloautomatický koagulometr ST4, automatické pipety

#### **3.1.5.5. Spotřební materiál**

Mikrozkumavky, trombocytární filtr (Filtropur S 0,2; Poresize 0,2  $\mu\text{m}$ ; firma Sardstedt), kyvety ke koagulometru, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám

### 3.1.6. Testy použité pro laboratorní diagnostiku protilátek typu lupus antikoagulans

#### 3.1.6.1. Aktivovaný parciální tromboplastinový test citlivý na lupus antikoagulans

##### Fáze před vyšetřením

APTT citlivý na LA (APTT-LA) slouží jako screeningový test v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu lupus antikoagulans. Citlivost reagentie k LA je dána typem fosfolipidů, sníženým množstvím fosfolipidů a nebo jejich změněným poměrem.

##### Princip

Princip testu je založen na měření rekalcifikačního času vyšetřované plazmy v přítomnosti kefalínu (fosfolipidy destičkového typu) a aktivátoru (silika). V plazmě chudé na destičky dochází postupně k aktivaci mediátorů vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin, vzniklý trombin aktivuje následně přeměnu fibrinogenu na fibrin. Přítomnost protilátek typu lupus antikoagulans v plazmě způsobí prodloužení koagulačního času.

##### Přístroje

Koagulometr STA Compact (STA-R)

##### Reagencie

Set: APTT- LA, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 6 x 2 ml reagentie obsahující kefalín, aktivátor (silika) a pufr (glycín)

Reagencie neobsažené v setu:

- 0,025 mol/l  $\text{CaCl}_2$
- Voda pro injekce

Stabilita reagentií viz tabulka č. 1:

Tab. č. 1

Set	2-8 °C	do expirace
Naředěný APTT-LA (nezamrazovat!)	2-8 °C	5 dní
	15-19 °C	96 hodin
Roztok $\text{CaCl}_2$	15-19 °C	3 dny

### Příprava k činnosti

PTT-LA: obsah lahvičky naředit 2 ml vody pro injekce, nechat stát 30 min při laboratorní teplotě a jemně promíchat, aby se vytvořil homogenní roztok.

Roztok CaCl<sub>2</sub>: je připraven k použití.

### Pracovní postup

Provedeme identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do analyzátoru. Metodicky se postupuje dle návodu k obsluze, nastavení koagulometru viz tabulka č. 2.

Tab. č. 2

Nastavení koagulometru	
Testovaná plazma	50 µl
Reagencie APTT-LA	50 µl
Inkubace (37 °C)	240 s
CaCl <sub>2</sub>	50 µl
Měřit koagulační čas.	

### Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Výpočet poměru R:

$$R = \frac{\text{čas vyšetřované plazmy}}{\text{čas normální plazmy}}$$

Způsob vydávání výsledků:

Časy pacienta a normální plazmy v sekundách a jejich poměr R.

### Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: poměr R = 0,80 – 1,20

### Interpretace výsledků, konzultační činnost a hlášení

Klinické použití: součást screeningu v laboratorní diagnostice lupus antikoagulans.

Prodloužení času APTT-LA nemusí být vždy způsobeno přítomností lupus antikoagulans. Tyto další možné důvody prodlouženého testu

(dysfibrinogenémie, přítomnost heparinu, deficit koagulačních faktorů nebo přítomnost specifického inhibitoru) je v rámci laboratorní diagnostiky lupus antikoagulans nutno vyloučit.

### Řízení jakosti

Pro denní kontrolu přesnosti používáme normální a patologickou plazmu.

Reagencie pro denní kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 minut při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

Coag-Path, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 min při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

Stabilita reagensů pro kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, Coag-Path (naředěné)    15- 19 °C    4 hodiny

### 3.1.6.2. Test s jedem Russelovy zmije - ředěný

#### Fáze před vyšetřením

Test s jedem Russelovy zmije (ředěný) slouží jako screeningový test v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu lupus antikoagulans. V přítomnosti protilátek typu LA dochází k výraznému prodloužení dRVVT testu, který se nekoriguje ani po směsných testech s normální plazmou.

#### Princip

Přidáním jedu Russelovy zmije k testované plazmě chudé na destičky dojde k aktivaci faktoru X v přítomnosti vápenatých iontů. Tím je eliminován vliv abnormalit koagulačních faktorů vnější a vnitřní cesty koagulační kaskády (Thiagarajan, 1986). Aktivovaný faktor X v přítomnosti purifikovaných fosfolipidů destičkového typu (kefalin) následně aktivuje přeměnu protrombinu na trombin, vzniklý trombin dále aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin a posléze na nerozpustný fibrin.

#### Přístroje

Automatický koagulometr STA Compact (STA-R)

#### Reagencie

- Kefalin-kaolinové reagens, výrobce firma EXBIO Olomouc s.r.o.

Balení: 1 x 3 ml lyofilizovaného kefalínu (lahvička s kaolinem zůstává nevyužita)

Russel Viper Venom, výrobce firma Wellcome Diagnostics

Balení: 5 x 0,2 mg jedu Russelovy zmije

- TRIS pufr o pH= 7,5 a roztok 0,025 mol/l CaCl<sub>2</sub>

Stabilita reaglií viz tabulka č. 3:

Tab. č. 3

Jed Russelovy zmije (zásobní roztok)	2-8 °C	1 měsíc
Jed Russelovy zmije (pracovní roztok)	15-19 °C	48 hodin
Kefalin (naředěný)	15-19 °C	5 dní
	-20°C	3 měsíce
TRIS pufr	2-8 °C	do expirace
CaCl <sub>2</sub>	18-25 °C	do expirace

### Příprava k činnosti

#### Příprava reagensí:

TRIS pufr o pH= 7,5 ⇒ složení pufru: 0,15 mol/l NaCl + 0,02 mol/l TRIS.

Kefalin: obsah lahvičky s kefalinem naředit 3 ml TRIS pufru, nechat stát 30 min při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat. Z takto připraveného roztoku kefalínu připravit pracovní roztok kapalinu naředěním TRIS pufrům v poměru 1:8 (0,2 ml roztoku kefalínu + 1,6 ml TRIS pufru). Nespotebovaný pracovní roztok rozpipetovat do zkumavek z umělé hmoty, zmrazit a skladovat při -20 °C.

Jed: obsah lahvičky rozpustit ve 2 ml fyziologického roztoku. Z takto připraveného zásobního roztoku vždy připravit čerstvý pracovní roztok naředěním TRIS pufrům v poměru 1:200 (0,01 ml zásobního roztoku jedu Russelovy zmiije + 2 ml TRIS pufru). Nespotebovaný zásobní roztok jedu Russelovy zmiije skladovat v lednici při 2-8 °C.  
Roztok CaCl<sub>2</sub>: je připraven k použití

### Pracovní postup

Provedeme identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do analyzátoru. Metodicky se postupuje dle návodu k obsluze, nastavení koagulometru viz tabulka č. 4.

Tab. č. 4

Nastavení koagulometru	
Plazma	50 µl
Hadí jed	50 µl
Kefalin	50 µl
Inkubace (37 °C)	60 s
CaCl <sub>2</sub>	50 µl
Měřit koagulační čas.	

### Charakteristika spolehlivosti

Rozsah měření: 15 -180 s

Poměrně vysoká citlivost dRVVT testu k LA je dána sníženým množstvím fosfolipidů.

### Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítá se čas z koagulometru.



Výpočet poměru R:

$$R = \frac{\text{čas vyšetřované plazmy}}{\text{čas normální plazmy}}$$

Způsob vydávání výsledků:

Časy pacienta a normální plazmy v sekundách, poměr R.

#### Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: poměr R= 0,80-1,20

#### Interpretace výsledků

Klinické použití: v laboratorním screeningu lupus antikoagulans, ale i jako diluční konfirmační test v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu LA.

#### Řízení jakosti

Pro denní kontrolu přesnosti používáme normální a patologickou plazmu.

Reagencie pro denní kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 minut při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

Coag-Path, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 min při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

Stabilita reagensů pro kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, Coag-Path (naředěné)    15- 19 °C    4 hodiny

### **3.1.6.3. Protrombinový test**

#### **Fáze před vyšetřením**

Protrombinový test je základní test aktivity faktorů protrombinového komplexu (postihuje poruchy vnější cesty aktivace protrombinu na trombin; faktory II, V, VII a X).

#### **Princip**

K citrátové plazmě se přidá tkáňový tromboplastin obsahující vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Sleduje se koagulační čas do vytvoření prvních fibrinových vláken.

#### **Přístroje**

Automatický koagulometr STA Compact (STA-R)

#### **Reagencie**

- Set: DG-PT, výrobce firma Grifols

Balení: 6 x 10 ml (králičí tromboplastin s kalciumem)

Reagencie neobsažené v setu:

- Voda pro injekce

Stabilita reagensů:

tromboplastin (lyofilizovaný)	2-8 °C	do expirace
tromboplastin (naředěný)	15-19 °C	48 hodin

#### **Příprava k činnosti**

Příprava reagensů:

Obsah lahvičky reagensie DG-PT rozpustit v 10 ml vody pro injekce. Nechat stát 30 minut při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat. Před vložením reagensie do automatického koagulometru vložit do lahvičky s reagensií bílé magnetické míchadélko (reagensie je ve stroji neustále promíchávána a tím se roztok tromboplastinu udržuje homogenní).

#### **Pracovní postup**

Provedeme identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do analyzátoru. Metodicky se postupuje dle návodu k obsluze. Nastavení koagulometru

viz tabulka č. 5.

Tab. č. 5

Nastavení automatického koagulometru	
Plazma	50 µl
Inkubace (37 °C)	240 s
Tromboplastin s kalciem	100 µl
Ihned po přidání tromboplastinu s kalciem měříme koagulační čas.	

### Charakteristika spolehlivosti

Rozsah měření: 4 – 90 s

### Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítají se koagulační časy normální plazmy a plazmy pacienta z koagulometru.

Výpočet poměru R (vypočte se automaticky v koagulometru, případně v LIS):

$$R = \frac{\text{čas vyšetřované plazmy}}{\text{čas normální plazmy}}$$

Výpočet INR (vypočte se automaticky v koagulometru, případně v LIS):

$$INR = (t_n/t_k)^{ISI}$$

tn - čas plazmy pacienta  
tk - čas normální plazmy  
ISI - index citlivosti tromboplastinu  
INR - mezinárodní normalizovaný poměr

Způsob vydávání výsledků:

Časy kontroly a pacienta v sekundách, hodnota poměru R (mezinárodní normalizovaný poměr INR se používá pouze pro monitorování antikoagulační léčby antagonisty vitamínu K).

### Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: R = 0,80 – 1,20 (± 3 s od normální kontroly)

### Interpretace výsledků

#### Klinická interpretace:

Protrombinový test se využívá při diagnóze poruch jaterního parenchymu a u koagulopatií jiného typu s poruchou tvorby aktivátorů protrombinu (poruchy vnější cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin; faktory II, V, VII a X). Používá se též k monitorování antikoagulační léčby založené na antagonistech vitamínu K (INR u léčených pacientů se pohybuje v rozmezí 2,0 – 4,0).

### Řízení jakosti

Pro denní kontrolu přesnosti používáme normální a patologickou plazmu.

#### Reagencie pro denní kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 minut při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

Coag-Path, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 min při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

#### Stabilita reagensů pro kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, Coag-Path (naředěné)      15- 19 °C      4 hodiny

### **3.1.6.4. Aktivovaný parciální tromboplastinový test**

#### **Fáze před vyšetřením**

Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT) je základní koagulační test monitorující vnitřní cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin.

#### **Princip**

V přítomnosti purifikovaných fosfolipidů destičkového typu (kefalin), kalcia a povrchového aktivátoru na bázi křemičitanů dochází v plazmě chudé na destičky k aktivaci mediátorů vnitřní cesty přeměny protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje následně přeměnu fibrinogenu na fibrin a posléze na nerozpustný fibrin.

#### **Přístroje**

Automatický koagulometr STA Compact (STA-R)

#### **Reagencie**

Set: PTT- Automate 10, výrobce firma Diagnostica Stago

Balení: 12 x 10 ml reagencie PTT-Automate (lyofilizovaná směs fosfolipidů z mozkové tkáně v pufované suspenzi křemičitanového aktivátoru s přidanými stabilizátory)

Reagencie neobsažené v setu:

- 0,025 mol/l  $\text{CaCl}_2$
- Voda pro injekce

Stabilita reaglií viz tabulka č. 6:

Tab. č. 6

Set PTT-Automate	2-8 °C	do expirace
Naředěná reagencie APTT	15-19 °C	96 hodin
Naředěná reagencie APTT	2-8 °C	7 dní
0,025 mol/l $\text{CaCl}_2$ (v přístroji)	15-19 °C	3 dny
0,025 mol/l $\text{CaCl}_2$ (zásobní roztok)	18-25 °C	do expirace

### Pracovní postup

Provedeme identifikaci vzorků, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do přístroje. Metodicky se postupuje dle návodu přístroje, nastavení koagulometru viz tabulka č. 7.

Tab. č. 7

Nastavení automatického koagulometru	
Plazma	50 µl
Reagencie PTT-Automate	50 µl
Inkubace (37 °C)	240 s
0,025 mol/l CaCl <sub>2</sub>	50 µl
Ihned po přidání kalcia začít měřit koagulační čas	

### Charakteristika spolehlivosti

Rozsah měření: 20 – 180 s

### Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítají se koagulační časy normální plazmy a plazmy pacienta z koagulometru. Výpočet poměru R (vypočte se automaticky v automatickém koagulometru, příp. v LIS).

$$R = \frac{\text{čas vyšetřované plazmy}}{\text{čas normální plazmy}}$$

Způsob vydávání výsledků:

Časy pacienta a normální plazmy v sekundách a jejich poměr R.

### Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: poměr R = 0,90 – 1,10 (± 4 s od normální plazmy)

### Interpretace výsledků

APTT se využívá při diagnóze koagulopatií s poruchou vnitřního koagulačního systému. Prodloužené časy dostáváme u jaterních nemocí, při poruchách faktorů

vnitřního koagulačního systému (VIII, IX, XI a XII), u hemofilií, při nedostatku vitamínu K, v přítomnosti látek s antitrombotickým účinkem. APTT však nepostihuje faktory VII a XIII a jakékoli změny v počtu či kvalitě trombocytů. Tento test se také používá ke kontrole heparinové terapie.

### Řízení jakosti

Pro denní kontrolu přesnosti používáme normální a patologickou plazmu.

Reagencie pro denní kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 minut při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

Coag-Path, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 min při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

Stabilita reagensů pro kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, Coag-Path (naředěné)    15- 19 °C    4 hodiny

### **3.1.6.5. Trombinový test**

#### **Fáze před vyšetřením**

Trombinový test postihuje tzv. třetí fázi koagulace, tj. štěpení fibrinogenu trombinem. Přítomnost některých antitrombotických látek (heparin, FDP) působí na reakci inhibičně.

#### **Princip**

Přidáním enzymu trombinu k testované plazmě je vyvolána přeměna fibrinogenu na nerozpustný fibrin bez účasti koagulačních faktorů vnější a vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin a bez  $\text{Ca}^{2+}$ . Rychlost této přeměny je za podmínek testu přímo úměrná koncentraci fibrinogenu a vyjadřuje se tzv. trombinovým časem.

#### **Přístroje**

Automatický koagulometr STA Compact (STA-R)

#### **Reagencie**

Topostasin, výrobce Hoffman-La Roche and Co. Ltd.

Balení: 5 lahviček trombinu o aktivitě 3000 NIH (standardizovaný lyofilizovaný trombin o vysoké aktivitě připravený z hovězí plazmy).

Fyziologický roztok

#### **Příprava k činnosti**

Příprava reagií:

Obsah lahvičky trombinu se naředí 400-450 ml fyziologického roztoku, rozpipetuje se po 1 ml do zkumavek z umělé hmoty a zamrazí se při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Před stanovením trombinového času se po rozmrazení k 1 ml trombinu přidá cca 2-4 ml fyziologického roztoku (tak, aby se čas normální kontrolní plazmy pohyboval v rozmezí 12-16 s).

Stabilita reagií:

Naředěný roztok trombinu	$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	3 měsíce
Pracovní roztok trombinu	$15-19\text{ }^{\circ}\text{C}$	24 hodin



### Pracovní postup

Provedeme identifikaci vzorků, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do přístroje. Metodicky se postupuje dle návodu přístroje, nastavení koagulometru viz tabulka č. 8.

Tab. č. 8

Nastavení automatického koagulometru	
Plazma	100 µl
Inkubace (37 °C)	240 s
Pracovní roztok trombinu	100 µl
Měřit koagulační čas.	

### Charakteristika spolehlivosti

Rozsah měření: 4-180 s

### Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítají se koagulační časy normální plazmy a plazmy pacienta z koagulometru. Výpočet poměru R (vypočte se automaticky v automatickém koagulometru, příp. v LIS).

$$R = \frac{\text{čas vyšetřované plazmy}}{\text{čas normální plazmy}}$$

### Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: 12-16 s ( $\pm 3$  s od normální plazmy),  
poměr R = 0,80 – 1,20

### Interpretace výsledků

Klinické použití: prodloužení trombinového času může nastat při poklesu fibrinogenu (pod hodnoty 0,6 g/l), za přítomnosti látek s antitrombotickým účinkem (FDP, heparin) nebo u dysfibrinogenémií.

### Řízení jakosti

Pro denní kontrolu přesnosti se používá normální neatestovaná kontrolní plazma.

Reagencie pro denní kontrolu přesnosti:

Coag-Norm, výrobce firma Diagnostika Stago

Balení: 100 x 1 ml

Příprava: obsah lahvičky naředit 1 ml vody pro injekce, nechat stát 30 minut při laboratorní teplotě a poté jemně protřepat.

Stabilita reagií pro kontrolu přesnosti:

Coag-Norm (naředěná) 15- 19 °C 4 hodiny

### **3.1.6.6. Směsné (korekční) testy**

#### **Fáze před vyšetřením**

Korekční (směsné) testy umožňují odlišit, zda je prodloužení koagulačních časů způsobené defektem koagulačních faktorů (rovněž nutno vyloučit vliv kumarinů či heparinu) nebo přítomností inhibitoru v plazmě.

#### **Princip**

Vyšetřovaná plazma se smísí s normální plazmou v poměru 1:1. Směs se inkubuje 1 hodinu při laboratorní teplotě a poté se vyšetří test, který vyšel ve screeningu prodloužený. Sleduje se korekce prodloužených časů normální plazmou. Nedojde-li ke korekci (normalizaci) koagulačního času, inkubuje se směs 2 hodiny při laboratorní teplotě, opět se vyšetří daný test a sleduje se korekce.

#### **Přístroje**

Automatický koagulometr STA Compact (STA-R)

#### **Reagencie**

Normální směsná plazma pro korekce:

Používá se směsná plazma od minimálně 5 pacientů s normálními hodnotami základních koagulačních testů.

Další reagencie dle použitého testu.

#### **Příprava k činnosti**

Normální směsná plazma pro korekce:

Připravuje se stejným způsobem jako plazma pacienta ⇒ dvojnásobná centrifugace, filtrace přes trombocytární filtr. Poté se plazma rozpipetuje do mikrozkušavek a zamrazí při -70 °C.

Zamražená plazma se rozmrazí při teplotě 37 °C a vytemperuje na 37 °C.

Příprava reagentů viz příslušné testy.

#### **Pracovní postup**

Příprava směsi:

- Smísit jeden objemový díl vyšetřované plazmy s 1 objemovým dílem normální plazmy (do plastové zkumavky pipetovat např. 0,5 ml vyšetřované plazmy + 0,5 ml normální plazmy), promíchat.
- Nechat inkubovat 1 hod při laboratorní teplotě.
- Vyšetřit sledovaný test (nastavení koagulometru viz příslušný test).
- Nedojde-li k normalizaci testu, inkubovat další hodinu při laboratorní teplotě a znovu vyšetřit daný test.

#### Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítají se koagulační časy z koagulometru a sleduje se korekce koagulačních časů normální plazmou.

Pro posouzení, zda došlo či nedošlo ke korekci testů, se vypočítá tzv. LCA index (Rösnerův index):

$$LCA = \frac{\text{čas směsi} - \text{čas normální plazmy}}{\text{čas pacienta}} \times 100$$

Je-li LCA index  $\leq 15 \Rightarrow$  negativní nález (došlo ke korekci testu)

Je-li LCA index  $> 15 \Rightarrow$  pozitivní nález (test se nekoriguje)

Způsob vydávání výsledků:

Koagulační časy normální plazmy a směsi vyšetřované a normální plazmy po 1 hodinové event. po 2 hodinové inkubaci v sekundách.

Pro PT, APTT, APTT-LA a dRVVT se vypočítá hodnota poměru R směsi po 1 hodinové event. po 2 hodinové inkubaci (výpočet viz příslušný test).

#### Interpretace výsledků

Klinické použití: korekční test se používá jako základní orientační test, který pomůže rozhodnout, zda je prodloužení koagulačního testu způsobeno defektem koagulačních faktorů nebo přítomností inhibitoru. Pokud se jedná o deficit některého z faktorů, dojde po inkubaci s normální plazmou ke zřetelné úpravě nebo normalizaci koagulačního času. Je-li přítomen inhibitor (protilátka), k úpravě nedojde. Lupus antikoagulans je bezprostředně působící inhibitor - jeho přítomnost prodlouží čas směsi již po smíchání nebo krátké inkubaci.

K rozlišení (průkazu charakteru) inhibitorů se používají konfirmační testy.

### **3.1.6.7. Diluční konfirmační testy**

#### **Fáze před vyšetřením**

APA mohou být zjišťovány v plazmě na základě jejich schopnosti prodlužovat koagulační testy závislé na fosfolipidech – lupus antikoagulans. Zvýšená citlivost reagensů je dána snížením množství fosfolipidů.

#### **Princip**

Jedná se o konfirmační test, kterým se prokazuje charakter inhibitoru – proti fosfolipidům nebo fosfolipoproteinovým komplexům. Diluční konfirmační testy jsou testy, u kterých se využívá snížená koncentrace fosfolipidů. Snížením množství fosfolipidů v testovacím systému dochází v přítomnosti LA k výraznému prodloužení časů ve srovnání s časem normální plazmy.

#### **Přístroje**

Poloautomatický koagulometr ST4

#### **Reagencie**

- Ředěná APTT reagencie

Pro přípravu ředěné APTT reagencie se používá reagencie uvedená v testu pro stanovení APTT.

- Ředěná PT reagencie

Pro přípravu ředěného tromboplastinu se používá reagencie:

Aktivovaný tromboplastin, výrobce firma EXBIO Olomouc s.r.o.

Balení: 10 x 5 ml lyofilizovaného aktivovaného tromboplastinu připraveného z lidské mozkové tkáně acetonovou dehydratací

- Normální směsná plazma:

Používá se směsná plazma od minimálně 5 pacientů s normálními hodnotami základních koagulačních testů.

- 0,025 mol/l  $\text{CaCl}_2$
- Voda pro injekce

Stabilita reagencií viz tabulka č. 9:

Tab. č. 9

Ředěné reagencie	18-25 °C	8 hodin
Normální směsná plazma	18-25 °C	8 hodin
	-70 °C	3 měsíce

### Příprava k činnosti

Příprava biologického materiálu: zamražené vzorky plazem rozmrazit při 37 °C a vytemperovat na 37 °C, před vyšetřením šetrně promíchat.

Příprava reagencií:

- Ředěná PT reagencie pro diluční konfirmační testy:

Obsah lahvičky s tromboplastinem EXBIO naředit 5 ml vody pro injekce, nechat stát 30 min při laboratorní teplotě, poté jemně promísit. Takto připravenou reagencii dále naředit vodou pro injekce v poměru 1:500, promíchat.

- Ředěná APTT reagencie pro diluční konfirmační testy:

Naředěnou APTT reagencii dále naředit vodou pro injekce v poměru 1:8, promíchat.

- Normální směsná plazma:

Směsná plazma připravená stejným způsobem jako plazma pacienta ⇒ dvojnásobná centrifugace, filtrace přes trombocytární filtr. Plazmu rozpipetovat do mikrozkuvek a zamrazit při -70 °C. Zamraženou plazmu rozmrazit při teplotě 37 °C a vytemperovat na 37 °C, před vyšetřením šetrně promíchat.

- Roztok 0,025 mol/l CaCl<sub>2</sub>:

Připraven k použití.

### Pracovní postup

- Provést APTT test s ředěnou APTT reagencii (1:8) a protrombinový test s ředěnou PT reagencii (1:500), viz následující postup.
- Na poloautomatickém koagulometru změřit čas pacienta a čas kontroly (výsledné časy jsou výrazně delší než koagulační časy, které získáme s neředěnými reagenciami). Vyšetření se provádí duplicitně.

- APTT ředěný 1:8 – pipetovat 0,1 ml ředěné APTT reagencie + 0,1 ml plazmy, nechat inkubovat 3 min, přidat 0,1 ml 0,025 mol/l CaCl<sub>2</sub> a začít měřit koagulační čas.
- PT ředěný 1:500 – pipetovat 0,1 ml ředěné PT reagencie + 0,1 ml plazmy, nechat inkubovat 5 min, přidat 0,1 ml 0,025 mol/l CaCl<sub>2</sub> a začít měřit koagulační čas.
- V případě, že je koagulační čas prodloužený ( $R > 1,20$ ), inkubujeme 1 díl vyšetřované plazmy s 1 dílem normální směsné plazmy 1 hodinu při 37 °C a poté vyšetříme diluční konfirmační test směsi.

#### Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Z poloautomatického koagulometru odečíst časy pacienta a časy normální směsné plazmy, zanést do LIS.

Vypočítat poměr R (vydělit průměrný čas pacienta průměrným časem normální směsné plazmy).

Způsob vydávání výsledků:

Speciální hodnocení.

#### Interpretace výsledků

Konfirmační testy v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu LA slouží k průkazu charakteru inhibitoru. V přítomnosti protilátky typu LA jsou koagulační časy vyšetřované plazmy výrazně prodloužené (ve srovnání s normální plazmou) a po inkubaci s normální plazmou nedojde k normalizaci testu.

Vzhledem k nízké specifitě dilučních konfirmačních testů je jejich význam v průkazu charakteru inhibitoru poměrně malý.

### **3.1.6.8. Neutralizační konfirmační test**

#### **Fáze před vyšetřením**

Vyšetření slouží jako konfirmační test v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu lupus antikoagulans.

#### **Princip**

Vyšetřovaná plazma je inkubována při teplotě 37 °C s hexagonální a bez hexagonální struktury fosfatidyletanolaminu. V další fázi je v obou systémech stanoven APTT za použití reagensie citlivé k LA. Jsou-li ve vyšetřované plazmě přítomny protilátky typu LA, dojde k jejich neutralizaci hexagonální strukturou fosfatidyletanolaminu, to způsobí zkrácení koagulačního času v systému s hexagonální strukturou fosfatidyletanolaminu v porovnání s koagulačním časem systému bez hexagonální struktury fosfatidyletanolaminu. Jestliže je rozdíl časů větší nebo roven 8 s, je přítomnost protilátek typu LA v plazmě potvrzena (Triplett, 1993).

#### **Přístroje**

Poloautomatický koagulometr ST4

#### **Reagensie**

Set: STACLOT LA, Diagnostika Stago

Balení:

- 2 x 1 ml lahvička s pufrem (reagensie 1)
- 2 x 0,25 ml lahvička s lyofilizovanou hexagonální strukturou fosfatidyletanolaminu (reagensie 2)
- 4 x 0,5 ml lahvička s lyofilizovanou normální plazmou obsahující inhibitor heparinu (reagensie 3)
- 2 x 1 ml lahvička s lyofilizovanou PTT-LS reagensií obsahující cefalin a silikonový aktivátor (reagensie 4)
- 2 x 1,5 ml ředícího roztoku (reagensie 5)

Reagensie neobsažené v setu:

- STA CaCl<sub>2</sub> 0,025 mol/l, výrobce firma Diagnostika Stago  
Balení: 24 x 15 ml



- Voda pro injekce

Stabilita reagensů viz tabulka č. 10:

Tab. č. 10

Reagencie 1 (po otevření)	2-8 °C	24 hodin
	20 °C	8 hodin
Reagencie 2 (po naředění)	2-8 °C	1 den
	20 °C	8 hodin
Reagencie 3 (po naředění)	20 °C	8 hodin (nezamrazovat!)
Reagencie 4 (po naředění)	2-8 °C	1 den
	20 °C	8 hodin
Reagencie 5 (po otevření)	2-8 °C	do expirace

#### Příprava k činnosti

Příprava biologického materiálu:

Zamražené plazmy rozmrazit při teplotě 37 °C a vytemperovat na 37 °C. Před vyšetřením šetrně promíchat.

Příprava reagensů:

- Reagencie č. 1: je připravena k použití.
- Reagencie č. 2: obsah lahvičky rozpustíme v 0,25 ml vody pro injekce, jemně promísíme. Před použitím necháme stát 15 min při laboratorní teplotě.
- Reagencie č. 3: obsah lahvičky rozpustíme v 0,5 ml vody pro injekce, jemně promísíme. Před použitím necháme stát 15 min při laboratorní teplotě.
- Reagencie č. 4: obsah lahvičky rozpustíme v 1,0 ml ředícího roztoku, jemně promísíme. Před použitím necháme stát 15 min při laboratorní teplotě.
- Reagencie č. 5 a roztok 0,025 mol/l  $\text{CaCl}_2$  jsou připraveny k použití.

## Pracovní postup (viz tabulka č. 11)

Tab. č. 11

	Kyveta 1 (37 °C)	Kyveta 2 (37 °C)
Vyšetřovaná plazma (nebo kontrola)	25 µl	25 µl
Reagencie 1 (pufr)	25 µl	-
Reagencie 2 (hexagonální struktura fosfolipidů)	-	25 µl
Smísit a inkubovat po dobu	9 minut	9 minut
Reagencie 3 (normální plazma)	25 µl	25 µl
Smísit a inkubovat po dobu	1 minuty	1 minuty
Reagencie 4 (PTT-LS)	50 µl	50 µl
Smísit a inkubovat po dobu	5 minut	5 minut
0,025 mol/l CaCl <sub>2</sub> (přehřátý na 37 °C)	50 µl	50 µl
Ihned po přidání roztoku CaCl <sub>2</sub> začít měřit koagulační čas.		
Zaznamenat koagulační čas	CT <sub>1</sub>	CT <sub>2</sub>

### Charakteristika spolehlivosti

Výsledky vyšetření mohou být ovlivněny případnou antikoagulační léčbou (v setu je obsažen inhibitor heparinu, který způsobuje necitlivost testu k hladinám heparinu do 1 IU/ml).

Set obsahuje normální plazmu, která v přítomnosti nedostatku nebo nedostatečné funkce některého z faktorů může vést ke korekci hodnoty. Jestliže nedojde ke zkrácení koagulačních časů v testovaném systému, pak jde zřejmě o přítomnost inhibitorů plazmatických koagulačních faktorů a je nezbytné použít testy k jejich přesnému zjištění.

Citlivost: bylo zjištěno, že test je vysoce citlivý k LA pozitivním plazmám.

Specifita: test má vysokou specifitu, všechny testované normální plazmy, plazmy pacientů léčených dikumariny, heparinizované plazmy do 1 IU/ml a deficitní plazmy dávaly negativní výsledky.

### Dokumentace, zpracování a vydávání výsledků

Porovnávají se koagulační časy získané v kyvetě 1 (CT<sub>1</sub>) a v kyvetě 2 (CT<sub>2</sub>).

Vypočítá se rozdíl CT<sub>1</sub> - CT<sub>2</sub>.

Způsob vydávání výsledků: časový rozdíl v sekundách.

### Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: negativní nález (časový rozdíl < 8 s)

### Interpretace výsledků (viz tabulka č. 12)

Diagnostika LA je obtížná pro různou citlivost reagensů a heterogenitu LA.

Neutralizační konfirmační test s hexagonálními fosfolipidy slouží k průkazu charakteru inhibitoru (třetí fáze laboratorní diagnostiky protilátek typu LA).

Zkrácení koagulačního času CT<sub>2</sub> o 8 sekund a více ukazuje na to, že v kyvetě 1 se projevuje účinek antifosfolipidových protilátek na prodloužení APTT, kdežto v kyvetě 2 je tento účinek neutralizován přidáním hexagonálních fosfolipidů. Časový rozdíl 8 sekund platí pro poloautomatický koagulometr ST4.

Tab. č. 12

CT <sub>1</sub> – CT <sub>2</sub>	Interpretace
< 8 s	Negativní nález
≥ 8 s	Pozitivní nález

Záporné hodnoty rozdílu časů nemají žádný klinický význam a výsledek vyšetřovaného vzorku je posuzován jako negativní nález.

## 3.2. Výsledky

### 3.2.1. Tabulky

Tabulka č. 13 Výsledky pacientů s negativními hodnotami ve screeningu a negativním PNT testem

Pacient č.	Screening						Směsné testy	Neutralizační konfirmační test
	PT poměr R	APTT poměr R	TT poměr R	LA poměr R	dRVVT poměr R	PNT / (rozdíl časů v s)		
1	0,98	0,81	0,94	0,83	0,86	-	NN (0,0)	
2	1,13	0,99	0,96	1,03	0,93	-	NN (1,1)	
3	0,93	0,96	1,06	1,01	0,91	-	NN (0,0)	
4	1,09	1,01	1,16	0,96	0,94	-	NN (0,0)	
5	1,15	1,11	0,98	1,13	0,94	-	NN (0,0)	
6	1,07	1,12	0,95	1,16	1,08	-	NN (0,0)	
7	1,20	0,87	0,97	0,87	1,06	-	NN (0,7)	
8	1,06	0,93	0,97	1,01	0,87	-	NN (0,0)	
9	1,06	0,99	1,15	1,04	0,99	-	NN (0,0)	
10	1,03	1,14	1,01	1,17	0,76	-	NN (0,0)	

NN...negativní nález

Tabulka č. 14 Výsledky pacientů s pozitivními hodnotami ve screeningu a negativním PNT testem

Pacient č.	Screening				Směsné testy	Neutralizační konfirmační test
	PT poměr R	APTT poměr R	TT poměr R	LA poměr R		
11	1,19	1,49	1,00	1,54	LCA APT/21,7	PNT / (rozdíl časů v s) NN (0,0)
12	0,96	3,57	1,06	1,31	APT/21,7	NN (0,4)
13	1,09	1,25	0,95	1,66	APT/1,2 LA/3,3	NN (0,0)
14	1,13	1,58	-	1,46	APT/30,3 LA/34,6	NN (4,6)
15	1,16	1,39	1,14	1,41	dRVVT/34,8 APT/11,4 LA/12,4	NN (0,0)

NN...negativní nález

Tabulka č. 15 Výsledky pacientů s pozitivními hodnotami ve screeningu a s pozitivním PNT testem

Pacient č.	Screening					Směsné testy	Neutralizační konfirmační test
	PT poměr R	APTT poměr R	TT poměr R	LA poměr R	dRVVT poměr R		
16	1,00	2,21	1,04	2,93	1,91	test/ LCA APTT/39,3 LA/46,9 dRVVT/39,5	PNT / (rozdíl časů v s) PN (30,0)
17	1,01	1,98	0,95	2,67	1,03	APTT/27,5 LA/35	PN (20,9)
18	0,95	1,49	-	1,51	1,27	APTT/39,2 LA/61,6	PN (56,1)
19	2,64	1,90	0,95	2,53	2,05	dRVVT/14,0 APTT/15,8 LA/34,0 dRVVT/10,9	PN (25,7)
20	1,41	2,50	0,75	3,42	1,33	PT/5,9 APTT/42,8 LA/44,2 dRVVT/34,8	PN (20,9)
21	1,08	1,36	0,93	1,51	1,27	PT/4,8 APTT/14,4 LA/20,1 dRVVT/18,6	PN (20,1)

PN... pozitivní nález

Tabulka č. 15 – pokračování

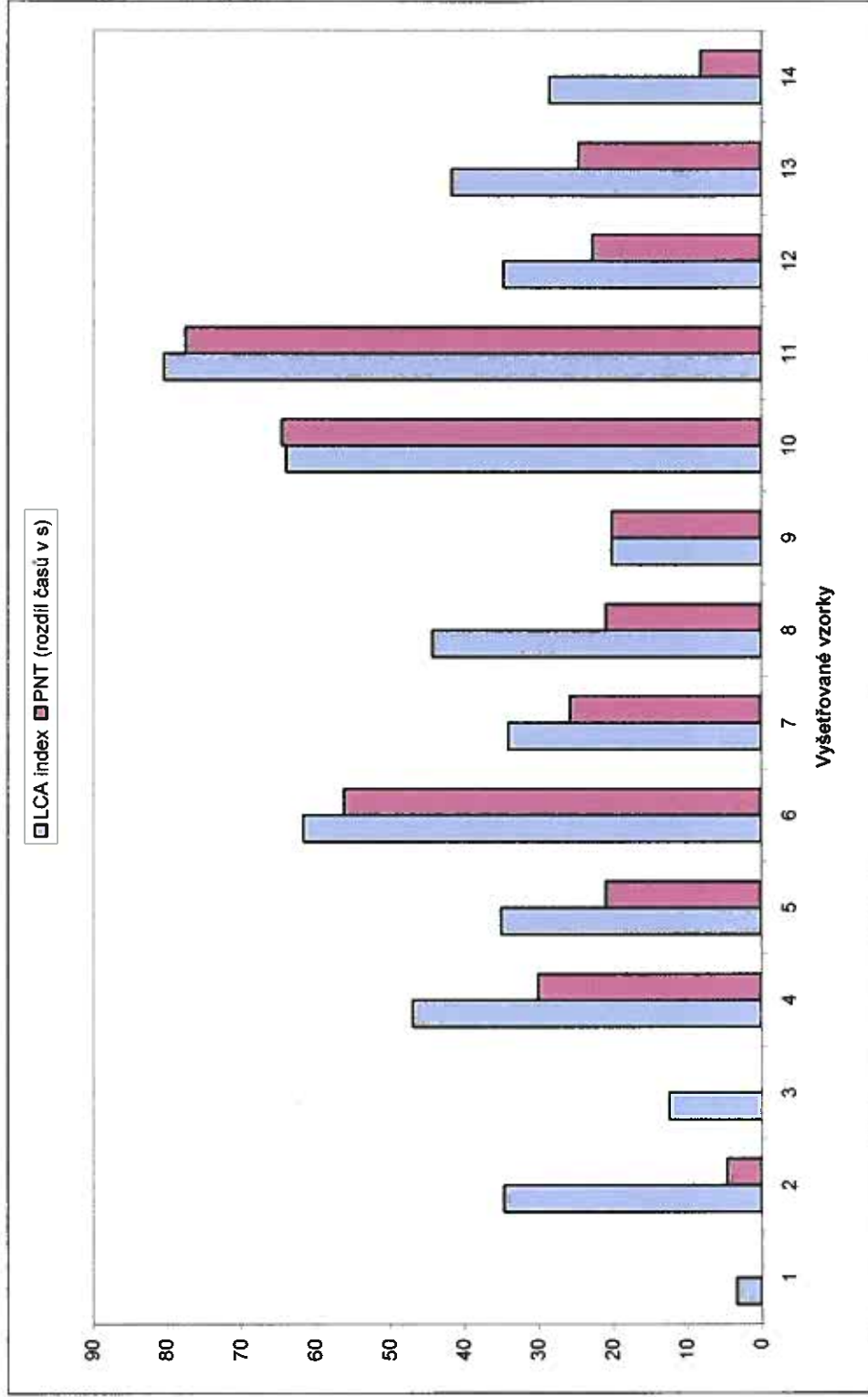
Pacient č.	Screening					Směsné testy	Neutralizační konfirmační test
	PT poměr R	APTT poměr R	TT poměr R	LA poměr R	dRVVT poměr R		
22	1,00	2,45	1,01	3,17	1,73	test/ LCA APTT/55,0 LA/63,9	PNT / (rozdíl časů v s) PN (64,5)
23	1,17	3,34	1,06	3,69	2,71	dRVVT/46,6 APTT/59,1 LA/80,4	PN 77,5
24	1,24	1,35	1,10	1,57	1,05	dRVVT/35,2 APTT/19,7 LA/34,7	PN 22,7
25	1,08	2,11	0,84	2,68	1,77	APTT/29,9 LA/41,6 dRVVT/34,8	PN 24,6
26	1,04	1,68	1,09	1,65	0,88	APTT/29,0 LA/28,5	PN 8,2

PN...pozitivní nález

### 3.2.2. Grafy

Porovnání LCA indexu směsných testů u APTT-LA a pozitivivy PNT testu

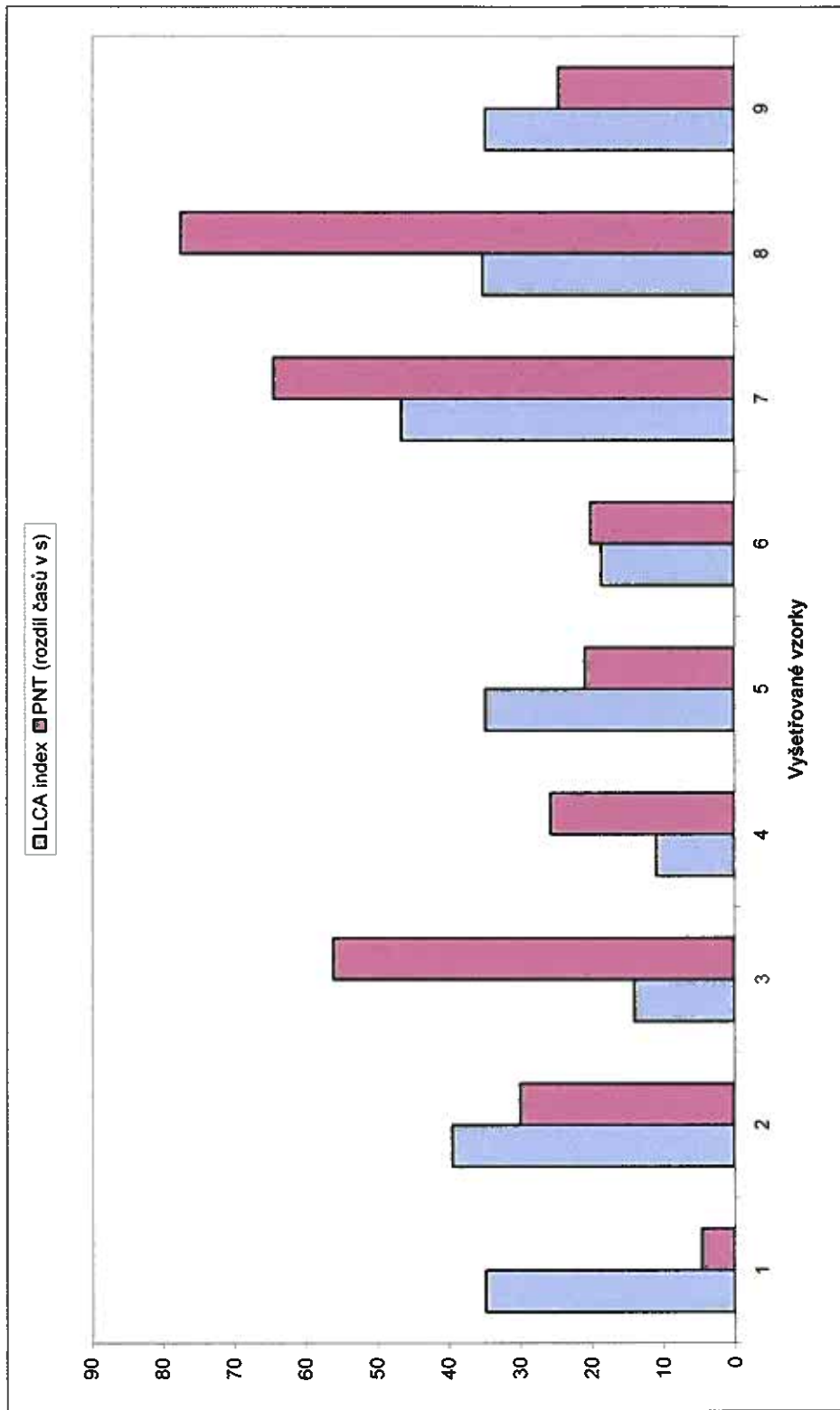
Graf č. 1





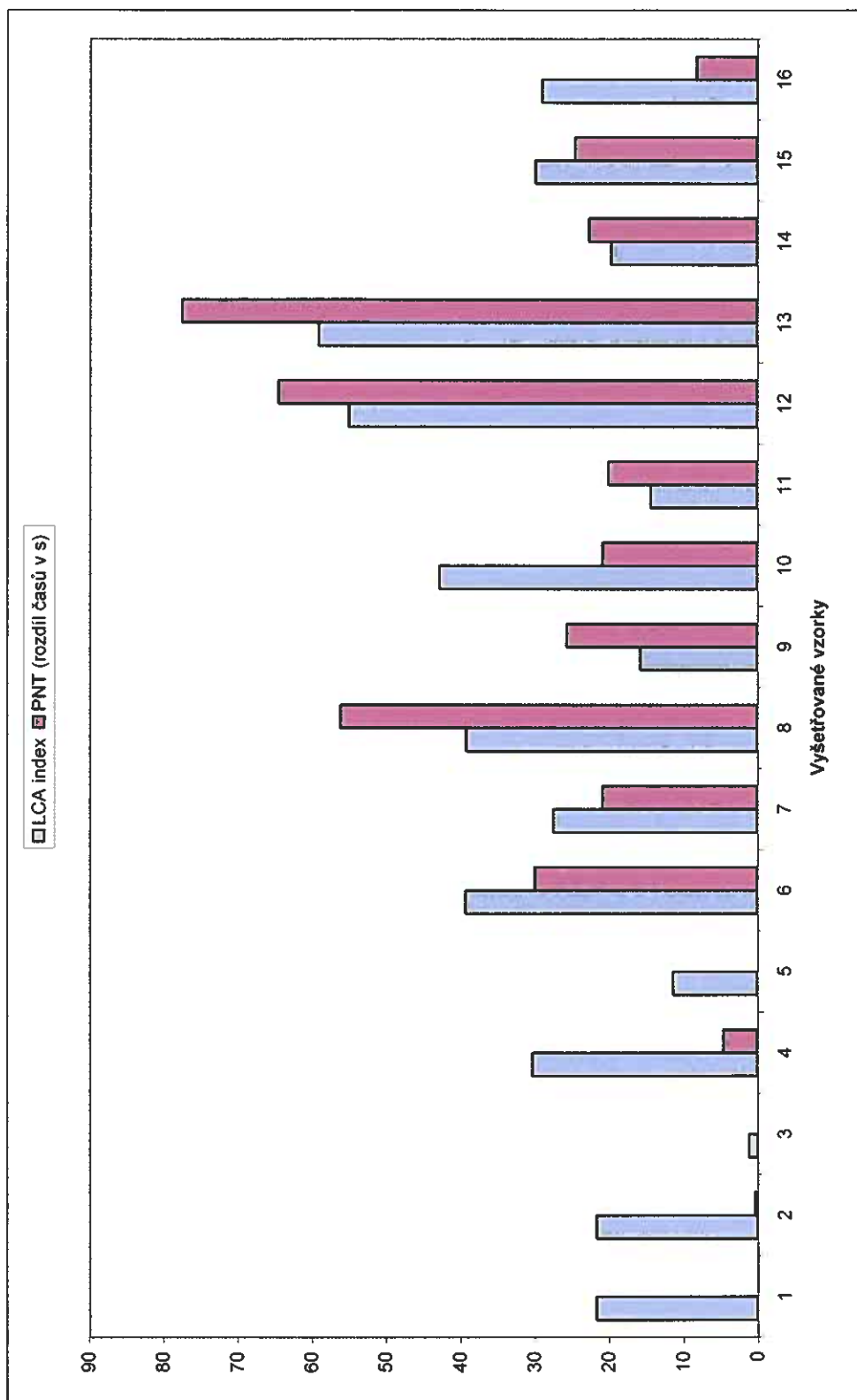
Graf č. 2

Porovnání LCA indexu směsných testů u dRVVT a pozitivity PNT testu



Graf č. 3

Porovnání LCA indexu směsných testů u APTT a pozitivity PNT testu



## 4. DISKUSE

V této části práce jsou diskutovány výsledky testů vzorků plazem vyšetřených v hematologické laboratoři II. Interní kliniky – Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Nejdůležitějším krokem při stanovení protilátek typu lupus antikoagulans je správné zpracování vyšetřovaného materiálu. K vyšetření se používá prakticky bezdestičková plazma, proto jsme odebrané vzorky citrátové krve dvojnásobně centrifugovali a poté jsme plazmu ihned použili k vyšetření. Pokud plazma nebyla ihned použita k vyšetření, plazmu jsme přefiltrovali přes trombocytární filtr a zamrazili v hlubokomrazícím boxu.

Nejčastěji používaným testem ve screeningu je APTT citlivý na LA a dRVVT test. I v našem souboru pacientů byly ve screeningu použity tyto dva testy. Navíc jsme pro vyloučení antikoagulační léčby, která může ovlivnit výsledky testů, provedli stanovení také základních koagulačních testů jako PT, APTT a trombinový test.

V případě positivity některého z testů ve screeningu jsme provedli směsné testy. I když je protilátka typu lupus antikoagulans ve většině případů bezprostředně působícím inhibítorem a převážně není nutné u směsných testů použít inkubaci, přesto jsme raději směs vyšetřované a normální plazmy inkubovali jednu eventuelně i dvě hodiny.

Jako konfirmační test, který potvrdí přítomnost inhibitoru typu LA, bývá nejčastěji používán destičkový neutralizační test se zvýšenou koncentrací fosfolipidů. U našeho souboru pacientů jsme použili konfirmační neutralizační test, který využívá schopnosti fosfolipidů v hexagonální fázi vázat protilátky typu lupus antikoagulans.

Vyšetřovaný soubor 26 pacientů tvořilo 15 žen a 11 mužů. V tabulce č. 13 jsou uvedeny výsledky screeningových testů 10 pacientů. U těchto vyšetřovaných vzorků plazem vyšly screeningové testy negativní, tedy hodnoty testů byly ve fyziologickém rozmezí. I přesto byl v rámci porovnání citlivosti zachytu jednotlivých testů u všech vzorků, tedy i u negativních, vyšetřen destičkový neutralizační test. U všech 10 vzorků vyšel negativní nález, to znamená rozdíl časů menší než 8 sekund.

V tabulce č. 14 jsou uvedeny výsledky testů 5 vyšetřovaných pacientů. Tito pacienti měli prodloužené koagulační časy ve screeningu – všichni měli prodloužené APTT, 4 prodloužené APTT-LA a pouze v jednom případě bylo prodloužené také dRVVT. U těchto prodloužených testů se vyšetřily směsné testy. U 2 pacientů došlo

po inkubaci s normální plazmou ke korekci APTT a APTT-LA, v obou případech bylo prodloužení ve screeningu pravděpodobně způsobeno deficitem některého z koagulačních faktorů. U dalších 3 pacientů nedošlo ani po dvouhodinové inkubaci s normální plazmou ke korekci testů (APTT, APTT-LA, dRVVT) – byla tak prokázána přítomnost protilátky. Konfirmační neutralizační test s hexagonálními fosfolipidy vyšel ve všech 5 případech negativní – nejednalo se tedy pravděpodobně o protilátku typu lupus antikoagulans (mohlo jít například o specifickou protilátku namířenou proti některému z koagulačních faktorů).

V tabulce č. 15 jsou uvedeny výsledky 11 vyšetřovaných pacientů. U všech těchto vyšetřovaných vzorků plazem vyšly minimálně dva ze screeningových testů prodloužené, v 8 případech byly tři z testů pozitivní - u všech pacientů bylo prodloužené APTT a APTT-LA, u 8 vyšetřovaných vzorků byl prodloužený také dRVVT, u 2 pacientů byl zároveň prodloužený PT. U prodloužených testů se vyšetřily odpovídající směsné testy. U APTT testu došlo ke korekci pouze u jednoho vyšetřovaného vzorku, u APTT-LA nedošlo ke korekci ani v jednom případě, u dRVVT došlo ke korekci u 2 pacientů a u PT došlo v obou případech ke korekci testu. Ve všech 11 případech vyšel pozitivní neutralizační konfirmační test s hexagonálními fosfolipidy - byla prokázána protilátka typu lupus antikoagulans.

Porovnáme-li v souboru vyšetřovaných pacientů citlivost záchytu jednotlivých testů ve screeningu, vychází nám pro APTT i APTT-LA 100% citlivost, pro dRVVT však pouze 81% citlivost, pro směsné testy je citlivost záchytu u APTT-LA 100 %, APTT 91 % a pro dRVVT 78 %.

Dále porovnáme-li LCA indexy u směsných testů a pozitivitu destičkového neutralizačního konfirmačního testu (rozdíl časů) zjistíme, že APTT-LA byl falešně pozitivní v 7 % případů, dRVVT v 11 % a APTT v 19 % případů, pokud jde o falešnou negativitu nacházíme u APTT-LA 0 %, u APTT 6 % a dRVVT dokonce ve 22 % případů (porovnání provedeno též graficky - viz grafy č. 1-3).

Z výsledků tedy vyplývá, že u vybraného souboru pacientů má test APTT-LA nejvyšší senzitivitu a zároveň nejvyšší specifitu k lupus antikoagulans. Zároveň výsledky vyšetření potvrzují skutečnost, že laboratorní diagnostika protilátek typu LA není jednoduchá, protože testy používané ve screeningu nejsou citlivé pouze k LA, v některých případech mohou být výsledky testů ve screeningu naopak falešně negativní. Z těchto důvodů je nezbytné postupovat v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu LA výše uvedeným způsobem, to znamená nejdříve provést

screeningové testy, v případě positivity některého z testů vyšetřit směsné testy a pokud je jejich výsledek pozitivní, potvrdit přítomnost protilátek typu lupus antikoagulans pomocí konfirmačních testů.

## 5. ZÁVĚR

Laboratorní diagnostika protilátek typu LA je problematická - je velmi citlivá na správné zpracování plazmy, neexistuje 100% citlivý screeningový test. V případě prodloužení koagulačních testů je nutno vyloučit jiné možné příčiny, jako je antikoagulační léčba, defekt koagulačních faktorů či přítomnost jiných inhibitorů. Z těchto důvodů se doporučuje provádět laboratorní diagnostiku lupus antikoagulans pouze ve specializovaných hematologických laboratořích.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem byly stanoveny tři vyšetřovací stupně k identifikaci lupus antikoagulans: alespoň jeden z testů ve screeningu musí vyjít prodloužený, následuje vyloučení jiné možné příčiny prodlouženého testu pomocí směsných testů a nakonec je nutný průkaz charakteru inhibitoru prostřednictvím konfirmačních testů.

Z vybraného souboru 26 pacientů byla v 11 případech prokázána protilátka typu lupus antikoagulans. Ve všech 11 případech byly splněny podmínky k identifikaci protilátek typu lupus antikoagulans – pozitivní screening, pozitivní směsné testy a pozitivní konfirmační test.

## 6. ZKRATKY

<b>ACLA</b>	antikardiolipinové protilátky
<b>APA</b>	antifosfolipidové protilátky
<b>APTT</b>	aktivovaný parciální tromboplastinový test
<b>APTT-LA</b>	aktivovaný parciální tromboplastinový test citlivý k lupus antikoagulans
<b>dRVVT</b>	řaděný test s jedem Russelovy zmije
<b>LA</b>	lupus antikoagulans
<b>LCA</b>	Rösnerův (LCA) index
<b>LIS</b>	laboratorní informační systém
<b>PNT</b>	destičkový neutralizační test
<b>PT</b>	protrombinový test
<b>INR</b>	mezinárodní normalizovaný poměr
<b>Ig</b>	imunoglobulin

## 7. LITERATURA

1. Brandt J. T. et al.: Criteria for diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb. Haemostasis*, 1995, 74, 4, s. 1185-1190.
2. Kmeťová J., Jašková A., Ivanková A.: Laboratorna diagnostika antifosfolipidového syndromu, Martin, Neografia a. s., 2006, s. 36-37.
3. Kolde H. J.: *Haemostasis*, Basel, Pentapharm Ltd., 2004, 2. vydání, s. 117-119.
4. Kvasnička J.: *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*, Praha, Grada Publishing a.s., 1. vydání, 2003, s. 58-59.
5. Matýšková M., Zavřelová J., Hrachovinová I.: *Hematologie pro zdravotní laboranty 2. díl, Krevní srážení*. Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999, s. 113-115, 166-168.
6. Pecka M.: *Laboratorní hematologie v přehledu 3. díl, Český Těšín*, Finidr s.r.o, 2004, s. 126-128.
7. Thiagarajan P., Pengo V., Shapiro S. S.: The use of diluted Russell viper venom time for diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood*, 1986, 68, 4, s. 869-874.
8. Triplett D. A., Barna L. K., Unger G. A.: A hexagonal (II) phase phospholipid neutralization assay for lupus anticoagulant identification. *Thromb. Haemostasis*, 1993, 74, 4, s. 787-793.