

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Vnější faktory ovlivňující citlivost
Quickova koagulačního testu

Bakalářská práce

Autor:	Hana Votrubová
Studijní program:	Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor:	Zdravotní laborant
Vedoucí práce:	MUDr. Ivan Vonke, MBA
Datum odevzdání:	3.5.2013

ABSTRAKT: Vnější faktory ovlivňující citlivost Quickova koagulačního testu

Cílem mé práce bylo zjistit, jak dlouho jsou hodnoty protrombinového času (PT) jinak také zvaného Quickova testu po odběru stabilní a zda tato doba je závislá na typu použité reagensie.

Jednotlivé časy jsem měřila do 1 hodiny po odběru a dále 12, 24, 48 a 72 hodin po odběru. K dispozici jsem měla pět druhů současných reagensií a to v zastoupení tkáňových tromboplastinů i rekombinantních tromboplastinů. Z tkáňových tromboplastinů to byl: Neoplastine CI Plus, PT Quick a Thromborel S, z rekombinantních tromboplastinů: Neoplastine R a Recombiplastin 2G.

Protrombinový čas (PT) spolu s aktivovaným parciálním tromboplastinovým časem (aPTT) dnes patří k základním koagulačním testům. Tyto metody jsou součástí předoperačních vyšetření, ale jsou také důležitým ukazatelem při monitoraci antikoagulační léčby. Pokud jsou výsledky patologické a pacient není zatížen žádnou antikoagulační léčbou, mohou nám ukázat na poruchu tzv. vnější nebo vnitřní koagulační a tím poukázat na možný deficit některého z koagulačních faktorů.

První část své práce jsem věnovala teorii, popisu hemostázy a jejich jednotlivých složek. Jsou zde zmíněny trombocyty a jejich účast při zástavě krvácení a vzniku primární hemostatické zátky. Dále jsou zde plazmatické faktory, jejich rozdělení, funkce a s nimi související tzv. třífázový model koagulační kaskády, včetně schématu. Následují přirozené inhibitory a fibrinolytický systém. Další část se zabývá patologií hemostázy, jejich jednotlivých složek. Následují koagulační testy a jejich rozdělení z hlediska specifity, kterou část hemostázy popisují a jejich jednotlivé principy.

Metodickou část mé práce jsem prováděla v Laboratoři klinické hematologie nemocnice České Budějovice a.s., kde jsem zaměstnána. Vzorky krve jsem získala na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice a.s. na úseku dárců krve. Soubor dat tvořilo 20 "relativně" zdravých dárců krve, nezatížených žádnou antikoagulační léčbou ani patologií některých koagulačních faktorů. Měření jsme prováděla na automatickém koagulačním analyzátoru STA-R Evolution[®] od firmy Diagnostica Stago, jehož princip je založen na metodě chronometrické a fotometrické. Je zde popsán analyzátor a pipetovací protokol reagensie Neoplastine CI Plus. Reagensie jsem

uchovávala a připravovala dle návodu použití od výrobce, stejně tak byly nastaveny pipetovací protokoly. Dále je zde zmíněná preanalytická, analytická a postanalytická fáze. Při vlastní práci jsem dodržovala SOP (standardní operační postup) Laboratoře klinické hematologie nemocnice České Budějovice a.s.

Ve čtvrté části své práce jsem zpracovala výsledky měření. Všechny naměřené hodnoty ve všech časových intervalech jsem zanesla do tabulky (viz. příloha 1 tab. č.8). Z tabulek (tab.1-5) vyplývá, že nejnižších průměrných časů měření dosahoval Recombiplastin 2G a to ve všech měřených časech. Nárůsty časů u většiny reagensů nejsou velké, ale jsou.

Rozdíly mezi jednotlivými měřeními ve vztahu k prvnímu měření jsem vypočetla, v procentuelním vyjádření vynesla do grafů (obr. 3-7) a vypočetla směrodatnou odchylku. Po 12 hodinách byl nejmenší průměrný rozdíl měření při použití reagensie Neoplastine R 0,40 % a směrodatná odchylka 1,50. Po 24 hodinách dosahoval nejmenší průměrný rozdíl Neoplastine R 0,80 % se směrodatnou odchylkou 2,10. Po 48 hodinách Thromborel S nejmenší průměrný rozdíl 4,70 % se směrodatnou odchylkou 2,90. Po 72 hodinách od prvního stanovení nejmenší průměrný rozdíl u Recombiplastin 2G 9,30 % se směrodatnou odchylkou 4,10.

Jednotlivé průměrné časy rozdílů jsem porovnávala s aktuálním validačním protokolem Laboratoře klinické hematologie nemocnice České Budějovice a.s., který udává pro opakovatelnost variační koeficient pro protrombinový čas $< 1,5\%$ ($CV < 1,5\%$). V čase 12 hodin po odebrání vzorků nepřekročily hodnotu $CV < 1,5\%$ pouze časy stanovené reagensiemi Neoplastine CI Plus, Neoplastine R a Recombiplastin 2G. U času 24 hodin od odběru nepřesáhl tuto hodnotu pouze Neoplastine R. U času 48 a 72 hodin po odběru překročily všechny reagensie $CV < 1,5\%$. V tomto jsem se neshodla s Baglinovou studií, která posunula možnost opožděné analýzy až na 72 hodin od odběru. Příčina byla ta, že Baglin určoval stabilitu dle klinického významu INR (mezinárodní normalizovaný poměr) mezi jednotlivými reagensiemi, v mé práci jsem stabilitu určovala dle přísnějšího kritéria, variačního koeficientu opakovatelnosti.

V další části jsem vypočetla průměrné vychýlení každé reagensie při všech

měřeních. Nejlépe vycházel Thromborel S se 4,8 %. Největšího průměrného vychýlení dosahoval PT Quick se 8,9 %.

V porovnání tromboplastinů činilo celkové průměrné vychýlení u rekombinantních 5,6 %. U tkáňových tromboplastinů 6,5 %. Tento rozdíl výrazně ovlivnila jedna reagencie, PT Quick.

Hypotéza, že protrombinový čas nebo-li Quickův test je stabilní podstatně delší dobu než je obvyklý 2 hodinový interval se potvrdila, ale tato stabilita je ovlivněna použitým tromboplastinem.

ABSTRACT: External factors influencing the sensitivity of coagulation on prothrombin time - Quick test

The aim of this work was to determine the length of the prothrombin time (PT) also called Quick test for stable sampling and whether this period has been dependent on the type of reagent.

Each time I measured within 1 hour of collection and then 12, 24, 48 and 72 hours after sampling. I had five kinds of existing reagents in the representation of tissue thromboplastin and recombinant thromboplastin. The following set of tissue thromboplastin was in study: Neoplastine CI Plus, Quick PT and Thromborel S, the recombinant thromboplastin: Neoplastine R and Recombiplastin 2G.

Prothrombin time (PT), together with the activated partial thromboplastin time (aPTT) is today one of the basic coagulation tests. These methods are part of the preoperative evaluation, but they are also an important indicator for monitoring of anticoagulant therapy. If the results are pathological and the patient is not burdened with any anticoagulant therapy, they may show us the failure of the so-called external or internal coagulation and thus point to a possible deficit of coagulation factors.

The first part of my thesis focuses on the theory, description of hemostasis and its individual components. Platelets and their involvement in stopping bleeding and the formation of the primary hemostatic plug have been mentioned. There are also plasma factors, the types, functions and related so-called three-phase model of the coagulation cascade, including the schema. The following are natural inhibitors and the fibrinolytic system. The next part deals with the pathology of hemostasis and its individual components. The next chapter deals with the coagulation tests and their distribution in terms of specificity, which part of hemostasis is described together with their individual principles.

Methodological part of my work has been carried out in the Laboratory of Clinical Hematology Hospital in Ceske Budejovice, where I am employed. Blood samples have been received at the Department of Hospital Transfusion in Ceske Budejovice in the field of blood donors. The data set consisted of 20 "relatively" healthy blood donors, unburdened by any anticoagulant therapy or pathology of coagulation factors.

Measurements were carried out on an automatic coagulation analyzer STA-R Evolution® from Diagnostica Stago, which principle is based on the method of chronometric and photometric. The analyzer and reagent pipetting protocol Neoplastine CI Plus has been described. Reagents were kept and prepared according to instructions of the manufacturer as well as the set protocol sheets have been set. Preanalytical, analytical and post-analytical phase is also mentioned. During the work I respected SOP (standard operating procedure) of Laboratory of Clinical Hematology Hospital Ceske Budejovice.

In the fourth part I compiled the results. All measured values at all time intervals were entered in the table (see Annex 1 Table 8). From the measured values, I calculated the average times of measurement values for each of the reagents and the determinant differences. As we can see from the tables (tab.1-5) Recombiplastin 2G shows the lowest average measuring values, in all the measured times. Increased time for most reagents are not large, but they exist.

The differences between the measurements in relation to the first measurement have been calculated and brought into graphs (Fig. 3-7) together with the standard deviation. After 12 hours, the lowest average difference measurements using reagents Neoplastine R 0,40 % and standard deviation of 1,50. After 24 hours, the lowest average difference was reached with Neoplastine R 0,80 % with a standard deviation of 2,10. After 48 hours Thromborel with the lowest average difference of 4,70 % with a standard deviation of 2,90. After 72 hours from the first fixing smallest average difference was in Recombiplastin 2G 9,30 % with a standard deviation of 4,10.

Individual differences in average times have been compared with the current validation protocol of Clinical Hematology Hospital Labs Ceske Budejovice as that given for the repeatability coefficient of variation for prothrombin time $< 1,5 \%$ ($CV < 1,5 \%$). In time, 12 hours after sampling did not exceed the value of $CV < 1,5 \%$ only times specified reagents Neoplastine CI Plus, Neoplastine R and Recombiplastin 2G. At the time 24 hours of collection did not exceed this value Neoplastine R only. At time 48 and 72 hours after sampling exceeded all reagents $CV < 1,5 \%$. This fact was in contradiction with Baglin study, which shifted the possibility of delayed analysis of up

to 72 hours of collection. While Baglin determined stability according to the clinical significance of INR (international normalized ratio) between the reagents, in my work stability was determined according to more precise stability criteria, the coefficient of variation of repeatability.

In the next section I calculated the average deviation of each reagent for all measurements. Top Thromborel S based S 4,8%. The largest average deviation amounted PT Quick PT 8,9 %. Compared thromboplastin average total deflection of the recombinant 5,6 %. The tissue thromboplastin 6,5 %. This difference was significantly influenced by one reagent, PT Quick.

The hypothesis that the prothrombin time or the Quick test is stable for much longer than the usual two-hour interval has been confirmed, but this stability is affected by the thromboplastin.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

.....

Hana Votrubová

Poděkování: Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce MUDr. Ivanu Vonkemu, MBA za poskytování důležitých rad a informací. Dík patří také mým kolegyním z oddělení Laboratoře klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s., za jejich spolupráci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině za podporu a trpělivost.

OBSAH

Úvod.....	13
1. Teoretická část	15
1.1. Fyziologie hemostázy - jednotlivé složky.....	15
1.1.1 Cévní stěna.....	15
1.1.2 Tkáňové složky	15
1.1.3 Trombocyty.....	15
1.1.3.1 Adheze	16
1.1.3.2 Agregace	16
1.1.3.3 Uvolňovací reakce	17
1.1.3.4 Retrakce	17
1.1.4 Plazmatické faktory	17
1.1.4.1 Faktory závislé na vitamínu K.....	17
1.1.4.2 Faktory citlivé k trombinu	18
1.1.4.3 Faktory fáze kontaktu	19
1.1.4.4 Tkáňový faktor.....	19
1.1.4.5 Fosfolipidy	20
1.1.4.6 Ionty minerálů.....	20
1.1.4.7 Adhezivní proteiny.....	20
1.2 Funkce hemostázy.....	20
1.2.1 Systém koagulační	20
1.2.1.1 Koagulační kaskáda	21
1.2.2 Přírodní inhibitory	22
1.2.2.1 Antitrombin III.....	23
1.2.2.2 Získané inhibitory	23
1.2.3 Fibrinolytický systém	24
1.3 Patologie hemostázy.....	24
1.3.1 Patologie cévní stěny	25
1.3.2 Patologie trombocytů.....	25
1.3.3 Patologie koagulačních faktorů	25

1.4 Koagulační testy.....	26
1.4.1 Typy koagulačních stanovení.....	26
1.4.1.1 Optické metody.....	26
1.4.1.2 Imunologické metody.....	27
1.4.1.3 Porovnání metod.....	27
1.4.1.4 POCT (Point-of-care testing).....	27
1.4.2 Metody popisující hemostázu.....	28
1.4.2.1 Globální testy.....	28
1.4.2.2 Skupinové testy.....	29
1.4.2.3 Specifické testy.....	31
2. Cíl práce a předpokládané hypotézy.....	32
2.1 Cíl práce.....	32
2.2 Předpokládané hypotézy.....	32
3. Metodika.....	33
3.1 Preanalytická fáze.....	33
3.1.1 Použité reagensie.....	34
3.1.1.1 STA neoplastine CI Plus.....	34
3.1.1.2 STA neoplastine R.....	34
3.1.1.3 PT Quick.....	34
3.1.1.4 Thromborel S.....	34
3.1.1.5 Recombiplastin 2G Hemosil.....	35
3.1.2 Skladování a příprava reagensií.....	35
3.2 Analytická fáze.....	35
3.2.1 Interní kontrola kvality.....	36
3.2.1.1 Validace.....	36
3.2.1.2 Verifikace.....	37
3.2.1.3 Kalibrace.....	37
3.2.1.4 Chyba.....	38
3.2.1.5 Přesnost.....	38
3.2.1.6 Správnost.....	38

3.2.1.7 Opakovatelnost	38
3.2.1.8 Reprodukovatelnost	39
3.2.2 Externí kontrola kvality	39
3.2.3 Automatický koagulační analyzátor STA-R Evolution®	39
3.2.4 Pipetovací protokol protrombinového času Neoplastin CI.....	41
3.2.5 Vlastní měření.....	41
3.3 Postanalytická fáze.....	41
4. Výsledky	43
4.1 Naměřené a statisticky zhodnocené hodnoty	43
4.2 Průměrný čas naměřených hodnot a směrodatná odchylka	43
4.3 Rozdíly vychýlení (%) a směrodatná odchylka	44
4.4 Celkové průměrné vychýlení	47
4.5 Porovnání průměrných rozdílů tkáňových a rekombinantních tromboplastinů...	47
4.6 Celkové průměrné vychýlení skupin použitých tromboplastinů.....	48
5. Diskuze	49
6. Závěr	52
7. Seznam použitých zdrojů.....	53
8. Klíčová slova	58
9. Přílohy.....	59

Úvod

Motto:

Zachování krevního oběhu a uchování krve v tekutém stavu je pro existenci živého organismu zcela nezbytné (Pecka et al. 1998).

Hemostáza je velmi složitý mechanismus, který jednak zajišťuje zastavení krvácení a současně udržuje tekutost krve v neporušeném cévním řečišti (Kolde 2004). Jeho narušení jak vrozené, tak získané se může projevit jednak krvácivými stavy nebo stavy trombofilními (Pecka et al. 1998).

Vyšetření hemostázy dnes patří k základním laboratorním vyšetřením, ať už se jedná o základní nebo speciální koagulační testy. Základním a nejčastěji prováděným stanovením je vyšetření protrombinového času (PT) nazývaného také Quickův test a aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT). Tato stanovení jsou nejčastěji součástí předoperačních vyšetření, kdy mohou poukázat na deficit některého z koagulačních faktorů nebo jako monitorace antikoagulační léčby, jejímž cílem je dosažení co nejrychlejší účinné a stabilní léčebné hladiny a tím zabránit vzniku trombóz nebo krvácení.

Stanovení protrombinového času respektive použití rozdílných typů současných reagensů při tomto stanovení je předmětem mé bakalářské práce. Protrombinový čas je základní koagulační vyšetření, u kterého je obvyklý problém dodržení předepsaného intervalu mezi odběrem a stanovením. Tento interval vychází ze stability vyšetření, která je ovlivněna mnohými vnějšími faktory. Zaujala mne Baglinova studie, která sleduje, jak dlouho jsou porovnávané tromboplastinové časy stabilní v závislosti na použití různých druhů tromboplastinů. Analýzu prováděli denně po dobu pěti dnů s různými tromboplastiny.

Srovnávací studie byla provedena při opožděné analýze, až pět dnů po odběru vzorků. Tato studie dochází k závěru, že „neexistuje klinicky významná změna v INR (mezinárodní normalizovaný poměr), pokud je analýza opožděna až o tři dny s jakoukoli reagensy tromboplastinu. Pokud je analýza opožděna o více než tři dny, měl

by být vybrán tromboplastin s vysokou reprodukovatelností. Je zřejmé, že vliv drobných rozdílů INR kvůli zpožděné analýze by měl být menší než rozdíl v INR vzhledem k použití různých tromboplastinů a koagulačních analyzátorů“ (Baglin et al. 1997).

V rámci své práce se zaměřuji na použití pěti různých druhů tromboplastinů, jak tkáňových, tak tromboplastinů rekombinantních. Při stanovení protrombinového času sleduji pouze změřený čas. Ostatní podmínky eliminuji. Stanovení provádím v určitých časových intervalech od doby odběru. Očekávám, že rozdíl mezi tromboplastiny by vzhledem ke standardizaci a zkvalitnění výroby měl být podstatně menší než v Baglinově studii.

Veškerá stanovení jsem prováděla v Laboratoři klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s. na koagulačním analyzátoru STA-R Evolution[®] od firmy Diagnostica Stago.

1. Teoretická část

Koagulace je komplexní enzymatický děj končící vytvořením nerozpustné fibrinové sítě. Jde o sérii enzymatických reakcí. Při těchto reakcích dochází limitovanou proteolýzou ke štěpení zymogenů, proenzymů přítomných v krvi na aktivní enzymy (Penka et al. 1994).

Na hemostáze se podílí především stěna cévní, složka tkáňová, trombocyty a plazmatické faktory. V těchto systémech však také hrají důležitou roli všechny látky, které jsou přítomné v krvi a na vnitřní stěně cév, tj. erytrocyty, leukocyty, lipidy a další bílkoviny (Penka et al. 2011).

Za fyziologických okolností jsou všechny tyto složky udržovány v dokonalé rovnováze. Při poruše některé z nich může vzniknout intravaskulární trombóza nebo patologické krvácení (Sakalová et al. 2010). Na udržování rovnováhy se podílí řada pozitivních i negativních zpětných vazeb (Matýšková et al. 1999).

1.1. Fyziologie hemostázy - jednotlivé složky

1.1.1 Cévní stěna

Při poranění cévní stěny je první reakcí reflexní vazokonstrikce. Ta napomáhá redukovat krevní ztráty. Na zastavení krvácení sama však nestačí a vyžaduje tedy účinnější mechanismy primární a sekundární hemostázy. Endotelové buňky významnou měrou produkují hemostaticky aktivní látky, jako je von Willebrandův faktor (Sakalová et al. 2010).

1.1.2 Tkáňové složky

Hlavními tkáňovými složkami uvolňovanými z poraněné tkáně je tkáňový faktor (TF), způsobující přeměnu protrombinu na trombin. Dále adenosin difosfát (ADP), vyvolávající primární agregaci (Pecka et al. 1998).

1.1.3 Trombocyty

Další důležitou složkou v systému hemostázy jsou trombocyty. Základní funkci

trombocytů je účast při zástavě krvácení a výstavba primární cévní zátky (Penka et al. 2009). Jde o agregát destiček, který tvoří základ fibrinové zátky. Její vytvoření je nezbytné při zástavě krvácení (Pecka 1996).

Zásadní úlohu mají nejen v primární hemostáze, ale také se účastní sekundární hemostázy (Sakalová et al. 2010).

Mají důležitý podíl na obnově vnitřního povrchu cévní stěny při poškození či poranění aterosklerotickým procesem nebo při fyziologicky probíhajícím odlučováním endotelia. Trombocyty mají schopnost fagocytózy, schopnost přenosu látek a pomocí svých povrchových receptorů jsou účastníky procesů různých reaktivních systémů (Penka et al. 2009).

Reagují na poškození cévní stěny nebo na expozici s cizími povrchy prostřednictvím následně koordinovaných reakcí a to změnou tvaru, sekrecí, adhezí a agregací. To vede k vytvoření přesně lokalizované hemostatické zátky (Kroll et al. 1989).

1.1.3.1 Adheze

Adheze trombocytů je proces, při kterém trombocyty přilínají na jiné povrchy. Trombocyty jsou velmi rychle vázány k povrchům hlubších vrstev stěn především větších cév, tvořené elastinem, svalovými buňkami, subendoteliálními mikrofibrilami a kolagenem. Adheze ke kolagenu a subendoteliálním strukturám je závislá na destičkovém vWF, fibronektinu a částečně také na Ca^{2+} a vazba je zprostředkována povrchovými glykoproteiny. Adheze neprobíhá na erytrocytech, leukocytech a endotelových buňkách.

1.1.3.2 Agregace

Agregace je vzájemné shlukování trombocytů. Vlivem vnějších podnětů při agregaci dochází nejprve k jejich spojování (primární agregace), při silnějších aktivačních impulsech k sobě trombocyty přilínají těsněji (sekundární agregace) přičemž dochází v trombocytu k řadě nevratných změn.

1.1.3.3 Uvolňovací reakce

Při uvolňovací reakci dochází k sekreci obsahu nejprve α granulí a při silnějším podnětu i denzních granulí.

1.1.3.4 Retrakce

K retrakci neboli smršťování dochází působením kontraktilního systému. Retrakce jsou schopné pouze živé a funkčně zdatné trombocyty. Tak se obnovuje průchodnost poraněné cévy uzavřené primární hemostatickou zátkou (Pecka 1996).

1.1.4 Plazmatické faktory

Jako plazmatické faktory jsou označovány proteiny plazmy, které se přímo účastní krevního srážení. Podle jejich místa účinku se rozdělují na faktory koagulační, přirozené inhibitory krevního srážení a faktory fibrinolýzy (Penka et al. 2011).

Většina plazmatických faktorů a jejich inhibitorů, s výjimkou von Willebrandova faktoru, se syntetizuje v játrech. Proto je selhání jater spojeno se změnami v hemostatickém systému (Senzolo et al. 2006).

Koagulační faktory s výjimkou fibrinogenu a protrombinu se nachází v plazmě ve velmi nízkých koncentracích. Jde o skupinu vysoce glykolysovaných proteinů. Všechny faktory s výjimkou na membrány vázaného tkáňového faktoru jsou plazmatické bílkoviny. Ty vyžadují proteolytické štěpení. Při tomto štěpení vzniká z původního proenzymu koagulačně aktivní enzym (Penka et al. 2011).

1.1.4.1 Faktory závislé na vitamínu K

Do této skupiny patří FII, FVII, FIX a FX. Vitamín K je nezbytný pro karboxylaci gama glutámového zbytku. Bez karboxylace není faktor schopen vazby na vápníkové ionty a fosfolipidy (Kolde 2004).

Pokud dojde ke snížení vitamínu K při jaterních poruchách nebo při antikoagulační léčbě preparáty kumarinového typu, ke karboxylaci nedochází (Pecka 2004). Faktory zůstávají koagulačně neaktivní a nazývají se tzv. PIVKA (Protein induced by vitamin K absence) faktory (Senzolo et al. 2006).

Faktor II neboli protrombin je poměrně stabilní faktor s dlouhým poločasem, který je tvořen v játrech. Jeho aktivní forma trombin má vedle enzymatické funkce také funkci neenzymatickou, váže se na trombomodulin a reaguje s fibrinem. V koagulaci má trombin klíčovou roli, podle potřeby působí jak prokoagulačně, tak antikoagulačně. Vedle štěpení fibrinogenu na fibrin aktivuje limitovanou proteolýzou kofaktory FV a FVIII, při větším množství trombin naopak tyto faktory degraduje. Je mohutný induktor aktivace krevních destiček, aktivuje FIX a FXIII. Po vazbě na trombomodulin aktivuje protein C na aktivní enzym APC a není již schopen zasáhnout do procesů srážení krve – negativní zpětná vazba (Matýšková et al. 1999).

Faktor VII je faktor s velmi krátkým biologickým poločasem. Je syntetizován v játrech, přítomen je také v séru. Jeho důležitým zdrojem jsou i aktivované monocyty/makrofágy. Faktor VII má i sám proteolytickou aktivitu a je schopen štěpit faktor X. Aktivity faktoru VII se zvyšují s věkem a v těhotenství. Je aktivován FXa, FXIIa, FXIa, FIXa a také komplexem TF-FVIIa (Penka et al. 1994). F VIIa je slabou serinovou proteázou (Waxman et al. 1992).

Faktor IX je také přítomen v séru. Aktivní forma F IXa je enzymaticky aktivní v komplexu zvaném tenáza (FIXa + FVIIIa+PI + Ca²⁺), ta aktivuje FX na Xa (Penka et al. 1994).

Faktor X je přítomen i v séru. Aktivován je tzv. tenázou (FIXa + FVIIIa+ PI + Ca²⁺) nebo komplexem FVIIa-TF (Penka et al. 1994).

1.1.4.2 Faktory citlivé k trombinu

Fibrinogen nebo-li faktor I je faktor s nejvyšší koncentrací v plazmě. Je přítomen v plazmě i v granulích trombocytů (Matýšková et al. 1999). Jeho minimální hemostatická koncentrace je pod 0,6 g/l. Fibrinogen je štěpen trombinem na fibrin nebo plazminem. Může být také štěpen tzv. trombinu podobnými enzymy, např. hadími jedy (Penka et al. 1994). Pro stabilitu a zachování jeho struktury jsou důležité Ca²⁺ ionty (Matýšková et al. 1999). Jeho nedostatek může vést ke krvácivým komplikacím (Kolde 2004).

Faktor XIII nebo-li fibrin stabilizující faktor. Skládá se ze dvou párů rozdílných

polypeptidů. Tvořen je v játrech nebo krevních destičkách. V závislosti na místě tvorby se liší struktura faktoru (Penka et al. 1994). Působením aktivovaného F XIII je nestabilní, solubilní fibrin stabilizován (Kolde 2004). Působením F XIII vznikají mezi fibrinovými vlákny velmi pevné kovalentní vazby, které v organismu nejsou štěpitelné (Penka et al. 2003).

Faktor V je kofaktorem krevního srážení, přítomen v plazmě a α granulích krevních destiček, je aktivován limitovanou proteolýzou trombinem a FXa za přítomnosti Ca^{2+} iontů. Může být aktivován také plazminem, elastázou neutrofilů, jedem Russelovy zmiže. Inhibitor FVa je aktivovaný protein C (APC).

Faktor VIII cirkuluje v plazmě navázán na von Willebrandův faktor (vWF). Kontaktem s fosfolipidy nebo trombinem se uvolňuje z vazby na vWF. Je syntetizován především v játrech, ale také v uzlinách, ledvinách, slinivce. Působením trombinu dochází k jeho limitovanému štěpení (Penka et al. 2011). F VIIIa funguje jako kofaktor ve vnitřní cestě aktivace protrombinu a při tvorbě koagulačně aktivního komplexu tenázy (VIIIa+IXa+PL+ Ca^{2+}). Ta je nezbytná k aktivaci FX (Vehar et al. 1984). Dlouhé působení většího množství trombinu naopak FVIIIa inaktivuje. Dalším inhibitor je APC za přítomnosti PL, Ca^{2+} , FV a proteinu S (Penka et al. 2011).

1.1.4.3 Faktory fáze kontaktu

Faktor XII je aktivován kontaktem např. se subendotelovými strukturami při poranění nebo proteázami. FXII aktivuje FXI a také prekalikrein (Penka et al. 1994).

Faktor XI cirkuluje v plazmě v komplexu s vysokomolekulárním kininogenem. Aktivován je proteolýzou FXIIa, FVIIa a trombinem v přítomnosti negativně nabitých částic (Penka et al. 2011).

Prekalikrein (PKa) je gamaglobulin, v plazmě cirkuluje navázán na HMWK. Je aktivován faktorem XIIa na kallikrein a ten zpětně aktivuje F XII (Penka et al. 2011).

1.1.4.4 Tkáňový faktor

Tkáňový faktor (TF) je buněčným kofaktorem, nachází se v organismu na buňkách, které se fyziologicky nedostanou do kontaktu s krví, tedy běžně není přítomen na

cévních endoteliích, krevních elementech ani jeho část necirkuluje v plazmě jako tzv. solubilní TF. Syntetizován je plně funkční, nepotřebuje k plnění své funkce proteolytickou modifikaci. Jeho prokoagulační aktivita je spojená s vazbou s fosfolipidy. Působí jako buněčný receptor pro FVII a tvorba komplexu s FVII nebo FVIIa zahajuje koagulaci. Tvorba komplexu vyžaduje přítomnost Ca^{2+} (Penka et al. 2011).

1.1.4.5 Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou estery glycerolu a kyseliny fosforečné, které jsou integrální součástí buněčných membrán (Penka 2011). Tvoří negativně nabitě povrchy, na nichž probíhá aktivace koagulačních faktorů (Penka et al. 1994).

1.1.4.6 Ionty minerálů

Vápníkové ionty hrají důležitou úlohu při reakcích faktorů závislých na vitamínu K, ty jsou pomocí vápníkových iontů navázány na fosfolipidy (Penka et al. 1994).

1.1.4.7 Adhezivní proteiny

Adhezivní proteiny zajišťují mezibuněčný kontakt. Tyto kontakty jsou založeny na vzájemných interakcích mezi mnoha páry adhezivních molekul (Hořejší et al. 2009). V hemostáze je jedním z nejdůležitějších adhezivních proteinů von Willebrandův faktor. Je přítomen na α granulích trombocytů, plazmě a subendotelu. Syntetizován je v megakaryocytech a endoteliálních buňkách. Zprostředkovává adhezi trombocytů v primární hemostáze. V koagulaci vWf jako nosič váže a stabilizuje FVII. Dalšími adhezivními proteiny jsou např. vitronektin (VN) a fibronektin (FN) (Penka et al. 2011).

1.2 Funkce hemostázy

1.2.1 Systém koagulační

Vytvoření fibrinového vlákna je cílem koagulace. K tomu dochází prostřednictvím vysoce regulované a koordinované kaskádovité reakce. Té se účastní faktory, jež jsou v krvi přítomny v neaktivní formě jako proenzymy a štěpeny jsou enzymy na aktivní

formu. Tyto faktory se nazývají koagulační faktory, značeny jsou „F“ a římskou číslicí. Aktivovaným formám se přidává „a“ (Matýšková et al. 1999).

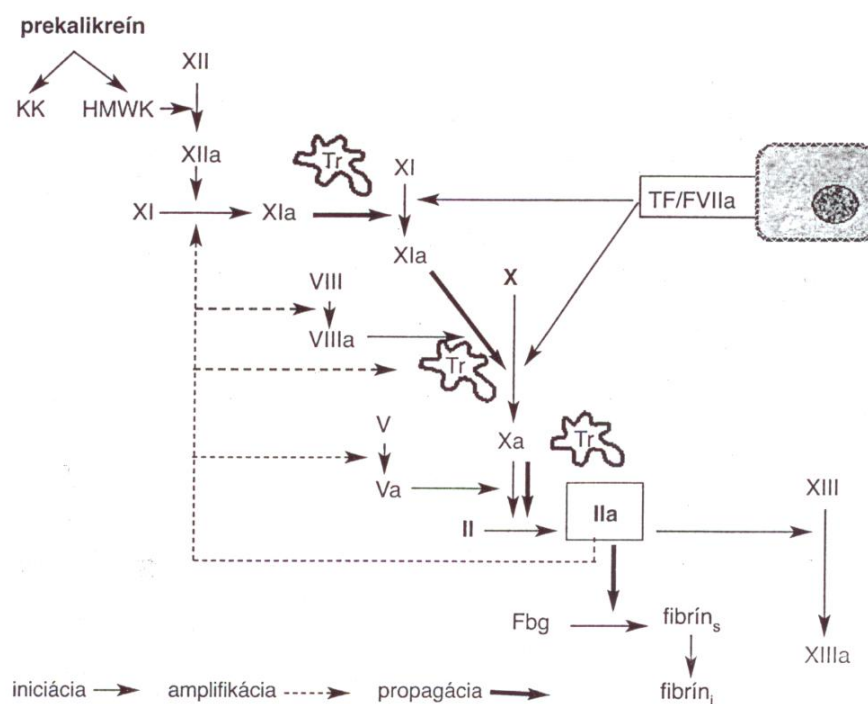
1.2.1.1 Koagulační kaskáda

Koagulační kaskádu popisuje tzv. třífázový model hemostázy, který rozděluje hemostatické pochody do tří dynamicky se rozvíjejících fází a to do fáze iniciace, fáze amplifikace a třetí fáze propagace (Penka et al. 2009).

Fáze iniciace je zahájena expresí tkáňového faktoru (TF) v místě poranění či zánětem. Na molekuly TF se naváží molekuly FVIIa (Nemerson, 1998). Tento komplex dále aktivuje FIX na FIXa a FX na FXa. FXa aktivuje další molekuly FVII na FVIIa, který působí na protrombin a tím vzniká malé množství trombinu. To však ještě nestačí ke vzniku fibrinového koagula.

Ve fázi amplifikace aktivuje trombin FXI na XIa, dále FVIII na FVIIIa a FV na FVa. FXIa aktivuje další molekuly FIX na FIXa. Trombin aktivuje také krevní destičky a leukocyty a tím jsou na povrchu jejich membrán exprimovány negativně nabitě molekuly fosfolipidů a na ty se navážou aktivované faktory IXa, VIIIa a Va. Dále trombin aktivuje také endotelie v nejbližším okolí poranění a tím zapříčiňuje jejich přeladění do tzv. prokoagulační fáze. Konečným výsledkem amplifikační fáze vzniká větší množství trombinu.

Fáze propagace: v této fázi dochází k vazbě FX na komplex FIXa a FVIIIa (vnitřní tenáza). Aktivovaný faktor Xa vytvoří s FVa komplex protrombinázy, ten po navázání molekuly protrombinu z ní odštěpí aktivační fragmenty F1+2 a tím zapříčiňuje její aktivaci na trombin. K přeměně fibrinogenu na fibrin je množství takto vzniklého trombinu dostačující. Trombin je stabilizován aktivovaným fibrin stabilizujícím faktorem XIIIa (Penka et al. 2009).



Obr. 1: Model aktivace hemostázy

Zdroj: Sakalová et al. 2010

Rozdílné je složení arteriálního a žilního trombu. Arteriální trombus je tvořen agregovanými trombocyty a leukocyty, které jsou spojeny fibrinogenem. Trombus v žilách je tvořen sítí fibrinu (fibrin rich), v němž jsou zachyceny erytrocyty, leukocyty a následovně i trombocyty. Ty v červeném (fibrinovém) trombu mezi sebou již nereagují, protože k dispozici nemají volný fibrinogen. Mohou uvolňovat další prokoagulační faktory a ty přispívají k růstu trombu. Následně podléhají nekróze (Kvasnička et al. 2003).

1.2.2 Přirozené inhibitory

Proces krevního srážení je regulován, většinou zpětnou vazbou, inhibitory koagulace. Jejich úkolem je řídit proces krevního srážení, aby se nešířil dál a proběhl jenom v místě poranění cévy (Kvasnička et al. 2003). Udrží dynamickou hemokoagulační rovnováhu, zabráňují nekontrolovanému srážení krve. Jejich deficit představuje výrazné riziko vzniku trombózy (Pecka 2004).

Inhibitory se rozdělují podle různých kritérií dle původu, specifity a systémů.

Plazmatické proteiny: antitrombin, protein C, protein S aj. Dále jsou to inhibitory působící na povrchu endotelu: inhibitor cesty tkáňového faktoru (TFPI-tissue factor pathway inhibitor) a trombomodulin (Kvasnička et al. 2003).

1.2.2.1 Antitrombin III

Mezi nejdůležitější přirozené inhibitory patří *antitrombin III (ATIII)*. Antitrombin III je koagulačně nejúčinnější látkou, která neutralizuje účinky trombinu (Lechner et al. 1995). Syntetizovaný je v játrech, nezávislý na vitamínu K (Senzolo et al. 2006). V plazmě je obsažen v poměrně vysoké koncentraci a společně s kofaktorem heparinu II odpovídá za 80% inhibiční koagulační aktivity. ATIII inhibuje koagulační proces tak, že vyvazuje trombin a jiné plazmatické proteinázy a tím vzniká irreverzibilní komplex. Navázáním heparinu může být tato rychlost mnohonásobně zvýšena. Dále vyvazuje FXa a některé další složky koagulačního systému, se kterými stejně jako s trombinem tvoří inaktivní komplexy.

Protein C je klíčovou složkou přirozené antikoagulační cesty, aktivována je na povrchu endoteliálních buněk trombinem navázaným k trombomodulinu. Vzniká v játrech za spoluúčasti vitamínu K (Pecka et al. 1998). Reguluje tvorbu trombinu tím, že inaktivuje některé koagulační faktory, to vede k potlačení aktivovaného koagulačního procesu (Debize et al. 1995).

Protein S vzniká v játrech za účasti vitamínu K, ale také na megakaryocytech a endoteliálních buňkách. Je kofaktorem PC. Spolu s ním tvoří důležitý komplex, jenž zajišťuje netvoření trombů na endoteliálních površích (Pecka et al. 1998).

1.2.2.2 Získané inhibitory

Získané inhibitory jsou autoproti látky proti faktorům hemostázy (Buliková et al. 2008). Oproti přirozeným inhibitorům, které jsou důležitou součástí koagulačního systému, inhibitory získané nepříznivě zasahující do koagulace, jejich přítomnost je patologická (Cines et al. 1995). Jejich přítomnost je nejčastěji doprovázena krvácivými projevy, méně často trombotickými. Nejvýznamnější úlohu hrají nespecifické antifosfolipidové protilátky, lupus antikoagulans a antikardiolipinové protilátky. Mezi

specifické inhibitory řadíme autoprotilátky namířené proti jednotlivým koagulačním faktorům, proti vWF, proteinu S (Buliková et al. 2008).

1.2.3 Fibrinolytický systém

Za fyziologických stavů je fybrinolytický systém udržován s koagulačním systémem ve vzájemné rovnováze (Colman et al. 2001). Pokud dochází ke zvýšení fibrinolytických vlastností, může nastat krvácení, naopak jejich snížení může vyvolat trombotické stavy (Pecka et al. 1998). Tento systém je zajišťován souhrou aktivátorů plasminogenu a inhibitory aktivátorů (Vaňásek et al. 1992). Je zodpovědný za lýzu sraženin fibrinu, ale také je zapojen do degradace kolagenu, angiogeneze, metastazování nádorů aj. Z tohoto důvodu je fibrinolytický systém spojen také s apoptózou (Kolde 2004).

Při porušení endotelu tedy dochází současně s aktivací primární hemostázy a koagulační kaskády i k aktivaci fibrinolýzy. Formace trombu je primárním stimulem k aktivaci fibrinolýzy. Fibrinolýza probíhá pomaleji, tj. 48-72 hodin i déle, dokud nedojde k řádnému zhojení rány. Jejím hlavním úkolem je rozpuštění vytvořené sraženiny a tím opětovné zprůchodnění cévy. Je to odpověď organismu na tvorbu fibrinových deposit. Jejich rozpuštění zajišťuje enzym plazmin, který vzniká aktivací plazminogenu (PLG) působením tzv. aktivátorů plazminogenu. Mezi aktivátory plazminogenu patří tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) a urokináza (uPA). Vedle toho může být plazminogen aktivován cestou krevní a to především kalikreinem, FXIa, FXIIa, ale také trombinem, tripsinem i plazminem (Matýšková et al. 1999).

1.3 Patologie hemostázy

Patologií hemostázy nebo-li poruchami krevního srážení jsou označovány stavy, kdy v důsledku chybění nebo nedostatečné funkce některých látek dochází ke krvácivým projevům nebo trombotickým příhodám (Penka et al. 1994). Tyto stavy mohou být vrozené nebo získané (Starý et al. 2005).

1.3.1 Patologie cévní stěny

Pro normální funkci cévní stěny v hemostáze je důležitá jednak neporušená struktura cévní stěny a metabolické aktivity, při kterých se tvoří velké množství hemostaticky aktivních látek. Alergické a zánětlivé změny mohou být příčinou zvýšené propustnosti cévních stěn (Pecka et al. 1998). Při takových poruchách dochází ke krvácivým projevům. Tyto stavy většinou postihují celý organismus. Jedná se např. o purpuru, kdy na kůži a sliznicích nacházíme petechie až sufúze (Matýšková et al. 1999).

1.3.2 Patologie trombocytů

V hemostáze je úloha trombocytů mnohostranná. Nezbytné jsou pro normální funkci cévní stěny, klíčovou úlohu mají v primární hemostáze a důležitou roli také hrají v plazmatické koagulaci. Dle počtu trombocytů rozdělujeme poruchy na trombocytopenii, tedy snížení počtu trombocytů. Trombocytóza nebo trombocytémie znamená zvýšení počtu trombocytů. Trombocytopenie hovoří o funkční nedostatečnosti trombocytů (Pecka 2004). Jak poruchy počtu trombocytů, tak poruchy z funkční nedostatečnosti se mohou navzájem prolínat, řada funkčních poruch je doprovázena trombocytopenií (Vaňásek et al. 1992).

1.3.3 Patologie koagulačních faktorů

Při nedostatečné funkci nebo chybění některého z koagulačních faktorů krevního srážení může docházet ke krvácivým stavům. Tyto koagulopatie mohou být vrozené a získané, ve vzácných případech se můžeme setkat i s kombinovanými defekty. Nejčastější vrozenou koagulopatií je hemofilie (Matýšková et al. 1999). *Hemofilie A* je krvácivá porucha způsobená snížením nebo chyběním koagulačního faktoru VIII (Makris 2012). Dědičnost je vázaná na pohlavní chromozom X, je recesivní. V populaci udržují nemoc ženy-přenašečky.

Při snížení nebo nedostatku faktoru FIX hovoříme o *hemofilii B*. Dědičnost i projevy jsou u obou hemofilií stejné. Při laboratorním vyšetření je základním stanovením hodnota aPTT. Klinickými projevy jsou krvácivé stavy, spontánní, často bez

příčiny. Hemofilie je nevyléčitelná a pacienti jsou odkázáni na doživotní substituční léčbu (Penka et al. 1994).

Von Willebrandova choroba je další vrozené krvácivé onemocnění (Matýšková et al. 1999). Funkční defekt nebo nedostatek vWF vede k poruše přilnavosti a agregaci krevních destiček a poruše schopnosti vázat F VIII (Luo et al. 2012). Nemoc postihuje obě pohlaví, je autozomálně dědičná. Při laboratorních vyšetřeních nacházíme u těžších forem prodloužené aPTT a dlouhou dobu krvácení. Dle tíže postižení se klinicky projevuje slizničním a kožním krvácením, obtížně tišitelným krvácením při poranění (Matýšková et al. 1999).

Získané koagulopatie se vyznačují snížením ne jednoho, ale obvykle celé skupiny koagulačních faktorů. Často doprovází poruchy střevní resorpce, poruchy funkce jater, stavy při některých otravách (Pecka et al. 1998).

1.4 Koagulační testy

Vyšetření hemostázy patří mezi základní laboratorní vyšetření.

1.4.1 Typy koagulačních stanovení

V dnešní době se manuální koagulační stanovení prakticky nepoužívá. Princip stanovení spočívá v detekci prvního fibrinového vlákna po přidání startovací reagentie, za pomoci háčku v temperované vodní lázni (Pecka et al. 2004).

Automatické koagulační analyzátory jsou založeny na mechanických principech, za použití kuliček, nebo na principech fotooptických, založených na nefelometrii či turbidimetrii (Matýšková et al. 1999).

1.4.1.1 Optické metody

Principem *turbidimetrie* je stanovení změny průchodnosti světla testovaným vzorkem. Stejně jako nefelometrie zaznamenává turbidimetrie zakalení zkoumaného vzorku.

Fotometrické metody stanovují intenzitu absorbance. K té dochází důsledkem štěpení specifického chromogenního substrátu (Matýšková et al. 1999).

1.4.1.2 Imunologické metody

Imunologické metody jsou založené na reakci antigenu s protilátkou (Matýšková et al. 1999).

1.4.1.3 Porovnání metod

Můžeme vyšetřovat jednak funkční aktivitu a jednak antigen, ať už vyšetřujeme protein koagulačních faktorů, systému primární hemostázy či přirozených inhibitorů. Při vyšetřování funkční aktivity využíváme metody koagulační a fotometrické. Při vyšetření antigenu metody imunologické (Matýšková et al. 1999).

1.4.1.4 POCT (Point-of-care testing)

Dříve používané manuální metody dnes nahradily automatizované koagulační analyzátory pracující na různých principech. Novinkou v koagulačních stanoveních je POCT testování, kdy za použití přenosného koagulometru Coagu Chek XS je možné monitorovat INR mimo laboratoř (Bereznicki et al. 2007).

Antikoagulační léčbou antagonisty vitamínu K je léčeno stále více pacientů. Tato léčba musí být pravidelně kontrolována měřením protrombinového času, vyjádřeného v INR. Proces pravidelných laboratorních kontrol je pro mnoho pacientů zdlouhavý a náročný především z důvodů správného dodržení preanalytické fáze. Z těchto důvodů je pro ně přínosné zařazení přenosných přístrojů ke stanovení INR mimo laboratoř.

POCT jsou laboratorní diagnostické testy, které se mohou provádět u lůžka pacienta nebo v domácí péči (Nichols 2007). Cílem POCT testování je poskytnutí rychlého a přesného výsledku tak, aby odpovídající léčba mohla být zahájena nebo změněna. To vede ke zlepšení klinického stavu pacienta (Bereznicki et al. 2007).

Coagu Chek XS je přístroj vhodný pro ambulantní sledování INR při antikoagulační léčbě (Sobieraj et al. 2009).

Přístroj Coagu Chek XS je přenosný koagulometr, měřící INR z plné krve, získané jednoduchým vpichem do prstu pomocí testovacích proužků. Testovací proužek obsahuje rekombinantní lidský tromboplastin s hodnotou ISI blízké 1. Proužek se vloží se do monitoru, které využívá elektrochemickou metodu pro stanovení

protrombinového času po aktivaci srážení tromboplastinu. Pomocí ISI je protrombinový čas převeden na INR. Výsledek je stanoven do minuty. Jeho použití je jednoduché i pro nekvalifikované pracovníky (Bereznicki et al. 2007).

1.4.2 Metody popisující hemostázu

Z hlediska specifity vyšetření popisující hemostázu, rozdělujeme typy stanovení na *globální*, které popisují celý srážecí proces. *Skupinové*, monitorující určitou část koagulačního děje a *specifické*, které stanovují jen jeden z koagulačních činitelů (Pecka et al. 1998).

1.4.2.1 Globální testy

Globální testy srážlivosti mohou odrážet individuální hemostatickou rovnováhu a tím přispět k posouzení krvácivých nebo trombotických stavů (Goldenberg et al. 2005). Poskytují základní a předběžnou informaci o stavu hemostázy (Hrubíško et al. 1983).

Mezi nejstarší koagulační testy na vyšetření primární hemostázy patří vyšetření *doby krvácivosti dle Dukeho* (Vojáček et al. 2004). *Doba krvácení* nás informuje o stavu primární hemostatické zátky, o primární hemostatické funkci trombocytů. Prodloužená doba krvácení může poukazovat nejen na snížené množství nebo poruchu funkce trombocytů, ale také na snížení hladiny vWF, který se na ně váže (Hrubíško et al. 1983).

Rumpel-Leedeho test nás informuje o poruchách funkce trombocytů a kapilár. Sledujeme vznik petechií po zatažení paže na předepsanou dobu (Sakalová et al. 2010).

Test konzumpce protrombinu – po vysrážení krve za standardních podmínek se stanovuje množství protrombinu v séru. Při některých poruchách vážne tvorba vnitřního aktivačního komplexu protrombinu, značná část protrombinu tedy zůstává v séru nespotřebovaná (Pecka et al. 1998).

Retrakce koagula monitoruje funkci trombocytů. Principem metody je stanovení změny objemu koagula, kterou zapříčiňuje působení intaktních trombocytů (Pecka et al. 1998). Retrakční schopnost trombocytů se projeví na množství séra uvolněného z krevní sraženiny (Hrubíško et al. 1983).

Euglobulinová lýza je stanovení, kdy bílkovinná frakce, kterou získáme speciálním postupem, obsahující hlavně plazminogen, se kalcie sráží. Pomocí plazminu dochází k jejímu samovolnému rozpuštění. Mírou fibrinolytické aktivity je čas, jenž uplyne od okamžiku rekalcifikace plazmy, do doby, kdy je bílkovinná frakce rozpuštěna (Pecka et al. 1998). Euglobulinová lýza odráží lytickou schopnost euglobulinové frakce (Collen 1999).

1.4.2.2 Skupinové testy

Protrombinový čas (PT) zvaný také tromboplastinový test nebo-li Quickův test – představil Armand Quick v roce 1935 (Poller,2004).

Jde o základní koagulační test, který nás informuje o vnější a společné cestě koagulačních faktorů (Sakalová et al. 2010). Po přidání tkáňového tromboplastinu a Ca^{2+} iontů k vyšetřované plazmě závisí rychlost vytvoření fibrinového vlákna na faktorech zevního koagulačního systému, tedy faktorů FII, FV, FVII, FX a fibrinogenu (Penka et al. 2003).

Jako reagentie se používají: tkáňový tromboplastin, obsahující extrakt z tkání bohatý na tkáňový faktor, nejčastěji z lidské placenty či králičího mozku a Ca^{2+} ionty. Nebo rekombinantní PT reagentie, obsahující rekombinantní tkáňový faktor, Ca^{2+} ionty, fosfolipidy, stabilizátory a pufr (Pecka 2004).

Výsledky tohoto stanovení se vyjadřují v sekundách, jako poměr časů, v procentech nebo v jednotkách INR. Při vyjádření v sekundách se udává čas denního normálu. Referenční meze se pohybují dle typu použité reagentie v rozmezí 10-17 sekund. Při udání výsledků jako poměr časů, se $R = \text{čas testované plazmy} / \text{čas normálu}$. $R = 0,8-1,2$. Při vyjádření výsledků v % normální koagulační aktivity je výsledek odečítán z kalibrační křivky. V současnosti se používání těchto hodnot nedoporučuje. Referenční meze jsou 70-120 % (Penka et al. 2009).

INR je mezinárodní normalizovaný poměr (Penka et al. 2009). INR je odvozeno od ISI, $INR = R^{ISI}$ (Poller 2004). ISI je mezinárodní index citlivosti, vyjadřuje citlivost daného tromboplastinu ku mezinárodnímu standardnímu tromboplastinu. Pro každý tromboplastin musí být určována hodnota ISI. Ideální hodnota je $ISI=1,0$ (Matýšková et

al. 1999). Hodnota INR vyjadřuje výsledky protrombinového času u pacientů s léčbou antagonisty vitamínu K. Terapeutické rozmezí INR= 2,0-4,0 (Penka et al. 2009). Hodnota INR je důležitá pro porovnání výsledků z jednotlivých laboratoří, kde jsou používané různé tromboplastiny (Horsti et al. 2005). K prodloužení časů dochází u nedostatku faktorů FII, FV, FVII, FX, fibrinogenu. Dále u jaterních onemocnění, nedostatku vitamínu K nebo léčbě jeho antagonisty, v přítomnosti inhibitorů. Fyziologicky u novorozenců (Penka et al. 2009).

Protrombinový čas je jedním z testů určených k monitorování antikoagulační léčby (Testa et al. 2002). Kumarinová antikoagulancia snižují krevní srážlivost nepřímo blokadou vitamínu K, jenž je kofaktorem karboxylace zbytků glutamové kyseliny, která je zabudovaná do struktury faktorů FII, FVII, FIX, FX, proteinů C a S, tedy K dependentních faktorů (Kessler et al. 2010). Pro mnoho pacientů je antikoagulační léčba celoživotní a tím je chrání před tromboembolickými komplikacemi (Skalická 2007). Trombóza a embolie patří mezi závažné stavy, které často ohrožují život pacientů, mnohdy vedou k úmrtí (Coufal 2012).

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) informuje o vnitřní cestě koagulačních faktorů - FXII, FXI, FIX, FVIII, ale zasahují do něj také faktory společné cesty FX, FV, protrombin a fibrinogen (Sakalová et al. 2010).

Po přidání parciálního tromboplastinu a Ca^{2+} iontů dochází k aktivaci koagulačního systému tzv. vnitřní cestou. Koncentrace faktorů vnitřního systému tedy ovlivňují rychlost tvorby fibrinového vlákna. Hodnoty výsledků se vyjadřují v sekundách nebo jako poměr časů: $R = \text{čas testované plazmy} / \text{čas normálu}$.

Normální hodnoty aPTT se liší dle použité reagentie, pohybují se v rozmezí 25-45 sekund (Matýšková et al. 1999).

Trombinový čas (TT) je jednoduchý test, při němž měříme rychlost přeměny fibrinogenu na fibrin po přidání trombinu (Sakalová et al. 2010). Normální hodnoty TT jsou do 18 sekund (Penka et al. 1994). Prodloužené hodnoty nacházíme u deficitu fibrinogenu a dysfibrinogenémii. Test bývá prodloužený při léčbě nefrakcionovaným heparinem (Sakalová et al. 2010).

Reptilázový čas Test podobný trombinovému času. Místo trombinu se přidává

reptiláza, což je hadí jed (hada *Bothrops atrox*). Narozdíl od trombinu však reptiláza není inhibovaná heparinem (Sakalová et al. 2010). Normální hodnoty jsou do 18 sekund (Matýšková et al. 1999).

Korekční testy se používají, pokud jsou prodloužené hodnoty PT, aPTT, TT. Rozlišují deficit koagulačních faktorů a přítomnost inhibitoru. Ředí se plazma pacienta s normální fyziologickou plasmou v určitých předepsaných poměrech (Sakalová et al. 2010).

1.4.2.3 Specifické testy

Specifickými testy stanovujeme funkce jednotlivých systémů (Penka et al. 2011).

2. Cíl práce a předpokládané hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit, jak dlouho po odběru jsou hodnoty Quickova testu stabilní a zjistit, zda tato doba je závislá na použité reagentii.

2.2 Předpokládané hypotézy

Hypotéza 1: Quick je relativně stabilní podstatně delší dobu než obvyklý dvouhodinový interval.

Hypotéza 2: Délka stability je ovlivněna metodikou analýzy, zejména použitým tromboplastinem.

Hypotéza 3: Rozdíly v použitých reagentiích budou podstatně menší než v práci Baglina.

3. Metodika

Vyšetření jsem prováděla v Laboratoři klinické hematologie nemocnice v Českých Budějovicích a.s. Měřila jsem vzorky 20 dárců krve, tedy relativně zdravých lidí, nezatížených žádnou antikoagulační léčbou. U všech vzorků jsem měřila hodnotu protrombinového času v určitých časových intervalech za použití pěti různých reagensů. Všechny vzorky byly nabrány za stejných standardních podmínek. Mezi jednotlivými měřeními jsem vzorky uchovávala v temnu při pokojové teplotě. V jednotlivých sériích jsem prováděla kontrolu správnosti s komerčně vyráběnými kontrolními materiály.

3.1 Preanalytická fáze

Preanalytická fáze zahrnuje kroky a postupy od doby, kdy je analýza požadovaná, do té doby, než je vzorek vložen do analyzátoru. Tyto kroky mohou výrazně ovlivnit výsledek stanovení. Jedná se o kroky prováděné mimo laboratoř, tedy přípravu pacienta, odběr vzorku a jeho transport. Kroky laboratorní zahrnují příjem materiálu, identifikace zkumavky a žádanky, uchování vzorku před analýzou, centrifugaci a přípravu reagensů a vzorku ke zpracování.

Mezi běžné preanalytické faktory, které vedou k odmítnutí vzorků a provedení analýzy patří odběr do nesprávné vakuety, dlouhý čas od odběru po dodání do laboratoře a nedodržení předepsané transportní teploty (Kazmierczak et al. 2000).

Nedodržení správného postupu může výsledek výrazně zkreslit. Pacient by před odběrem měl být na lačno. Krev by měla být odebrána pokud možno bez zatažení paže. Odebírá se žilní krev, uzavřeným systémem do předem označené vakuety s 0,109M citrátem sodným v poměru 1díl citrátu a 9 dílů krve. Po odběru se vakueta kývavým pohybem promíchá, aby nedošlo ke vzniku sraženiny. Při prudkém promíchání může nastat hemolýza (Matýšková et al. 1999).

Nemocnice České Budějovice a.s. používá odběrový systém Becton Dickinson Vacutainer. Vakuety určené pro koagulační stanovení mají modrý uzávěr. Odebraná krev se i s řádně vyplněnou žádankou expeduje do laboratoře. Transport by měl být co nejšetnější a nejrychlejší za dodržení předepsané teploty a světelných podmínek.

Pracovník přijímající materiál zkontroluje veškeré požadované údaje na žádance i vakuetě a žádanku i vakuetu označí stejným číselným kódem. Pod tímto číslem je vzorek dále zpracováván. Údaje na žádance se zadají do laboratorního informačního systému.

3.1.1 Použité reagensy

Tkáňové tromboplastiny jsou komplexní směsi, obsahující extrakt z tkání bohatý na tkáňový faktor, nejčastěji z lidské placenty či králičího mozku a Ca^{2+} ionty (Pecka 2004). Rekombinantní tromboplastiny obsahují rekombinantní tkáňový faktor, Ca^{2+} ionty, fosfolipidy, stabilizátory a pufr (Smith et al. 2006).

3.1.1.1 STA neoplastine CI Plus

STA neoplastine CI Plus vyrábí firma Stago. Jde o předkalibrovaný, lyofilizovaný tromboplastin, který se připravuje z čerstvé králičí mozkové tkáně. Obsahuje inhibitor heparinu. Prodloužený protrombinový čas odpovídá reálnému snížení koagulačních faktorů II, V, VII, X nebo fibrinogenu (Diagnostica Stago, 2011).

3.1.1.2 STA neoplastine R

STA neoplastine R vyrábí firma Stago. Lyofilizovaný tromboplastin připravený z lidského rekombinantního tkáňového faktoru a fosfolipidů. Obsahuje inhibitor heparinu. Prodloužení protrombinového času odpovídá skutečnému snížení faktorů protrombinového komplexu (Diagnostica Stago, 2006).

3.1.1.3 PT Quick

PT Quick vyrábí firma Medirox. Tkáňový tromboplastin, obsahující chlorid vápenatý. Vhodný k monitorování antikoagulační terapie (Medirox, 2011).

3.1.1.4 Thromborel S

Thromborel S vyrábí firma Siemens. Připraven z lidské placenty (Siemens, 2010).

3.1.1.5 Recombiplastin 2G Hemosil

Recombiplastin 2G Hemosil vyrábí firma Instrumentation Laboratory. Obsahuje lidský rekombinantní tkáňový faktor v syntetické směsi fosfolipidů v kombinaci s chloridem vápenatým a pufry není citlivý na heparin. Vysokou citlivost vykazuje ke sníženým hodnotám faktorů II, V, VII, a X (Instrumentation Laboratory, 2011).

Veškeré reagensie vyráběné z lidských tkání nebo lidských tělních tekutin procházejí během výroby všemi kroky, které vedou k odstranění virů a po výrobě náležitou kontrolou. I přesto bychom měli s reagensii zacházet jako s biologickým materiálem, tedy dodržovat všechna bezpečnostní opatření (Siemens, 2010).

3.1.2 Skladování a příprava reagensií

STA neoplastine CI Plus

Nenařazený roztok se uchovává v monitorované chladničce při teplotě 2-8 °C dle doby expirace. Před nařazením se inkubuje 10min při pokojové teplotě. Po smíchání se roztok nechá rozpouštět po dobu 30min při pokojové teplotě, aby došlo k důkladnému rozpuštění lyofilizovaného materiálu. Stabilita nařazeného roztoku v analyzátoru je 48 hodin (SOP).

Ostatní reagensie jsem nařadila a uchovávala stejným způsobem, přesně dle návodů použití od výrobce.

Pro hemokoagulační vyšetření se používá krevní plazma, proto musí být vzorek odstředěn. Na oddělení Laboratoře klinické hematologie nemocnice v Českých Budějovicích a.s. se krevní vzorky na stanovení protrombinového času centrifugují v odstředivce Jouan B4i, 2 minuty při 3200 ot./min (SOP).

Po odstředění jsem zhodnotila, zda je dodržen předepsaný poměr protisrážlivého činidla a krve a zda není přítomna sraženina. Dále jsem zkontrolovala, zda plazma není hemolytická, chylózní či ikterická. U optických koagulometrů může tento stav materiálu ovlivnit naměřenou hodnotu.

3.2 Analytická fáze

Zahrnuje veškeré faktory, které mohou ovlivnit vlastní měření v analyzátoru.

Všechny přípravy reagensí, kontroly kvality, kalibrace a vlastní měření jsou zahrnuty v standardních operačních postupech (SOP), které má každá laboratoř podrobně vypracované.

Správnost laboratorních vyšetření a systém kontroly je již po desetiletí stále aktuální téma (Horsti et al. 2008). Z hlediska vlastní analýzy musí laboratorní metody splňovat určité požadavky. Ty musí být známy a jejich plnění pravidelně kontrolováno, pro zajištění co nejvyšší spolehlivosti laboratorních výsledků (Racek et al. 2006). Dosažení kvality není věcí stálou, musí se pravidelně sledovat a zlepšovat (Dastych et al. 2008). Znamená to pravidelné provádění analýz kontrolních vzorků, jejich hodnocení a v případě chyby včasná reakce laboratoře. Podle toho, kým je kontrola prováděná, rozlišujeme externí kontrolu kvality a interní kontrolu kvality (Racek et al. 2006).

3.2.1 Interní kontrola kvality

Interní kontrolou kvality sledujeme analytická měření pomocí kontrolních materiálů. Ta se provádějí v určitých sériích. Tím získáme informace o každé metodě, tedy o přesnosti (reprodukovatelnost a opakovatelnost), správnosti a porovnatelnosti přístrojů. Každá laboratoř má podmínky interní kontroly kvality zaneseny ve standardních operačních postupech. Kontrolní vzorky pro kontrolu kvality jsou komerčně vyráběné a pohybují se v referenčních mezích a mimo referenční meze (Pecka et al. 2006). Pro *kontrolu správnosti* se používají dvě nezávislé komerčně atestované materiály. Kontrola se provádí vždy po kalibraci nebo změně šarží. U rutinních vyšetření je tuto kontrolu vhodné provádět 1x za měsíc. *Kontrolu přesnosti* je možné provádět s použitím komerčních neatestovaných vzorků. Tyto kontroly se provádějí současně s měřením vzorků pacientů, minimálně 1-2 x denně. *Porovnatelnost přístrojů* se provádí v rutinním provozu, pokud se pro danou metodu používá více přístrojů, minimálně 1 x denně. Zároveň při změně šarže a po kalibraci (Pecka et al. 2006).

3.2.1.1 Validace

Validace znamená ověřování, že specifikované požadavky pro zamýšlené použití

jsou přiměřené. Potvrzuje, že měřicí systém a postup je schopen plnit požadavky, jenž jsou na něj kladené, měření jsou korektní s přesně provedenou kalibrací. V klinické laboratoři se provádějí pouze metody validované. Proces validace se provádí pouze v případě, dojde-li k modifikaci metod validovaných výrobcem, nebo pokud je použito metod jiného typu (Friedecký et al. 2010).

3.2.1.2 Verifikace

Verifikace nebo-li ověření nám poskytuje objektivní důkaz o tom, že metoda splňuje specifikované požadavky. Jde o proces ověřování, že je laboratoř schopna při zavádění metod, které jsou validované, dosáhnout uváděné výkonnosti metody. Poukazuje na způsobilost laboratorního personálu a způsobilost zařízení a prostředí vzhledem k provádění daného měřicího postupu. Měřicí postup by měl být v konkrétní laboratoři plně funkční. V klinické laboratoři se verifikují všechny postupy měření a metody (Friedecký et al. 2010). Výsledky měření mají v klinické laboratoři silný dopad na praxi. Mohou být faktorem, který ovlivní zdraví, ale někdy život pacienta. Validací a verifikací si laboratoř zajišťuje při rutinním provozu kvalitu dat (Friedecký et al. 2010).

3.2.1.3 Kalibrace

Kalibrace určuje vztah mezi měřeným signálem a množstvím, nejčastěji koncentrací, zjišťovaného analytu. Dále zajišťuje přenos hodnot z referenčních materiálů nejvyšší metrologické třídy na referenční materiály nižších tříd, postupně až na kalibrátory pracovní, které se používají v rutinních laboratořích. Pod pojmem kalibrátor rozumíme materiál, který je ke kalibraci použitý. Závislost měřeného signálu na měřené vlastnosti analytu graficky znázorňuje kalibrační křivka (Dastyh et al. 2008). Kalibrační křivka musí být minimálně tříbodová (Matýšková et al. 1999).

Kalibraci kontrolujeme zpracováním kontrolního materiálu. Její stabilitu a stabilitu celého měřicího systému pravidelně kontrolujeme systémem vnitřní kontroly. Pokud jsou při výměně reagensů hodnoty kontrolních vzorků mimo povolené rozmezí, provádíme recalibraci (Dastyh et al. 2008).

3.2.1.4 Chyba

Chyba je mírou nesprávnosti. Ukazuje nesoulad mezi analyzovaným výsledkem a skutečnou hodnotou stanovované veličiny ve vzorku. Vyjadřuje se jako chyba relativní nebo absolutní. Absolutní chyba znamená rozdíl mezi výsledkem měření a skutečnou-správnou-hodnotou. Její veličina může být kladná i záporná. Relativní chyba je absolutní chyba se vztahem ke skutečné hodnotě. Chyby mohou být systematické nebo náhodné. Systematické chyby zkreslují výsledky vždy v určitém směru, mají stálý charakter. Výsledky jsou soustavně nižší nebo vyšší. Vyjadřují se hodnotami vychýlení nebo-li Bias. Náhodné chyby nejsou pravidelné, při opakovaných měření se výsledky liší. Jsou rovnoměrně rozptýleny kolem průměrné hodnoty, četnost jednotlivých výsledků vykazuje normální rozložení - Gaussova křivka (Dastyeh et al. 2008).

3.2.1.5 Přesnost

Přesnost znamená těsnou shodu mezi výsledky opakovaných analýz téhož vzorku. Číselně se vyjadřuje směrodatnou odchylkou (SD) nebo variačním koeficientem opakovaných měření - nepřesností. Po zjištění přesnosti se zařazují po každé analytické sérii vzorků pacientů vzorky kontrolního materiálu (Matýšková et al. 1999).

3.2.1.6 Správnost

Správnost představuje těsnost shody mezi tzv. pravou hodnotou a hodnotou naměřenou. Rozdíl mezi výsledkem měření, tedy mezi průměrem opakovaných měření a správnou hodnotou je číselným vyjádřením správnosti. K její zjištění se používají kontrolní materiály, v nichž jsou uvedeny odchylky, které nesmí být překročeny (Matýšková et al. 1999). *Nesprávnost* je způsobena systematickou analytickou chybou a výsledek vždy odchyluje jedním směrem (Racek et al. 2006).

3.2.1.7 Opakovatelnost

Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku. Podmínkou opakovatelnosti je stejný postup měření, stejný měřicí systém, stejné místo, stejné pracovní podmínky a opakované měření na stejných objektech v krátkém časovém úseku (SEKK, 2009).

3.2.1.8 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost zahrnuje různá místa, obsluhující personál při měření na stejných nebo podobných objektech (SEKK, 2009).

3.2.2 Externí kontrola kvality

Hemokoagulační laboratoře se účastní *externí kontroly kvality* v pravidelných intervalech. Z dodaných kontrolních materiálů, v normálním a patologickém rozmezí, provádějí požadované analýzy. Ty se zaznamenají do speciálního přiloženého formuláře a ten se odesílá k vyhodnocení. Firma provádějící externí kontrolu kvality vystaví výsledkový list a na základě úspěšnosti vystaví laboratoři certifikát. Laboratoř klinické hematologie nemocnice České Budějovice a.s. se účastní 2x ročně externího hodnocení kvality u firmy SEKK, spol. s r.o. se sídlem v Pardubicích.

3.2.3 Automatický koagulační analyzátor STA-R Evolution®

Měření jsem prováděla na analyzátoru STA-R Evolution® od firmy Diagnostica Stago. Tento přístroj je založen na metodě chronometrické a fotometrické. Princip chronometrické metody spočívá v měření odchylky oscilační amplitudy kuličky.

Díky dvěma zahnutým kolejničkám na dně kyvety a přítomnému elektromagnetickému poli dochází při stálé viskozitě k pohybu kuličky. Velkou citlivost tohoto systému umožňuje frekvence tohoto pole, která se blíží oscilační frekvenci kuličky. Magnetické pole vytvářejí 2 motorové cívky, které jsou softwarem automaticky nastavovány v závislosti na viskozitě prostředí a druhu testu. Oscilační amplituda kuličky je při stálé viskozitě stálá, pokud se viskozita zvětšuje – při srážení – oscilační amplituda kuličky se zmenšuje. Změnu amplitudy využívá algoritmus, jenž stanovuje dobu srážení.

Chronometrický měřicí princip platí pro koagulační metody, jenž jsou použity při stanovení PT, aPTT, FBG, TT, deficitu jednotlivých faktorů vnější i vnitřní cesty koagulace (Diagnostica Stago, 2005).

Fotometrické měření je založeno na absorbanci monochromatického zdroje světla o vlnové délce 405 nm nebo 540 nm, které prochází kyvetou v době, kdy probíhá

barevná reakce. Kyvetou procházející světlo je při průchodu částečně pohlcováno reakčním prostředím. Přenesené světlo se změní a převede na absorbanci. Pokud jsou součástí reagentie protilátky, při reakci protilátky s antigenem vzniká produkt, jenž intenzitu světla změní. Toto je imunologická metoda. Zdrojem dopadajícího jednobarevného světla je wolframhalogenová lampa a filtr.

Fotometrický měřicí princip platí pro chromogenní metody, které jsou používané při stanovení ATIII a proteinu C a pro imunologické metody, které jsou použity při stanovení D dimeru a vWF (Diagnostica Stago, 2005).



Obr. 2: analyzátor STA-R Evolution®

Zdroj: vlastní foto

3.2.4 Pipetovací protokol protrombinového času Neoplastin CI

- 50µl plazma + 50µl ředící pufr Owren-koller
- inkubace 240 sekund
- 100µl Neoplastine CI Plus

Pipetovací protokoly ostatních reagensů byly nastaveny dle návodů doporučení od výrobce.

3.2.5 Vlastní měření

Vzorky nastavené ve stojancích se v nakládací oblasti vkládají do analyzátoru, kde jsou automaticky zasouvány do přístroje ke čtečce čárových kódů. Po načtení kódů je stojánek přesunut k místu aspirace. Analyzátor si sám z laboratorního počítačového systému přeneše požadované informace k vyšetření. Kyveta s kuličkou je automaticky naplněna stanoveným množstvím plazmy spolu s přesným množstvím ředícího roztoku. Tato směs se požadovanou dobu inkubuje. Několik vteřin před uplynutím inkubační doby je kyveta automaticky přenesena do měřicí zóny, kde je k ní přidána startovací reagensie a měření je provedeno. Po ukončení analýzy je kyveta přenesena do odpadního koše, použité jehly jsou automaticky promyty.

Všechny reagensie od firmy Diagnostica Stago mají čárový kód, který se načítá na čtečce čárových kódů pro reagensie. Po načtení reagensie se vloží do určené pozice v zásobníku, který má stálou teplotu. Veškeré požadované analýzy jsou přenášeny z hlavního počítače, kde je zadáno ID pacienta, číslo vzorku a požadované metody. Analyzátor je vybaven systémem Cap Piercer, zkumavky není třeba zbavovat víček, pracuje v uzavřeném systému, čímž se minimalizuje kontakt laboranta s biologickým materiálem. Analyzátor má databázi vzorků a samostatnou tiskárnu.

3.3 Postanalytická fáze

Ke špatné interpretaci výsledků může dojít v postanalytické fázi v důsledku neodpovídajícího analytického rozmezí či z důvodu nedostatečných nebo zkreslených

informáciách o vzorku (Ward-Cook et al. 2003).

4. Výsledky

4.1 Naměřené a statisticky zhodnocené hodnoty

V době od 16.-19.4.2012 jsem prováděla měření v laboratoři Klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s. Všechny analyzované vzorky byly nabrány za stejných standardních podmínek. Ihned po odběru transportovány do laboratoře, připraveny k analýze a stanoveny. První časy jsem změřila do 1 hodiny po odběru. Druhé měření 12 hodin po odběru. Další 24, 48 a 72 hodin po odběru. Měření jsem u každé hodnoty prováděla jednou, pokaždé na stejném analyzátoru. Mezi jednotlivými stanoveními jsem vzorky uchovávala v temnu při pokojové teplotě. Před vlastním měřením jsem se všemi reagensii provedla kontrolu kvality s komerčně vyráběnými kontrolními materiály. V referenčních mezích s „normálními“ - N, mimo referenční meze s „patologickými“ - P, s přesnou hladinou testovaného parametru a povolenými odchylkami. Dle validačního protokolu Laboratoře klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s. je variační koeficient (CV) opakovatelnosti, tzn. nepřesnost u protrombinového času u normální plazmy $CV < 1,5 \%$. U abnormální plazmy, tedy patologické je $CV < 2,0 \%$.

Sledovala jsem pouze naměřené časy. Časy jednotlivých měřených sérií uvádím v příloze, tabulka č. 8. U jednotlivých reagensii jsem počítala průměr časů změřených v daném čase a směrodatnou odchylku. Vše uvádím v následujících tabulkách.

4.2 Průměrný čas naměřených hodnot a směrodatná odchylka

Tabulka 1: Průměrný čas a směrodatná odchylka Neoplastine CI Plus

Neoplastine CI Plus	čas od odebrání vzorku(sec)				
	1h	12h	24h	48h	72h
průměr	13,8	13,9	14,1	14,9	15,5
sm. odchylka	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7

Tabulka 2: Průměrný čas a směrodatná odchylka Neoplastine R

Neoplastine R	čas od odebrání vzorku(sec)				
	1h	12h	24h	48h	72h
průměr	13,5	13,5	13,6	14,7	15,6
sm. odchylka	0,7	0,7	0,7	0,8	1,0

Tabulka 3: Průměrný čas a směrodatná odchylka PT Quick

PT Quick	čas od odebrání vzorku(sec)				
	1h	12h	24h	48h	72h
průměr	15,5	15,9	16,2	17,1	18,2
směrodatná odchylka	0,9	0,9	0,9	1,0	1,2

Tabulka 4: Průměrný čas a směrodatná odchylka Thromborel S

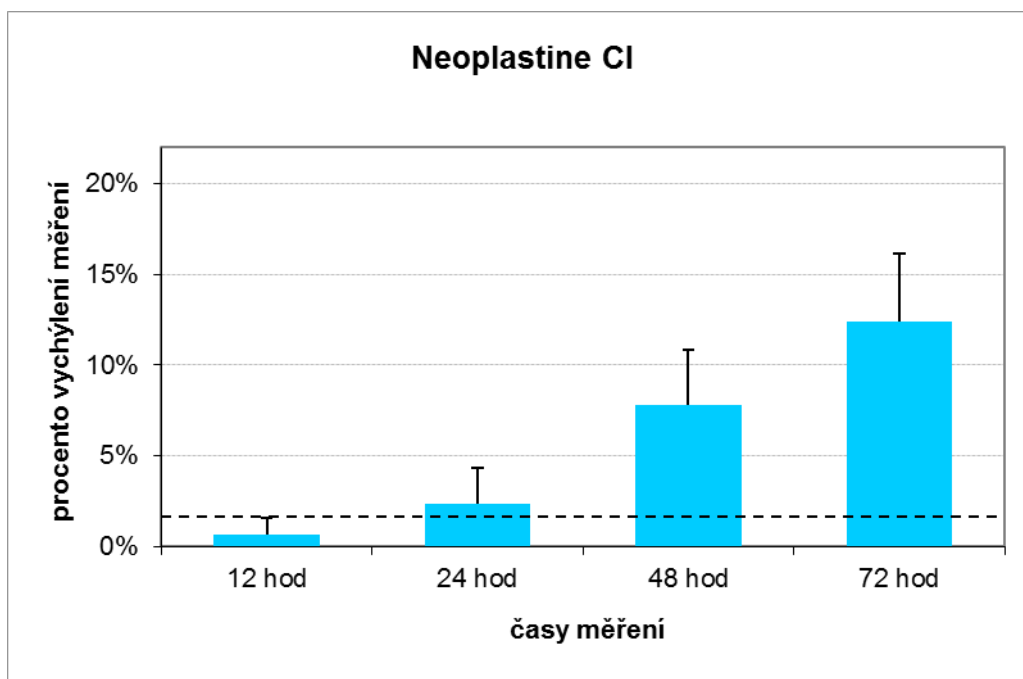
Thromborel S	čas od odebrání vzorku(sec)				
	1h	12h	24h	48h	72h
průměr	13,9	13,5	13,6	14,5	15,2
směrodatná odchylka	0,6	0,7	0,6	0,7	0,8

Tabulka 5: Průměrný čas a směrodatná odchylka Recombiplastin 2G

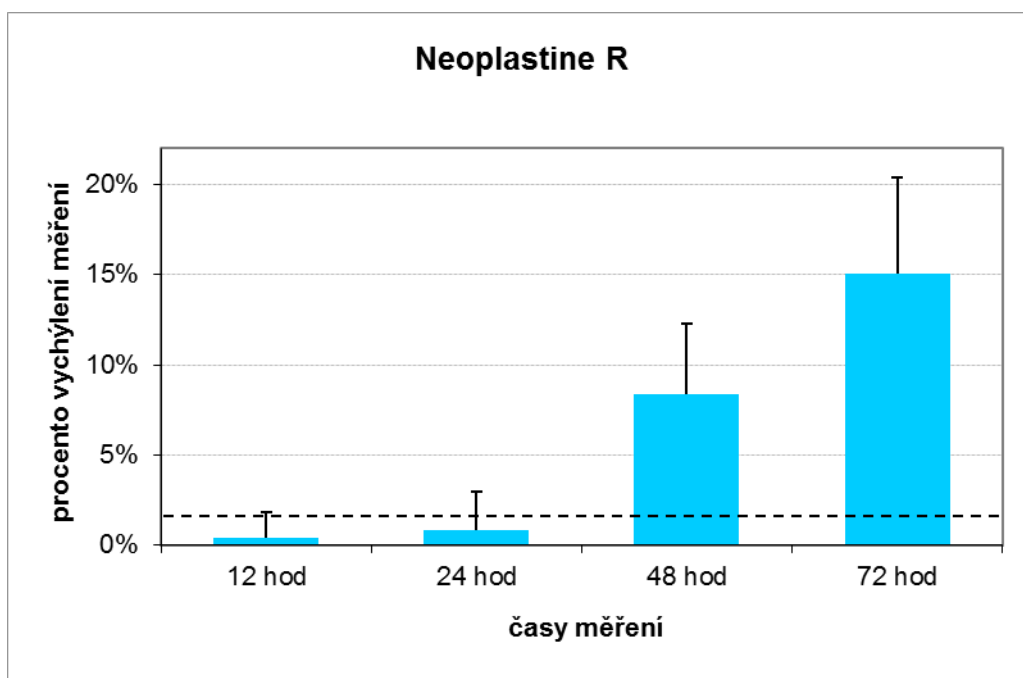
Recombiplastin 2G	čas od odebrání vzorku(sec)				
	1h	12h	24h	48h	72h
průměr	11,7	11,9	12,1	12,6	12,8
směrodatná odchylka	0,6	0,7	0,6	0,6	0,8

4.3 Rozdíly vychýlení (%) a směrodatná odchylka

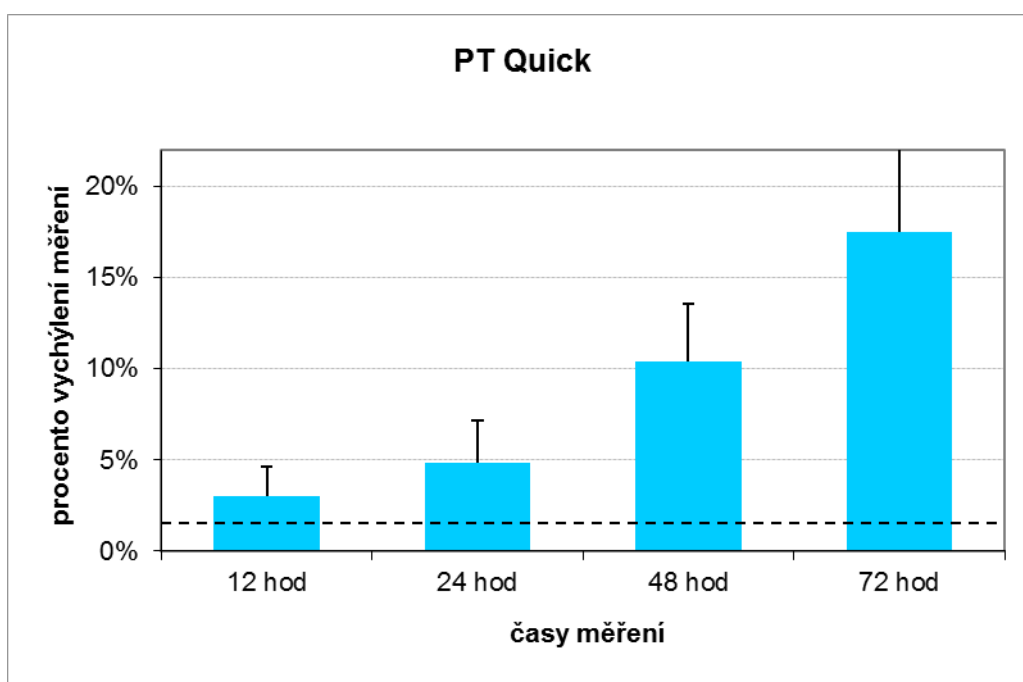
Jelikož mne zajímaly rozdíly mezi jednotlivými měřeními u konkrétní reagentie v daných časových intervalech, do následujících grafů, provedených v počítačovém programu Microsoft Office Excel jsem zaznamenala procentuelní rozdíly a směrodatnou odchylku.



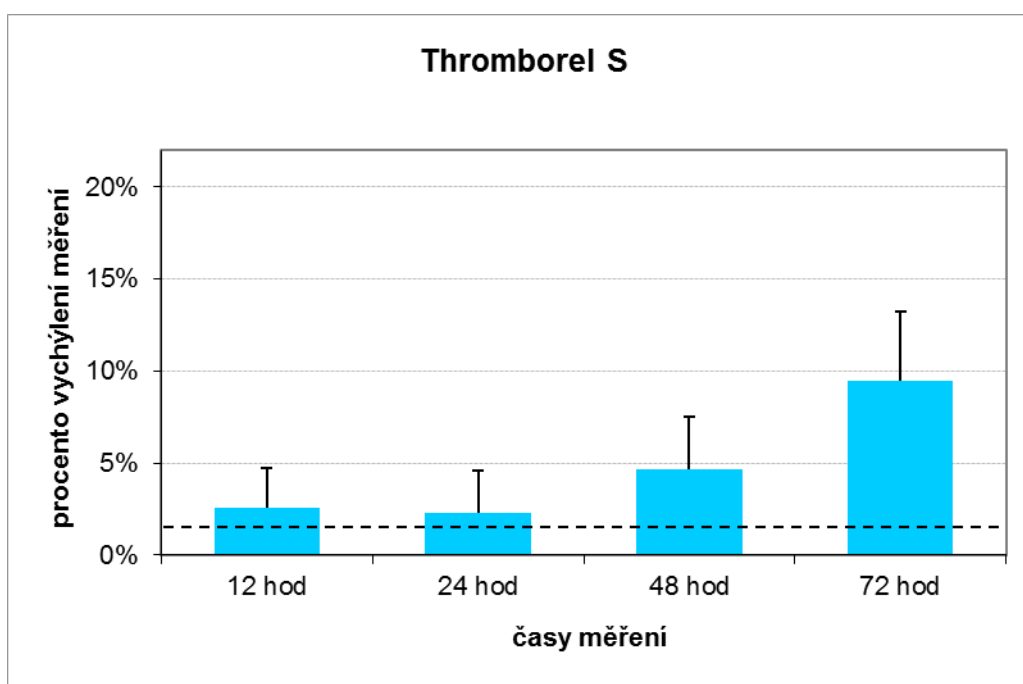
Obr. 3: Rozdíl vychýlení (%) měření v závislosti na času stanovení při použití Neoplastine CI Plus. Chybová úsečka je 1 směrodatná odchyłka.



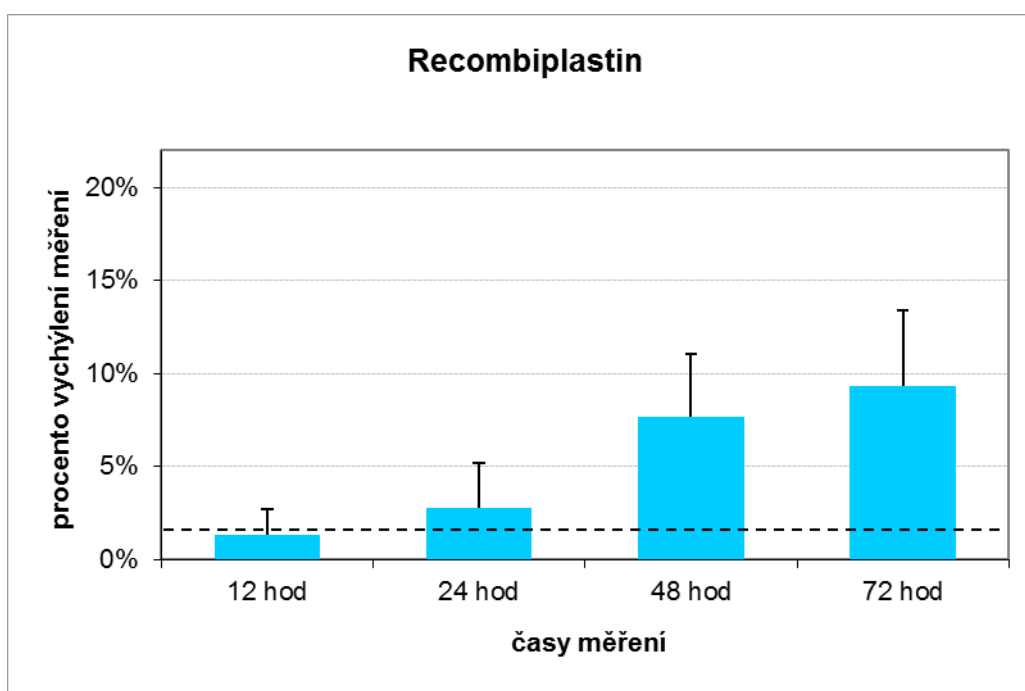
Obr. 4: Rozdíl vychýlení (%) měření v závislosti na času stanovení při použití Neoplastine R.



Obr. 5: Rozdíl vychýlení (%) měření v závislosti na času stanovení při použití PT Quick.



Obr. 6: Rozdíl vychýlení (%) měření v závislosti na času stanovení při použití Thromborel S.



Obr. 7: Rozdíl vychýlení (%) měření v závislosti na času stanovení při použití Recombiplastin 2G.

4.4 Celkové průměrné vychýlení

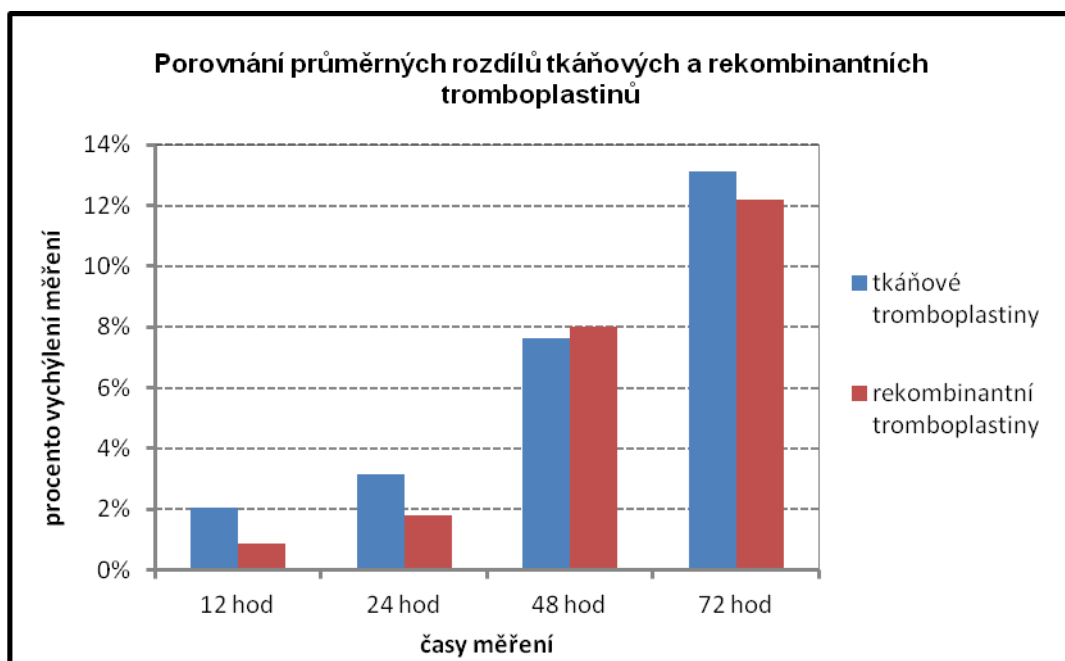
V této tabulce shrnuji celkové průměrné vychýlení (%) při měření protrombinového času u každé reagensie ve všech časech (obr. 3-7).

Tabulka 6: Celkové průměrné vychýlení u jednotlivých reagensií (%)

	Průměr vychýlení %
Neoplastine CI Plus	5,8
Neoplastine R	6,2
PT Quick	8,9
Thromborel S	4,8
Recombiplastin 2G	5,3

4.5 Porovnání průměrných rozdílů tkáňových a rekombinantních tromboplastinů

V grafu je znázorněno porovnání vychýlení skupiny tkáňových tromboplastinů a skupiny rekombinantních tromboplastinů v daných časových obdobích.



Obr. 8: Porovnání vychýlení (%) skupiny tkáňových a rekombinantních tromboplastinů

4.6 Celkové průměrné vychýlení skupin použitých tromboplastinů

V závěrečné tabulce mezi sebou porovnávám celkové průměrné vychýlení skupiny tkáňových tromboplastinů a rekombinantních tromboplastinů.

Tabulka 7: Celkové průměrné vychýlení mezi tromboplastiny tkáňovými a rekombinantními (%)

Tkáňové tromboplastiny	Neoplastine CI Plus	6,5
	PT Quick	
	Thromborel S	
Rekombinantní tromboplastiny	Neoplastine R	5,6
	Recombiplastin 2G	

5. Diskuze

Cílem této práce bylo zjistit, jak dlouho po odběru jsou hodnoty protrombinového času, jinak zvaného Quickova testu stabilní a zjistit, zda tato doba je závislá na druhu použité reagentie. Zaměřila jsem se na použití různých druhů současných reagentií při měření časů. Použila jsem jak tkáňové tromboplastiny – Neoplastine CI Plus, PT Quick, Thromborel S, tak tromboplastiny rekombinantní – Neoplastine R a Recombiplastin 2G. Časy jsem měřila v intervalu do 1 hodiny po odběru, 12 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin po odběru.

Jelikož je antikoagulační léčba pro mnoho pacientů nezbytnou, mnohdy i celoživotní léčbou, je důležitá její pravidelná a spolehlivá kontrola. Proto je úzce spojena s laboratorními testy. Samotnému stanovení však předchází odběr vzorku, tedy preanalytická fáze. Ta je velmi důležitá, ale laboratoří velmi málo ovlivnitelná.

Jelikož složky vyšetřované v koagulaci jsou poměrně labilní, je řádný odběr hlavním předpokladem k vydání správných výsledků (Penka et al. 2009).

V preanalytické fázi může být zdrojem chyb nevhodně naplánovaný či provedený odběr nebo odběr ze špatného místa, nevhodný antikoagulační roztok, chybný export vzorku, jeho skladování a příprava před vlastní analýzou (Ward-Cook et al. 2003).

Pro stanovení protrombinového času, ale i ostatních koagulačních testů je vhodné použití jednorázových plastových zkumavek (Raijmakers et al. 2010). Po odběru je důležité šetrné promíchání krve ve zkumavce (Penka et al. 2009).

Export materiálu pro hemokoagulační vyšetření by měl být co nejrychlejší, zpracování vzorku by mělo být provedeno do dvou hodin po odběru, jinak by mohl být výsledek nehodnotitelný (Penka et al. 1994). Oproti tomuto tvrzení existují studie, které dobu mezi odběrem a analyzováním prodlužují: „Doba mezi odběrem a stanovením protrombinového času může být do 6 hodin po odběru a to pokud je vzorek uchováván jak při teplotě pokojové, při 4-8 °C i při 37 °C“ (van Geest-Daalderop et al. 2005). Cílem této studie bylo zjistit vliv teplotních podmínek a doby uchovávání pro stanovení protrombinového času. Krev byla okamžitě odstředěna, plazma byla uchována při pokojové teplotě, při teplotě 4 °C a zmrazena na -20 °C. Vzorky byly analyzovány ihned po uskladnění a opakovány po 6 hodinách, 12 hodinách a 24 hodinách. Závěrem

lze konstatovat, že vzorky transportované při pokojové teplotě i při 4°C jsou akceptovány u hodnot protrombinového času až do 24 hodin po odběru (Rao et al. 2000). V mé práci vycházím z Baglinovy studie, kdy u odebraných vzorků z mimo nemocničních zařízení stanovoval hodnoty protrombinového času, respektive INR v opožděné analýze, až 120 hodin po odběru s devíti různými tromboplastiny. „Neexistuje klinicky významná změna v INR, pokud je analýza opožděna až o tři dny s jakoukoli reagensií tromboplastinu. Pokud je analýza opožděna o více jak tři dny, měl by být vybrán tromboplastin s vysokou reprodukovatelností. Je zřejmé, že vliv drobných rozdílů INR kvůli zpožděné analýze by měl být menší než rozdíly v INR vzhledem k použití různých reagensií a koagulačních analyzátorů“ (Baglin et al. 1997).

Chyby v analytické fázi mohou být v důsledku chybného používání analyzátorů, jeho nedostatečné údržby, neodpovídajícího objemu reagensií či jejich kontaminace. Chyby při samotném měření mohou vznikat v důsledku chybné kalibrace či nevhodně zvoleného kalibrátoru. Nedodržení času inkubace, nepřesným ředěním, prošlou expirací reagensií. Těmto chybám lze předcházet pravidelnou vnitřní kontrolou kvality (Ward-Cook et al. 2003).

Ve čtvrté části své práce jsem zpracovala výsledky měření. Všechny naměřené hodnoty ve všech časových intervalech jsem zanesla do tabulky (viz. příloha 1 tabulka č.8). Do jedné hodiny po odběru dosahoval nejnižšího průměrného času Recombiplastin 2G 11,7 sec s naměřenou směrodatnou odchylkou 0,6. Po 12 hodinách Recombiplastin 2G 11,9 sec a směrodatná odchylka 0,7. Po 24 hodinách opět Recombiplastin 2G 12,1 sec se směrodatnou odchylkou 0,6. V době 48 hodin po odběru Recombiplastin 2G hodnoty 12,6 sec a směrodatné odchylky 0,6 a v čase 72 hodin po odběru hodnoty 12,8 sec a směrodatné odchylky 0,8. Z tabulek vyplývá, že nárůsty časů u většiny reagensií nejsou velké, ale jsou. V tomto se neshodují s Baglinovou prací, který změnu zaznamenává až za 72 hodin po odběru.

Následující grafy (obr. 3-7) vyjadřují procentuelní rozdíly vychýlení mezi jednotlivými měřeními ve vztahu k prvnímu měření a vypočítanou směrodatnou odchylku. Po 12 hodinách byl nejmenší průměrný rozdíl vychýlení měření při použití reagensie Neoplastine R 0,40 % a směrodatná odchylka 1,50. Po 24 hodinách dosahoval

nejmenší průměrný rozdíl (vychýlení Neoplastine R 0,80 % se směrodatnou odchylkou 2,10. Po 48 hodinách Thromborel S nejmenší průměrný rozdíl vychýlení 4,70 % se směrodatnou odchylkou 2,90. Po 72 hodinách od prvního stanovení nejmenší průměrný rozdíl vychýlení u Recombiplastin 2G 9,30 % se směrodatnou odchylkou 4,10.

Jednotlivé průměrné rozdíly vychýlení jsem porovnávala s aktuálním validačním protokolem Laboratoře klinické hematologie nemocnice České Budějovice a.s., který udává pro opakovatelnost variační koeficient pro protrombinový čas $< 1,5\%$ ($CV < 1,5\%$). Do 12 hodin od odebrání vzorku dosahovaly hodnoty $CV < 1,5\%$ časy stanovené reagensy Neoplastine CI Plus, Neoplastine R a Recombiplastin 2G. U času 24 hodin po odběru nepřesáhl hodnotu $CV < 1,5\%$ pouze Neoplastine R s průměrným rozdílem 0,80 %. 48 a 72 hodin po odběru překročily všechny reagensy $CV < 1,5\%$. Při takovém porovnání reagensů se u času 12 hodin po odběru do tohoto limitu vešly pouze tři z pěti, u času 24 hodin pouze jedna z pěti. Také zde jsem se neshodla s Baglinovou studií. Baglin viděl rozdíly až po 72 hodinách po odběru. Tak dlouho jsem však již vzorky neměřila, neboť z předchozích porovnání bylo zřejmé, že nejpozději po 24 hodinách jsem se dostala na nereprodukovatelné hodnoty. Je zřejmé, že od Baglinovy studie doba pokročila a na měřené hodnoty jsou udávána přísnější kritéria.

Při výpočtu celkového průměrného vychýlení (tab.6) u každé reagensy ve všech časech dosáhl nejnižší hodnoty Thromborel S 4,8 %.

V grafu (obr. 8) je znázorněno porovnání průměrných rozdílů tkáňových a rekombinantních tromboplastinů. Při detailním pohledu je vidět, že rekombinantní jsou lepší po 24 hodinách, zatímco 48 a 72 hodin po odběru již tak velký rozdíl není zaznamenán.

U rekombinantních činilo celkové průměrné vychýlení 5,6 %, u tkáňových tromboplastinů 6,5 % (tab.7) Tento rozdíl je ovlivněn reagensy PT Quick, která ze skupiny tkáňových tromboplastinů vycházela nejhůře.

Z dosažených výsledků lze konstatovat, že prodloužit čas stanovení na případných 12 hodin od odběru lze jenom při použití některých tromboplastinů. Při době delší nejsou výsledky reprodukovatelné.

6. Závěr

Cílem mé práce bylo zjistit, jak dlouho po odběru jsou hodnoty protrombinového času neboli Quickova testu stabilní a zda tato doba je závislá na použité reagentii.

Provedla jsem měření s pěti různými reagentii. Se třemi z pěti reagentii byl výsledek po 12 hodinách v rozsahu nejistoty. Zároveň byl provedenými měřeními prokázán rozdíl stability výsledků v závislosti na použité reagentii. Tím byl splněn cíl práce.

Se třemi z pěti reagentii bylo stanovení stabilní minimálně 12 hodin, tím byla potvrzena má první hypotéza.

Stabilita protrombinového času se lišila v závislosti na druhu použité reagentie, tím byla potvrzena i druhá hypotéza.

Baglin uvádí stabilitu u všech reagentii minimálně 72 hodin, používá však kritérium klinické významnosti. Při nedostupnosti zdrojových dat z Baglinovy studie je přesné porovnání obtížné, je však velmi pravděpodobné, že rozdíly mezi jednotlivými reagentii jsou v mém sledování menší. Pozorovala jsem větší rozdíly v porovnání reagentii mezi jednotlivými výrobci než v porovnání dle typu reagentie. Tím třetí hypotéza nebyla potvrzena.

7. Seznam použitých zdrojů

- Baglin, T., Luddington, R. *Reliability of delayed INR determination: implications for decentralized anticoagulant care with off-site blood sampling*. Br J Haematol 96: 431-4, 1997.
- Bereznicki, L.R., Jackson, S.L., Peterson, G.M. et al. *Accuracy and clinical utility of the CoaguChek XS portable international normalised ratio monitor in a pilot study of warfarin home monitoring*. J Clin Pathol 60(3): 311-314, 2007.
- Buliková, A., Smejkal, P., Zavřelová, J., Clupová, G., Penka, M. *Získané inhibitory krevního srážení*. Interní medicína pro praxi 10(7): 336-339, 2008.
- Collen, D.: *The plasminogen (fibrinolysis system)*. Thromb Haemost 82: 259-270, 1999.
- Coufal, Z. *Nové možnosti prevence a terapie systémové tromboembolie*. Interní medicína pro praxi 14(10): 357-360, 2012.
- Dastych, M., Breinek, P. et al. *Klinická biochemie bakalářský obor zdravotní laborant*. Masarykova univerzita Brno, 2008.
- Diagnostica Stago. *Neoplastine CI PLUS. Stanovení protrombinového času*. France. 2011.
- Diagnostica Stago. *Neoplastine R. Stanovení protrombinového času*. France. 2006.
- Diagnostica Stago, *Referenční příručka*, 2005.
- Friedecký, B., et al. *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích (online)*. ČSKB ČLS JEP, 2010. Dostupné z: www.cskb.cz/res/file/doporuceni/valid/Validace_2010.pdf.
- Goldenberg, N.A., Hathaway, W.E., Jacobson, L., Manco-Johnson, M.J. *A new global assay of coagulation and fibrinolysis*. Thromb Res 116 (4): 345-56, 2005.
- Horsti, J., Uppa, H., Vilpo, J.A. *Poor agreement among prothrombin time international normalized ratio methods: comparison of seven commercial reagents*. Clin Chem 51(3): 553-60, 2005.
- Hořejší, V., Bartůňková, J. *Základy imunologie*. Praha: Triton, s. 81, 2009.

- Hrubíško, M. et al. *Hematologie a krevní transfuze I. Hematologie*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1983. ISBN 08-040-83.
- Instrumentation Laboratory. *Recombiplastin 2G*. Italy, 2011.
- Kazmierczak, S.C., Catrou, P.G. *Analytical Interference. More than Just a Laboratory Problem*. Am J Clin Pathol 113: 9-11, 2000.
- Kolde, H. J. *Haemostasis*. Basel: Pentapharm Ltd. 2004.
- Kroll, M.H., Schafer, A.I. *Biochemical mechanisms of platelet activation*. Blood 74(4): 1181-1195, 1989.
- Kvasnička, J. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003. ISBN 80-7169-993-4.
- Lim, M.D., Dickherber, A., Compton, C.C. *Before you analyze a human specimen, think quality, variability, and bias*. Anal Chem 83: 8-13, 2011.
- Luo , G.P., Ni, B., Yang, X., Wu ,Y. Z. *Von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis*. Acta Haematol 128(3): 158-169, 2012. DOI:10.1159/000339426.
- Makris, M. *Prophylaxis in haemophilia should be life-long*. Blood Transfus 10(2): 165-168, 2012. DOI: 10.2450/2012.0147-11.
- Matýšková, M., Zavřelová, J., Hrachovinová, I. *Hematologie pro zdravotní laboranty 2.díl: Krevní srážení*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1999. ISBN 80-7013-278-7.
- Medirox. *PT Quick*. Sweden, 2011.
- Metrologické terminologie v klinické a analytické laboratoři. 2. přepracované a doplněné vydání*. SEKK spol s r.o., EURACHEM ČR, 2009.
- Nichols, J.H. *Point of care testing*. Clin Lab Med 27:893-9082, 2007.
- Pecka, M. *Laboratorní hematologie v přehledu III. Fyziologie a patologie hemostázy*. Český Těšín: FINIDR, s.r.o., 2004. ISBN 80-86682-03-X.

- Pecka, M. *Přehled laboratorní hematologie II. Bílá krevní řada. Krevní destička*. Praha: Galén, 1996. ISBN 80-85824-43-4.
- Pecka, M., Malý, J. *Laboratorní hematologie*. Hradec Králové: HK Credit 55, 2006. ISBN 80-86780-29-5.
- Pecka, M., Malý, J., Dejmková, J. *Přehled laboratorní hematologie III.: Hemostáza Imunohemologie*. Český těšín: Galén, 1998. ISBN 80-85824-89-2.
- Penka, M., Buliková, A., et al. *Neonkologická hematologie. 2., doplněné a zcela přepracované vydání*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009.
- Penka, M., Buliková, A., Matýšková, M., Zavřelová, J. *Diseminovaná intravaskulární koagulace(DIC)*. Praha: Grada Publishing, a.s., s. 77, 2003. ISBN 80-247-0341-6.
- Penka, M., Krahulcová, E., Matýšková, M. *Hematologie*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1994. ISBN 80-7013-162-4.
- Penka, M., Tesařová, E. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011.
- Poller, L. *International Normalized Ratios (INR): the first 20 years*. J Thromb Haemost 2: 849-860, 2004.
- Racek, J. *Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd.* Praha: Galén, 2006. ISBN 80-726-2324-9.
- Raijmakers, M.T., Menting, C.H., Vader, H.L., van der Graaf, F. *Collection of blood specimens by venipuncture for plasma-based coagulation assays: necessity of a discard tube*. Am J Clin Pathol 133: 331-5, 2010.
- Rao, L.V., Okorodudu, A.O., Petersen, J.R., Elghetany, M.T. *Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions*. Clin Chim Acta 300: 13-21, 2000.
- Sakalová, A., Bátorová, A., Mistrík, M., Hrubíško, M. et al. *Klinická hematol'ogia*. Martin: Osveta, 2010.
- Senzolo, M., Burra, P., Cholongitas, E., Burroughs, A.K. *New insights into the*

- coagulopathy of liver disease and liver transplantation*. World J Gastroenterol 12(48): 7725-36, 2006.
- Skalická, H. et al. *Předoperační vyšetření. Návod pro praxi*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007. ISBN 978-80-247-1079-2.
- Smith, S.A., Comp, P.C., Morrissey, J.H. *Phospholipid composition controls thromboplastin sensitivity to individual clotting factors*. J Thromb Haemost 4: 820-7, 2006.
- Sobieraj, T.M., Daniel ,D., Farrelly, B., et.al. *Accuracy and clinical usefulness of the CoaguChek S and XS Point of Care devices when starting warfarin in a hospital outreach setting*. Thromb Res 123(6): 909-13, 2009.
- SOP KOA 1*. České Budějovice: Oddělení klinické hematologie, Nemocnice České Budějovice, a.s., 2007.
- SOP KOA 5*. České Budějovice: Oddělení klinické hematologie, Nemocnice České Budějovice, a.s., 2007.
- SOP P 2*. České Budějovice: Oddělení klinické hematologie, Nemocnice České Budějovice, a.s., 2006.
- Starý, J. et al. *Dětská hematologie*. Praha: Galén, s. 204, 2005. ISBN 80-7262-327-3.
- Testa, S., Morstabilini, G., Fattorini, A., Galli, L., Denti, N., D'Angelo, A. *Discrepant sensitivity of thromboplastin reagents to clotting factor levels explored by the prothrombin time in patients on stable oral anticoagulant treatment: impact on the international normalized ratio system*. Haematologica 87: 1265-73, 2002.
- Siemens. *Thromborel S*. Germany, 2010.
- van Geest-Daalderop, JH., Mulder, AB., Boonman-de Winter, LJ., Hoekstra, MM., van den Besselaar, AM. *Preanalytical variables and off-site blood collection: influences on the results of the prothrombin time/international normalized ratio test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy*. Clin Chem 51: 561-8, 2005.

- Vaňásek, J., Brabec, V., Čermák, J. et al. *Hematologie a transfuziologie II. díl*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1992. ISBN 80-7013-133-0.
- Vehar, G.A., Keyt, B., Eaton, D. et al. *Structure of human factor VIII*. Nature 312, 337-42, 1984.
- Vojáček, J., Malý, M. et al. *Arteriální a žilní tromboza v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing a.s, s. 191, 2004.
- Waxman, E., Ross, J.B.A., Laue, T.M. et al. *Tissue factor and its extracellular soluble domain: the relationship between intermolecular association with factor VIIa and enzymatic activity of complex*. Biochemistry 31: 3998-4003, 1992.
- Ward-Cook, K., M., Lehmann, C., A., Schoeff, L.E., Williams, R., H. *Clinical Diagnostic Technology. The Total Testing Process. Volume 1: The Preanalytical Phase*. Washington, DC: AACCC Press, 2003. ISBN 1-890883-89-1.

8. Klíčová slova

Hemostáza

Mezinárodní normalizovaný poměr - INR

Protrombinový čas - PT

Rekombinantní tromboplastin

Tkáňový tromboplastin

Key Words

Hemostasis

International normalized ratio

Prothrombin time

Recombinant thromboplastin

Tissue thromboplastin

9. Přílohy

Příloha 1

Tabulka 8: naměřené hodnoty (na další stránce)

	NEOPLASTINE CI					NEOPLASTINE R					PT QUICK					THROMBOREL S					RECOMBIPLASTIN 2G				
	0h	12h	24h	48h	72h	0h	12h	24h	48h	72h	0h	12h	24h	48h	72h	0h	12h	24h	48h	72h	0h	12h	24h	48h	72h
1	14,20	14,20	14,50	15,20	15,90	13,70	14,00	14,30	15,30	16,40	15,40	15,80	16,20	17,20	18,00	14,20	13,80	14,00	14,90	15,90	11,90	12,50	12,70	12,90	12,90
2	14,20	14,30	14,40	15,60	16,10	13,90	13,80	14,10	15,30	16,30	15,60	16,20	16,60	17,70	18,80	14,40	14,00	14,00	15,00	16,00	12,10	12,40	12,40	12,90	13,20
3	13,90	13,90	14,00	14,90	15,70	13,60	13,50	13,40	14,40	15,30	15,80	15,80	15,90	16,50	18,00	14,10	13,60	13,40	14,20	15,10	11,60	11,30	11,60	12,40	13,00
4	14,10	14,30	14,70	15,40	16,20	14,60	14,70	15,00	16,00	17,10	15,80	16,20	16,90	17,90	18,70	15,00	14,80	14,90	16,10	16,40	12,20	12,50	12,80	13,50	13,50
5	13,10	13,00	13,20	13,90	14,30	12,70	12,70	12,70	13,40	14,40	14,20	14,60	14,60	15,20	16,00	13,00	12,70	12,70	13,40	13,90	10,90	10,90	11,10	11,70	11,50
6	13,60	13,50	13,80	14,50	15,00	13,40	13,30	13,30	14,40	15,00	14,70	15,10	15,50	16,30	17,60	13,60	13,30	13,20	14,10	14,70	11,30	11,50	11,60	12,40	12,30
7	13,80	13,80	14,10	14,50	14,90	13,20	13,30	13,10	13,80	14,40	15,20	15,70	15,70	16,40	17,70	13,80	13,40	13,20	14,10	14,40	11,70	11,80	11,90	12,30	12,80
8	13,40	13,50	13,40	13,70	14,30	13,30	13,20	13,20	13,90	14,70	17,00	17,70	17,30	18,20	19,40	13,60	13,50	13,40	14,10	14,90	11,00	11,10	11,10	11,50	11,50
9	13,70	14,00	14,20	14,60	15,00	13,00	13,00	13,00	13,90	14,50	14,90	15,60	15,80	16,30	17,00	13,40	13,20	13,20	14,20	14,30	11,50	11,50	11,80	12,00	12,20
10	14,60	14,60	14,60	15,20	15,80	14,60	14,40	14,60	15,50	16,40	16,70	17,20	17,70	18,50	19,40	14,90	14,90	15,10	15,90	16,40	12,50	12,70	12,80	13,40	13,60
11	12,90	13,20	14,00	14,90	15,50	12,30	12,40	13,00	14,60	15,60	14,50	15,20	15,80	16,90	18,30	12,80	12,70	12,90	14,20	14,80	10,80	11,00	11,40	12,20	12,60
12	13,60	13,90	14,10	15,00	15,70	13,30	13,50	13,50	14,70	15,60	15,40	16,00	16,30	17,60	18,20	13,70	12,30	13,50	14,50	15,50	12,10	12,30	12,30	13,00	13,20
13	12,90	13,10	13,30	13,80	14,70	12,30	12,00	12,20	12,90	13,70	13,90	14,10	14,20	15,00	15,60	13,00	12,60	12,70	13,60	14,40	10,80	10,80	11,10	11,60	11,50
14	13,90	14,00	14,00	14,90	15,50	13,60	13,40	13,50	14,40	15,70	15,50	15,40	16,00	17,10	18,30	14,30	13,70	13,50	14,40	15,50	12,10	12,10	12,30	13,00	13,30
15	13,80	13,90	14,20	14,70	15,20	13,70	13,60	14,00	14,60	15,20	15,30	16,00	16,50	16,90	17,50	13,80	13,70	13,70	14,40	15,20	11,80	11,90	11,90	12,30	12,40
16	14,00	14,10	14,50	15,80	16,70	13,80	13,90	14,20	16,00	17,10	15,40	16,40	16,70	18,00	20,10	14,00	13,60	13,80	15,40	16,30	11,40	11,80	12,40	13,10	13,60
17	13,70	13,80	14,10	14,70	15,40	13,50	13,60	13,80	14,80	15,90	14,90	15,30	15,60	16,20	17,50	13,70	13,60	13,70	14,70	15,20	11,70	12,00	12,20	13,00	13,00
18	13,40	13,40	13,40	14,50	15,20	13,30	13,00	13,20	14,30	15,20	14,90	15,20	15,50	16,20	17,80	13,30	13,00	12,90	13,80	14,50	11,80	11,90	11,90	12,60	12,70
19	14,10	14,20	14,60	15,70	16,60	13,80	13,80	14,10	15,40	16,90	16,60	17,00	17,40	18,20	20,00	14,40	14,00	13,90	14,90	15,90	12,20	12,50	12,80	13,40	13,90
20	14,80	14,70	15,00	15,60	16,20	15,00	14,40	14,60	15,50	15,80	17,30	17,70	17,60	18,70	19,20	14,50	13,90	13,30	14,50	14,40	13,50	13,50	13,20	13,60	14,00

Příloha 2



Obr. 9: Odstředivka JOUAN B4i

Zdroj: vlastní foto



Obr. 10: Vakuety Becton Dickinson Vacutainer

Zdroj: vlastní foto

Příloha 3

Tabulka 9: Průměrné rozdíly vychýlení (%) Neoplastine CI Plus a směrodatná odchylka v jednotlivých časech

Neoplastine CI Plus	12 hod	24 hod	48 hod	72 hod
průměr	0,60	2,30	7,80	12,40
sm. odchylka	0,90	2,00	3,10	3,70

Tabulka 10: Průměrné rozdíly vychýlení (%) Neoplastine R a směrodatná odchylka v jednotlivých časech

Neoplastine R	12 hod	24 hod	48 hod	72 hod
průměr	0,40	0,80	8,30	15,10
sm. odchylka	1,50	2,10	3,90	5,30

Tabulka 11: Průměrné rozdíly vychýlení (%) PT Quick a směrodatná odchylka v jednotlivých časech

PT Quick	12 hod	24 hod	48 hod	72 hod
průměr	3,00	4,80	10,40	17,50
sm. odchylka	1,60	2,30	3,20	4,70

Tabulka 12: Průměrné rozdíly vychýlení (%) Thromborel S a směrodatná odchylka v jednotlivých časech

Thromborel S	12 hod	24 hod	48 hod	72 hod
průměr	2,60	2,30	4,70	9,50
sm. odchylka	2,20	2,30	2,90	3,70

Tabulka 13: Průměrné rozdíly vychýlení (%) Recombiplastin 2G a směrodatná odchylka v jednotlivých časech

Recombiplastin 2G	12 hod	24 hod	48 hod	72 hod
průměr	1,30	2,80	7,70	9,30
sm. odchylka	1,40	2,40	3,30	4,10