

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Vyšetření D-dimeru u pacientů z okresu
Jindřichův Hradec**

Bakalářská práce

Autor práce: Veronika Procházková

Studijní program: B5345 - Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: doc. RNDr. Miroslav Šíp, DrSc.

Datum odevzdání práce: 14.8.2013

Abstrakt

Vyšetření hladiny (koncentrace) d-dimeru v plazmě slouží k zachycení několika patologických stavů. Mezi nejčastější patří venózní trombóza a plicní embolie. Jenom trombóza je diagnostikovaná u 71 pacientů ze 100 000 obyvatel ročně, u plicní embolie je to na stejný počet obyvatel 69 osob. Díky zjištění hladiny d-dimeru můžeme i určit riziko trombofilie, tedy náchylnosti ke vzniku trombóz. Trombózy jsou třetím nejčastějším patologickým stavem po infarktu myokardu a mozkové mrtvici. Dalším diagnostikovatelným stavem jsou nepochybně diseminovaná intravaskulární koagulace, malignita, akutní koronární syndromy, zánětlivá onemocnění. Zvýšenou hladinu nacházíme i v období těhotenství.

Mými cíly bylo:

1. Osvojení si metody pro vyšetření d-dimeru, kterou používají v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. na oddělení Hematologie a krevní transfúze, během 1 měsíce.
2. Zpracování alespoň 30 vzorků.

D-dimer patří mezi štěpné produkty fibrinu. Vzniká při fibrinolýze, které předchází sled reakcí koagulační kaskády. Jeho přítomnost v krvi tedy svědčí o určité fibrinolytické aktivitě v cévním systému. Jeho hladina se zvyšuje i po traumatech nebo operacích. Zvýšenou koagulací a následně vyvolanou fibrinolýzou mohou trpět lidé, kteří užívají hormonální léčbu.

V teoretické části mé bakalářské práce jsem se zabývala tím, co je d-dimer, kdy vzniká. Zmínila jsem i koagulační kaskádu, která předchází samotné fibrinolýze. Zaměřila jsem se na hlavní trombotické stavy, při kterých je hladina d-dimeru zvýšená, z jakých příčin tyto stavy vznikají, jakým způsobem se dají diagnostikovat. Zabývala jsem se tím, která onemocnění mohou kvůli trombotickým stavům a trombofilii

vzniknout, jaké jsou symptomy. V této části se nachází i druhy léčby trombotických stavů, materiál a podmínky práce se s ním, druhy hematologických vyšetření, možnosti stanovení d-dimeru a příprava protilátek.

V praktické části je popsán příjem materiálu, jeho příprava k analýze, analýza, popis přístroje, potřebné reagentie, princip práce. Pracovala jsem na oddělení Hematologie a krevní transfúze v nemocnici v Jindřichově Hradci. Bylo mi umožněno vyšetřit 100 vzorků, ve většině od pacientů z ambulantních oddělení nemocnice. Pracovala jsem na automatickém koagulometru ACL Elite Pro a vyšetřila jsem hladinu d-dimeru. Ke stanovení d-dimeru v Jindřichově Hradci v rutinní praxi používají latex-aglutinační metodu. D-dimer obsažený v plazmě vytváří komplex s monoklonální protilátkou, která je navázaná na latexové částici. Samotný princip měření je imunoturbidimetrie, při 405 nm. Světelný paprsek se absorbuje na vzniklých imunokomplexech a měří se úbytek intenzity světla, které prošlo přes reakční kyvetu s analyzovaným vzorkem.

Naměřené hodnoty d-dimeru jsem zpracovala do tabulek a grafů pomocí počítačového programu do samostatné části bakalářské práce. Výsledky jsem si rozdělila podle pohlaví, cut-off hodnoty d-dimeru užívané v Jindřichohradecké nemocnici, podle rizikového věku 45 let. Vytvořila jsem grafy a tabulky, podle kterých jsem hodnotila výzkum.

Zvýšenou hladinu d-dimeru se mi podařilo prokázat u 56 pacientů, přičemž podíl mužů a žen byl stejný. Závislost zvýšené koncentrace na zvyšujícím se věku jsem nezpozorovala. Nepotvrzení dvou hypotéz může být zapříčiněno tím, že jsem vyšetřovala vzorky od malé skupiny pacientů, kteří měli diagnostikovaný nějaký patologický stav. Zvýšená koncentrace d-dimeru je nejčastěji způsobena životním stylem, dědičností. Při práci v laboratoři jsem si osvojila latex-aglutinační stanovení d-dimeru v plazmě.

Abstract

Investigation of level (concentration) of d-dimer in the plasma is used to capture several pathological conditions. The most common is venous thrombosis and pulmonary embolism. Just thrombosis is diagnosed in 71 patients out of 100 000 inhabitants per year, pulmonary embolism in the same population in 69 inhabitants. Thanks to determine levels of d-dimer we can also determine the risk thrombophilia, a tendency to thrombosis. Thrombosis is the third most common pathological condition after myocardial infarction and stroke. Another states we can diagnose are undoubtedly disseminated intravascular coagulation, tumors, acute coronary syndromes, inflammatory disease. Increased level of d-dimer is found in pregnancy.

My main objectives were to:

1. Acquisition of method for the examination of d-dimer, which is used in the Hospital Jindřichův Hradec, a.s. the Department of Haematology and Blood Transfusion, during one month.
2. Processing of at least 30 samples.

D-dimer is one of the fission products of fibrin. It occurs in fibrinolysis, which was preceded by a sequence of reactions coagulation cascade. Its presence in the blood shows a fibrinolytic activity in the vascular system. Its level is increased after trauma or surgery. People taking hormonal therapy may suffer from increased coagulation and subsequently induced fibrinolysis.

I deal in the theoretical part of my thesis what is d-dimer, when arises. I mentioned also the coagulation cascade, which precedes the fibrinolysis. I focused on the main thrombotic condition in which the levels of d-dimer increased, from what causes these conditions arise, how they can be diagnosed. I was considering which diseases can develop because of thrombotic states and thrombophilia, what

the symptoms are. In this section there is also the types of thrombotic conditions treatment, material, conditions of work with it, the types of hematological examination, the possibility of establishing d-dimer and preparation of antibodies.

The practical part describes the reception of material, its preparation for analysis, analysis, description of the apparatus, required reagents, the principle of work. I worked in the Department of Haematology and Blood Transfusion in the Hospital in Jindřichův Hradec. It was allowed to me to examine 100 patient samples, in most of the outpatient department of the hospital. I worked on the automatic coagulation analyzer ACL Elite Pro and I examined the levels of d-dimer. The latex-enhanced method is used to determine the d-dimer in routine practice in Jindřichův Hradec. D-dimer contained in the plasma forms a complex with the monoclonal antibody, which is bound to the latex particle. The principle of measurement is immunoturbidimetry, at 405 nm. The light beam is absorbed on the immune complexes and decrease of the transmitted light intensity, which passed through the reaction cell with a sample to be analyzed, is measured.

I processed the measured values of d-dimer in tables and graphs using a computer program to separate part of the thesis. I divided the results according to gender, cut-off value of d-dimer used in hospital in Jindřichův Hradec, according to risk age of 45. I created graphs and tables and I evaluated the research.

Increased level of d-dimer was showed in 56 patients, while the proportion of men and women was the same. I did not notice dependence on increased concentration with increasing age. Unconfirmed of two hypotheses may be due to the fact that I investigated samples from a small group of patients who were diagnosed with a pathological condition. Increased concentrations of d-dimer are most often caused by lifestyle and heredity. By working in the laboratory I have developed latex-agglutination d-dimer determination in plasma.

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 bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 výsledky 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 dne 14.8.2013

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Poděkování patří mému vedoucímu bakalářské práce, panu doc. RNDr. Miroslavu Šípovi, DrSc. a zároveň mojí konzultantce paní Stieblerové a celému oddělení Hematologie a krevní transfúze, Nemocnice J.Hradec, a.s., kteří mi pomáhali zejména s praktickou částí mé bakalářské práce a umožnili mi přístup do laboratoře.

Obsah

1. Současný stav	14
1.1 D-dimer a fibrin/fibrinogen degradační produkty	14
1.1.1 D-dimer	14
1.1.2 Fibrin/fibrinogen degradační produkty	14
1.2 Zástava krvácení	15
1.2.1 Cévní stěna a trombocyty	15
1.2.2 Plazmatický koagulační systém	15
1.3 Fibrinolýza	17
1.3.1. Inhibitory fibrinolýzy	17
1.3.2 Fibrinolytika	18
1.4 Trombotické stavy	19
1.4.1 Trombóza a trombofilie	19
1.4.2 Tromboflebitida	19
1.4.3 Flebotrombóza	19
1.4.4 Vznik trombotického stavu	19
1.4.4.1 Vrozené příčiny vzniku trombotických stavů	20
1.4.4.2 Získané příčiny vzniku trombotických stavů	21
1.4.4.2.1 DIC (disseminated intravascular coagulation)	21
1.4.4.3 Rizikové faktory	22
1.4.5 Diagnostika trombotických stavů	24
1.5 Onemocnění vyvinutá z trombotických stavů	25
1.5.1 Embolie	25
1.5.2 Ischemické choroby	25
1.5.2.1 Končetinová ischemie	25

1.5.2.2 Ischemická choroba srdeční (IČHS)	25
1.5.3 Mrtvice.....	26
1.6 Časté symptomy trombofilních stavů a souvisejících onemocnění.....	27
1.6.1 Dyspnoe (dušnost)	27
1.6.2 Bolest na hrudi	27
1.6.3 Mdloba (synkopa).....	27
1.7 Léčba trombotických stavů.....	28
1.7.1 Antitrombotická léčba.....	28
1.7.2 Antikoagulační léčba	28
1.7.3 Antikoagulační léčba perorálními preparáty	28
1.7.4 Trombolytická léčba	29
1.8 Odebíraný biologický materiál	30
1.8.1 Zacházení se vzorkem.....	30
1.9 Preanalytická část	31
1.9.1 Odběr venózní krve	31
1.9.2 Odběrové zkumavky	32
1.9.3. Antikoagulační činidla	33
1.9.4 Množství odebraného vzorku	33
1.9.5 Vlivy působící na analyty v biologických vzorcích.....	33
1.9.6 Úprava vzorků - centrifugace	34
1.10 Vyšetření v hematologii.....	35
1.10.1 Vyšetření z nesrážlivé a ze srážlivé krve	35
1.10.2 Kategorie vyšetřovacích testů	35
1.11 Stanovení d-dimeru	36
1.11.1 Latex-aglutinační metody.....	36
1.11.2 Imunonefelometrie a imuniturbidimetrie	36

1.11.3 D-dimer latex-aglutinační test	36
1.11.4 Vývoj testování d-dimeru.....	37
1.12 Příprava protilátek.....	38
2. Cíle a hypotézy.....	39
3. Metodika	40
3.1. Preanalytická část	40
3.1.1 Příjem biologického materiálu	40
3.1.2 Žádanka.....	42
3.1.3 Zadávání do LISu (laboratorní informační systém).....	42
3.1.4 Důvod odmítnutí biologického materiálu	43
3.1.5 Příprava vzorků k analýze - centrifugace.....	44
3.2 Analytická část	45
3.2.1 Analyzátor ACL Elite Pro.....	45
3.2.1.1 Popis přístroje.....	46
3.2.1.2 Kalibrace	47
3.2.1.3 Kontrola kvality	47
3.2.2 Stanovení hladiny d-dimeru	47
3.2.2.1 Princip testu	47
3.2.2.2 Potřebné reagensie.....	47
3.2.2.2.1 Příprava reagensií.....	48
3.2.2.3 Pracovní postup	49
3.3 Postanalytická fáze.....	51
4. Výsledky.....	52
4.1. Poměr fyziologických a patologických hodnot.....	52
4.2 Věkové zastoupení vyšetřovaných pacientů	53

4.3 Závislost koncentrace d-dimeru na věku	53
4.4 Průměrná koncentrace d-dimeru celkově	54
4.5. Průměrná koncentrace d-dimeru věkových kategorií	55
5. Diskuze	56
6. Závěr	60
7. Použitá literatura.....	62
8. Klíčová slova	67
9. Přílohy	68

Úvod

Díky zjištění hladiny d-dimeru v lidské plazmě můžeme u pacienta pozorovat některé patologické stavy a na základě toho můžeme rozhodnout o určité profylaxi. Nejčastějším patologickým stavem je patrně venózní trombóza. Ta je celkově třetím nejčastějším patologickým stavem po infarktu myokardu a mozkové mrtvici. Vznik trombotického stavu zapříčiňuje trombofilie, ať už vrozená nebo dědičná. Jde o poruchu hemostatického mechanismu a je příčinou zvýšené tendence k trombózám. Riziko trombofilie zvyšuje žilní trombóza před 45. rokem života, opakované žilní trombózy, tepenné trombózy před 35. rokem, rodinná anamnéza tromboembolických příhod, opakovaně předčasně ukončené těhotenství. (Penka et al, 2001)

Kromě žilní trombózy lze pomocí kvantitativních d-dimer testů diagnostikovat plicní embolii, diseminovanou intravaskulární koagulaci, malignitu, predikovat akutní koronární syndromy po prvním případě a dokonce lze hladinou d-dimeru korelovat s určitým stupněm aterosklerózy. (Korte, Riesen, 2000)

D-dimer je štěpný produkt fibrinu, tzn. že nález zvýšené koncentrace v citrátové plazmě značí zvýšenou fibrinolýzu. Obecně je jeho cut-off hodnota stanovena na 500 ng/ml. (Korte, Riesen, 2000)

D-dimer testy vytěsňují dříve používaná vyšetření pro diagnostiku některých patologických stavů, např. diagnostika plicní embolie dříve hojně používanou počítačovou tomografií. (Gupta et al., 2009) Došlo ale i k samotnému vývoji ve vyšetřování hladiny d-dimeru. Dříve se hojně využívalo vyšetření pomocí ELISA testů, které poskytovaly pouze kvalitativní výsledek a zároveň byl test zdlouhavý, a proto se nemohl dobře využívat pro ambulantní účely. (Heim et al, 2004)

Dnes zřejmě nejpoužívanější metodou je latex-aglutinační stanovení koncentrace d-dimeru v plazmě. Jedná se o kvalitativní stanovení s vysokou citlivostí, ale malou specifičností, jehož konečného výsledku lze dosáhnout do 15 minut. (*Brown et al., 2003*)

1. Současný stav

1.1 D-dimer a fibrin/fibrinogen degradační produkty

1.1.1 D-dimer

D-dimer je látka bílkovinné povahy obsažená v krevní plazmě, která se vyšetřuje nejčastěji při podezření na trombotické procesy. Jeho přítomnost svědčí o aktivaci krevního srážení a následné fibrinolýze. D-dimer je štěpný produkt fibrinu. Jeho hladina bývá zvýšená i po traumatech či operacích. Vyšetření se uplatňuje při diagnostice hluboké žilní trombózy, plicní embolie či DIC. Právě pro diagnózu DIC se často používá metoda, která sleduje dynamiku změn v hladině d-dimeru. Pro zaznamenání změny dynamiky se nejčastěji používá ELISA nebo LIA. Pro stanovení d-dimeru se však nejčastěji používá latex-aglutinační metoda pomocí speciální reakce antigen - protilátka, která se měří turbidimetrií (*Vokurka et al, 2007; Penka et al, 2001; Sedláček, 2006*). Latex-aglutinační metoda spadá mezi ambulantní vyšetření. Koncentrace d-dimeru se pohybují v ng/ml, přičemž za cut-off hodnotu d-dimeru je obecně považována koncentrace 500 ng/ml (*Lowe, 2006; Korte and Riesen, 2000*).

1.1.2 Fibrin/fibrinogen degradační produkty

Jde o bílkoviny, které vznikají štěpením fibrinu pomocí plazminu na fibrin/fibrinogen degradační produkty (FDP). D-dimer je jedním z fibrin/fibrinogen degradačních produktů. K jejich průkazu se používá také nejčastěji latex-aglutinační metoda. Jde o rychlou, reprodukovatelnou metodu. Kromě této se používá i kvantitativní EIA (*Penka et al, 2003*).

Dnes se využívá hlavně stanovení d-dimeru. Stanovení d-dimeru a FDP se využívá jen v případě, pokud je třeba diagnostikovat primární hyperfibrinolýzu. D-dimer testy jsou o řád citlivější než stanovení FDP (*Penka et al, 2003; Kubisz, 2006*).

1.2 Zástava krvácení

Rozlišují se pojmy primární hemostáza, kdy se zástavy krvácení účastní cévní stěna a trombocyty, a pojem hemokoagulace, kdy se účastní koagulační faktory (*Kubisz et al, 2006*).

1.2.1 Cévní stěna a trombocyty

Při poranění cévy dochází k vazokonstrikci, uvolní se tkáňový faktor (TF), který aktivuje trombocyty a hemokoagulaci. Při obnažení kolagenu v endotelu cévy dochází k adhezi trombocytů ke kolagenovým vláknům (vliv von Willebrandova faktoru). Následně dochází k agregaci dalších trombocytů. Agregaci umožňuje fibrinogen, přičemž je vazba reverzibilní. Vzniká primární zátka. Látky uvolňované z granul trombocytů pomáhají vazby stabilizovat a vzniká sekundární zátka. Konečným výsledkem je destičkový trombus (*Kubisz et al, 2006*).

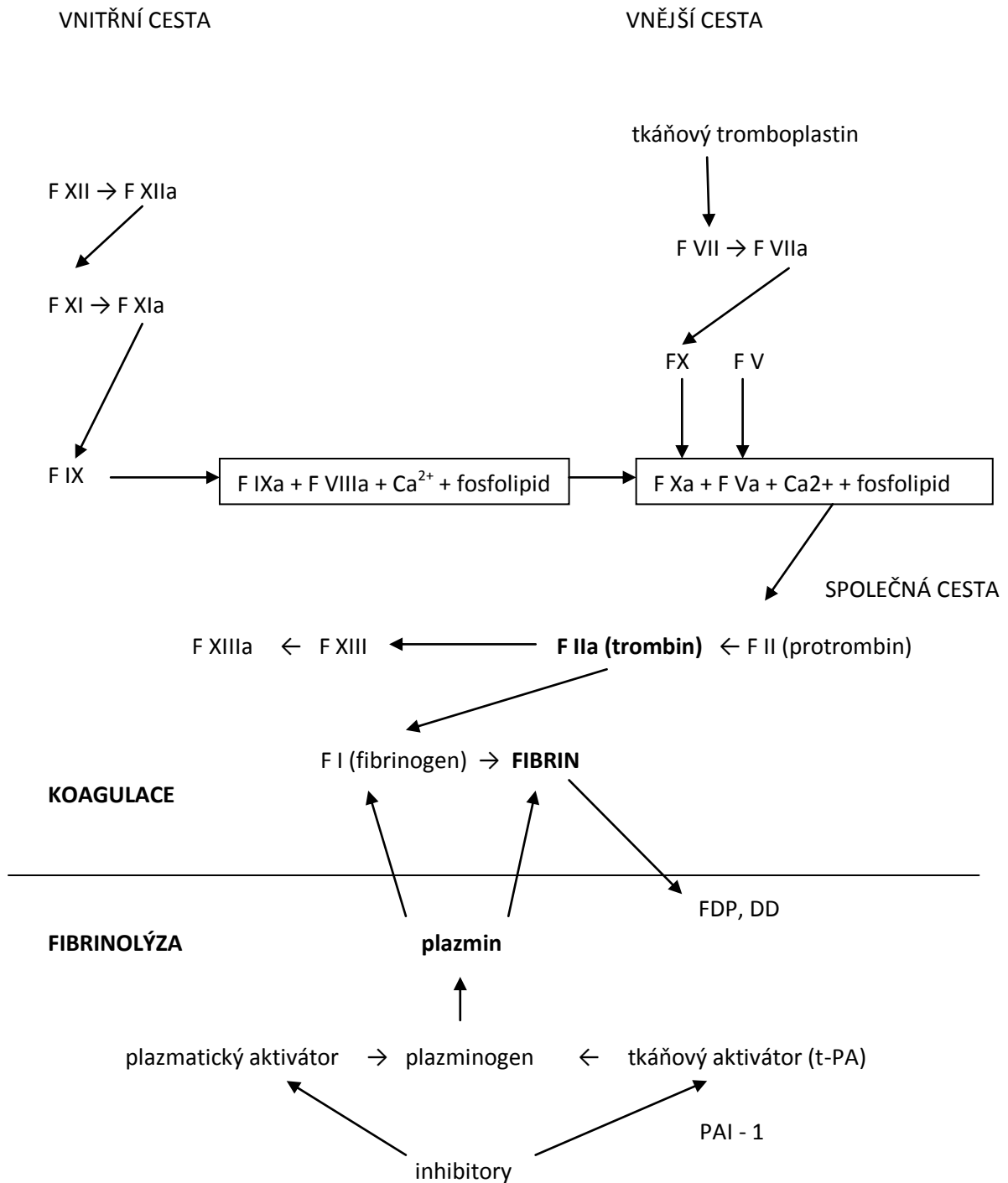
1.2.2 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém je tvořen koagulačními faktory. Tyto faktory mají charakter polypeptidů a glykoproteinů. Cílem je přeměna fibrinogenu na fibrin, který stabilizuje destičkový trombus a konečným produktem je definitivní trombus. Do tohoto procesu se zapojují i červené krvinky. Konečného stavu je docíleno kaskádou reakcí koagulačních faktorů (*Kubisz et al, 2006*).

Můžeme rozlišit vnější a vnitřní cestu aktivace koagulační kaskády, které se spojují ve společnou cestu. Vnější cesta začíná vyplavením tkáňového faktoru (TF) z monocytů a endotelových buněk. Tkáňový faktor váže FVII v plazmě, tím se změní konformace FVII a dojde k jeho aktivaci. Tento komplex aktivuje FX a FIX. FIXa pak také aktivuje FX. FXa následně umožňuje přeměnu protrombinu na trombin, který je ale hemostaticky nedostatečně aktivní. Trombin dále aktivuje FV, FVIII, FXI. Tyto aktivované formy (vznikající i působením TF/FVIIa a FXIa) se vážou na povrch trombocytů. Vzniká komplex FVIIIa/FIXa aktivující FX. FXa pak s FVa vytváří na povrchu trombocytů komplex (protrombináza), který štěpí protrombin na trombin. Tímto způsobem se vytváří mnohem větší množství hemostaticky účinného trombinu. Trombin (proteáza) následně štěpí fibrinogen na fibrinopeptidy a fibrinový monomer.

Monomery se spojují a vytvářejí polymer pomocí nekovalentních vazeb. Polymer se postupně stabilizuje a vzniká definitivní trombus (Kubisz *et al*, 2006).

Obr. 1 Koagulační kaskáda (Zdroj: vlastní schéma)

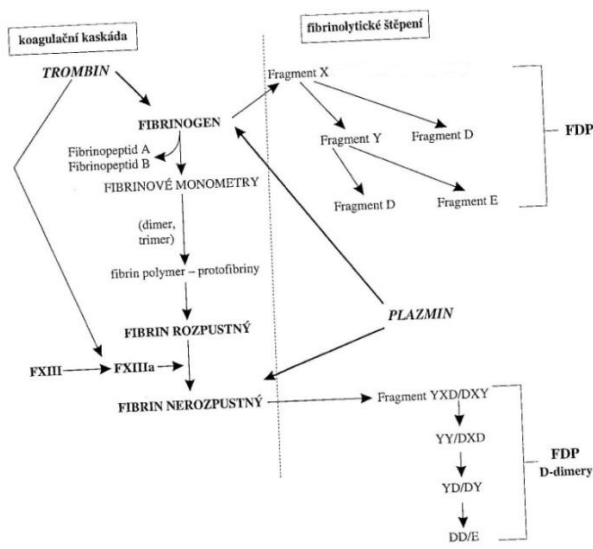


1.3 Fibrinolýza

Fibrinolýza je přirozený proces organismu pro rozpouštění vzniklého fibrinového trombu. Jde o systém koordinovaných interakcí aktivátorů a inhibitorů. Můžeme rozlišit dva typy aktivátorů, a sice tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) a urokinázu (u-PA). Jde o proteázy, které aktivují přeměnu plazminogenu na aktivní plazmin. Aktivní plazmin je enzym, který umožňuje rozštěpení fibrinogenu na degradační produkty. Jsou to kratší peptidy, označované jako peptidy X, Y, D, a E. Pokud se štěpí stabilizovaný polymerizovaný fibrin vznikají specifické štěpné produkty - tzv. d-dimery. Jsou to dva peptidy D spojené kovalentní vazbou (Kubisz *et al*, 2006; Čertík, 2003).

1.3.1. Inhibitory fibrinolýzy

Mezi nejhlavnější inhibitory se řadí serinová proteáza PAI-1. Produkuje ho endotel, trombocyty a játra. Tento inhibitor inaktivuje t-PA. Vytváří s ním komplex t-PA/PAI-1. Z tohoto komplexu se již nemůže uvolnit aktivní forma PAI-1, tzn. nedochází k inaktivaci tkáňového aktivátoru plazminogenu. Dalším z hlavních inhibitorů plazminu je je α 2-antiplazmin, který je produkován trombocyty (Čertík, 2003).



Obr. 2 Schéma koagulační kaskády a fibrinolytického štěpení

(Zdroj: Penka *et al*, 2001)

1.3.2 Fibrinolytika

Fibrinolýza se může aktivovat podáním léků (tzv. fibrinolytik). Tyto léky aktivují právě plazminogen a tím se celý proces spouští a posiluje. Tyto léky lze užívat u trombóz a embolií, při kterých je zvýšená srážlivost krve. Aktivace fibrinolýzy se využívá například v případě akutního infarktu myokardu, kde je nutné v co nejkratším čase rozpustit krevní sraženinu, která vedla k ucpání některé koronární tepny. Tím se obnoví průtok (*Vokurka et al, 2007*).

1.4 Trombotické stavy

V souvislosti s trombotickými stavy se v literatuře uvádí několik pojmů, které se významově odlišují.

1.4.1 Trombóza a trombofilie

Pokud někdo trpí trombofilií, znamená to, že má větší sklon k žilním a arteriálním trombózám. Trombóza znamená intravitální intravaskulární srážení krve. Vzniká tzv. trombus, který se může usadit na stěně tepny, žíly nebo v kapiláře. Jde o poruchu dvojité kaskády krevního srážení (*Penka et al, 2001; Fakan, 2005*).

1.4.2 Tromboflebitida

Tromboflebitida je méně závažný stav než flebotrombóza. Jde o postižení povrchových žil, kde nehrozí embolizace do plic. Nebezpečné mohou být ty, které jsou umístěny blízko vstupu do hlubokého žilního systému. V tom případě se nasazuje antikoagulační léčba (*Vojáček et al, 2004*).

1.4.3 Flebotrombóza

Při flebotrombóze dochází k akutnímu zúžení nebo ucpání hlubokých žil. Nejčastěji se toto postižení týká dolních končetin. Může ale postihovat i horní končetiny a ojedinele hrud' (*Vojáček et al, 2004*).

1.4.4 Vznik trombotického stavu

Při vzniku trombózy má klíčovou roli cévní stěna. Ta je za fyziologických podmínek na vnitřní straně pokryta antitrombotickou vrstvou. Povrch výstelkových buněk a povrch krevních elementů je elektronegativní, tzn. že se navzájem odpuzují. Pokud dojde k poškození, změní se náboj a dojde k opsonizaci endotelií a začnou nasedat trombocyty. Nesednutí trombocytů se může objevit i na zdánlivě nepoškozené cévě, dál od místa poškození. Za poškozením dochází k turbulenci krve a tím dochází k dalšímu mechanickému poškození (*Čertík, 2003*).

1.4.4.1 Vrozené příčiny vzniku trombotických stavů

Na vznik trombózy má většinou vliv několik faktorů najednou. Mezi vrozené příčiny vzniku trombózy patří defekt antitrombinu III, proteinu C, proteinu S, Leidenská mutace faktoru V, mutace protrombinu 20210A, defekty přirozených inhibitorů koagulace, defekty fibrinolýzy, trombocytů, hyperhomocysteinémie, geneticky podmíněné zvýšené množství koagulačních faktorů (*Tripodi and Mannucci, 2001; Kubisz, 2006*).

Antitrombin III

Je to nejsilnější přirozený inhibitor koagulační kaskády. Vrozený deficit je způsobený mutací na 1. chromozómu, jedná se o autozomálně-recesivní dědičnost. Buď jeho množství v krvi klesá, anebo se syntetizuje dysfunkční AT. Jeho hladina se měří pomocí ELISA, EIA, LIA (*Kubisz et al, 2006*).

Defekt protrombinu 20210G-A

Jde o mutaci, kdy je na 11. chromozómu v pozici 20210 zaměněný guanin za adenin. Mutace neovlivňuje koagulační funkci trombinu, ale snižuje jeho inhibiční funkci. Diagnostikuje se pomocí PCR (*Kubisz et al, 2006*).

Defekt proteinu C (PC)

Protein C je vitamin K-dependentní protein, syntetizuje se v játrech, po aktivaci má antikoagulační aktivitu, v komplexu s PS inaktivuje faktory Va a VIIIa. Může být snížena jeho celková hodnota v krvi nebo je snížena jeho aktivita (*Kubisz et al, 2006*).

Deficit proteinu S (PS)

Jde opět o vitamin K-dependentní protein, působí jako kofaktor PC, syntetizován v játrech. V plazmě je ve volné i navázané formě. Koagulaci reguluje pouze volný PS, který pak tvoří komplex s aktivovaným PC. Hodnota celkového i volného PS může být snížena, nebo může být hodnota volného PS v normě, ale je snížena jeho funkce, anebo je hladina celkového v normě a volného PS je snížena (*Kubisz et al, 2006*).

Protein C i S se vyšetřuje pomocí ELISA, LIA, EIA, nebo genetického vyšetření, které ale není běžně dostupné (*Kubisz et al, 2006*).

APC rezistence

Při tomto stavu jde o to, že faktor Va je rezistentní vůči působení komplexu PC-PS, který ho za normálních okolností inaktivuje. Tím zůstává Va v cirkulaci a dochází k nadměrné aktivaci koagulace. Příčinou APC rezistence je bodová mutace na pozici 506 pro rychlé štěpení faktoru Va - záměna argininu na glutamin (*Kubisz et al, 2006*).

Hyperhomocysteinémie (HHc)

Je to metabolická porucha, kdy se tvoří dysfunkční enzymy. To vede k poruchám metabolismu metioninu a homocysteinu. Homocystein indukuje expresi tkáňového faktoru na monocitech a makrofázích, což zvyšuje tendenci k trombóze. Také zvyšuje produkci PAI-1 v endotelových buňkách a buňkách hladké svaloviny, tím se snižuje fibrinolytická aktivita a vyvolává se zvýšení syntézy a uvolňování tkáňového faktoru. Stanovuje se imunochemicky, chromatograficky, genetickým vyšetřením (*Kubisz et al, 2006*).

1.4.4.2 Získané příčiny vzniku trombotických stavů

Příčiny získané mohou být antifosfolipidový syndrom, hyperkoagulační porucha trombocytů, poruchy fibrinolýzy, defekty inhibitorů koagulace, poruchy funkce endotelu, DIC, heparinem indukovaná trombocytopenie, získané zvýšené hodnoty koagulačních faktorů (*Kubisz, 2006*).

1.4.4.2.1 DIC (disseminated intravascular coagulation)

Při tomto onemocnění dochází k celkové poruše krevního srážení, doprovází jiné onemocnění, či patologický stav, při kterém dochází k vychýlení hemokoagulační rovnováhy.

Primární patologickým stavem mohou být bakteriální či virové infekce, nádorová onemocnění, traumata (např. popáleniny), jaterní poškození, metabolické poruchy (např. acidóza, alkalóza, diabetes mellitus), hemolytické potransfúzní reakce, gynekologické a porodnické komplikace.

Nastává nerovnováha mezi protrombotickými a antitrombotickými procesy. Trombin se vytváří ve zvýšené míře, tím pádem se zvyšuje i hladina fibrinu. Současně

je snižená hladina přirozených inhibitorů, což vede ke snížení odstraňování fibrinu, tzn. že je poškozená fibrinolýza (*Penka et al, 2003*).

Diagnostika

Pro určení správné diagnózy se přihlíží ke klinickému stavu, laboratornímu vyšetření a je třeba se zaměřit na to, zda pacient trpí nějakou chorobou, která by mohla být s DIC sdružená.

Neexistuje jen jeden test, který by byl tak vysoce specifický i senzitivní pro prokázání DIC. Proto se obvykle provádí série testů a sice PT (protrombinový čas), aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový test), podle možností laboratoře AT-III (antitrombin), stanovuje se počet trombocytů, hladina fibrinogenu a fibrin degradačních produktů (FDP). D-dimer je důležitým markrem pro diagnózu DIC. (*Penka et al, 2003; Sakurada et al, 2005*)

Léčba a prevence

K léčbě se využívá nejčastěji heparin, podávají se inhibitory krevního srážení, popřípadě trombololytika, kumariny, antitrombotické látky, substituční přípravky (faktory krevního srážení, krevní deriváty atd).

Za prevenci můžeme považovat osobní i rodinnou anamnézu, léčbu přidružených onemocnění a laboratorní vyšetření (*Penka et al, 2003*).

1.4.4.3 Rizikové faktory

Rizikové faktory přispívající ke vzniku trombózy jsou hormonální léčba, vyšší věk, obezita, kouření, operace, poranění, imobilizace, nádorová onemocnění, těhotenství, hypertenze, diabetes mellitus, zápalové onemocnění, pozitivní rodinná anamnéza trombózy (*Kubisz, 2006; Penka et al, 2001*).

Antikoncepce

Při užívání kombinované antikoncepce (podávání estrogenů a gestagenů) se může zvyšovat hladina fibrinogenu, protrombinu, F VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII,

klesá hladina inhibitorů koagulace (proteinu S a antitrombinu), faktoru F V. Zvyšuje se hladina inhibitoru koagulace proteinu C. Nastává hyperkoagulace, která je však kompenzována druhotnou aktivací fibrinolýzy. To dokazuje nález zvýšené hladiny štěpných produktů fibrinu a d-dimeru v krvi. Před operací je nutné zvážit, zda tuto léčbu vysadit nebo ne a v jakém intervalu před operací. U urgentních případů se provádí heparinizace (*Skalická et al, 2007; Kvasnička, 2003*).

Hypertenze

Krevní tlak je laterální tlak krevního sloupce na cévní stěnu. Jeho výška je určena náplní krevního řečiště a vlastnostmi cévní stěny. Normální tlak v dospělosti dosahuje hodnot: systolický krevní tlak 110-139 mm Hg (STK) a diastolický tlak 60-89 mm Hg (DTK) (*Sovová, Řehořová, 2004*). Pokud naměříme při nejméně dvou návštěvách lékaře v různý den za klidových podmínek systolický krevní tlak nad 140 mm Hg a/nebo diastolický krevní tlak nad 90 mm Hg, můžeme mluvit o hypertenzi (*Steffen et al, 2010*). Vývoj hypertenze je ovlivněn dědičností, zvýšenou citlivostí na psychickou zátěž, obezitou, výživou atd. (*Strítěský, 2001*).

Těhotenství

V těhotenství je obvyklé, že se zvyšuje tendence k hyperkoagulaci, zvyšuje se koncentrace d-dimerů, proto vzniká falešně pozitivní výsledek pro žilní tromboembolii. Snižuje se protein S, účinek proteinu C klesá. Aktivita protrombinu a hladina fibrinogenu (působením estrogenu) a dalších koagulačních faktorů se zvyšuje. Zvyšuje se koncentrace inhibitorů fibrinolýzy (PAI-1 inhibitor aktivátoru plazminogenu, TAFI - trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy), zpomaluje se tok krve. To vše přispívá k rozvoji hyperkoagulace (*Kvasnička, 2003; Kline et al, 2005*).

Pro zjištění patologické trombofilie u těhotných žen se provádí skupina testů, protože pouhé zjištění hladiny d-dimeru je prakticky neinformativní. Proto se vyšetřuje aktivita antitrombinu, aktivita proteinu C, aktivita volného proteinu S, lupus antikoagulans (protein zvyšující riziko vzniku krevních sraženin), vyšetření na Leidenskou mutaci FV, mutace protrombinu, MTHFR 677TT u žen, které mají v osobní anamnéze opakovaný potrat, intrauterinní úmrtí plodu, preeklampsii nebo se u ní vyskytla žilní trombóza před těhotenstvím. Společně s předchozími testy

se provádí vyšetření fibrinogenu, koncentrace již zmiňovaného d-dimeru a krevní obraz (počet destiček) (Kvasnička, 2003).

1.4.5 Diagnostika trombotických stavů

Při diagnostice se zaměřujeme i na rodinnou anamnézu (vrozené trombofilie, bércové vředy u příbuzných). V osobní anamnéze se zaměřujeme na přítomnost rizikových faktorů flebotrombózy, nedávné operace, úrazy, těhotenství, malignitu, užívání hormonální léčby, varixy, obezitu atd. Při postižení trombotickým stavem u pacienta pozorujeme otok končetiny, bolest v končetině, cyanotické zbarvení.

Diagnostiku je možné provést několika způsoby. Využívá se Dopplerovy metody, která zjistí překážku v řečišti, ale neřekne, o jakou překážku přejně jde. Duplexní ultrasonografie se využívá v případě, pokud už existuje podezření na flebotrombózu. Ultrasonografie má vysokou citlivost pro diagnózu hluboké žilní trombózy u symptomatických pacientů. U pacientů asymptomatických je citlivost snížena. CT vyšetření se používá zřídka, stejně jako flebografie pomocí magnetické rezonance, izotopová flebografie a rentgenová kontrastní flebografie (Vojáček et al, 2004; Quaseem et al, 2007).

Z laboratorních metod nám pomůže trombózu diagnostikovat základní koagulace (aPPT, PT, fibrinogen, TT/ReT), krevní obraz, trombocyty, lipidový metabolismus, aktivita antitrombinu III, F VIII. K diagnostice může pomoci vyšetření na přítomnost Leidenské mutace (FVL) a PT20210A pomocí PCR. Může se zjistit hladina proteinu S, proteinu C, antitrombinu. Validitu koagulačního vyšetření snižuje koagulační léčba a akutní stav. Proto se doporučuje opakovat vyšetření s nějakým časovým odstupem (Penka et al, 2001, Vojáček et al, 2004).

1.5 Onemocnění vyvinutá z trombotických stavů

Pokud nedojde k zachycení a léčení trombotických stavů, mohou se rozvinout další onemocnění jako je např. diseminovaná intravaskulární koagulace, ischemická onemocnění, embolie a další. (*Vojáček et al, 2004*)

1.5.1 Embolie

Jde o zanesení nějakého hmotného materiálu z jednoho místa řečiště do druhého krevním proudem. Nejčastěji se jedná o trombus (sraženinu) v tomto případě pak mluvíme o tromboembolii. Může ale dojít ke vmetení kapek tuku, kousku nádoru nebo bublin plynu. Plicní embolie znamená vnesení do plicní tepny, systémová tromboembolie vmetení z levé části srdce, aorty nebo jiné velké tepny do tepen velkého oběhu. Vzduchová embolie obnáší vnik bublin vzduchu do krevního řečiště při otevření žily nebo při dekompresi u potápěčů, tuková embolie vnik kapének tuku do řečiště po fraktuře dlouhé kosti, rozdrčení tukové tkáně (*Fakan, 2005*).

Akutní plicní embolií je postiženo přibližně 69 osob na 100 000 osob ročně. (*Gupta et al, 2009*) Asi jedna třetina pacientů postižených žilní trombózou trpí i plicní embolií, zatímco ostatní dvě třetiny mají samostatně hlubokou žilní trombózu (*Segal et al, 2007*).

1.5.2 Ischemické choroby

1.5.2.1 Končetinová ischemie

Z trombózy se může rozvinout netraumatická akutní končetinová ischemie, zvláště u starších pacientů (pozdní diagnóza). Traumatická akutní končetinová ischemie nastává po sportovních a dopravních traumatech (*Čertík, 2003*).

1.5.2.2 Ischemická choroba srdeční (ICHS)

Jde o nedokrevnost myokardu, která je způsobená patologickým procesem v koronárním řečišti. Rozdělujeme ji na akutní a chronickou formu. Nejčastější příčinou je aterosklerotický plát. Mezi rizikové faktory patří hypertenze, poruchy lipidového metabolismu, kouření, diabetes mellitus, obezita, nedostatek fyzické činnosti, stres, pozitivní rodinná anamnéza, mužské pohlaví atd.

Mezi chronické ICHS patří angina pectoris (bolest se objevuje po námaze, má typickou lokalizaci a charakter, důležitá je anamnéza, vyšetření EKG).

Nestabilní angina pectoris spadá pod akutní formu ICHS. Jde o nově vzniklou anginu pectoris do 4 týdnů od vzniku nebo zhoršení již existující angíny. Může se objevit vyšší intenzita bolesti nebo prodloužení bolesti. Mezi akutní ICHS patří i náhlá smrt, akutní infarkt myokardu.

Léčba se provádí antikoagulanty a antiagregačními přípravky při hospitalizaci. Pozoruje se aPTT, při účinné dávce se pohybuje v 2-3x delším čase než u normálního pacienta (*Sovová, Řehořová, 2004*).

1.5.3 Mrtvice

Mrtvice může být následkem trombózy, embolie nebo krvácení. Ve většině případů se mrtvice týká pacientů starších 65 let, vyšší riziko hrozí ženám než mužům. Jde vlastně o ischemické postižení mozku. Vyšetřuje se pomocí počítačové tomografie. Aby nedošlo k poškození mozku, je potřeba zahájit včas trombolytickou léčbu, přibližně do 4,5 hodin od počátku příznaků. Jako léčba se používá intravenózní rekombinantní tkáňový aktivátor plazminogenu (*Saenger and Christenson, 2010*).

1.6 Časté symptomy trombofilních stavů a souvisejících onemocnění

1.6.1 Dyspnoe (dušnost)

Jde o subjektivně pozorovaný pocit nepříjemného vnímání dýchání. Pacient pociťuje dechovou tíseň, krátkodechost, zvýšenou potřebu dechové činnosti (*Steffen et al, 2010*).

1.6.2 Bolest na hrudi

K určení z jaké příčiny k bolesti došlo se využívá anamnéza, fyzikální vyšetření, charakter a lokalizace bolesti.

Při angině pectoris se objevuje píchavá, křečovitá bolest dosahující maxima relativně často. Někdy bolest postihuje levou paži a ruku, pravou část hrudníku, krku, dolní čelisti, uší i záda. Někteří pacienti pociťují bolest jako hluboký pocit tlaku.

Bolest u plicní embolie nemá přesnou lokalizaci (*Steffen et al, 2010*).

Bolest při ischemické chorobě srdeční je svíravá, někdy pociťována jako tlak nebo nedostatečnost dechu. Bolest se objevuje hrudní kostí, někdy v dolní čelisti, v ramenou, horních končetinách. Bolest trvá několik minut. Nejčastěji bolest nastává po námaze, stresu, jídle, chůzi v mrazu, po pohlavním styku (*Sovová, Řehořová, 2004*).

1.6.3 Mdloba (synkopa)

Jde o náhlé snížení krevního tlaku, dochází ke krátkodobé ztrátě vědomí které se opět dostaví po obnovení průtoku krve mozkem při poloze vleže. Nastává při silném citovém nebo nepříjemném citovém prožitku. Před synkopou může postižený pociťovat nevolnost, slabost, poruchy vidu, zívání. Samotná synkopa je však symptom (*Sovová, Řehořová, 2004*).

1.7 Léčba trombotických stavů

Při léčbě je žádané, aby pacient zůstal mobilní. Pacient využívá kompresní obinadla nebo punčochy. V případě blízkosti trombu hlubokého žilního systému podat antikoagulancia. Velmi vzácně dochází k chirurgickým zákrokům (*Vojáček et al, 2004*).

1.7.1 Antitrombotická léčba

Cílem této léčby je se zabránit vzniku nadměrné koagulace, nebo rozpustit fibrinovou složku vytvořeného trombu (*Kubisz, 2006*).

1.7.2 Antikoagulační léčba

Tato léčba spočívá v podávání nefrakcionovaného heparinu (UFH), který inhibuje koagulaci. Cílem je expresivně prodloužit čas aPTT jeden a půl až dvakrát (*Penka et al, 2001; Sobotka et al, 2006*). Léčba může působit na iniciální fázi koagulace, zamezuje přeměně protrombinu na trombin, blokuje účinky trombinu, podporuje přirozené antikoagulační vlastnosti organismu, potlačuje tvorbu vitamin K-dependentních faktorů. Indikuje se v případě prevence arteriální a žilní trombózy, léčby žilní a arteriální trombózy (*Kubisz, 2006*).

Heparin

Jeho účinek spočívá v tom, že se naváže na antitrombin. Tím zvýší jeho inhibiční účinek na koagulaci. Tento komplex inaktivuje faktor IIa (trombin), Xa, XIIa, XIa, IXa. Pouze třetina celkového množství se váže na antitrombin, zbytek nemá znatelný antikoagulační účinek. Mezi jeho nežádoucí účinky patří krvácení. Při závažnějších projevech se podává protaminofosfát, který heparin váže, nebo se heparin vysazuje. Může proběhnout alergická reakce, nastat trombocytopenie s tvorbou nebo bez tvorby protilátek. Nejčastěji se podává intravenózně 2-10 dní, přičemž se kombinuje s perorálními antikoagulancii (warfarin) (*Vojáček et al, 2004*).

1.7.3 Antikoagulační léčba perorálními preparáty

Mezi nejčastější se řadí warfarin. Jde o perorální antikoagulancium působící na metabolismus vitaminu K. Nevzniká redukováná forma vitaminu K, která přeměňuje neaktivní koagulační faktory na jejich aktivní formy a nedochází ke koagulaci. Nástup

jeho účinku je pozvolný, proto se pro akutní léčbu nehodí a využívá se heparin. Léčba těchto dvou přípravků se překrývá přibližně 4-5 dní, dokud se nestabilizuje účinek warfarinu. Nežádoucím účinkem je znovu krvácení nebo kožní nekróza. Podává se lidem s žilní trombózou nebo s plicní embolizací. Dávkování a účinnost léčby se kontroluje pomocí protrombinového času, kdy se INR (mezinárodního normalizovaného poměru) pohybuje nejčastěji mezi 2,0-3,0. Při překročení hodnoty INR 4,0 je účinek spojen s vysokým rizikem krvácení. Ke krvácení může dojít i díky nekázni pacienta, při změně dietního a medikamentózního režimu. K neutralizaci kumarinů slouží vitamin K (*Penka et al, 2001; Vojáček et al, 2004*).

1.7.4 Trombolytická léčba

Zajišťuje, že bude céva znovu průchodná. Dochází k iniciaci přeměny plazminogenu na plazmin. Je vystupňovaná fibrinolytická aktivita plazminogen-plazminového systému. Používá se streptokináza, urokináza, tkáňový aktivátor plazminogenu. Kontroluje se trombinový čas, hladina fibrinogenu, FDP. Je to léčba vhodná pro rozpuštění trombu, působí do 12 hodin po vzniku trombu. Cílem je navození fybrinolytického procesu podáním aktivátorů fibrinolýzy. Při akutním srdečním infarktu, akutních uzávěrech periferních cév, žilních trombózách, akutní masivní embolizaci atd. Kontraindikací může být jakékoli riziko krvácení. Při jednorázovém podání není potřeba laboratorní kontrola, při kontinuálním podávání trombolytika je léčba kontrolována hodnotami TT (30-90 sekund) (*Penka et al, 2001; Kubisz et al, 2006*).

1.8 Odebíraný biologický materiál

Krev

Krev obsahuje buněčné částice (erytrocyty, leukocyty, trombocyty) suspendované v plazmě. Mimo krevní řečiště se krev sráží, což je zapříčiněno přeměnou rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin (*Chromý et al, 2002*).

Plazma

Jde o směs anorganických i organických látek rozpuštěných ve vodě, přičemž podíl vody v plazmě je přibližně 91-93 %. Největší část rozpuštěných látek jsou bílkoviny (65-85 g/l) a lipidy. Zbytek jsou ostatní látky, jejichž koncentrace je až o několik řádů nižší.

Pro získání plazmy se krev odebírá do zkumavky s protisrážlivým činidlem. Příprava plazmy je rychlá, protože se celá krev může hned odstředovat (*Chromý et al, 2002*).

Sérum

Pokud necháme krev srazit (nádobka s polárním povrchem a bez antikoagulancií), získáme sérum. Sérum je složením velmi podobné plazmě, ale chybí v něm srážlivé látky, včetně fibrinogenu. Pro vyšetření d-dimeru je sražená krev nepoužitelná.

Sérum a plasma mají mít nažloutlou barvu a být čiré. Červené zabarvení nám ukazuje hemolýzu. Mléčné zakalení poukazuje na emulgované tukové kapénky, mluvíme pak o chylózním vzorku (*Chromý et al, 2002*).

1.8.1 Zacházení se vzorkem

S každým biologickým vzorkem je nutno zacházet jako s potenciálně infekčním. S tím souvisí dodržování bezpečnostních předpisů jako jsou hygienická doporučení na pracovišti, ochranný oděv, bezpečnostní pomůcky, zdravotní prohlídky personálu, likvidace infekčních odpadů atd. (*Chromý et al, 2002*).

1.9 Preanalytická část

Preanalytická část je nedílnou součástí analýzy, často se o ní ale mluví odděleně. Do této části zahrnujeme všechny postupy od zažádání o analýzu až po zahájení samotné analýzy, tzn. i příprava pacienta k odběru biologického materiálu, vlastní odběr, identifikace biologického materiálu v odběrové zkumavce či nádobce, transport do laboratoře atd. Příprava vzorku v laboratoři se řadí už mezi analytickou část. Týká se to například ředění vzorku, centrifugace atd. (*Chromý et al, 2002; Dastyh et al, 2008*).

Vyšetření je nutné provést do určité doby od odběru. Některé analyty jsou termo- nebo fotolabilní. Skladování vzorků se provádí za předem jasně definovaných podmínek, při kterých by nemělo dojít ke změně obsahu analytu ve vzorku (*Chromý et al, 2002*).

1.9.1 Odběr venózní krve

Krev se nejčastěji odebírá z loketní žíly, vsedě nebo vleže, pacient by měl být alespoň 30 minut před odběrem v klidu. Je třeba být nalačno (poslední jídlo večer před odběrem, druhý den ráno vypít v malém množství vodu nebo neslazený čaj) nebo dodržovat určitou dietu. Pokud je to nutné, doporučuje se i vysazení léků na dobu alespoň 24-72 hodin před odběrem. Lékař by měl o tomto pacienta poučit a seznámit ho s tím.

Pro zviditelnění žíly se používá škrtdlo. Aby se žíla zviditelnila, pacient zacvičí s rukou, ale jen po krátkou dobu. Místo vpichu se dezinfikuje, přitom je třeba dbát na to, aby dezinfekce v místě vpichu zaschla. Po uvolnění škrtdla se odebírá volně proudící krev do předem označené zkumavky. Měl by být dodržen požadovaný odebíraný objem, tzn. jednorázové zkumavky by se měly naplnit po značku. U nesrážlivé krve by měl být dodržen poměr protisrážlivého činidla a krve, např. jeden díl 0,109 M citrátu sodného na devět dílů krve. Jehla se vytáhne a přiloží se tampon na místo vpichu, zajistí se náplastí. Zkumavku s protisrážlivým činidlem ihned po odběru promíchat. 25 (*Chromý et al, 2002; Sedláček, 2006; Kubisz et al, 2006*).

1.9.2 Odběrové zkumavky

Dnes se používají komerčně vyrobené zkumavky, které už obsahují přesně definované množství antikoagulačního nebo koagulačního činidla.

Odběr se provádí do tzv. uzavřeného systému, tj. odběr do vakuované zkumavky z plastu. Objem zkumavek se pohybuje mezi 2-10 ml, jsou uzavřeny umělohmotnou zátkou, které jsou přizpůsobeny pro vpich jehly. Gumové zátky zkumavek jsou barevně odlišné podle toho, které antikoagulační nebo koagulační činidlo obsahují. Barevné rozlišení je dáno normou ISO. Celý systém je sterilní, pro jedno použití.

Samotná jehla je chráněna plastovým krytem, jehla pokračuje na druhou stranu menší jehlou, která je krytá pryžovou zátkou. Po zavedení jehly do žíly se propíchne gumová zátky zkumavky menší jehlou. Díky vakuu dojde k nasátí přesného množství krve do zkumavky (*Chromý et al, 2002*).

Aditivum	Použití	Barva
Bez aditiv	biochemie, serologie	červená
Dělicí gel*	biochemie	žlutá
Heparin (14,3 U/ml)	hematologie, plasma	zelená
Heparin + dělicí gel*	hematologie, plasma	světle zelená
K2/K3 EDTA (1,5 mg/ml)	hematologie	fialová
Citrát sodný (0,105 mol/l)	koagulace	modrá
KF(2,5 mg/ml) + oxalát K (2 mg/ml)	glukosa, laktát	šedá
Citran Na 1:4	sedimentace	černá
Monojodocitan Na (0,5 mg/ml) + heparin	glukosa	zelená

* Gel odděluje po odstředění supernatant od krevní sraženiny nebo od krvinek

Tabulka 1: Odběrové zkumavky (*Zdroj: Chromý et al, 2002*)

Sraženou krev získáme po odebrání do zkumavky bez antikoagulačního činidla. K proběhnutí koagulačního procesu je potřeba asi 30 minut. Po zcentrifugování získáme

sérum. Ze zkumavky s antikoagulačním činidlem získáme krev nesraženou a následně plazmu (*Chromý et al, 2002*).

1.9.3. Antikoagulační činidla

Jsou to látky, které vytvářejí komplexy s ionty endogenního vápníku, který je nutný pro srážení krve. Používají se sodné nebo draselné soli kyseliny citronové nebo šťavelové nebo EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Dalším činidlem je heparin, který má jiný mechanismus působení. Aktivuje inhibitor krevní koagulace, zejména antitrombin III. Právě nesrážlivá krev se používá nejčastěji v hematologii (*Chromý et al, 2002*).

1.9.4 Množství odebraného vzorku

Nemělo by dojít ke zbytečnému zatěžování pacienta odběrem. K zátěži přispívá fakt, že se používají uzavřené systémy, a jednomu pacientovi může být odebráno několik zkumavek na základě různých požadovaných analýz. Protiváhou je ale minimalizace rizika nákazy infekcí, kontaminace vzorku a jeho znehodnocení (*Chromý et al, 2002*).

1.9.5 Vlivy působící na analyty v biologických vzorcích

Můžeme rozlišit dvě základní skupiny faktorů. První z nich jsou neovlivnitelné faktory, jako je dědičnost, věk, pohlaví, biorytmy, gravidita, současně probíhající jiné onemocnění atd. Druhou skupinou jsou vlivy proměnné, např. vliv diety, tělesná námaha, kofein, kouření, alkohol, léky, životní styl atd. (*Chromý et al, 2002; Racek et al, 2006*).

Vliv léčby na výsledek vyšetření

Léky, které pacient užívá, mohou zkreslovat výsledky. U odběru krve, tam kde je to možné, je doporučeno provést odběr na lačno, i to znamená vysazení léků na dobu 24-72 hodin před odběrem. To se prakticky často neděje, a proto je nutné myslet na léčbu při interpretaci výsledků a při analýze. Je vhodné, aby byla léčba zaznamenána v žádance (*Chromý et al, 2002*).

1.9.6 Úprava vzorků - centrifugace

Lidská krev se odstřeďuje 5-10 minut při 1000 - 2000 otáčkách za minutu, při teplotě 18 - 25 °C. Pokud se provádí hemokoagulační test, odstřeďování trvá přibližně 15 minut při 2000 otáčkách. Pokud se provádí centrifugace vzorků v separačním gelu, nelze centrifugaci opakovat (*Chromý et al, 2002*).

1.10 Vyšetření v hematologii

1.10.1 Vyšetření z nesrážlivé a ze srážlivé krve

Odebírá se nesrážlivá krev (EDTA nebo citrát sodný), která se před analýzou promíchá. Z této krve se stanovuje krevní obraz (hemoglobin, erytrocyty, hematokrit, leukocyty, trombocyty), retikuloocyty, osmotická rezistence erytrocytů atd. V plazmě se potom nejčastěji provádí Quickův test, fibrinogen, trombinový test, aPTT atd. (*Chromý et al, 2002*).

1.10.2 Kategorie vyšetřovacích testů

V hematologii existuje několik kategorií vyšetřovacích testů: koagulační, nefelometrické, fotometrické a imunologické.

Koagulační - principem je vytvoření sraženiny. Zásadní je čas, za který koagulum vznikne od okamžiku přidání reagentie k vyšetřované plazmě.

Nefelometrické - Využívá se vzniku zákalu při koagulaci nebo při agregaci (trombocytů), jehož intenzita se měří. Principem je měření odraženého světla na koloidních částicích.

Fotometrické - V důsledku štěpení specifického chromogenního substrátu vzniká zabarvení, jehož intenzita se měří pomocí spektrofotometrů.

Imunologické - základním principem je reakce antigenu s protilátkou

- enzymoimunostanovení (EIA) - specifická protilátka je označena enzymem, který umožňuje vznik barevného produktu. Intenzita zabarvení je úměrná koncentraci vyšetřovaného proteinu
- latex-aglutinační metoda - na latexové částici je navázaná specifická protilátka proti dokazované bílkovině, vzniká aglutinát.

Pokud chceme vyšetřit funkce jednotlivých koagulačních proteinů, používají se koagulační a fotometrické metody, pokud zjišťujeme antigeny, používáme metody imunologické (*Kubisz et al, 2006*).

1.11 Stanovení d-dimeru

1.11.1 Latex-aglutinační metody

Jde o reakci antigen-protilátka. Protilátky bývají navázány na latexové částice, na červené krvinky nebo na kuličky koloidního zlata. Mezi spolehlivé metody patří imunoturbidimetrické stanovení nebo modifikovaný ELISA test. V tomto případě mluvíme o pasivní nepřímé aglutinaci.

Latexové částice jsou kulovité částice stejné velikosti v emulzi, na kterých mohou být sorbovány antigeny nebo protilátky. Po smíchání latexových částic s navázanou protilátkou se vzorkem dojde k navázání antigenu ze vzorku. Dojde ke shlukování částic a narůstá turbidita (*Kvasnička, 2003; Chromý et al, 2002*).

1.11.2 Imunonefelometrie a imunoturbidimetrie

Tyto dvě metody mají vysokou citlivost. Díky nim se dají měřit analyty v koncentracích v ng/ml. Měří se zákal vzniklý po setkání antigenu s protilátkou. K měření se využívá dvou metod a sice turbidimetrie, která měří množství procházejícího světla, a nefelometrie měřící množství odraženého světla z procházejícího paprsku. Paprsek tvoří monochromatické světlo. Vznik precipitátu má dvě fáze. V první (rychlé) fázi vznikají rozpustné primární imunokomplexy, které se dají detekovat pouze speciálními metodami. Druhá (pomalá) fáze se vyznačuje agregací imunokomplexů. První fáze trvá přibližně 10 sekund, kdežto druhá fáze zabere 5- 30 minut (*Chromý et al, 2002; Litzman et al, 2007*).

1.11.3 D-dimer latex-aglutinační test

Latexová částice je potažená anti-d-dimer protilátkou, ty se smíchají s testovanou plazmou. Pokud v plazmě d-dimery chybí, zůstávají nenavázané částice v suspenzi. Pokud d-dimer v plazmě je, začne se na ně vázat monoprottilátky navázané na částicích. Agregát je pak detekován spektrofotometrem (*Tripodi, 2011; Brown et al, 2003*).

Latexová turbidimetrie pro vyšetření d-dimeru má vysokou citlivost (95 %), specifitu (74%) a vysokou negativní prediktivní hodnotu pro plicní embolii u pacientů s nízkou až střední pravděpodobností výskytu onemocnění. Negativní test na d-dimery

tedy vylučuje pravděpodobnost onemocnění hlubokou žilní trombózou nebo plicní embolií u mladších a relativně zdravých pacientů (*Quaseem, 2007; Vojáček et al, 2004*). Imunoturbidimetrické testy mohou být bez problémů prováděny na koagulometrech (*Tripodi, 2011*).

1.11.4 Vývoj testování d-dimeru

Testování d-dimeru pro stanovení žilní trombózy je levný, rychlý způsob, lze detekovat z jakékoli části žilního systému. D-dimer ELISA test je přesný, kvantitativní, schopný prokázat nízké koncentrace, dlouho dobu standardní test. Pro diagnózu plicní embolie je vysoce citlivý, ale málo specifický. Nevýhodou je pracnost a práce v dávkách než po jednotlivých vzorcích. Na jeho provedení je potřeba přibližně 3 hodiny. První latex-aglutinační testy spočívaly v tom, že vznikla viditelná aglutinace. Jednalo se o rychlý, kvalitativní a snadno proveditelný test. Druhá generace latex-aglutinačních testů byla vylepšena o fotometrický analyzátor, který poskytoval kvantitativní výsledek a reprodukovatelné měření nízkých koncentrací. Membránová ELISA využívá monoklonální protilátky, která je chemicky označena a poskytuje barevnou změnu v případě zvýšené koncentrace d-dimeru (*Brown et al, 2003; Heim et al, 2004*).

D- dimer se vyšetřuje z citrátové plazmy. V posledních letech se objevil nápad, vyšetřovat hladinu d-dimeru z celé krve. To zajišťuje např. SimpliRED test, dokonce je možné vyšetřit d-dimer z kapilární krve. Výsledek je tak dostupný za kratší dobu (přibližně za 2 minuty), přitom je kvalitativní. Tento test vykazuje negativní prediktivní hodnotu mezi 82 - 92 %. Citrátová plazma se jinak standardně odstředuje při 3000 g po dobu 15 minut (*Heim et al, 2004; Wilson and Gard, 2003; Schutbens et al, 2002*).

1.12 Příprava protilátek

Za fyziologických podmínek protilátky vznikají jako odpověď na přítomnost makromolekulárních látek. Můžeme rozlišit tři typy protilátek: polyklonální, monoklonální a rekombinantní. V souvislosti s d-dimery nás zajímají protilátky monoklonální.

Příprava monoklonálních protilátek se datuje roku 1975, kdy Kohler a Milstein popsali hybridomovou technologii. Pro přípravu monoklonálních protilátek se imunizuje myš příslušným antigenem. Poté je myš usmrcena a ze sleziny jsou izolovány B-lymfocyty. Ty jsou inkubovány s buňkami myšího myelomu (nádor vycházející z plazmatických buněk). Tyto dva druhy buněk se fúzí pomocí ethylenglykolu a vytváří tzv. hybridom. Buňky hybridomu mají schopnost se neomezeně dělit a vytvářet imunoglobuliny. O tom, jaká bude primární struktura variabilní oblasti produkovaného imunoglobulinu, rozhoduje genetická informace z B-ly, se kterým došlo k fúzi. Samozřejmě vzniká víc typů protilátek na základě toho, že B-lymfocyt rozpoznal více typů epitopů a antigenů. Aby se získala požadovaná protilátka, musí dojít k izolaci určitého hybridomu (klonu), který se pak může pěstovat v kultivačním médiu, kam se bude produkovat požadovaná protilátka (*Pohanka, 2009, Litzman et al, 2007*).

Monoklonální protilátky vykazují vysokou specifitu k jednomu epitopu. Toho se využívá při aglutinačních a precipitačních reakcích. Mimo to se mohou monoklonální protilátky využívat jako nejrůznější léky. Dnes se hojně využívá značených protilátek, a sice značených enzymem nebo fluorescenční značkou (*Litzman et al, 2007*).

2. Cíle a hypotézy

Cílem této bakalářské práce je:

1. Osvojení si metody pro vyšetření d-dimeru, kterou používají v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. na oddělení Hematologie a krevní transfúze, během 1 měsíce.
2. Zpracování alespoň 30 vzorků.

Hypotézy pro tuto bakalářskou práci znějí:

1. Zvýšená hladina nezávisí na pohlaví.
2. Koncentrace d-dimeru v patientských vzorcích stoupá se zvyšujícím se věkem.
3. Předpokládám, že zvýšená hladina d-dimeru bude u více než poloviny vzorků.

3. Metodika

V této části bakalářské práce popisuji, s jakým materiálem jsem pracovala a jak jsem ho připravovala pro analýzu. Charakterizuji zde použitou metodiku pro stanovení d-dimeru.

3.1. Preanalytická část

3.1.1 Příjem biologického materiálu

Biologický materiál se přijímá na Oddělení hematologie a krevní transfúze - v hematologické laboratoři, s úseku koagulace. Je důležité, aby materiál přijímala laborantka a přitom zkontrolovala stav přijímaného materiálu (např. zda nejsou zkumavky poničeny).



Obr 3: Místo příjmu biologického materiálu

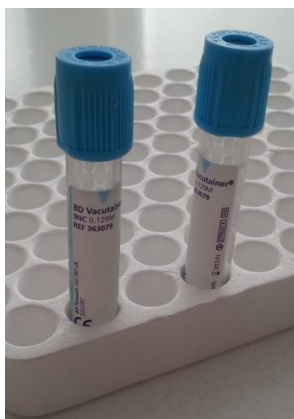
(Zdroj: vlastní foto)

Biologický materiál se do hematologické laboratoře dostává nejčastěji z ambulancí nemocnice (interní oddělení, chirurgie, gynekologie atd.), zvláště pak pro vyšetření d-dimeru. Z ambulance hematologického oddělení se přijímá materiál hlavně na vyšetření krevního obrazu a jeho rozšířené vyšetření a na hlavní koagulační vyšetření. Koagulační vyšetření se týká hlavně pacientů, kterým se kontroluje

antikoagulační léčba. Mimo to se do laboratoře pro zpracování přijímá biologický materiál od externích praktických lékařů.

Biologický materiál je přepravován v boxech a chladících boxech určených pro přepravu biologického materiálu. Zkumavky s citrátem sodným pro vyšetření d-dimeru se přepravují v kontejnerech při laboratorní teplotě, tj. do 25°C.

Pro vyšetření d-dimeru se přijímá venózní krev ve zkumavkách BD Vacutainer o objemu 4,5 nebo 2,7 ml. Tyto zkumavky jsou s protisrážlivým činidlem - 0,129M citrát sodný. Je důležité, aby byl dodržen objemový poměr krve ku citrátu a sice v poměru 10:1. Biologický materiál by měl být do laboratoře dopraven co nejrychleji, nejpozději do dvou hodin od odběru.



Obr 4: Odběrové zkumavky BD Vacutainer s citrátem sodným

(Zdroj: vlastní foto)

Při přijímání biologického materiálu je třeba přiřadit k žádankám příslušné zkumavky. Zkumavka musí správně identifikovatelná, tzn. že bychom na ní měli najít příjmení, popř. křestní jméno pacienta a rok narození. Tyto údaje by měly souhlasit s údaji na žádance. Důležitý je i typ odběrové zkumavky. Krev by měla být odebrána do takové zkumavky, aby bylo možné provést požadovaná vyšetření. U vyšetření d-dimeru je důležité, aby krev byla odebrána do zkumavky s citrátem sodným - modrá zátka.

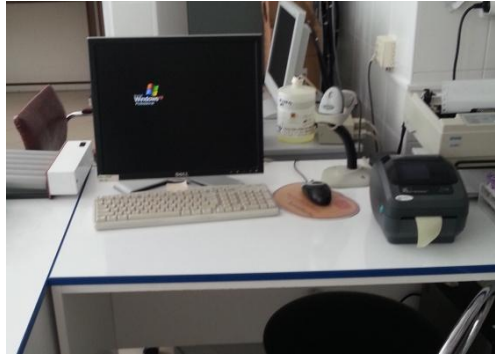
3.1.2 Žádanka

Na žádance musí být všechny údaje potřebné k identifikaci a provedení vyšetření. Nesmí chybět:

- Příjmení a jméno pacienta
- rodné číslo pojištěnce
- diagnóza
- kód pojišťovny
- datum a čas odběru
- razítko a podpis lékaře, který žádá vyšetření
- řádně označená požadovaná vyšetření

3.1.3 Zadávání do LISu (laboratorní informační systém)

Aby mohla být provedena požadovaná vyšetření, je potřeba údaje z tištěné žádanky převést do laboratorního informačního systému. V Jindřichově Hradci používají informační systém OpenLIMS Stapro. Ten je propojen s nemocničním informačním systémem, takže po zadání rodného čísla pacienta do LISu se nám už o něm ukážou informace (jeho jméno a příjmení, kód pojišťovny, diagnóza, provedená vyšetření i z jiných laboratoří atd.). Někdy je naopak nutné všechny údaje do systému zadat. Automaticky je zadán datum a čas zápisu. Na základě zadání do LISu pacient získá laboratorní číslo a vytisknou se štítky s čárovými kódy, podle kterých pak pracují příslušné analyzátoři. Jeden štítek se lepí na žádanku a další na příslušné zkumavky. Na štítku na zkumavce je uvedeno rodné číslo pacienta, jméno a příjmení a zkratka vyšetření, které bude provedeno z příslušné zkumavky. Někdy je uváděno právě přidělené laboratorní číslo pacienta.



Obr 5: Počítač pro zadávání informací do LISu a tiskárna čárových kódů

(Zdroj: vlastní foto)

3.1.4 Důvod odmítnutí biologického materiálu

Laborantka nesmí biologický materiál přijmout, pokud:

- údaje na žádance nesouhlasí s údaji na zkumavce
- odběrová zkumavka není vhodná pro požadovaná vyšetření
- odběrová zkumavka není popsána
- na žádance chybí údaje (pojišťovna, lékař, požadovaná vyšetření atd.)
- biologický materiál je ze zkumavky vylitý, zkumavky jsou poničené
- nebyl dodržen požadovaný objem
- vzorek je sražený
- vzorek je po centrifugaci chylózní nebo silně hemolytický

Pokud dojde k odmítnutí vzorku, je třeba provést zápis do LIS a do Deníku neshod při příjmu materiálu. Zapisuje se datum, oddělení, ze kterého materiál přišel, jméno pacienta, číslo žádanky, důvod odmítnutí (např. špatná identifikace, chybění údajů atd.), jak byla situace řešena (např. telefonicky) a jméno osoby, se kterou byla řešena a podpis laborantky.

Pokud nejde materiál zpracovat, identifikovat, požaduje se po lékaři nový odběr i se žádankou. Může nastat situace, kdy se údaje na žádance a zkumavce shodují,

ale chybí označení požadovaných vyšetření. V tom případě se volá lékaři, který sdělí požadovaná vyšetření ke vhodné zkumavce. I v tomto případě musí být proveden zápis.

3.1.5 Příprava vzorků k analýze - centrifugace

Před tím, než vložíme vzorek do analyzátoru, jsem musela vzorky na analýzu připravit. Pro vyšetření d-dimeru jsem dávala zkumavky zcentrifugovat (odstředit).

U centrifug se využívá odstředivé cíly, která oddělí krvinky od séra nebo plazmy. Při vkládání zkumavek jsem dbala na to, aby byla centrifuga vyvážená, tzn. že jsem dávala sudý počet zkumavek. Pokud jsem měla lichý počet zkumavek s biologickým materiálem, k vyvážení jsem použila stejně velkou zkumavku s vodou. Nastavila jsem počet otáček a dobu odstředování vhodnými tlačítky a vzorky se zcentrifugují. Centrifugace zkumavek s citrátem sodným trvá 15 minut při 2500 otáčkách/min.

Megafuge 1.0

Po vyvážení jsem zavřela víko, pomocí tlačítka SET a + nebo - nastavila otáčky (speed) a čas odstředování (time), spustila jsem centrifugu pomocí tlačítka START. V případě nutnosti jsem použila tlačítka STOP. Po odstředění jsem otevřela centrifugu pomocí tlačítka LID.

Rotofix 32

Opět vyvážíme, zavřeme víko, pomocí šipek jsem nastavila počet otáček a dobu odstředování a stiskla tlačítka START, v případě nutnosti tlačítka STOP. Centrifuga se vypne samovolně.

Po centrifugaci jsem dávala stočené zkumavky opatrně do stojánku a kontrolovala jsem, zda není plazma silně hemolytická nebo chylózní. Pokud jsem na takový vzorek narazila, nahlásila jsem to některé z laborantek. Takový materiál se většinou nemohl zpracovat, protože by mohlo dojít ke zkreslení výsledků. V takovém případě se po lékaři požaduje nový odběr i se žádankou. V případě, že byla plazma nažloutlé barvy, mohla jsem materiál dál zpracovávat.

3.2 Analytická část

Tato část zahrnuje samotnou analýzu vzorků, kterou jsem prováděla na koagulačním analyzátoru ACL Elite Pro. Podařilo se mi provést analýzu na 100 vzorcích, které byly přijaty z různých oddělení Nemocnice Jindřichův Hradec a.s. a od externích lékařů.

3.2.1 Analyzátor ACL Elite Pro

Jedná se o hemokoagulační analyzátor, který je plně automatizovaný, speciálně zkonstruovaný pro klinické použití v hemokoagulační laboratoři. Testuje se na něm srážení a/nebo fibrinolýza. V Jindřichově Hradci se na tomto analyzátoru provádí:

- koagulační testy (PT - protrombinový čas, APTT - aktivovaný parciální tromboplastinový čas, faktor srážení VIII)
- chromogenní testy (antitrombin, fibrinogen-C)
- imunologické testy (d-dimer, volný protein S)
- speciální testy (APCR, protein C, protein S)



Obr 6: Koagulometr ACL Elite Pro

(Zdroj: www.nemjh.cz)

3.2.1.1 Popis přístroje

Na přístroji můžeme pozorovat několik komponent: LCD obrazovka, zásobník na vzorky, promývací roztok, pipetovací jehly, prostor pro reagentie, pipetovací rameno, zásobník rotorů, odpadní prostor pro rotory, vývod kapalného odpadu, klávesnice, externí skener čárových kódů.

Zásobník na vzorky

Kapacita zásobníku je pro 40 zkumavek. Je zde i 10 pozic pro kalibrátory nebo lahvičky s reagentiemi (označené A1 - A10). Okolo zásobníku se nacházejí optické snímače, které rozeznávají přítomnost a rozmístění zkumavek a lahviček s reagentiemi.

Prostor pro reagentie

Pro reagentie na tomto analyzátoru nalezneme 12 pozic, z nichž 8 pozic je chlazených, 4 jsou pro reagentie používané při pokojové teplotě, zároveň 4 z nich jsou vybaveny míchacím mechanismem.

Promývací roztok a kapalný odpad

Promývací roztok se dostává do promývací nádržky, která je umístěná v prostoru pro reagentie mezi pozicí R4 a R5. V této nádržce se promývají pipety mezi cykly. Odpad jde hadičkou do odnímatelné externí nádržky. Promývací roztok se používá i jako optický referenční roztok pro nefelometrický kanál.

Pipetovací rameno

Na rameni můžeme najít dvě jehly z nerezové oceli, které pipetují vzorek a/nebo reagentie, dávkují je do vnějších a vnitřních částí reakčních kyvet v rotoru.

Rotory

Jedná se o polystyrenové reakční kyvety na jedno použití, které propouštějí UV světlo. Na jednom rotoru nalezneme 20 vnějších a 20 vnitřních přihrádek. Vnější a vnitřní přihrádka je oddělená přepážkou. Do vnitřní přihrádky se pipetuje vzorek a/nebo reagentie, do vnější reagentie. Díky přepážce zůstávají vzorek a reagentie oddělené, při centrifugaci přeteče obsah vnitřní přihrádky do přihrádky vnější a samotná reakce a její analýza probíhá ve velké přihrádce na vnější straně rotoru. Opticky je tedy snímána vnější část rotoru, které bychom se neměli dotýkat.

Do zásobníku se vejde 12 rotorů. Ze zásobníku do prostoru držáku rotorů (kde probíhá analýza) jsou podávány automatickým podavačem. Ten zužitkované rotory přemísťuje do odpadního prostoru pro rotory, odkud se musí vyhazovat do biologického odpadu.

3.2.1.2 Kalibrace

Kalibrace se provádí se změnou šarže, minimálně dvakrát za rok a podle výsledků denní kontroly kvality. Ke kalibraci se používá kalibrátor ze soupravy HemosIL™ D-dimer.

3.2.1.3 Kontrola kvality

Denně jsem prováděla kontrolu s určenou hodnotou d-dimeru od výrobce. Komerční kontrolní plazmy jsou dvě, jedna má abnormálně nízkou a druhá abnormálně vysokou hladinu d-dimeru. U obou je deklarované rozmezí hodnot. Výsledky kontrol se ukládají do paměti analyzátoru a na konci měsíce jsou tištěny.

Externí kontrola kvality probíhá 4x ročně a je prováděna firmou SEKK.

3.2.2 Stanovení hladiny d-dimeru

Stanovení hladiny d-dimeru pomáhá odhalit nejčastěji trombózu, embolii, DIC a slouží k monitorování trombolytické léčby.

3.2.2.1 Princip testu

Ke stanovení hladiny d-dimeru byla použita metoda využívající princip latexové aglutinace. Latexové částice, které jsou potažené monoklonální protilátkou proti d-dimeru, tvoří agregáty s d-dimerem z vyšetřované plazmy. Turbidita vzorku je pak mírou koncentrace d-dimeru ve vzorku.

3.2.2.2 Potřebné reagensie

Pro měření hladiny d-dimeru jsem používala reagensie HemosIL™. Souprava HemosIL™ D-Dimer obsahuje 4 lahvičky latexové reagensie (R), 4 lahvičky reakčního pufru (B) a 2 lahvičky d-dimer kalibrátoru (C).

- Latexová reagensie - 3ml lyofylizované suspenze polystyrenových latexových částic pokrytých myší monoklonální protilátkou proti

d-dimeru s hovězím sérovým albuminem, pufrům, stabilizátory a konzervačními látkami

- Reakční pufr - 9 ml fosfátového pufru, hovězí sérový albumin, stabilizátory a konzervační látky
- D-dimer kalibrátor - 1 ml lyofilizovaného roztoku d-dimeru, částečně purifikovaného z lidského fibrinu naštěpeného lidským plazminem, hovězí sérový albumin, stabilizátory a konzervační látky

Pro kontrolu vyšetření d-dimeru na koagulačních analyzátořech je důležitá sada kontrol. Kontroluje se s nimi přesnost a správnost stanovení hraničních a abnormálních hodnot d-dimeru. Souprava HemosIL™ Controls obsahuje 5 lahviček nízkých a 5 lahviček vysokých kontrol.

- Nízká d-dimer kontrola - 1ml lyofilizovaného roztoku d-dimeru, částečně purifikovaný z lidského fibrinu, naštěpený lidským plazminem, hovězí sérový albumin, pufr, stabilizátory, konzervační látky
- Vysoká d-dimer kontrola - 1 ml lyofilizovaného roztoku d-dimeru, částečně purifikovaného z lidského fibrinu, naštěpeného lidským plazminem, hovězí sérový albumin, pufr, stabilizátory a konzervační látky

Současně jsou k provedení analýzy potřeba reagentie koagulometru (Faktor diluent, Cleaning solution, Wash-R Emulsion) a interní kontrolní plazma dárců (skladování v mrazáku). Pro přípravu reagentií ze souprav se ještě používá aqua pro iniectione. (*Křišťufová, 2011*)

3.2.2.2.1 Příprava reagentií

- latexová reagentie: obsah lahvičky jsem smíchala se 3 ml aqua pro iniectione
- reakční pufr je komerčně připraven k použití
- d-dimer kalibrátor: obsah lahvičky jsem smíchala 1 ml aqua pro iniectione
- d-dimer kontroly: opět jsem obsah lahvičky smíchala s 1 ml aqua pro iniectione
- reagentie koagulometru jsou přiraveny k použití

Latexovou reagencii, kalibrátor a kontroly jsem jemně pomíchala krouživými pohyby, nechala je stát asi 30 minut při pokojové teplotě. Před použitím bylo třeba reagentie ještě jednou jemně promíchat, aby nevznikla pěna.

Tabulka 2: Uložení a stabilita reagentií (*Zdroj: Křišťufová, 2011*)

	stabilita po rozpuštění v originální lahvičce		
	při 2 - 8 °C	při 15 - 25 °C	při -20 °C
latexová reagentie	1 měsíc	1 den	-
reakční pufr	1 měsíc	1 den	-
d-dimer kalibrátor	1 měsíc	3 dny	2 měsíce
d-dimer kontroly	1 měsíc	8 hodin	2 měsíce
směsná kontrola dárců	při -42 °C po dobu 1 měsíce		
Factor diluent	-	do data expirace	-
Cleaning solution HemosIL™	-	do data expirace	-
Wash-R Emulsion HemosIL™	-	do data expirace	-

3.2.2.3 Pracovní postup

Před první analýzou se provádí kalibrace přístroje. Tu prováděla vždy jedna z laborantek. Důležité je rozmístění všech reagentií na správná místa (podle mapy reagentií uvedené v přístroji).

Odstředěné zkumavky jsem opatrně odzátkovala a vložila do zásobníku vzorků. Dbala jsem na to, aby čárový kód směřoval vně zásobníku. Analyzátor po spuštění přečte kódy a z laboratorního informačního systému zjistí, jaká vyšetření jsou

z konkrétní zkumavky požadovány. Poté nastává samotná analýza, kdy analyzátor pipetuje reagentie (70 μ l pufru, 90 μ l latexové reagentie) a vzorek (20 μ l) do rotoru. Dochází k odstředění, vzniku agregátů a měření.

Rozsah měření koncentrace d-dimeru, který je analyzátor ACL Elite Pro schopen zachytit, je 200 – 1050 ng/ml. Pokud dojde k naředění vzorku, je analyzátor schopen naměřit až 5250 ng/ml.

3.3 Postanalytická fáze

Výsledky jsou přeneseny z analyzátoru do LIS, které kontroluje laborantka s vysokoškolským vzděláním. Za cut-off hodnotu v nemocnici v Jindřichově Hradci považují 255 ng/ml. Výsledky jsou uvolňovány na jednotlivá oddělení nemocnice prostřednictvím nemocničního informačního systému. Výsledky se hodnotí v souvislosti s klinickým stavem pacienta a vzhledem k fyziologické hodnotě. Některé výsledky se konzultují s lékařem, obzvlášť pokud dojde k prudkému vychýlení hodnot, anebo pokud hodnota překročí koncentraci 1000 ng/ml. Na některá oddělení se výsledky dodávají v tištěné formě, stejně jako externím lékařům. Všechny výsledky jsou archivovány v LISu a v tištěné formě v Hlavní knize.

Zanalyzované zkumavky jsem vyjmula z analyzátoru, zazátkovala a uložila do stojánku, který byl skladován následujících 24 hodin při pokojové teplotě. Archivovány jsou i žádanky.

4. Výsledky

Vyšetřila jsem 100 patientských vzorků, z toho 53 od mužů a 47 od žen. Po získání výsledků od 100 pacientů z okresu Jindřichův Hradec jsem zpracovala výsledky do tabulek a grafů pomocí programu Microsoft Office 2007. Tabulka s naměřenými hodnotami a uvedenými diagnózami je zahrnuta do části Přílohy.

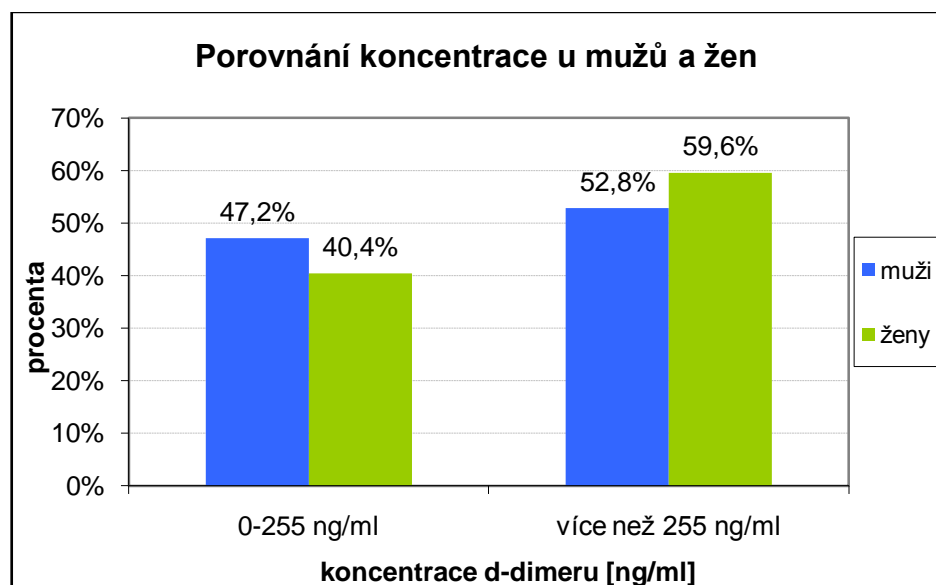
4.1. Poměr fyziologických a patologických hodnot

Tabulka 3: Koncentrace d-dimeru u mužů a žen

Pohlaví	Koncentrace d-dimeru		celkem
	0-255 ng/ml	> 255 ng/ml	
Muži	25	28	53
Ženy	19	28	47
celkem	44	56	100

Z tabulky č. 2 můžeme vyčíst, že do cut-off hodnoty se vešlo celkem 44 pacientů, z toho 25 mužů a 19 žen. Patologickou hodnotu vykazovalo celkem 56 vzorků, z toho 28 od mužů a 28 od žen. Celkem bylo vyšetřeno 53 vzorků od mužů a 47 vzorků od žen.

Graf 1: Koncentrace d-dimeru u mužů a žen



Graf č. 1 ukazuje, že fyziologickou hodnotu mělo po zaokrouhlení 47% mužů a 40 % žen. Patologickou hodnotou bylo zatíženo 53% mužů a 60% žen.

4.2 Věkové zastoupení vyšetřovaných pacientů

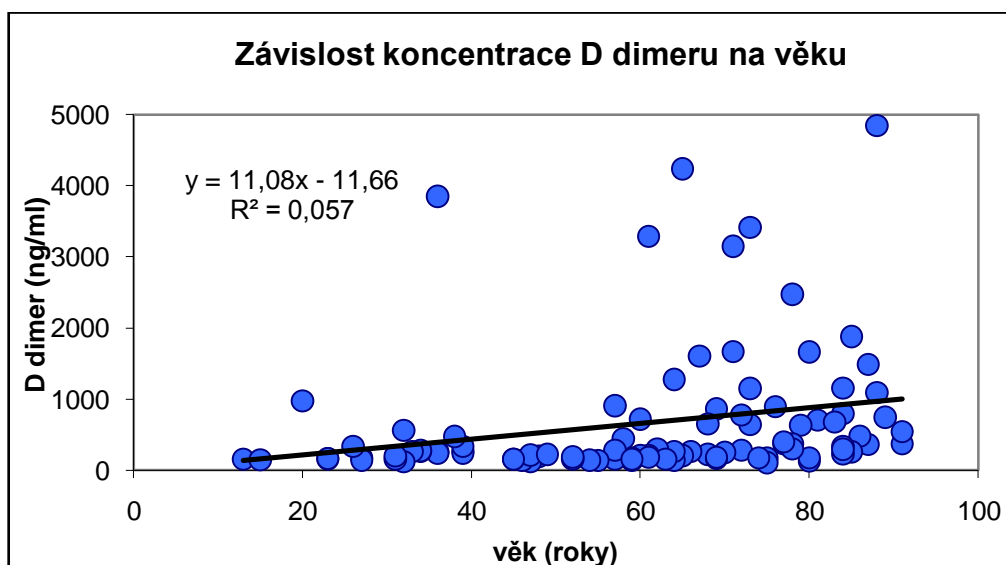
Tabulka 4: Věkové zastoupení vyšetřovaných pacientů

	Mladší než 45 let	Starší než 45 let	Celkem
Muži	10	43	53
Ženy	12	35	47
Celkem	22	78	100

Tabulka č. 4 znázorňuje, kolik pacientů účastnících se vyšetření je starších než 45 let a kolik je jich mladších. Celkem 22 pacientů bylo mladších 45 let, z toho 10 mužů a 12 žen. 78 pacientů bylo starších 45 let, z toho 43 mužů a 35 žen. Celkem se vyšetření účastnilo 53 mužů a 47 žen.

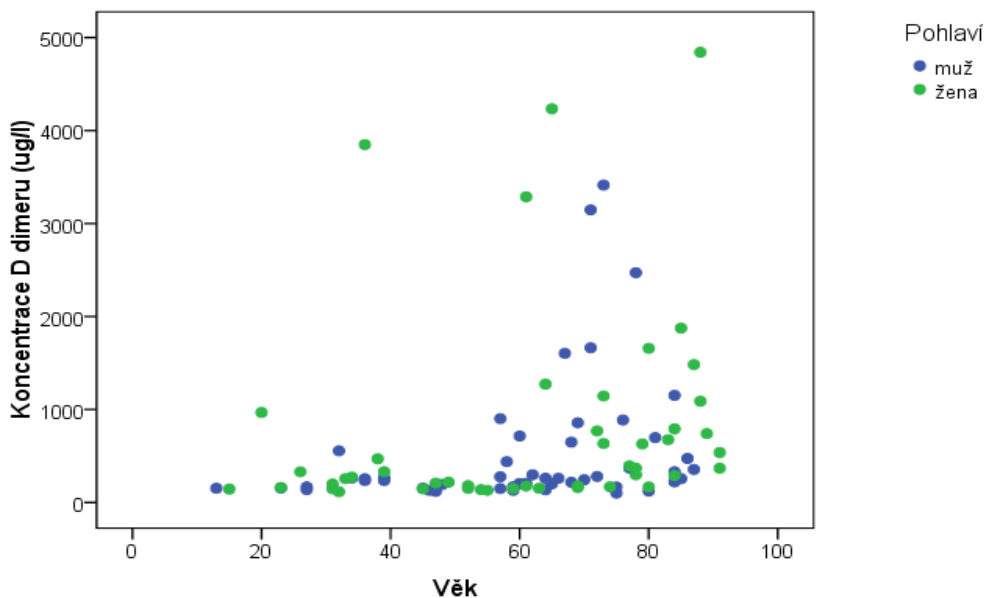
4.3 Závislost koncentrace d-dimeru na věku

Graf 2: Závislost koncentrace d-dimeru na věku



Na grafu č. 2 můžeme vidět závislost koncentrace d-dimeru na věku. Zároveň vidíme, že vyšetření proběhlo u pacientů všech věkových kategorií (pod 20 a nad 80 let). Nejsou zde zahrnuty hodnoty větší než 5250 ng/ml a menší než 100 ng/ml.

Graf 3: Zastoupení mužů a žen



Na grafu č. 3 vidíme koncentraci d-dimeru v závislosti na věku, přičemž jsou barevně odlišeni muži a ženy. Nejsou zde zahrnuty hodnoty větší než 5250 ng/ml a menší než 100 ng/ml.

4.4 Průměrná koncentrace d-dimeru celkově

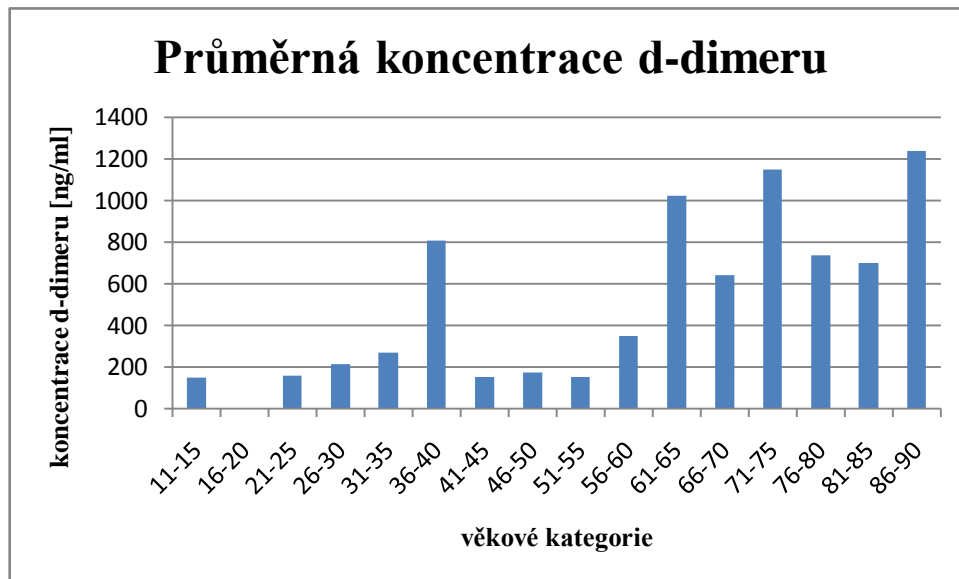
Tabulka 5: Průměrná koncentrace d-dimeru u mužů a žen

	Průměr [ng/ml]	Směrodatná odchylka [ng/ml]	Střední chyba průměru [ng/ml]
Muži	540,9	727,2	102,8
Ženy	786,4	1108,0	161,6

Z tabulky č. 3 vyčteme průměrnou koncentraci d-dimeru, směrodatnou odchylku a střední chybu průměru. Průměrná koncentrace d-dimeru u mužů je 540,9 ng/ml, u žen je vyšší a sice 786,4 ng/ml. Směrodatná odchylka u mužů je 727,2 a u žen 1108 ng/ml. Střední chyba průměru u mužů je 102,8 ng/ml a u žen 161,6 ng/ml.

4.5. Průměrná koncentrace d-dimeru věkových kategorií

Graf 4: Průměrná koncentrace d-dimeru u různých věkových kategorií



Na grafu č. 5 vidíme průměrné koncentrace d-dimeru u jednotlivých věkových skupin. Skupina je tvořena pacienty, kteří spadají do dané věkové kategorie. Věkové kategorie jsem si rozdělila po 5 letech. Do grafu jsem nezahrnovala hodnoty větší než 5250 ng/ml a menší než 100 ng/ml.

5. Diskuze

D-dimer je vhodným markrem některých patologických stavů. Zvýšenou hladinu nacházíme hlavně při postižení trombózou, kterou je zatíženo přibližně 71 pacientů na 100 000 osob ročně (*Segal et al., 2007*), a plicní embolií, kterou je postiženo 69 pacientů ze 100 000 osob (*Gupta et al, 2009*). Dále se zvýšené hodnoty d-dimeru objevují ve stáří, při mrtvici, v novorozeneckém období, při periferní arteriopatii, srdečním selhání, hemolýze, infekci, krvácení, po nedávné operaci, při jaterním nebo ledvinném onemocnění, zánětlivém střečním onemocnění, DIC, ischemické chorobě srdeční a při trombolytické terapii atd. (*Tripodi, 2011*).

Hladina d-dimeru se vyšetřuje i v době těhotenství. Zvyšuje se a překračuje hodnotu 500 ng/ml. To ale vede k falešně pozitivním výsledkům. Ve druhém trimestru mělo zvýšenou hladinu 82% z testovaných žen a ve třetím trimestru byly hodnoty všech žen větší než 500 ng/ml. To nám ukazuje, že koncentrace v průběhu těhotenství se fyziologicky zvyšuje. Proto je nutné zavést nové prahové hodnoty d-dimeru, aby se vyloučila možnost výskytu tromboembolie u těhotných žen (*Kline et al., 2005*).

Při vyšetření hladin d-dimeru jsem se zaměřila i na zachycení diagnóz, se kterými vzorky přišly. Mezi nejčastější diagnózy (bez ohledu na to, zda šlo o patologickou hodnotu nebo ne), se kterými jsem se při vyšetřování koncentrace d-dimeru setkala byla právě flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin. U této diagnózy se vyskytly 3 patologické hodnoty a 8 fyziologických. U této diagnózy předpokládám, že pacienti jsou léčeni, proto hodnota d-dimeru není ve většině patologická. Často se objevila i dušnost a bolest na hrudi, což může být ukazatelem právě plicní embolie. U těchto diagnóz byla u 13 pacientů zvýšená hladina d-dimeru, fyziologická byla prokázána u 9 pacientů. Dalšími diagnózami byla různá zánětlivá onemocnění, postižení srdce, nádory, různá onemocnění krve a další. Nepodařilo se mi ale provést vyšetření, které by souviselo s těhotenstvím nebo novorozeneckým obdobím.

Za patologickou hodnotu je obecně považována koncentrace nad 500 ng/ml (Korte, Riesen, 2000). V Jindřichově Hradci je ale cut-off hodnota nastavena poněkud jinak, a sice na 255 ng/ml. Patologickou hodnotu vykazovalo 56 vzorků, 44 vzorků se vešlo do fyziologické cut-off hodnoty. Potvrdil se mi tedy předpoklad, že patologická hodnota bude naměřena u více než poloviny pacientů.

Cílovou skupinou pro vyšetření jsou především lidé středního věku (45 let), u kterých lze předpokládat rozvoj trombotických stavů, přičemž ženy onemocní častěji před 45. rokem života než muži. Tato onemocnění se mohou týkat i dětí. Žilní trombóza postihuje i děti pod 15 let. V souvislosti s rostoucím věkem se riziko výskytu žilní trombózy zvyšuje exponenciálně. U dívek pubertálního a postpubertálního věku se klade důraz na riziko trombóz v souvislosti s užíváním hormonální antikoncepce. (Chalmers et al., 2011; Quaseem et al., 2007).

Mohu potvrdit, že vyšetření proběhlo hlavně u pacientů starších 45 let. Celkem jich bylo 78, z toho 43 mužů a 35 žen. 22 pacientů bylo mladších než 45 let. Zastoupení mužů a žen je rovnoměrné. Pacienti mladší 15 let byli dva, jeden mužského pohlaví a druhý ženského. Ani u jednoho nebyla uvedena diagnóza trombózy, pouze vada koagulace. U obou pacientů byla naměřena fyziologická hodnota d-dimeru. (viz Příloha č. 7). Závislost zvýšené hladiny d-dimeru na pohlaví nemohu potvrdit, protože vztah není lineární, není možné daty smysluplně proložit přímkou.

Při zjišťování, zda se koncentrace d-dimeru zvyšuje s rostoucím věkem, jsem zjistila, že nalezený model není příliš kvalitní. To určuje hodnota spolehlivosti (R) spojnice trendu, jejíž hodnota je blízko nule. Nelze tedy říct, že koncentrace d-dimeru se úměrně zvyšuje s rostoucím věkem. To souvisí i se zjištěním, že získané výsledky jsou velice variabilní. Průměrná hodnota hladiny d-dimeru u mužů je 540,9 ng/ml, u žen je to 786,4 ng/ml. Rozptyl hodnot kolem střední hodnoty je u obou pohlaví vysoký. U mužů dosahuje hodnoty 727,2 ng/ml a u žen je to dokonce 1108 ng/ml. V obou

případech je směrodatná odchylka přes 40% větší, než samotný průměr. Střední chyba průměru je také vysoká, u mužů 102,8 ng/ml a u žen 161,6 ng/ml.

Pro zmapování koncentrací d-dimeru v různých věkových skupinách jsem si rozdělila pacienty do skupin. Každá skupina je interval 5 let věku. Nejvíce pacientů bylo v kategorii 61-65 let, 71-75 let a 76-80. V každé této kategorii bylo 10 pacientů. Nejméně pacientů spadalo do věkové kategorie 11-15 let, 21-25 let a 41-45 let, kde byli pacienti po dvou. U kategorie 16-20 let jsem nevyšetřila žádného pacienta. Nejvyšší průměrnou hodnotu d-dimeru jsem naměřila u poslední kategorie - 86-90 let. Nejnižší u kategorie 11-15 let (2 pacienti), následovala skupina pacientů ve věku 41-45 let (2 pacienti). Nejvíce patologických hodnot se vyskytovalo u pacientů věkové skupiny 86-90 let. U všech 8 pacientů z této věkové kategorie jsem naměřila patologickou hladinu d-dimeru v plazmě.

Při interpretaci výsledků je důležité zaměřit se nejen na to, zda hodnota je patologická nebo ne, ale i na klinický stav pacienta, důvod, proč k vyšetření došlo. U pacientů, kteří jsou pod vlivem léčby trombotických stavů je důležité pozorovat i předchozí výsledky vyšetření i výsledky ostatních vyšetření. Hlídá se razantní vychýlení hodnot od hodnot dříve provedených vyšetření. Může to znamenat nedodržování zásad léčby, ale i změnu stavu pacienta. Při hodnocení výsledků si v hematologické laboratoři v Jindřichově Hradci všímají i hodnot, které převyšují 1000 ng/ml. Takové hodnoty je pak nutné oznámit telefonicky ošetřujícímu lékaři.

Dříve se hojně využívalo ELISA stanovení d-dimeru v plazmě k diagnostice trombotických stavů. Tento test byl dlouhou dobu považován za zlatý standard, ale bylo potřeba vyvinout test, který by byl rychlejší a poskytoval by kvantitativní výsledek. Mezi takové testy patří stanovení d-dimeru pomocí latexové aglutinace. V dnešní době se u této metody pro měření nejvíce využívá imunoturbidimetrie. Byl kladen důraz na to, aby bylo možné rychlé vyšetření vzorků, např. aby bylo možné vyloučit život ohrožující stav (týká se hlavně plicní embolie). Proto byla vyvinuta tato metoda, která

poskytuje kvantitativní hodnocení. Citlivost této metody je přes 90 %, specifčnost je ale poněkud nižší - kolem 70 %. Tento test se provádí na automatizovaném koagulometru, umožňuje poskytovat opakovaně nižší koncentrace d-dimeru. Test může být zhotoven do 15 minut. (*Tripodi, 2011; Brown et al., 2003; Heim et al., 2004*).

Se stejnou metodou jsem pracovala v nemocnici v Jindřichově Hradci, kde se provádí vyšetření pacientů z ambulancí na koagulometru ACL Elite Pro.

6. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo osvojení si metody, kterou používají na oddělení Hematologie krevní transfúze v Nemocnici Jindřichův Hradec a.s. Druhým cílem bylo vyšetřit minimálně 30 vzorků v období jednoho měsíce.

Podářilo se mi vyšetřit 100 vzorků, z toho 53 od mužů a 47 od žen. Z celkového množství vykazovalo patologickou hodnotu (nad hodnotou cut-off = 255 ng/ml) 56 vzorků. 44 pacientů mělo fyziologickou hodnotu d-dimeru.

Stanovila jsem si tři hypotézy:

Hypotéza 1 zněla, že zvýšená hladina nezávisí na pohlaví. Tato hypotéza se mi potvrdila. Nemůžu říct, že by se zvýšená hladina d-dimeru vyskytovala statisticky výrazněji u mužů nebo u žen.

Hypotéza 2 říká, že koncentrace d-dimeru v patientských vzorcích stoupá se zvyšujícím se věkem. Tato hypotéza se mi nepotvrdila, i když byly v zastoupení téměř všechny věkové skupiny (kromě novorozenců, předškolních a školních dětí). Na druhou stranu, možná právě to, že tyto mladší věkové skupiny se mezi vyšetřovanými vzorky neobjevili poukazuje na to, že patologickými stavy, spojenými se zvýšenou koncentrací d-dimeru v krvi, netrpí.

Posledním předpokladem bylo, že zvýšená hladina d-dimeru bude u více než poloviny vzorků. To se mi u vyšetřovaných pacientů z okresu Jindřichův Hradec potvrdilo. Tento výsledek jsem předpokládala z důvodu toho, že do zmíněné laboratoře se vzorky pro vyšetření d-dimeru dostávají hlavně z ambulantních oddělení nemocnice.

Pro lepší statistické hodnocení by bylo vhodné zaměřit se na větší skupinu obyvatel, s tím, že by byli zahrnuti všechny věkové kategorie s rovnoměrným

zastoupením mužů a žen. Bylo by vhodné do vyšetřování zahrnout i tu skupinu lidí, kteří by nevykazovaly žádné známky trombofilních stavů.

Myslím si, že v dnešní době je výskyt trombofilních stavů poměrně častý. Důvodem mohou být dědičné příčiny, ale stejně tak i příčiny jako je stravování, málo pohybu, životní styl. Myslím, že změnou zažitých návyků a změnou životního stylu by se dal omezit výskyt těchto patologických stavů. Dnes ale zároveň dochází k úspěšné a dobře kontrolovatelné terapii.

7. Použitá literatura

1. BROWN, M. D. et al. Turbidimetric D-Dimer Test in the Diagnosis of Pulmonary Embolism: A Metaanalysis. *Clinical Chemistry*. 2003, vol. 49, no. 11, p. 1846-1853 [2012-10-22]
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/49/11/1846.full>
2. ČERTÍK, B. Akutní končetinová ischemie, 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2003, 147 s. ISBN 80-247-0624-5
3. DASTYCH, M., BREINEK, P. et al. Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 232 s. ISBN 978-80-210-4572-9
4. FAKAN, F. Přehled patologie pro bakalářské zdravotnické obory. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2005, 112 s. ISBN 80-246-1054-X
5. GUPTA, R. T. et al. D-Dimers and Efficacy of Clinical Risk Estimation Algorithms: Sensitivity in Evaluation of Acute Pulmonary Embolism. *American Journal of Roentgenology*. 2009, vol. 193, no. 2, s. 425-43
Dostupné z: <http://www.ajronline.org/content/193/2/425.full>
6. HEIM, S. W. et al. D-dimer testiny for deep venous thrombosis: A metaanalysis. *Clinical Chemistry*. 2004, vol. 50, no. 7, p. 1136-114
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/50/7/1136.full>
7. CHALMERS, E. et al. Guideline on the Investigation, Management and Prevention of Venous Thrombosis in Children*. *British Journal of Haematology*. 2011, vol 154, p. 196–207
Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2010.08543.x/pdf>

8. CHROMÝ, V. et al. Bioanalytika: analytická chemie v laboratorní medicíně, Brno: Masarykova univerzita, 2002, 267 s. ISBN 80-210-2917-X
9. KLINE, J. A. et al. D-Dimer Concentrations in Normal Pregnancy: New Diagnostic Thresholds Are Needed, *Clinical Chemistry*, 2005, vol. 51, no. 5, p. 825-829
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/51/5/825.full.pdf+html>
10. KORTE, W., RIESEN, W. Latex-enhanced Immunoturbidimetry Allows D-Dimer Determination in Plasma and Serum Samples. *Clinical Chemistry*. 2000, vol. 46, no. 6, p. 871-872
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/46/6/871.full>
11. KRIŠTUFOVÁ, H. D-dimer, Jindřichův Hradec: Oddělení hematologie a krevní transfúze, 2011, 6 s.
12. Kubisz, P. a kolektiv Hematológia a transfuzológia: učebnica. 1. vydání. Praha: Grada, Bratislava: Grada Slovakia, 2006, 323 s. ISBN 80-8090-000-0
13. KVASNIČKA, J. Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2003, 299 s. ISBN 80-7169-993-4
14. LITZMAN, J. et al. Základy vyšetření v klinické imunologii. 1. vydání. Brno: Masarykova Univerzita, 2007, 59 s. ISBN 978-80-210-4227-8
15. LOWE, G. D. O. Can Haematological Tests Predict Cardiovascular Risk? The 2005 Kettle Lecture. *British Journal of Haematology*. 2006, vol. 133, no. 3, p. 232-250
Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2006.06021.x/full>

16. PENKA, M. et al. Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC). 1.vydání. Praha: Grada Publishing, 2003, 231 s. ISBN 80-247-0341-6
17. PENKA, M. et al. Hematologie I: Neonkologická hematologie. Praha: Grada Publishing, 2001, 201 s. ISBN 80-247-0023-9
18. POHANKA, M. Biosenzory pro stanovení chemických a biologických agens: studijní pomůcka. 1. vydání, Hradec Králové: Univerzita obrany, 2009, 56 s. ISBN 978-80-7231-336-5
19. QUASEEM, A. et al. Current Diagnosis of Venous Thromboembolism in Primary Care: A Clinical Practice Guideline from the American Academy of Family Physicians and the American College of Physicians. *Annals of Family Medicine*. 2007, vol. 5, no.1, s. 57-62
Dostupné z: <http://www.annfammed.org/content/5/1/57.full>
20. RACEK, J. Klinická biochemie. 2. vydání. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-7262-324-9
21. SAENGER, A.K., CHRISTENSON, R.H. Stroke Biomarkers: Progress and Challenges for Diagnosis, Prognosis, Differentiation and Treatment. *Clinical Chemistry*. 2010, vol. 56, no.1, s. 21-33
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/56/1/21.full>
22. SAKURADA, K. et al Usefulness of a Latex Agglutination Assay for FDP D-Dimer to Demonstrate the Presence of Postmortem Blood, 2005, *Int J Legal Med*, vol 119, p. 167-171
Dostupné z:
<http://deemzet.nl/documenten/pdf/fibrinolysis%20test%20als%20detectie%20mi ddel.pdf>
23. SEGAL, J. B. et al. Review of the Evidence on Diagnosis of Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism. *Annals of Family Medicine*. 2007, vol. 5, no. 1, p. 63-73 [cit 2012-10-22]
Dostupné z: <http://www.annfammed.org/content/5/1/63.full>.

24. SEDLÁČEK, P. Jak se vyznat v laboratorních hodnotách: Jak správně rozumět laboratorním výsledkům?, Jaké jsou normální hodnoty?, Co znamenají odchylky? Praha: Eminent, 2006, 145 s. ISBN 80-7281-256-4
25. SCHUTBENS, R. E.G. et al. No Influence of Heparin Plasma and Other (Pre)analytic Variables on D-Dimer Determinations. *Clinical Chemistry*. 2002, vol. 48, no. 9, p. 1611-1613
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/48/9/1611.full>
26. SKALICKÁ, H. a kolektiv. Předoperační vyšetření: návody pro praxi. 1. vydání. Praha: Grada, 2007, 149 s. ISBN 978-80-247-1079-2
27. SOBOTKA, P. et al. Pathophysiology: Laboratory Exercises. 1. vydání. Prague: Charles University, 2006, 90 s. ISBN 80-246-1043-4
28. SOVOVÁ, E., ŘEHOŘOVÁ, J. Kardiologie pro obor ošetrovatelství, 1. vydání, Praha: Grada Publishing. 2004, 156 s. ISBN 80-247-1009-9
29. STEFFEN, H.M. et al. Diferenciální diagnostika ve vnitřním lékařství, 1. české vydání. Praha: Grada Publishing, 2010, 391 s. ISBN 978-80-247-2780-6
30. STRŽÍTESKÝ, J. Patologie: [učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium]. 1. vydání. Olomouc: Epava, 2001, 338 s. ISBN 80-86297-06-3
31. TRIPODI, A. D-dimer Testing in Laboratory Practice. *Clinical Chemistry*. 2011, vol. 57, no. 9, p. 1256-1262
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/57/9/1256.full>
32. TRIPODI, A., MANNUCCI, P. M. Laboratory Investigation of Thrombophilia. *Clinical Chemistry*. 2001, vol. 47, no. 9, p. 1597-1606
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/47/9/1597.full>
33. VOJÁČEK, J., Malý, M. Arteriální a žilní tromboza v klinické praxi. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2004, 276 s. ISBN 80-247-0501-X
34. VOKURKA, M., Hugo, J. a kolektiv Praktický slovník medicíny. 8. vydání. Praha: Maxdorf, 2007, 518 s. ISBN 978-80-7345-123-3
35. WILSON, D. B., GARD, K. M. Evaluation of an Automated, Latex-Enhanced Turbidimetric D-Dimer Test (Advanced D-Dimer) and Usefulness in the

Exclusion of Acute Thromboembolic Disease. American Journal of Clinical Pathology. 2003, vol. 120, p. 930-937
Dostupné z: <http://ajcp.ascpjournals.org/content/120/6/930.full.pdf+html>

8. Klíčová slova

d-dimer

imunoturbidimetrie

latexová aglutinace

plicní embolie

trombóza

Key Words

d-dimer

immunoturbidimetry

latex-enhanced agglutination

pulmonary embolism

thrombosis

9. Přílohy

Příloha č. 1 Žádanka oddělení hematologie a krevní transfúze Nemocnice Jindřichův

Hradec, a.s.

Oddělení hematologie a krevní transfúze Nemocnice J. Hradec a.s.				
ŽÁDANKA O LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ			Podpis lékaře, razítko, adresa, IČZ/ICP	
Příjmení, jméno				
Číslo pojištěnce				
Diagnóza	Kód pojišťovny	Datum a čas odběru		
Statim	Požadované vyšetření označte křížkem. Vyšetření dostupné statim je označeno hvězdou *. Za metodou je uveden typ odebraného materiálu (B = krev)			
<input type="checkbox"/>	Krevní obraz *	B-K2EDTA	AT III - antitrombin III	B - citrát
<input type="checkbox"/>	Krevní obraz s rozpočtem leukocytů *	B-K2EDTA	D-dimer*	B - citrát
<input type="checkbox"/>	Rozpočet leukocytů mikroskopicky	B-K2EDTA	Trombofilní stavy koagulační screening	B - citrát
<input type="checkbox"/>	Retikulocyty	B-K2EDTA	Protein S	B - citrát
<input type="checkbox"/>	LE buňky	Srážlivá krev	Protein C	B - citrát
<input type="checkbox"/>	Quick - tromboplastinový test*	B - citrát	Hladina faktoru VIII	B - citrát
<input type="checkbox"/>	APTT*	B - citrát	Laboratorní číslo	
<input type="checkbox"/>	Fibrinogen *	B - citrát		
<input type="checkbox"/>	Trombinový čas*	B - citrát		
<input type="checkbox"/>	Krvácivost dle Duke	B - citrát		

Podrobné informace jsou dostupné na internetu i internetu Nemocnice J. Hradec a.s. v laboratorní příručce oddělení. 2075.1

Příloha č. 2 Centrifuga Megafuge 1.0 (Zdroj: vlastní foto)



Příloha č. 3 Centrifuga Rotofix 32 (Zdroj: vlastní foto)



Příloha č. 4 Zásobník na vzorky (*Zdroj: vlastní foto*)



Příloha č. 5 Rotor s reakčními květy (*Zdroj: vlastní foto*)



Příloha č. 6 Promývací roztok Wash-R a dilutory (pipetovací jehly) (*Zdroj: vlastní foto*)



Příloha č. 7 Tabulka naměřených hodnot d-dimeru a diagnóz, řazeno podle pohlaví
a roku narození

Číslo vzorku	Pohlaví	Rok narození	Koncentrace d-dimeru [ng/ml]	Diagnóza
1	muž	25	355,2	Městnavé selhání srdce
2	muž	26	472,7	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
3	muž	27	255,6	Anémie
4	muž	28	1151,2	Cystitida
5	muž	28	221,4	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
6	muž	28	330,9	Esenciální (primární) hypertenze
7	muž	31	698	Mdloba - synkopa a zhroucení - kolaps
8	muž	32	122,2	Mdloba - synkopa a zhroucení - kolaps
9	muž	34	2471,1	Esenciální (primární) hypertenze
10	muž	34	> 5250	Subdurální krvácení (akutní) (neúrazové)
11	muž	35	369,7	Akutní infekce HCD
12	muž	36	886,7	Horečka
13	muž	37	166,5	Vada koagulace
14	muž	37	101	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
15	muž	39	3414	Esenciální (primární) hypertenze
16	muž	40	279,8	Bolest hrudi
17	muž	41	1664	Chronické selhání srdce
18	muž	41	3146,6	Dušnost - dyspnoe
19	muž	42	> 5250	Nestabilní angína (pectoris)
20	muž	42	244	Dušnost - dyspnoe
21	muž	43	857,2	Dušnost - dyspnoe
22	muž	44	217,4	Pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav
23	muž	44	649,1	Pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav
24	muž	45	1603,7	Esenciální (primární) hypertenze
25	muž	46	259,9	Bolest hrudi
26	muž	47	201,5	Dušnost - dyspnoe
27	muž	48	136,3	Fibrilace a flutter síní
28	muž	48	260,5	Městnavé selhání srdce
29	muž	50	298	Dušnost - dyspnoe
30	muž	51	206,1	Pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav
31	muž	52	714	Žilní městky dolních končetin se zánětem
32	muž	52	204,8	Bolest hrudi
33	muž	53	168,8	Dědičná sférocytóza

Číslo vzorku	Pohlaví	Rok narození	Koncentrace d-dimeru [ng/ml]	Diagnóza
34	muž	53	131	Fibrilace a flutter síní
35	muž	54	< 100	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
36	muž	54	439,1	Chronická ischemická choroba srdeční
37	muž	55	901,7	Sekundární a neurčený ZN - nitrohruční - intratorakální - mízní uzliny
38	muž	55	149,1	Bolest hrudi
39	muž	55	276,4	Dorzalgie, mnohočetné poškození páteře
40	muž	64	192,7	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
41	muž	65	119,2	Fibrilace a flutter síní
42	muž	66	130,3	Chronické selhání ledvin
43	muž	67	153,7	Pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav
44	muž	73	266,2	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
45	muž	73	236	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
46	muž	76	255,1	Vada koagulace
47	muž	76	235,9	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
48	muž	78	262,5	Pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav
49	muž	80	555,4	Pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav
50	muž	85	168,3	Bolest hrudi
51	muž	85	137	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
52	muž	89	155,8	Dušnost - dyspnoe
53	muž	99	153	Vada koagulace
54	žena	21	368,4	Selhání srdce
55	žena	21	537,1	Selhání srdce
56	žena	23	740,5	Nestabilní angína (pectoris)
57	žena	24	4842,2	Pokračující infarkt myokardu přední stěny
58	žena	24	1089,2	Akutní bronchitida
59	žena	25	1483,2	Dušnost - dyspnoe
60	žena	27	1875	Fibrilace a flutter síní
61	žena	28	289,3	Plicní embolie bez akutního cor pulmonale
62	žena	28	792,6	Dušnost - dyspnoe
63	žena	29	675,1	Bolest hrudi
64	žena	32	1658	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
65	žena	32	167,5	Hypoglykemie bez komatu způsobená léky

Číslo vzorku	Pohlaví	Rok narození	Koncentrace d-dimeru [ng/ml]	Diagnóza
66	žena	33	629,7	Bolest hrudi
67	žena	34	369,7	Dušnost - dyspnoe
68	žena	34	297,6	Dušnost - dyspnoe
69	žena	35	394,5	Diabetes melitus nezávislý na inzulinu s neurčitými komplikacemi
70	žena	38	169,4	Astma převážně alergické
71	žena	39	634,6	Selhání srdce
72	žena	39	1145,5	Fibrilace a flutter síní
73	žena	40	770	Dušnost - dyspnoe
74	žena	43	160,6	Mdloba - synkopa a zhroucení - kolaps
75	žena	43	177,6	Mozkový infarkt způsobený neurčitou inkluzí nebo stenózou mozkových tepen
76	žena	47	4234,8	Gastroenteritida a kolitida NS původu
77	žena	48	1272,2	Bolest v končetině, bérce
78	žena	49	153	Bolest hrudi
79	žena	51	3288	ZN - dolní lalok bronchus nebo plíce
80	žena	51	176,7	Dušnost - dyspnoe
81	žena	53	149,7	Fibrilace a flutter síní
82	žena	57	131,5	Dyspepsie
83	žena	58	137,9	Palpitace
84	žena	60	151,1	Diabetes melitus nezávislý na inzulinu s neurčitými komplikacemi
85	žena	60	181,2	Pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav
86	žena	63	218,6	Flebitida a tromboflebitida cév dolních končetin
87	žena	65	208,1	Zhoubný nádor - horní zevní kvadrant prsu
88	žena	67	147,9	Bolest hrudi
89	žena	73	330,7	Mdloba - synkopa a zhroucení - kolaps
90	žena	74	469,5	Vada koagulace
91	žena	76	3849,4	Selhání srdce
92	žena	78	272,3	Alergie
93	žena	79	256,6	Chronická rýma
94	žena	80	115,1	Pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav
95	žena	81	148,2	Endometrióza pánevní pobřišnice
96	žena	81	198,6	Abnormality bílých krvinek, nezařazené jinde
97	žena	86	330,3	Dušnost - dyspnoe
98	žena	89	160,6	Mdloba - synkopa a zhroucení - kolaps
99	žena	92	967,9	Pneumonie
100	žena	97	144,4	Vada koagulace