

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Koagulační vyšetření

Bakalářská práce

Autor: Lenka Rojdlová

Vedoucí práce: MUDr. Karel Blažek

Datum odevzdání: 5. 5. 2011

ABSTRACT: Coagulation examination

Today coagulative examination belongs to the hematological tests which are often required namely as part of pre-surgery examinations and in frame of anti-coagulative therapy observation. The basic coagulative examinations are activated partial thromboplastine time (aPTT), prothrombinal time (PT), determination of blood platelets amount and the time of bleeding (Duke's time). These examinations enable us to find out whether a disorder of internal or external way of coagulative cascade occurs or if it applies to thrombocytopeny or a functional blood platelets disorder. This thesis focuses on research what is the influence on the aPTT examination and PT time interval result between the patient's blood taking and its laboratory analysis.

The coagulative cascade is stated in the theoretical part along with its main ways according to the latest literary data and additions. The following chapter deals with coagulative factors which take part in the coagulative cascade activation. Attention is also dedicated to blood platelets and next possible pathology of haemostasia. The biggest part deals with the methods of coagulative determination. The thesis focuses also on analytical processes during coagulation examination, as well as the significance of non-analytic examination phase is emphasized here.

The practical and research part of my thesis was performed in the laboratory Laboma, s.r.o. České Budějovice, where I examined 50 random samples chosen of daily routine operation from various patients. In all these samples coagulative examination with aPTT and PT tests was carried out at different time intervals after the blood taking. The aim was to verify how final values of the stated coagulation examinations change if these are carried out after a longer time than recommended in the laboratory practice. In both used coagulation tests, before the sample analysis, verification was made to prove the outcome exactness. Verification is also the practical part of this thesis.

On the basis of measured outcomes, I carried out the statistical evaluation which shows how measured values differ depending on the blood taking time interval and whether it is possible to perform these coagulation examinations in a different time interval from blood taking.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Koagulační vyšetření vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému vedoucímu bakalářské práce MUDr. Karlovi Blažkovi za jeho přátelský přístup a poskytování důležitých informací, které mi pomohly při psaní této bakalářské práce. Dík patří i paní Aleně Fálové za její cenné rady a pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

Úvod	7
1. Současný stav – teoretická část	8
1.1 Koagulační kaskáda	8
1.1.1 Cesty koagulace	8
1.2 Koagulační faktory	10
1.2.1 Proenzymy – enzymy	10
1.2.2 Kofaktory	12
1.2.3 Fibrinogen	12
1.3 Trombocyty	13
1.4 Patologie hemostázy	13
1.4.1 Poruchy destičkové složky	14
1.4.2 Poruchy cévní složky	14
1.4.3 Koagulopatie	15
1.5 Koagulační stanovení	15
1.5.1 Typy koagulačních stanovení	16
1.5.1.1 Optické metody	16
1.5.1.1.1 Automatický koagulační analyzátor CEVERON® Alpha	17
1.5.1.2 Elektromechanické metody	17
1.5.1.3 POCT (Point-of-care testing)	18
1.5.2 Metody popisující hemostázu	18
1.5.2.1 Globální testy	19
1.5.2.2 Skupinové testy	19
1.5.2.3 Specifické testy	21
2. Cíl	22
2.1 Cíl práce	22
2.2 Předpokládané hypotézy	22
3. Metodika	23
3.1 Část preanalytická	23

3.2 Část analytická	24
3.2.1 Příprava, skladování a stabilita reagensů	24
3.2.2 Kalibrace metod	25
3.2.3 Měření kontrol	27
3.2.4 Vlastní měření	27
3.2.5 Výpočet výsledků	28
3.2.6 Kontrola kvality	29
3.2.6.1 Validace	29
3.2.6.2 Verifikace	30
3.2.7 Ověřování naměřených hodnot	30
3.2.7.1 Opakovatelnost a mezilehlá preciznost (přesnost)	30
3.2.7.1.1 Aritmetický průměr	31
3.2.7.1.2 Směrodatná odchylka	31
3.2.7.1.3 Variační koeficient	31
3.2.7.2 Vychýlení (bias) metody	32
3.2.7.3 Kombinovaná nejistota	33
4. Výsledky	34
4.1 Ověřování správnosti výsledků pomocí verifikace	34
4.2 Naměřené hodnoty a jejich statistické vyhodnocení	34
4.2.1 Aritmetický průměr a směrodatná odchylka	37
4.2.2 Relativní odchylka	39
4.2.3 Párový t-test a dosažená hladina významnosti	41
5. Diskuze	42
6. Závěr	45
7. Seznam použité literatury	46
8. Klíčová slova	52
9. Přílohy	53

Úvod

Vyšetření koagulace se v dnešní době provádí v každé hematologické laboratoři. Předoperační vyšetření srážlivosti krve je racionální diagnostický základ, který by měl být proveden pacientům, kteří jdou na plánovaný operační výkon. Hlavním cílem předoperačního monitorování hemostázy je zvýšit bezpečnost pacientů, kteří podstoupí chirurgický zákrok (Kozek-Langenecker 2010). Dalším, mnohem důležitějším důvodem, kdy se provádí pravidelné vyšetření koagulace je monitorování antikoagulační terapie. Nejčastěji prováděné vyšetření je vyšetření časů zevní a vnitřní cesty koagulace (PT a aPTT). Případné prodloužení časů může být důsledkem nepřítomnosti jakéhokoliv koagulačního faktoru nebo jeho nedostatečnou aktivací. Nejčastěji vyskytující se nedostatek koagulačního faktoru je nedostatek FVIII u jedinců s hemofilií (Kershaw et al. 2009).

Věda i technika ve zdravotnictví v posledním desetiletí pokročila. Proto se už dnes nepoužívají k vyšetření koagulace manuální metody, ale nahradily je automatické koagulační analyzátory nebo-li koagulometry. Tyto přístroje usnadní laborantkám práci a samozřejmě ušetří hodně času, který by strávily taháním prvního fibrinového vlákna u manuálních metod.

Systémy k vyšetření hemostázy jsou metody, které zjišťují hlavně účast složek plazmatického koagulačního a fibrinolytického systému v celkovém procesu hemostázy. Jedná se především o funkční testy – koagulační metody, spektrofotometrické metody, ale i metody ke stanovení antigenu (Pecka et al. 2010). V této práci se budu zabývat pouze metodami koagulačními. Zcela nejnovější metodou, která usnadní koagulační vyšetření je systém CoaguChek XS, nebo-li monitorování metodou POCT (Point-of-care testing).

Laboratoř Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích, kde jsem prováděla praktickou část své práce má k dispozici automatický koagulační analyzátor CEVERON® Alpha, na kterém jsem vyšetřovala náhodně vybrané pacientské vzorky. U těchto vzorků jsem zjišťovala, jaký vliv má časový faktor na kvalitu vyšetření, pokud se vyšetření provádí v delším časovém intervalu od odběru než je doporučeno.

1. Současný stav – teoretická část

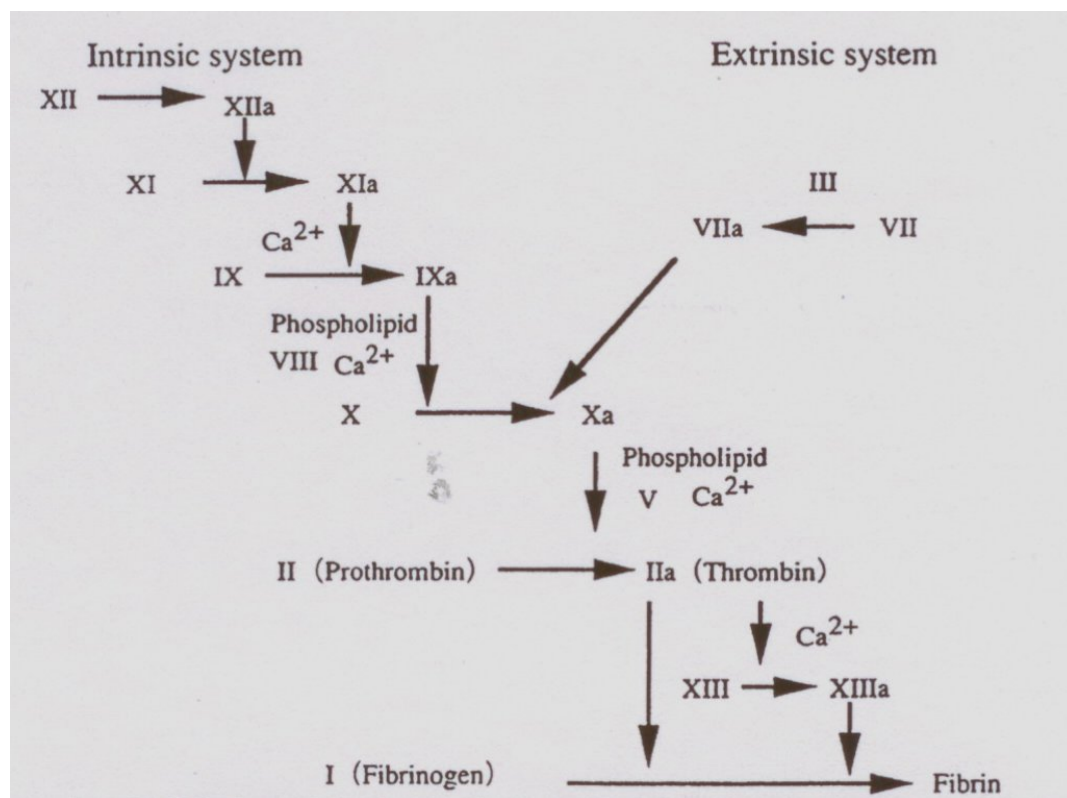
1.1 Koagulační kaskáda

Koagulační kaskáda, jinak také zvaná plazmatický koagulační systém představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku nerozpustného fibrinu (Pecka 2004). Cílem tohoto systému je tedy přeměna fibrinogenu na fibrin, který stabilizuje destičkový trombus a vytváří tak, v součinnosti s krevními buňkami červený (definitivní) trombus. Tato přeměna je uskutečňována sérií na sebe navazujících enzymatických reakcí (Kubisz et al. 2006). Koagulační kaskáda se podle způsobu aktivace dělí na zevní a vnitřní systém (Matýšková et al. 1999). Hlavním iniciátorem koagulační kaskády je tkáňový faktor (Mitroulis et al. 2010). Aktivace koagulační kaskády vzniká vytvořením komplexu TF s FVIIa. Tento komplex přímo aktivuje koagulační faktory FIX a FX, které v poslední řadě vedou ke vzniku fibrinu a vytvoření koagula (Holy, Tanner 2010).

1.1.1 Cesty koagulace

Při srážení krve oběma způsoby, jak cestou vnější tak vnitřní má důležitou úlohu fosfolipidová složka. K aktivaci zevní (tkáňové) cesty je zapotřebí tkáňového faktoru (TF), který se uvolňuje např. v případě poranění (Matýšková et al. 1999). Při této cestě se uplatňuje fosfolipid, který je spolu s tkáňovým faktorem součástí tkáňového tromboplastinu. Za působení tohoto fosfolipidu spolu s vápenatými ionty dochází k přímé aktivaci FX na FXa, který byl aktivován komplexem TF a FVIIa. Pro vnitřní (plazmatickou) cestu poskytuje fosfolipid trombocyty ve formě destičkového faktoru 3. Při této plazmatické cestě se postupně aktivují některé plazmatické faktory (Hrubíško et al. 1983). Děje se to aktivací, kdy dochází ke kontaktu FXII a FXI s aktivním povrchem, fyziologicky kolagenem obnaženým po poranění (Matýšková et al. 1999). Aktivní FXII spolu s prekalikreinem a HMWK (vysokomolekulárním kininogenem) aktivuje FXI a ten FIX, který za kofaktorového působení aktivuje FVIIIa a za působení

destičkového fosfolipidu aktivuje FX (Matýšková 2010). Za vlastní aktivaci protrombinu odpovídá FXa, ať už jde o aktivaci vnitřní nebo vnější cestou. Od aktivace FX je další cesta koagulace (přeměna protrombinu na aktivní trombin) až po přeměnu fibrinogenu na fibrin stejná (Hrubiško et al. 1983). Přeměna protrombinu na trombin je uskutečňována pomocí aktivního FV, Ca^{2+} a fosfolipidu (obr. 1) (Kurata, Horii 2004). Je to klíčový proces, který určuje rozsah hemostatické zástrčky nebo trombotického procesu. Následné roztržení trombinu je zásadní pro vytvoření stabilní fibrinové sraženiny (Salvagno, Berntorp 2010). Poslední nejdůležitější reakcí je přeměna fibrinogenu na fibrin za účasti trombinu. Trombin s Ca^{2+} aktivuje FXIIIa, který zodpovídá spolu s trombinem za vznik pevného fibrinového vlákna (Matýšková 2010).



Zdroj: Kurata, Horii 2004

Obr. 1: Kaskáda koagulačních faktorů

Do procesu krevní koagulace patří a systém fibrinolýzy, který ale není předmětem mé práce, proto zde není popsán.

1.2 Koagulační faktory

Většina koagulačních činitelů je tvořena v játrech, některé potřebují k syntéze vitamín K, jsou to tzv. K-dependetní faktory. Většina z nich, mimo fibrinogenu a protrombinu se nachází v plazmě ve velmi nízkých koncentracích. Převážná část faktorů, s výjimkou tkáňového faktoru, je v plazmě přítomna ve formě proenzymu (koenzymu) a pro svou správnou funkci vyžaduje proteolytické štěpení, při kterém z původního proenzymu vzniká koagulačně aktivní enzym. Jediný z faktorů, který koluje v cirkulaci v aktivní formě, ale ve velmi nízkých koncentracích, je FVIIa. Většina faktoru VII je přítomna v plazmě v podobě neaktivního proenzymu. V případě koagulačních faktorů se jedná převážně o glykoproteiny charakteru proenzymů a kofaktorů, které v procesu krevního srážení prodělávají strukturální změny. Faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein po rozštěpení vykazují enzymatickou aktivitu a řadí se mezi serinové proteázy. Jejich aktivní místo obsahuje serin. Jiné koagulační faktory se po rozštěpení účastní tvorby koagulačně aktivních komplexů a chovají se jako kofaktory. Jsou to především faktory VII, V a vysokomolekulární kininogen (HMWK) (Pecka 2004).

1.2.1 Proenzymy – enzymy

Většina enzymů, které se podílí na koagulaci, jsou serinové proteázy, mají tedy v aktivním místě enzymu aminokyselinu serin. Tato skupina koagulačních faktorů se dělí ještě na tři podskupiny, do které se už jednotlivé faktory zařazují.

Jako první jsou faktory závislé na vitamínu K, tzv. K-dependetní faktory. K jejich řádné funkci je potřeba vitamínu K, který je nutný pro karboxylaci γ -karboxyglutamátového zbytku. Na vitamínu K závislé faktory jsou FII, VII, IX, X. Tyto faktory jsou při nedostatku vitamínu K sice tvořeny, ale nevznikají jejich aktivní formy.

Faktor II nebo-li protrombin vzniká v játrech (Matýšková et al. 1999). Jeho aktivní forma trombin hraje zásadní roli jak v koagulaci, tak i v antikoagulaci či fibrinolýze (Licari, Kovacic 2009). Vedle štěpení fibrinogenu v koagulační kaskádě katalyzuje trombin tři skupiny reakcí, které slouží k regulaci tvorby koagula. První skupina zahrnuje aktivaci buněk, čímž vzniknou povrchy, na kterých mohou koagulační reakce probíhat. Druhá skupina reakcí slouží k posílení probíhající koagulace a zpevnění vznikajícího koagula. Poslední typ reakcí je naopak nutný k zabránění nadměrnému srážení. Jedná se o reakce vedoucí k inaktivaci faktorů krevního srážení. Trombin zasahuje i v jiných systémech, hraje důležitou roli při poranění v procesech zástavy krvácení, zánětu a hojení. (Matýšková et al. 1999). Zvýšená hladina protrombinu je spojena s rizikem vzniku arteriální a žilní trombózy (Scott et al. 2004). Faktor VII, který se syntetizuje v játrech, je přítomen také v séru. Je aktivován FXa, FXIIa, FXIa, FIXa, ale i komplexem TF-FVIIa. Jeho aktivita se pomalu zvyšuje s věkem a v těhotenství (Matýšková et al. 1999). Faktor IX, který je nalézán i v séru, je potřebný k zástavě krvácení a jeho nedostatek je příčinou hemofilie B (Sineuridze et al. 2010). Je aktivován FXIa, ale také FVIIa. Jeho aktivní forma má strukturu podobnou trypsinu. Faktor X je také tvořen v játrech a je obsažen v séru. Je aktivován tenázou, což je komplex FIXa, PL (fosfolipidu), Ca^{2+} a FVIIIa a nebo je aktivován komplexem TF-FVIIa. Aktivovaná forma tohoto faktoru v přítomnosti PL a Ca^{2+} aktivuje FV na FVa (Matýšková et al. 1999). Nedostatek FX je vzácný a jeho diagnostika je založena na současném prodloužení PT i aPTT (Menegatti, Peyvandi 2009).

Další podskupinou jsou faktory citlivé k trombinu, kam se řadí faktor XIII nebo-li fibrin stabilizující faktor. Je to poslední faktor koagulační kaskády (Matýšková et al. 1999). Jde o klíčový regulátor fibrinolýzy. FXIII je přítomný v trombocytech, monocyttech a v makrofázích (Muszbek et al. 2010). Jeho aktivní forma hraje důležitou roli v hemostáze, hojení ran a udržení těhotenství.

A jako poslední podskupina proenzymů jsou faktory fáze kontaktu, mezi které patří FXII a FXI. Faktor XII je nalézán jak v plazmě, tak i v séru (Matýšková et al. 1999). Je to koagulační protein, který je nezbytný pro testy krevní srážlivosti, ale jeho nedostatek není spojen s krvácením (Stavrou, Schmaier 2010). Zvýšená hladina FXII je

u žen v těhotenství a po menopauze. Faktor XI je zymogen proteázy plazmy a je tvořen především v játrech (Martincic et al. 1999). Jeho aktivní forma přispívá k hemostáze při aktivaci FIX (Emsley et al. 2010). FXI je aktivován limitovanou proteolýzou FXIIa, trypsinem, FVIIa, ale i trombinem v přítomnosti negativně nabitých částic (Matýšková et al. 1999).

1.2.2 Kofaktory

Kofaktory se dělí na plazmatické a buněčné.

Do plazmatických kofaktorů se řadí FV a FVIII (Matýšková et al. 1999). FV se tvoří v játrech a v megakaryocytech, ale je také přítomný v plazmě a v granulích krevních destiček. Je aktivován limitovanou proteolýzou trombinem a FXa. FVIII se v plazmě vyskytuje ve stopovém množství, kde je navázán na von Willebrandův faktor (vWF). Vazba s vWF stabilizuje FVIII tím, že ho chrání před biologickým štěpením aktivovaným proteinem C a FXa (Pecka et al. 2010).

Mezi buněčné kofaktory patří tkáňový faktor. Tento faktor není za normálního stavu přítomen na cévních endoteliích, krevních elementech a necirkuluje v plazmě. Nalézá se v adventicii tkání, na buňkách obklopující cévy, tedy na buňkách, které se fyziologicky nedostanou do kontaktu s krví. TF zahajuje koagulaci tvorbou komplexu s koagulačním faktorem FVII a FVIIa (Matýšková et al. 1999).

1.2.3 Fibrinogen

Fibrinogen je faktor s nejvyšší koncentrací v plazmě. Pro zachování struktury a stability tohoto faktoru hraje důležitou roli Ca^{2+} . Hladina fibrinogenu se zvyšuje při zátěžích jako je poranění, záněty a těhotenství (Matýšková et al. 1999). Příliš vysoká koncentrace fibrinogenu je hlavním rizikovým faktorem pro vznik trombózy a kardiovaskulárních chorob. Z fibrinogenu spolu s glykoproteinem je tvořena hlavní bílkovinná složka krevní sraženiny – fibrin, který velmi nečinně obíhá v krevním řečišti

(Scott et al. 2004). Vazba fibrinogenu s některými proteiny plazmy ovlivňuje proces formace fibrinu i jeho rozpouštění (Matýšková et al. 1999).

1.3 Trombocyty

Dalšími komponenty, které hrají zásadní roli při srážení krve jsou trombocyty. Aktivně se také podílí u zánětlivých procesů a při hojení ran (Dame et al. 2006). Aktivace trombocytů je rozhodující pro jejich správnou funkci, která zahrnuje komplexní souhry adheze a signalizačních molekul (Jurk, Kehrel 2005). Aktivace krevních destiček nastane např. při porušení cévní stěny, poté změní svůj diskoidní (klidový) tvar na tvar s kulovitými výběžky a přilepí se na svůj povrch. Tento proces se nazývá adheze a vyžaduje přítomnost několika adhesivních proteinů, zejména se zde uplatňuje vWF, fibronektin, fibrinogen a část Ca^{2+} . V další fázi se destičky lepí na sebe, jde o tzv. agregaci. Agregaci způsobuje ADP uvolněný z poraněné tkáně a ADP uvolněný z hutných granul, které se uvolňují při změně tvaru trombocytů. Adhesivní a agregační schopnost destiček odpovídá za vznik primární hemostatické zátky. Jen na ní se pak může vytvořit pevná sekundární fibrinová hemostatická zátka ve formě fibrinové sítě nebo koagula. Spolu s ADP se uvolňují z trombocytů i další látky zesilující agregaci, tedy látky, které způsobují smrštění cévní stěny, tzv. vazokonstrikci a látky, které zasahují do procesu srážení krve. Významnou úlohou krevních destiček je smršťování nebo-li retrakce fibrinové sraženiny nebo koagula (Hrubíško et al. 1983). In vitro dochází k vytlačení séra ze smršťujícího se koagula a in vivo slouží k podpoře uzavření rány (Matýšková et al. 1999).

1.4 Patologie hemostázy

Koagulační poruchy jsou poměrně časté. Intenzivní péče se poskytuje pacientům, kteří trpí těžkou trombocytopenií, pacientům, u kterým se provádějí dlouhodobé globální testy srážlivosti a v neposlední řadě pacientům, které postihla diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) (Levi, Schultz 2010). Při poruše

některých složek hemostázy dochází k prodloužení času krvácení a k opožděnému hojení.

1.4.1 Poruchy destičkové složky

Pokud jde o snížení počtu trombocytů, jedná se o trombocytopenii. V případě kvalitativního nedostatku trombocytů jde o trombocytopatii. Obě tyto poruchy mohou způsobit poruchu v hemostáze (Hrubíško et al. 1983).

1.4.2 Poruchy cévní složky

Zánětlivé nebo alergické změny drobných cév mohou vést ke zvýšení propustnosti cévní stěny a k pronikání krve do okolních tkání, tím se na kůži a sliznicích tvoří krevní výrony.

Mezi vrozené poruchy patří vrozená teleangiektázie, která se projevuje jasně červenými uzlíčky na rtech, čele, tvářích, na nosní a ústní sliznici, ale i v zažívacím traktu. Tyto uzlíčky jsou velikosti špendlíkové hlavičky, v místě výdutě cévy snadno prasknou, nereagují vazokonstrikcí a těžko se zde tvoří hemostatická zátka (Hrubíško et al. 1983).

Mezi získané choroby patří degenerativní nebo zánětlivé změny na cévách, které mohou být příčinou trombózy. Krevní destičky hrají důležitou roli při tromboembolických onemocněních, přispívají ke vzniku trombů, které mohou vést k těžkým komplikacím, jako jsou cévní mozkové příhody nebo infarkt myokardu (Lowenberg et al. 2010). Trombóza a její komplikace v současné době zaujímají první tři místa kardiovaskulárních chorob, které jsou hlavní příčinou nemoci a úmrtnosti na celém světě (Owens, Mackman 2010).

Pokud vznikají tromby v kapilárách ve většině tkáních, jedná se o diseminovanou intravaskulární koagulaci, kdy je nejčastější příčinou uvolnění tkáňového tromboplastinu z poškozených tkání (Hrubíško et al. 1983).

1.4.3 Koagulopatie

Při koagulopatiích se jedná o nedostatek plazmatické složky, defekt se může týkat jakéhokoli faktoru. Mohou být jak vrozené, tak i získané.

Vrozené choroby jsou vzácné, nejčastěji se vyskytující je hemofilie A. Tato nemoc je vázaná na X chromozom, postihuje tedy jedince mužského pohlaví, ženy jsou v tomto případě přenašečky. Jde o snížení nebo chybění koagulačního FVIIIa. Další vrozená koagulopatie je hemofilie B, kdy je o snížení nebo nedostatek FIX. Obě tyto choroby jsou nevyléčitelné, dochází pouze k náhradě nebo substituci chybějícího faktoru. Stejně tak vyskytující se koagulopatií je von Willebrandova choroba (Hrubisko et al. 1983), kdy chybění vWF vede ke krvácení (Wang, Eikenboom 2010). Tato choroba postihuje muže i ženy, chybění FVIIIa je menší než u hemofilie A. Ostatní vrozené defekty faktorů jsou velmi vzácné.

Získané koagulopatie se na rozdíl od vrozených koagulopatií vyznačují snížením ne jednoho, ale zpravidla celé skupiny koagulačních faktorů. Toto snížení se objevuje zejména při onemocnění jater, při antikoagulační léčbě a při chorobné aktivaci procesu srážení krve (Hrubisko et al. 1983).

1.5 Koagulační stanovení

Koagulační vyšetření je jednou z metod laboratorního vyšetření krve. Toto stanovení se používá při vyšetření hemostázy. Hemostáza je komplexní proces, na kterém se podílí řada složek a mechanismů a jehož cílem je zástava krvácení (Pecka 2004). Je to proces, který je založen na složité interakci mezi cévní stěnou, krevními buňkami a koagulačními proteinů. Vyšetření hemostázy zahrnuje laboratorní testy, kterými jsou testy vyšetření koagulace, fibrinolytické testy a vyšetření funkce krevních destiček (Tluerlemann et al. 2009). Porucha hemostázy, která může způsobit vážné krvácení musí být vyloučena před každým operačním výkonem nebo jinou invazivní procedurou (Albert et al. 2009). Další indikací pro koagulační vyšetření je monitorování antikoagulační terapie u dlouhodobě léčících se pacientů. Mezi nejčastější koagulační

testy patří aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) a protrombinový čas (PT). Principem každého koagulačního stanovení je měření reakčního času od spuštění reakce až po vytvoření zjizitelného koagula nebo fibrinového vlákna (Pecka 2004).

1.5.1 Typy koagulačních stanovení

Existují dva typy koagulačních stanovení, manuální a přístrojové (koagulometry).

Manuální typ stanovení se v dnešní době ke stanovení koagulace nepoužívá. Jeho princip byl založen na detekci prvního fibrinového vlákna v koagulačním médiu pomocí háčku v temperované lázni. Měřil se koagulační čas od okamžiku přidání startovací reagentie až do vytvoření fibrinového vlákna (obr. 2; viz. 9. Přílohy). Přístrojové stanovení (pomocí koagulometrů) je trojího typu, jsou tedy založeny na třech principech. Na dvou principech jsou založeny metody elektromechanické, na jednom principu metoda optická.

1.5.1.1 Optické metody

Optická metoda využívá principu monochromatického světelného záření procházející kyvetou, které na fotobuňku propouští nebo odráží jen určité množství záření. Optická hustota prošlého záření je pak dána vlastností média v určitém stavu koagulačního děje. Měří se snížení optické hustoty buď tvorbou fibrinové struktury (stroměčková struktura) nebo tvorbou koagula. Využívá metod turbidimetrie a nefelometrie. Optické koagulometry mohou mít problémy se stanovením hemolytických, lipemických nebo ikterických vzorků (Pecka 2004), což může ovlivnit přesnost měření. Takovéto vzorky by neměly být vyšetřovány.

1.5.1.1.1 Automatický koagulační analyzátor CEVERON® Alpha

Laboratoř Laboma s.r.o. používá k provádění koagulačních vyšetření v plazmě plně automatický koagulační analyzátor Caveron® Alpha (obr. 3; viz. 9. Přílohy). K analyzátoru je připojen osobní počítač, který může být doplněn tiskárnou, kterou se následně tisknou výsledky. Přístroj pracuje na fotometrickém principu měření. Koagulační čas je vyhodnocen na základě optického měření změny turbidity, způsobené tvorbou fibrinových vláken. Vzorky lze analyzovat v jejich původních odběrových zkumavkách.

Analyzátor je tvořen rotorem pro vzorky, jehož 42 pozic je uspořádáno do kruhu. Vnější kruh má 24 pozic pro odběrové zkumavky a vzorky statimové, všechny jsou snímány čtečkou čárových kódů. Vnitřní kruh má 6 pozic pro kontroly a kalibrátory, 6 pozic pro mikrozkušavky a 6 pozic pro speciální nádobky o objemu 3 ml. Další důležitou součástí je měřicí květový rotor. Tento rotor s měřicími květy má 84 pozic a jeho teplota je nastavena na 37 °C. Do těchto květů jsou pomocí pipetovacích ramen (jehel) dávkovány reagenty a vzorky (kontroly, kalibrátory) o objemu 500 µl. Aby se zabránilo kontaminaci, jsou pipetovací jehly po každém kroku propláchnuty v proplachovacích stanicích. Obě pipetovací jehly jsou napojeny na senzor hladiny, která měří konduktivitu na povrchu jehel. Lze tak určit objem kapaliny v reagentních nádobkách i ve zkumavkách vzorků. Když se jehla dotkne hladiny s kapalinou, je zaznamenána změna konduktivity. Tento impuls je elektronicky zpracován a počítač vyhodnotí zbývající objem kapaliny v nádobce.

Aby se zamezilo případným chybám a poškození přístroje, jsou na analyzátoru umístěny diody LED, které signalizují jeho stav (Stručná uživatelská příručka).

1.5.1.2 Elektromechanické metody

Elektromechanické metody se rozdělují do dvou hlavních skupin: na metody háčkové a kuličkové.

Háčkové metody používají měřicí kyvety, kde jsou zasunuty dvě elektrody. Pravá elektroda je pohyblivá, levá elektroda je pevná. Na tyto elektrody je přiváděn elektrický proud a jakmile dojde k vytvoření prvního fibrinového vlákna, proběhne elektrický impuls mezi elektrodami a zastaví se ukazatel času. Zjišťuje se tedy proběhnutí elektrického signálu mezi elektrodami.

Druhou skupinou jsou metody kuličkové, které využívají principu kovové kuličky, která se pohybuje v magnetickém poli a vlivem změny viskozity prostředí po spuštění koagulačního procesu dojde k vychýlení kuličky z jejího dřívějšího směru. Detekuje se tedy změna magnetického pole po vychýlení kuličky. Tato změna je pak převedena na elektrický impulz, který zastaví ukazatel času. (Pecka et al. 1998). Na velmi podobném principu jako tyto kuličkové metody byly dříve založeny metody manuální, kde se první fibrinové vlákno tahalo háčkem.

1.5.1.3. POCT (Point-of-care testing)

Novým typem přístroje, který má usnadnit práci a může monitorovat protrombinový čas u lůžka pacienta či v domácí péči je systém CoaguChec XS. Tento systém se používá ke kvantitativnímu stanovení při monitoringu protrombinového času pomocí testovacích proužků s použitím kapilární krve odebrané z konečku prstu nebo nativní žilní krve. Testovací proužek obsahuje lyofilizované činidlo. Reaktivní složky tohoto činidla se skládají z tromboplastinu a peptidového substrátu. Po nanesení vzorku tromboplastin aktivuje koagulaci, což vede k tvorbě trombinu (Pecka et al. 2010). Na rozdíl od laboratorních zkoušek je tento POCT (Point-of-care testing) prováděn i nekvalifikovanými nebo polovyškolenými osobami a v mnoha případech není předmětem přísných programů kontroly kvality, které existují v centrálních laboratořích (Perry et al. 2010).

1.5.2 Metody popisující hemostázu

Tyto metody se používají k diagnostice poruch hemostázy a trombózy (Matýšková et al. 1999). Můžeme je dělit na testy globální, které popisují celý jeden

nebo více srážecích procesů, na testy skupinové, ty popisují určitou část koagulačního děje a na testy specifické, u kterých se stanovuje jeden z koagulačních činitelů (Pecka 2004).

1.5.2.1 Globální testy

Představují jen orientační testy, dnes jsou nahrazovány testy skupinovými (Matýšková et al. 1999.)

Mezi tyto testy se řadí doba srážlivosti nativní krve (Lee – White), která se již v dnešní době nepoužívá, většinou ji nahrazují skupinové koagulační testy. Princip tohoto testu spočíval v určení času srážení nativní žilní krve. Měřil se čas od okamžiku odběru až po srážení krve za standardních podmínek (Pecka 2004). Podle velikosti zkumavky se normální hodnoty pohybovaly mezi 6-15 minutami (Matýšková et al. 1999).

Dalším testem je doba krvácení, při kterém se určuje čas, kdy dojde k zastavení krvácení při standardním vpichu. Je to rychlá orientační metoda, která nám poskytne první informace o funkci trombocytů (Pecka 2004). Nejčastěji používaná metoda je metoda dle Duke, kdy se určuje se doba, za kterou dojde k zástavě krvácení v místě standardního vpichu do ušního lalůčku. Normální hodnota je více než 270 sekund (Matýšková et al. 1999).

1.5.2.2 Skupinové testy

Mezi základní skupinové koagulační testy, které se v laboratořích nejčastěji provádějí patří aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) a protrombinový čas (PT). Provádění těchto koagulačních vyšetření vyžaduje znalost hlavních cest srážení (Green 2010).

Tromboplastinový čas dle Quicka – protrombinový čas (PT) je nejčastěji požadovaný koagulační test (Fevaloro et al. 2010). Je měřen z nesrážlivé krve – plazmy, do které se přidává citrát sodný (Knoschnewis et al. 2004). Tento základní koagulační

test monitoruje zevní koagulační systém (FF II, V, VII, X a fibrinogen). Přidáním tkáňového tromboplastinu s Ca^{2+} k testované citrátové plazmě se sleduje rychlost, za kterou se vytvoří fibrinové vlákno. Jeho tvorba závisí na faktorech zevního koagulačního systému. Výsledky tohoto testu se vyjadřují v sekundách, v procentech a v jednotkách INR. Normální hodnoty v sekundách se liší podle typu reagencie, rozmezí je 10 - 15 sekund. V procentech 70 - 120 % a v jednotkách INR 0,8 - 1,2 (Matýšková et al. 1999). INR je mezinárodní normalizovaný poměr, který je vypočítán za použití mezinárodního indexu citlivosti (ISI) a střední hodnoty protrombinového času (MNPT). Je tedy vypočítán podle vzorce: $\text{INR} = [\text{PT pacienta} / \text{MNPT}] (\text{ISI})$. ISI je hodnota pro konkrétní reagencie, které se používají při tomto testu (Fevaloro et al. 2010). Hodnota ISI se pohybuje kolem 1,0. Protrombinový čas se sleduje u antikoagulační terapie antagonisty vitamínu K (Osman, Lindahl 2009). K prodloužení časů dochází u vrozeného nedostatku F VII, X, II, V a fibrinogenu, dále u nedostatku vitamínu K, při léčbě antagonisty vitamínu K, při jaterním onemocnění, při léčbě heparinem a fyziologicky mají prodloužený PT novorozenci (Matýšková et al. 1999).

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) je nejpoužívanějším testem při monitorování terapie heparinem (Dudek et al. 2010). Sleduje vnitřní cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin a zachycuje faktory koagulačního systému (FF II, V, VIII, XI, X, XII, fibrinogen, prekalkrein a HMWK) (Pecka 2004). Po přidání parciálního tromboplastinu – kefalínu a Ca^{2+} k vyšetřované plazmě dochází k aktivaci koagulačního systému vnitřní cestou. Rychlost tvorby fibrinového vlákna závisí na koncentraci faktorů vnitřního systému. K urychlení aktivace je přidáván aktivátor (kaolin, křemičitany, kyselina elagová). Výsledky aPTT se vyjadřují v sekundách a v jednotkách Ratio (R). Tyto jednotky Ratio udávají poměr časů, $R = \text{čas testované plazmy} / \text{čas denního normálu}$, kde čas denního normálu je vypočítán jako průměrný čas 20-ti hodnot ze směsných plazem od 20-ti dárců. Hodnoty v sekundách se výrazně stejně jako u PT liší podle typu reagencí, rozmezí bývá 25 - 45 sekund. V jednotkách Ratio je rozmezí 0,8 – 1,2, toto rozmezí je pro všechny reagencie stejné. Prodloužení časů je u vrozeného nebo získaného nedostatku faktorů vnitřní cesty, při léčbě heparinem a fyziologicky také u novorozenců. (Matýšková et al. 1999).

Výsledek těchto testů může být ovlivněn nesprávnými preanalytickými technickými postupy, jako je způsob napíchnutí žíly při odběru, odběr krve, transport materiálu do laboratoře nebo podmínky skladování před vlastní analýzou. Také vzorky s viditelnou hemolýzou by neměly být vyšetřovány (Laga et al. 2006). Dalším faktorem kvality a správnosti vyšetření je čas mezi odběrem vzorku a jeho vyšetřením v laboratoři. Vzorky je nutné před samotným vyšetřením odstředit při pokojové teplotě (Lippi et al. 2006), k analýze se používá pouze krevní plazma.

1.5.2.3 Specifické testy

Tyto testy využívají zjišťování hladiny jednotlivých faktorů ve vnitřní nebo vnější cestě aktivace protrombinu. Většinou se sledují funkční charakteristiky dané látky a přítomnost antigenu (Pecka et al. 1998).

Specifické testy se většinou provádějí jen ve specializovaných laboratořích.

2. Cíl práce a předpokládané hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo ověření vlivu časového faktoru na kvalitu vyšetření a pomocí verifikace se ujistit, zda jsou použité metody spolehlivé a zaručují správnost naměřených výsledků.

2.2 Předpokládané hypotézy

Hypotéza 1: Předpokládá se, že rozhodujícím faktorem pro kvalitu koagulačního vyšetření je doba mezi odběrem krve pacienta a jejím vyšetřením v laboratoři. Doporučená doba zpracování vzorku je do 4 hodin po odběru.

Hypotéza 2: Předpokládá se, že provedení verifikace proběhne úspěšně, a že použitý analyzátor je plně funkční a poskytuje nám správné výsledky.

3. Metodika

V laboratoři Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích jsem měla k dispozici 50 náhodně vybraných patientských vzorků z denního rutinního provozu, které jsou do laboratoře svázeny od praktických lékařů. U těchto pacientů s různými diagnózami jsem vyšetřovala aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) a protrombinový čas (PT). V této kapitole jsou také uvedeny jednotlivé analytické části tohoto vyšetření.

3.1 Část preanalytická

Do této, velice důležité části, která může negativně ovlivnit výsledek vyšetření patří: příprava a poučení pacienta, odběr materiálu (krev), transport materiálu, příjem a identifikace vzorku a příprava vzorku (centrifugace,...).

Hlavním předpokladem pro řádné výsledky je správně provedený odběr. Odběr se provádí mimo laboratoř. Pacientovi by měla být krev odebírána na lačno. Na žádance, která je nedílnou součástí patientského vzorku by měl být napsaný čas odběru, případné komplikace při odběru a léčba (zejména antikoagulační) (Matýšková et al. 1999). Odebírá se vzorek žilní krve do předem označené zkumavky (jméno a rodné číslo pacienta) s protisrážlivým roztokem 0,109 mol/l citrátu sodného v poměru 9:1 (9 dílů krve:1 díl citrátu sodného). Typy používaných zkumavek v laboratoři Laboma s.r.o. jsou: BD Vacutainer s modrým uzávěrem a AQUISEL s modrým uzávěrem (obr. 4; viz. 9. Přílohy). Po odběru se zkumavka s obsahem vzorku šetrně promíchá převrácením, ne třepáním, aby nedošlo k hemolýze.

Vzorky musí být do laboratoře transportovány co nejrychleji. Transport vzorků v laboratoři Laboma s.r.o. zajišťuje svozová služba laboratoře. Zkumavky jsou ukládány do stojánek a ty pak do tepelně izolovaných termoboxů, ve kterých jsou do laboratoře převezeny. Ne všechny vzorky se do laboratoře dostanou do 4 hodin po odběru.

Po doručení vzorků do laboratoře se nejprve zkontroluje, zda se přebírá označená zkumavka (jméno, příjmení pacienta a rodné číslo pacienta) s řádně vyplněnou žádankou. Následně se zkumavce i žádance přidělí stejný čárový kód a

informace ze žádanky se zadají do LIS (počítačový program, kterým se provádí příjem materiálu). Pod tímto kódem se vzorek vyšetřuje po celou dobu v laboratoři až po vydání výsledků.

K vyšetření se používá pouze krevní plazma, proto se musí před samotnou analýzou vzorky centrifugovat. Vzorky se v laboratoři Laboma s.r.o. České Budějovice centrifugují 15 minut při 3000 otáčkách /min. v odstředivce CENTRIC 322 A (SOP).

3.2 Část analytická

Do analytické fáze vyšetření patří všechny faktory, které mohou ovlivnit vlastní provedení vyšetření. Musí se přesně dodržovat popsané metodické postupy. Každá laboratoř má podrobně vypracované standardní operační postupy (SOP) pro přípravu diagnostických setů a reagensů, vlastní provedení testu, nastavení a kalibraci přístrojů a provedení kontrol a kalibrací (Matýšková et al. 1999). Podle těchto SOP laboratoře Laboma s.r.o. jsem prováděla i praktickou část této mé práce.

3.2.1 Příprava, skladování a stabilita reagensů

Reagencie jsou důležitou součástí reakce, kdy po jejich přidání k citrátové plazmě dochází k vytvoření prvních fibrinových vláken. Každá laboratoř používá reagencie od různých výrobců. Laboratoř Laboma s.r.o. používá níže uvedené reagencie.

Pro vyšetření funkce vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin (aPTT) je zapotřebí reagensů DAPTTIN (Technoclone) a Ca-Chloride Solution 25 mmol/l f. Ceveron – (Technoclone). DAPTTIN (Technoclone) je dodáván v lyofilizovaném stavu, připravuje se přidáním 10 ml čerstvé destilované vody, poté musí pracovní roztok 10 minut homogenizovat. Ca-Chloride Solution 25 mmol/l f. Ceveron – (Technoclone) je dodáván v kapalném stavu a slouží k přímému použití. Neotevřené reagencie jsou stabilní při 2-8 °C do doby expirace vyznačené na lahvičkách. Po rozpuštění je DAPTTIN stabilní 15 dní při teplotě 2-8 °C a Ca-Chloride po otevření 1 měsíc při teplotě 2-8 °C.

K vyšetření zevní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin (PT) se používá reagentie Technoplastin HIS f. Ceveron (Technoclone). Tato reagentie je dodávána v lyofilizovaném stavu, připravuje se přidáním 20 ml čerstvé destilované vody. Po přidání destilované vody musí pracovní roztok 10 minut homogenizovat. Neotevřená reagentie je stabilní při 2-8 °C do doby expirace vyznačené na lahvičkách. Po rozpuštění je roztok Technoplastin HIS stabilní 6 dní při teplotě 2-8 °C.

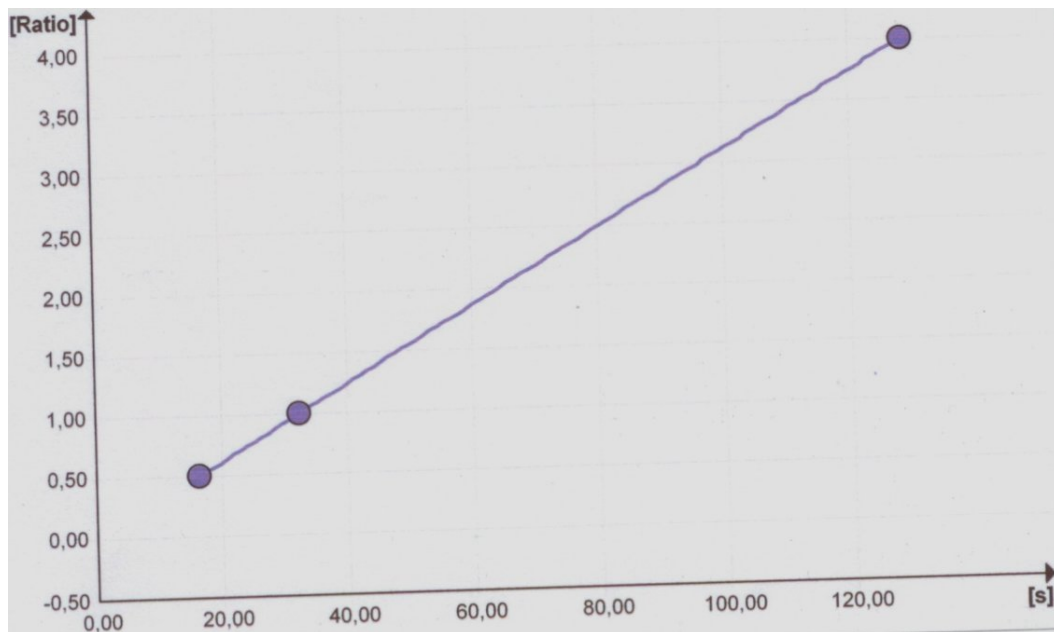
Stabilita všech reagentií je sledována softwarem analyzátoru, obsluha je povinná hlášení o stabilitě sledovat (SOP).

3.2.2 Kalibrace metod

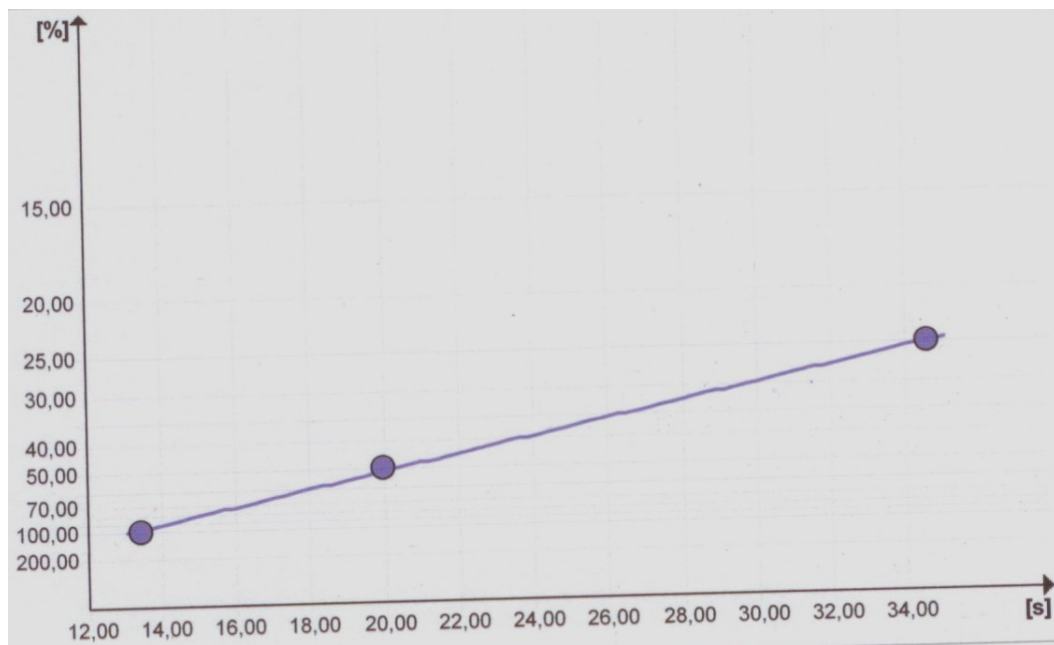
Kalibrace metod použitých v této práci se provádí vyšetřením různých ředění kalibrační plazmy (100%, 50%, 25%...), vynesení naměřených hodnot do grafu a sestrojením kalibrační křivky, která musí být minimálně třibodová (obr. 5 a 6). Jako kalibrační plazmy se nejčastěji používají firemní referenční plazmy s přesně uvedenými hodnotami stanovovaných složek (Matýšková et al. 1999).

U aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (aPTT) se kalibrace neprovádí. Pomocí referenční plazmy (Coagulation Reference f. Ceveron) se určí normální hodnota testu a z ní se vypočtou násobky v rozmezí ratio 0,5 až 4, které se poté zadají do analyzátoru. Normální hodnota testu se nastavuje jako koagulační čas vhodné referenční plazmy. Ten se měří při každé změně šarže reagentie nebo nastavení přístroje. Referenční plazma je dodávána v lyofilizovaném stavu, připravuje se přidáním 1 ml destilované vody. Poté se musí nechat plazma 20 minut homogenizovat.

U protrombinového testu (PT) jsou výsledky INR kalkulovány automaticky za použití hodnot ISI a normální hodnoty testu. Hodnoty ISI, které jsou provedené výrobcem jsou tedy výsledkem kalibrace. Tyto hodnoty jsou deklarovány pro každou šarži reagentie. Normální hodnota testu se stejně jako u aPTT nastavuje jako koagulační čas vhodné referenční plazmy. Koagulační čas se i zde měří při každé změně šarže reagentie nebo nastavení přístroje. Referenční plazma je u tohoto testu stejná jako u aPTT a připravuje se tedy stejným způsobem (SOP).



Obr. 5: Kalibrační křivka u aPTT



Obr. 6: Kalibrační křivka u PT

3.2.3 Měření kontrol

Před samotným měřením patientských vzorků se musí změřit kontroly, aby došlo k ujištění, že příslušný analyzátor měří správně. U obou metod se používají dvě stejné kontroly: Coagulation Control N f. Ceveron, (Technoclone) a Coagulation Control A f. Ceveron, (Technoclone). Jedna kontrola je vždy v rozmezí fyziologických hodnot. Druhá kontrola je naopak v rozmezí hodnot převyšujících a je tedy v oblasti patologických hodnot. Obě kontroly jsou dodávány v lyofilizovaném stavu a připravují se přidáním 1 ml destilované vody, poté musí kontroly 20 minut homogenizovat. Měření se provádí pravidelně každý den vždy ráno před zpracováním rutinních vzorků od pacientů a pokaždé při delším přerušení práce. Kontroly musí být zpracovány a měřeny za naprosto stejných podmínek jako patientské vzorky. Kontrolní a kalibrační protokoly jsou následně vytištěny a dokumentovány (SOP).

3.2.4 Vlastní měření

Do počítače, který je součástí automatického analyzátoru CEVERON[®] Alpha se zadají čísla vzorků, které budeme vyšetřovat a zvolí se typy požadovaných vyšetření. Následně se vyšetřované vzorky naskládají do rotoru pro vzorky na předem počítačem uvedené pozice. V rotoru jsou už předem připravené příslušné reagentie. Pokud je vše na správném místě, může se zahájit analýza vyšetřovaných vzorků. Zavře se kryt analyzátoru a měření se odstartuje tlačítkem Start v menu pracovního listu (Work list). V průběhu měření jsou v pracovním listu zobrazeny informace o teplotě chlazených pozic reagentií (14 °C) a o teplotě kyvetového rotoru (zahřátý na 37 °C). Po naměření hodnot posledního vzorku se celé měření automaticky zastaví a veškeré naměřené hodnoty, které jsou zobrazeny v menu pracovního listu se uloží do archívu. Následně se tyto výsledky mohou vytisknout.

Toto měření se v průběhu celé mé práce provádělo celkem čtyřikrát. První měření se uskutečnilo ihned po doručení vzorků do laboratoře, poté následovalo měření po 4 hodinách, další po 8 hodinách. Čtvrté (poslední) měření se provedlo až druhý den,

přesně v čase, ve kterém probíhalo první měření v předešlém dni. Naměřené hodnoty byly mezi sebou následně statisticky porovnány.

3.2.5 Výpočet výsledků

V pracovním listu jsou zobrazeny naměřené hodnoty. U používaných reagensů je rozmezí ve výsledkových listech nastavené u aPTT: 24 - 40 sec. a 0,8 - 1,2 Ratio a u PT: 10 - 14 sec., 70 - 120 % a 0,80 - 1,20 INR. Sám počítač ihned zhodnotí, zda je výsledek v rozmezí fyziologických či patologických hodnot

U aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT) se hodnoty vyjadřují v sekundách s udáním času denního normálu a v hodnotách Ratio (R). Hodnota Ratio se vypočítá podle vzorce:

$$R = \frac{\text{čas testované plazmy}}{\text{čas normálu}},$$

kde čas normálu u aPTT = 33,1 sec.

U protrombinového času (PT) se hodnoty vyjadřují v sekundách s udáním času denního normálu a v hodnotách Ratio (R). Hodnota Ratio se vypočítá stejně jako u aPTT podle vzorce:

$$R = \frac{\text{čas testované plazmy}}{\text{čas normálu}},$$

kde čas normálu u PT = 12,6 sec.

Dále se PT uvádí v procentech (%) normální koagulační aktivity a v hodnotách INR, což je mezinárodní normalizovaný poměra jeho hodnota se spočte jako:

$$INR = R^{ISI},$$

kde ISI je mezinárodní index citlivosti a vyjadřuje citlivost daného tromboplastinu stanovenou vůči mezinárodnímu standardnímu tromboplastinu. Hodnota ISI musí být určována pro každý tromboplastin a v dnešní době bývá už vždy uváděna výrobcem reagentie (Matýšková et al. 1999). Kalciový tromboplastin (TECHNOPLASTIN[®] HIS) pro stanovení protrombinového času (PT, Quick) má hodnotu ISI 1,3.

3.2.6 Kontrola kvality

Vnitřní kontrola kvality poskytuje denní průběžné informace o každé metodě, zda je zajištěna reprodukovatelnost výsledků. Provádí se kontroly přesnosti, ale i správnosti. Účelem této analýzy je získat výsledek, který je dobrou aproximací správné hodnoty (Matýšková et al. 1999). Postupy vnitřní kontroly kvality mají okamžitý efekt na laboratorní práci a měly by vést ke kontrole, popřípadě k vyloučení analytické série laboratorních výsledků. Cílem řízení kvality je detekovat analytické chyby, v ideálním případě všechny ty, které mohou negativně ovlivnit rozhodovací medicínský proces (Bartoš et al. 2008). Výsledky získané v procesu vnitřní kontroly kvality lze použít pro validaci a verifikaci metod, stejně jako při odhadu nejistoty výsledků měření (Friedecký et al. 2008).

3.2.6.1 Validace

Validace metod je v klinických laboratořích vyžadována normami managementu kvality. Jejím hlavním cílem je prostřednictvím experimentálního stanovení analytických a výkonnostních znaků metod prokázat, že bylo dosaženo takové úrovně těchto znaků, která postačuje pro daný účel. V laboratorní medicíně to znamená, že výsledky měření jsou efektivním nástrojem diagnostiky, terapie a prevence. Validace potvrzuje, že měřicí postup (systém nebo výrobek) je schopen plnit požadavky na ně kladené, jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací. V klinických laboratořích se v naprosté většině používají již validované metody, produkované výrobcem in vitro diagnostik (Friedecký et al. 2010).

V laboratoři Laboma s.r.o. jsou metody validovány výrobcem reagentů IVD CE.

3.2.6.2 Verifikace

Verifikace je poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky. Je to potvrzení, že jsou dosaženy funkční vlastnosti nebo zákonné požadavky na měřicí systém, potvrzení prostřednictvím objektivních důkazů, že data o analytických znacích deklarována výrobcem, jinou laboratoří, nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři s použitím konkrétního měřicího systému dosažena. Pojem verifikace se používá v laboratořích pro proces ověřování, zda je laboratoř schopna dosáhnout u použitých a již výrobcem validovaných metod deklarovanou výkonnost metody. Potvrzuje, že měřicí postup (systém nebo výrobek) je plně funkční v konkrétní laboratoři.

V laboratořích se verifikují všechny metody a postupy měření (Friedecký et al. 2010). Verifikace analytických spolehlivostí metod (aPTT a PT) včetně nejistot v laboratoři Laboma s.r.o. jsou uvedeny ve verifikačních protokolech, které jsou součástí této práce (obr. 7 a 8; viz. 9. Přílohy).

3.2.7 Ověřování naměřených hodnot

Naměřené hodnoty koagulačního vyšetření byly ověřeny pomocí verifikace. Verifikace byla provedena u dvou kontrolních vzorků a u obou použitých metod před vlastní analýzou 50-ti náhodně vybraných vzorků. Tímto se potvrdilo, že vše splňuje výše specifikované požadavky.

3.2.7.1 Opakovatelnost a mezilehlá preciznost (přesnost)

Použijí se dva až tři vzorky materiálů o různých hodnotách (fyziologické a patologické). Měří se minimálně 10, optimálně včas 20 dní po sobě a je nutné získat alespoň 20 výsledků. Pokud je při měření v některém dni získán odlehlý nebo ne zcela

důvěryhodný výsledek, je třeba dobu měření adekvátně prodloužit. Cílem mezilehlé preciznosti je kvantifikace náhodné chyby měření (Friedecký et al. 2010).

Byly měřeny dva kontrolní vzorky, každý z obou vzorků byl měřen 23 dní za sebou (v sérii). Naměřené výsledky byly dále zpracovány. Vše je uvedeno ve verifikačních protokolech (obr. 7 a 8; viz. 9. Přílohy).

3.2.7.1.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr AM se vypočítá jako podíl součtu všech naměřených hodnot ku počtu měření, podle vzorce:

$$AM = \frac{\sum Xi}{n},$$

kde n = počet měření

Xi = naměřené hodnoty.

3.2.7.1.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka SD se vypočítá podle vzorce:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (Xi - AM)^2} .$$

3.2.7.1.3 Variační koeficient

Variační koeficient CV se udává v procentech a vypočítá se jako podíl směrodatné odchylky a aritmetického průměru podle vzorce:

$$CV = \frac{SD}{AM} \cdot 100 .$$

3.2.7.2 Vychýlení (bias) metody

Cílem tohoto dalšího postupu verifikace je odhad systematické chyby měření pomocí analýzy referenčního nebo vhodného kontrolního materiálu. K provedení tohoto odhadu musí být minimalizována náhodná chyba měření použitím dostatečného počtu opakovaných měření (minimálně 10). Výsledná hodnota vychýlení (bias) dokumentuje stav návaznosti měření v laboratoři a vyčísluje systematickou složku celkové chyby výsledků měření. Tato hodnota je vhodná pro zpracování do odhadu nejistoty měření (Friedecký et al. 2010).

Měření se provádělo za podmínek opakovatelnosti. Byly měřeny dva kontrolní vzorky, které byly použity pro měření mezilehlé preciznosti. Každý vzorek byl měřen desetkrát, deset dní za sebou. Ze získaných souborů výsledků byly vypočteny stejně jako u mezilehlé preciznosti hodnoty aritmetického průměru, směrodatné odchylky a variačního koeficientu. Nakonec byla vypočtena hodnota vychýlení (bias) a výtěžnost. Výtěžnost se vypočte podle vzorce:

$$R = \frac{AM}{\mu} \cdot 100,$$

kde μ je danou referenční (cílovou) hodnotou.

Bias je následně vypočten dle vzorce:

$$B = \frac{AM - \mu}{\mu} \cdot 100,$$

obě dvě hodnoty jsou udávány v procentech.

3.2.7.3 Kombinovaná nejistota

Kombinace zjištěných a vyčíslených dílčích složek nejistoty je provedená kovariancí. Jsou-li zjištěny potřebné dílčí nejistoty (Ambrožová 2005), vypočte se kombinovaná nejistota podle vzorce:

$$u_{r, \text{tot}} = \sqrt{(u_{r, \text{repro}}^2 + u_{r, \text{ref}}^2 + B_r^2 + u_{r, \text{xp}}^2)},$$

kde $u_{r, \text{repro}}$ = variační koeficient mezilehlé přesnosti, reprodukovatelnosti

$u_{r, \text{ref}}$ = nejistota hodnot certifikovaného (referenčního) materiálu

B_r = systematická odchylka (vychýlení, bias)

$u_{r, \text{xp}}$ = nejistota systematické odchylky.

Kombinovaná nejistota byla spočtena za pomoci kalkulátoru, který je dostupný na stránkách www.cskb.cz. Výsledek kombinované nejistoty je udáván v procentech, stejně jako dílčí nejistoty, které jsou potřebné pro jeho vypočítání.

4. Výsledky

4.1 Ověření správnosti výsledků pomocí verifikace

V období 12. 8. – 13. 9. 2010 byla před samotnou analýzou náhodně vybraných patientských vzorků provedena verifikace na měřícím analyzátoru CEVERON® Alpha, u dvou kontrolních vzorků a u použitých metod stanovení koagulace. Touto analýzou (kontrolou) se potvrdilo, že příslušný měřící analyzátor měří správně. Tudíž se mohla potvrdit předpokládaná správnost následujícího měření a naměřených hodnot.

Verifikace byla provedena 23 po sobě jdoucích dní před zahájením analýzy patientských vzorků. Verifikační protokoly obou metod (aPTT a PT) jsou součástí této práce (obr. 7 a 8; viz. 9. Přílohy).

4.2 Naměřené hodnoty a jejich statistické vyhodnocení

V období 14. 9. - 22. 9. 2010 byly naměřeny hodnoty koagulačních vyšetření u 50-ti náhodně vybraných patientských vzorků. Každý vzorek byl měřen čtyřikrát. První měření se provedlo ihned po doručení vzorků do laboratoře. Druhé měření proběhlo po 4 hodinách od prvního měření. Potřetí se vzorky měřily po 8 hodinách od prvního měření. Poslední (čtvrté měření) se provedlo druhý den ve stejný čas, kdy se vzorky měřily poprvé.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty koagulačních vyšetření v sekundách

číslo vzorku	aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas)				QUICK (protrombinový čas)			
	sec.				sec.			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
1	31,1	30,8	31,0	35,3	12,4	12,0	11,9	12,9
2	43,6	41,2	44,4	50,5	30,1	28,5	28,3	30,2

číslo vzorku	aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas)				QUICK (protrombinový čas)			
	sec.				sec.			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
3	67,6	59,8	62,4	78,8	49,6	48,9	47,1	48,9
4	47,9	45,5	45,3	54,0	27,6	26,4	25,7	27,8
5	39,7	40,5	39,7	43,9	21,6	21,3	20,9	22,4
6	36,8	37,8	37,6	40,6	25,8	25,0	24,7	26,0
7	35,4	35,9	36,8	40,8	26,6	26,2	25,1	27,0
8	55,7	53,5	53,6	60,6	38,9	36,9	37,1	39,1
9	36,5	36,1	35,8	39,9	22,0	21,4	21,4	23,0
10	47,0	47,1	48,0	53,3	26,1	25,6	25,6	27,5
11	33,5	33,2	33,6	37,9	17,3	16,9	16,5	18,3
12	33,2	33,1	34,0	37,5	14,2	13,8	13,8	15,0
13	36,4	37,5	37,6	41,2	21,9	21,6	21,4	23,0
14	37,5	37,3	37,6	44,1	22,5	22,1	21,5	23,3
15	42,7	43,7	44,2	49,4	25,0	23,6	23,3	25,2
16	31,5	31,6	31,6	35,6	16,2	15,6	15,1	16,8
17	53,4	55,3	56,0	61,6	35,9	33,6	33,6	35,0
18	27,7	28,7	29,3	31,3	14,0	13,3	13,5	14,4
19	53,1	50,8	51,7	59,6	29,7	28,2	27,2	29,3
20	36,2	36,9	35,5	40,2	20,6	20,5	20,2	21,3
21	47,0	51,1	48,5	53,4	35,8	36,3	36,0	36,3
22	30,7	30,6	33,0	36,3	13,0	12,9	12,9	14,0
23	40,5	40,4	42,6	47,6	28,1	27,9	27,9	29,2
24	33,8	33,6	33,6	36,1	17,8	18,1	17,4	18,5
25	31,6	32,5	31,6	33,9	13,0	12,9	12,8	13,7
26	42,9	43,0	44,8	49,0	30,7	29,8	29,2	32,4
27	43,2	40,4	45,0	50,0	28,9	28,6	28,1	30,4
28	55,2	51,3	55,1	60,4	28,7	27,3	27,8	30,0
29	45,1	44,6	46,2	49,8	33,9	33,6	33,2	35,3

číslo vzorku	aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas)				QUICK (protrombinový čas)			
	sec.				sec.			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
30	36,4	36,2	36,2	38,9	14,8	14,3	14,6	15,4
31	30,9	32,6	32,2	34,0	13,7	13,3	13,4	14,4
32	40,9	43,5	44,0	45,8	30,8	29,6	30,6	31,9
33	40,2	42,9	43,3	48,0	30,3	29,6	29,3	31,5
34	45,2	48,1	46,8	52,1	34,4	33,4	32,9	35,6
35	41,8	44,0	43,9	47,0	26,0	25,2	24,9	26,6
36	26,4	27,1	27,9	30,4	13,4	13,2	13,0	14,1
37	29,6	31,9	30,5	35,7	12,4	12,0	12,1	13,1
38	37,0	36,9	37,5	44,1	22,8	21,9	22,0	23,5
39	30,1	30,2	30,3	35,1	13,8	13,5	13,6	14,5
40	28,5	28,4	28,7	30,4	13,6	13,3	13,5	14,6
41	29,3	28,3	29,4	32,0	12,0	11,6	11,9	13,0
42	31,0	31,3	31,9	34,0	18,8	18,3	18,7	20,0
43	31,4	31,9	32,8	34,5	13,5	13,3	12,9	14,5
44	42,3	41,5	42,5	45,2	28,8	27,7	27,8	29,4
45	32,0	33,0	32,9	34,8	13,5	12,9	12,9	14,5
46	31,3	31,6	31,5	35,2	12,4	12,3	12,4	13,3
47	44,9	44,5	44,4	49,5	30,4	29,9	29,2	32,6
48	54,5	53,9	54,0	56,1	28,5	27,9	27,3	29,4
49	35,3	35,3	35,6	36,3	13,7	12,9	13,1	14,8
50	40,2	39,8	40,3	43,7	32,9	32,1	32,0	34,2

Pro přehlednost jsou v tabulce uvedeny jen výsledky v sekundách. Tyto časové výsledky byly statisticky zhodnoceny. V počítačovém programu Microsoft Office Excel byly vytvořeny tabulky, do kterých byly vepsány již uvedené naměřené hodnoty. Z těchto 50-ti hodnot se následně vypočítaly průměry se směrodatnými a relativními odchylkami. Z vypočítaných výsledků byly sestaveny následující grafy, které zobrazují,

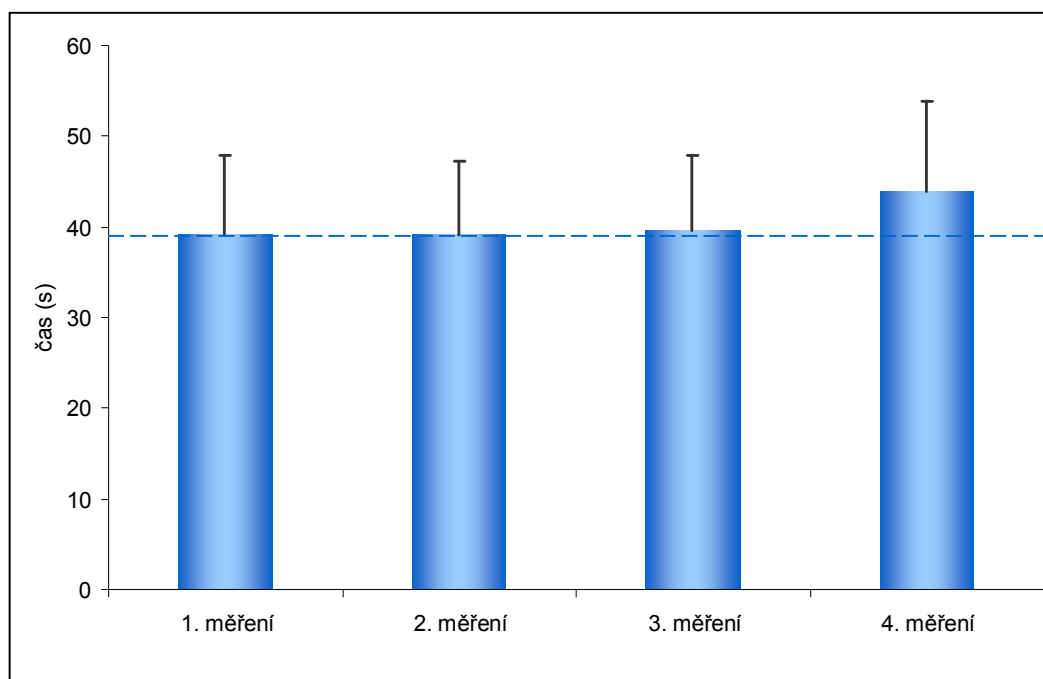
jak se mění naměřené hodnoty v závislosti na prodlouženém čase. Nakonec byl použit pro potvrzení či vyloučení předpokládané hypotézy párový t-test.

Soubor tabulek, který obsahuje veškeré naměřené hodnoty v určených jednotkách je vložen v příloze (tab. 2, 3 a 4; viz. 9. Přílohy).

4.2.1 Aritmetický průměr a směrodatná odchylka

Tabulka 5: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky u aPTT v sekundách

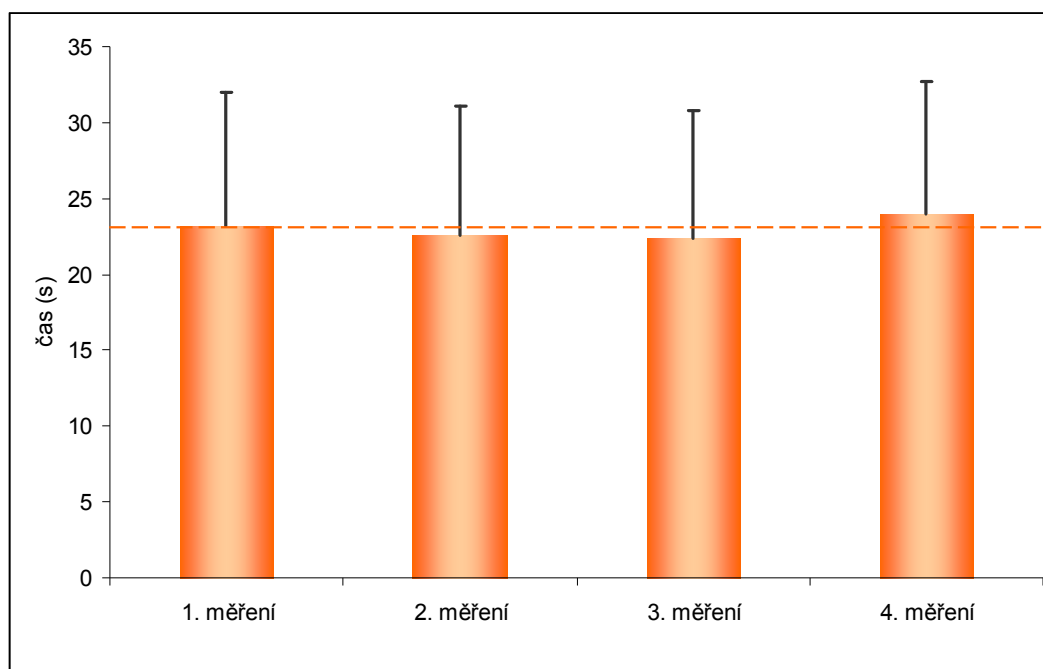
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
průměr	39,114	39,134	39,654	43,908
směrodatná odchylka	8,8	8,0	8,3	10,0



Obr. 9: Závislost měnících se průměrných hodnot u aPTT na základě prodlouženého časového intervalu mezi odběrem a vyšetřením. Chybové úsečky odpovídají velikosti směrodatných odchylek. Přerušovaná čára zvýrazňuje hodnotu prvního měření

Tabulka 6: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky u PT v sekundách

	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
průměr	23,168	22,540	22,346	22,942
směrodatná odchylka	8,8	8,6	8,4	8,7



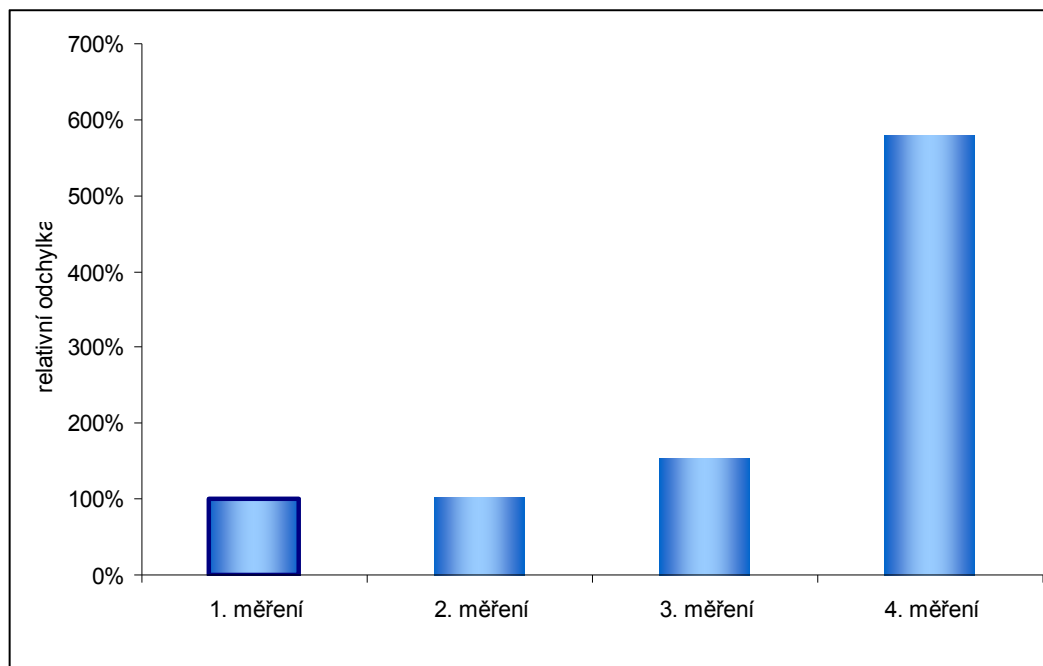
Obr. 10: Závislost měnicích se průměrných hodnot u PT na základě prodlouženého časového intervalu mezi odběrem a vyšetřením. Chybové úsečky odpovídají velikosti směrodatných odchylek. Přerušovaná čára zvýrazňuje hodnotu prvního měření.

4.2.2 Relativní odchylka

Výpočet relativní odchylky byl proveden následujícím způsobem: nejprve se spočítal průměrný rozdíl mezi prvními a druhými (prvními a třetími, prvními a čtvrtými) naměřenými hodnotami. Tento rozdíl se poté přičetl (případně odečetl) k průměru prvního měření, kterému se pro názornost přiřadila hodnota 1. Převedením na procenta jsem získala relativní posun v hodnotách druhého, třetího a čtvrtého měření ve srovnání s počátečním stavem (= 100 %).

Tabulka 7: Relativní odchylky u aPTT v %

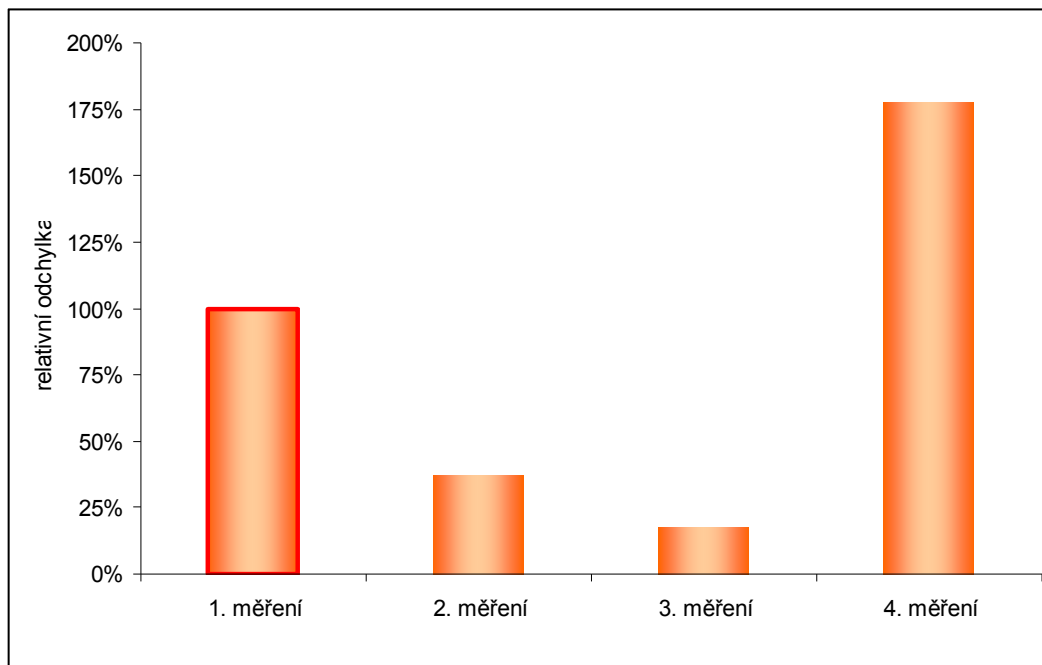
1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
100	102	154	579



Obr. 11: Zobrazení relativních odchylek u aPTT udávajících, o kolik % se v průměru liší hodnoty, které byly naměřeny v různém časovém intervalu od 1. měření.

Tabulka 8: Relativní odchylky u PT v %

1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
100	37	18	177



Obr. 12: Zobrazení relativních odchylek u PT udávajících o kolik % se v průměru liší hodnoty, které byly naměřeny v různém časovém intervalu od 1. měření.

4.2.3 Párový t-test a dosažená hladina významnosti

Párový t-test slouží k porovnání průměrů dvou skupin spojitých dat, které byly získány opakovaným měřením stejných vzorků. Nezajímaly mě tedy vzájemné rozdíly mezi všemi čtyřmi naměřenými skupinami dat, ale pouze rozdíly mezi prvním a druhým, prvním a třetím a prvním a čtvrtým měřením. Dosažená hladina významnosti (p) v tomto případě udává, zda je či není rozdíl naměřených hodnot statisticky významný. Pokud je dosažená hladina významnosti menší než 5 %, je rozdíl naměřených hodnot statisticky významný. Čím je tedy výsledek menší, tím větší je rozdíl.

Tabulka 9: Dosažená hladina významnosti u aPTT v %

1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
	94,029	1,024	0,000

Tabulka 10: Dosažená hladina významnosti u PT v %

1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
	0,000	0,000	0,000

Tabulka 9 ukazuje, že hodnoty prvního a druhého měření u aPTT se od sebe statisticky neodlišují ($p = 94$ %). Další měření už jsou statisticky významně odlišná.

Rozdíly hodnot u PT jsou podle dosažené hladiny významnosti ($p < 0,001$ %) ve všech třech případech statisticky významné. Veliký rozdíl ukazují i dva grafy (obr. 10 a 12), kde je vidět, že hodnoty PT v průběhu času nerovnoměrně kolísají.

5. Diskuze

Hlavním cílem mé práce bylo zjistit a porovnat, jak ovlivňuje prodloužený časový interval výsledné hodnoty koagulačního vyšetření u dvou základních koagulačních testů: u aPTT (aktivovaného tromboplastinového času) a u PT (protrombinového času).

Za prodloužený časový interval byla považována doba mezi odběrem vzorku, jeho doručením do laboratoře a následně jeho vyšetřením v laboratoři. Krev je nutno v tomto případě dodat do laboratoře ke zpracování do 4 hodin po odběru, aby nedošlo ke znehodnocení výsledků. Už po 4 hodinách dochází ke zvýšení inaktivace FV a FVIII (Kvasnička 2003).

Koagulační vyšetření se provádí z krevní plazmy, která se odebírá do zkumavky s citrátem sodným. Vzorky dodané v jiném antikoagulantu, jako je EDTA by neměly být vyšetřovány (Crist et al. 2009). Správnost laboratorních výsledků závisí na mnoha faktorech, které mohou mít objektivní (variabilita dané metody, stabilita používaného přístroje) nebo subjektivní příčinu (kvalifikace pracovníků, individuální přístup pracovníka ke stanovení). Faktory ovlivňující správnost výsledků mohou být rozděleny na preanalytické, analytické a postanalytické. Zatímco analytické faktory jsou kontrolovatelné a je možné jim předejít, některé chyby v preanalytické fázi jsou těžko prokazatelné. U většiny testů je nutné zpracování vzorku do 2 hodin po odběru. Zpracováním se rozumí centrifugace vzorku (krve) a stažení plazmy do umělohmotných zkumavek. Poté se plazma může skladovat až 4 hodiny do provedení vlastní analýzy při 18-22 °C (Matýšková et al. 1999). Faktory, které výsledné hodnoty koagulačních vyšetření snižují (zkracují čas koagulace pacienta) jsou: dlouhodobá venózní komprese při odběru, tělesné cvičení u mužů, dlouhodobá rybí dieta, nedodržení poměru krev:citrát (9:1), hemolýza, chybná centrifugace, těhotenství (multigravidita), imobilizace, obezita. Některé léky mohou též snížit výsledné hodnoty, mezi ně patří například barbituráty, antiepileptika, glukokortikoidy, karbamazepin, koenzym Q10, perorální antikoncepce, penicilin, vitamin K. Konzumací potravin s vysokým obsahem vitamínu K může též dojít ke snížení naměřených koagulačních hodnot. Naopak k

prodloužení časů koagulace u pacientů a tedy k výsledným vysokým naměřeným hodnotám přispívá technicky chybný odběr krve, nepromíchání vzorku ihned po odběru, nedodržení poměru krev:citrát (9:1), tělesné cvičení, malnutrice, hypoalbuminemie, dlouhodobé vystavení vyšším teplotám, hořečnaté stavy, průjem, alkoholický excés, nedostatečný příjem vitamínu K, vyšší hematokrit, prodloužení doby zpracování (po 24 hodinách dochází k prodloužení o 7 % a po 72 hodinách o 25 %), nedostatečné přehřátí roztoků. Zvýšený čas koagulace mají také novorozenci. Mezi léky, které prodlužují dobu koagulace patří například anaestetika, antibiotika 2. a 3. generace, antidepressiva, antikoagulancia, hormonální antikoncepce, antidiabetika, vysoké dávky heparinu (Kvasnička 2003). Také hemolyzované vzorky by se neměly vyšetřovat a při příjmu by měly být odmítnuty. Hemolýza způsobuje aktivaci srážecích faktorů, působí rušivými vlivy a tím ovlivňuje správnost výsledků (Laga et al.).

Jak je výše uvedeno, doporučený časový interval mezi odběrem vzorku pro koagulační vyšetření a jeho vyšetřením v laboratoři jsou 4 hodiny. Za tuto dobu by se měl vzorek z odběrové místnosti nebo z místa, kde byl odběr proveden doručit do laboratoře, kde je následně zpracován. Bohužel, ne ve všech laboratořích, které tato vyšetření koagulace zajišťují lze doporučený časový interval 4 hodin dodržet. Výsledky této práce ukazují, jak se případné prodloužení časového intervalu projeví či neprojeví na změně naměřených hodnot.

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (tab. 5 a 6), které byly vypočteny z naměřených hodnot koagulačních vyšetření (tab. 1) se od sebe příliš neliší. Naopak je ale tomu u relativní odchylky, která udává o kolik % se v průměru liší hodnoty, které byly naměřeny v různém časovém intervalu od prvního měření. U aktivovaného tromboplastinového času (aPTT) se naměřené hodnoty druhého měření (4 hodiny po prvním měření) od naměřených hodnot prvního měření (po doručení vzorku do laboratoře) liší pouze o 2 %. Následně naměřené hodnoty třetího měření (8 hodin po prvním měření) se od naměřených hodnot prvního měření liší už o 54 %. Naměřené hodnoty posledního čtvrtého měření (24 hodin po prvním měření) se od naměřených hodnot prvního měření liší o celých 479 % (tab. 7). Velice odlišné výsledky relativních odchylek jsou u protrombinového času (PT), kde i hodnoty měřené v různých časových

intervalech mezi sebou velice kolísaly. Naměřené hodnoty druhého měření (4 hodiny po prvním měření) od naměřených hodnot prvního měření (po doručení vzorku do laboratoře) v průměru klesly o 63 %. Naměřené hodnoty třetího měření (8 hodin po prvním měření) od naměřených hodnot prvního měření v průměru klesly o 82 %. Naměřené hodnoty posledního čtvrtého měření (24 hodin po prvním měření) od naměřených hodnot prvního měření v průměru stouply o 77 % (tab. 8).

Z těchto výsledků je patrné, že by se doporučený časový interval od odběru vzorku po jeho zpracování v laboratoři měl dodržovat. Případné delší prodloužení časového intervalu má vliv na výsledky koagulačního vyšetření.

6. Závěr

Cílem této práce bylo ověření vlivu časového faktoru na kvalitu koagulačního vyšetření a pomocí verifikace se před zahájením vlastní analýzy vzorků ujistit, zda jsou použité koagulační metody spolehlivé a zaručují správnost měřených výsledků.

Verifikace obou koagulačních metod proběhla v pořádku, tudíž jsem mohla předpokládat, že následné měření patientských vzorků z denního rutinního provozu bude poskytovat správné výsledky. Tím se potvrdila má druhá hypotéza - správnost naměřených hodnot. Z naměřených hodnot byly vypočteny průměrné hodnoty, směrodatné a relativní odchylky a párovým t-testem byla vypočtena dosažená hladina významnosti. Tato dosažená hladina významnosti potvrdila, že za rozhodující faktor pro kvalitu vyšetření a následně naměřených hodnot je považována doba mezi odběrem vzorku, jeho transportem do laboratoře a jeho následným vyšetřením v laboratoři. Tímto se tedy potvrdila i má první hypotéza. Z výsledků mohu tedy konstatovat, že u aktivovaného tromboplastinového času (aPTT) po 4 hodinách (po odběru) nedochází k odlišným statisticky významným hodnotám. Další naměřené hodnoty (měřené po 8 a 24 hodinách od prvního měření) se již odlišují a jsou staticky významné. U protrombinového času (PT) se naměřené hodnoty statisticky významně liší už po 4 hodinách od prvního měření.

Na základě mých výsledků a poznatků, které jsem v této práci získala, mohu navrhnout, aby se doporučený časový interval mezi odběrem krve a jejím vyšetřením v laboratoři dodržoval. Pokud se tento časový interval dodržet nedá, měla by laboratoř počítat s nepřesně naměřenými hodnotami.

7. Seznam použitých zdrojů

- [1] ALBERT, F.W., et al. Haemostatic testing prior to elective surgery? Yes!. *Haemostaseologie*. 2009, 29, 1, s. 58-63. ISSN 0340-6199.
- [2] AMBROŽOVÁ, J. Nejistota měření – příspěvek k diskuzi. *Labor Aktuell*. 2005. 11-18.
- [3] BARTOŠ, V., et al. *Příručka k vnitřní kontrole kvality* [online]. ČSKB, 2008 [cit. 2011-02-14]. Dostupné z WWW: <<http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--vnitri-kontrola-kvality>>. ISBN 978-80-254-1130-8.
- [4] CRIST R. A., et al. Effects of EDTA on routine and specialized coagulation testing and an easy method to distinguish EDTA-treated from citrated plasma samples. *Lab Hematol*. 2009, 15, 4, s. 45-8.
- [5] DAME, C.; GAEDICKE, G.; SCHULZE, H. Physiology of megakaryopoiesis and thrombocytes. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 2006, 154, 6, s. 502-+. ISSN 0026-9298.
- [6] DUDEK, M. M.; HARRIS, L. F. ; KILLARD, A. J. . Evaluation of activated partial thromboplastin time (aPTT) reagents for application in biomedical diagnosis device development. *Int J Lab Hematol*.. 2010, 10, s. Epub ahead of print.
- [7] FRIEDECKÝ, B., et al. *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích* [online]. ČSKB ČLS JEP, 2010 [cit. 2011-02-14]. Dostupné z WWW: <http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/valid/Validace_2010.pdf>.
- [8] FRIEDECKÝ, B., et al. *Doporučení o vnitřní kontrole kvality* [online]. ČSKB, 2008 [cit. 2011-02-14]. Dostupné z WWW: <<http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--vnitri-kontrola-kvality>>.

- [9] EMSLEY, J.; McEWAN, P. A.; GAILANI, D. Structure and function of factor XI. *Blood*. 2010, 115, 13, s. 2569-2577. ISSN 0006-4971.
- [10] FAVALORO, E. J., et al. Improving the harmonisation of the International Normalised Ratio (INR) : Time to think outside the box?. *Clin Chem Lab Med*. 2010, 48, 8, s. 1079-90.
- [11] GREEN, D. Interpreting coagulation assays. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010, 21, 1, s. 3-6.
- [12] HOLY, E. W.; TANNER, F. C. Tissue factor in cardiovascular disease pathophysiology and pharmacological intervention. *Adv Pharmacol*. 2010, 59, s. 259-92.
- [13] HRUBIŠKO, M., et al. *Hematologie a krevní transfuze II. : Krevní transfuze*. 1. české vydání. Praha : Avicentrum zdravotnické nakladatelství, 1983. 208 s. ISBN 08-056-83.
- [14] JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets : Physiology and biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2005, 31, 4, s. 381-392. ISSN 0094-6176.
- [15] KERSHAW, G.; JAYAKODI, D.; DUNKLEY, S. Laboratory identification of factor inhibitors : The perspective of large tertiary homophilia center. *Semin Thromb Hemost*. 2009, 35, 8, s. 760-8.
- [16] KHOSCHNEWIS, S., et al. INR comparison between the CoaguChec Pro PT(N) and a standard laboratory method. *Thromb Res*. 2004, 113, 5, s. 327-32.

[17] KOZEK-LANGENECKER, S. A. Perioperative coagulation monitoring. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2010, 24, 1, s. 27-40.

[18] KURATA, M.; HORII, I. Blood coagulation tests in toxicological studies : Rewiew of methods and their significance for drug safety assessment. *The Journal of Toxilogical Sciences.* 2004, 29, 1, s. 13-32.

[19] KUBISZ, P. , et al. *Hematológia a transfuzológia.* Bratislava : Grada Publishing, a.s., 2006. 324 s. ISBN 80-8090-000-0.

[20] KVASNIČKA, J. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi.* Praha : Grada. 2003. 299 s. ISBN 80-7169-993-4.

[21] LAGA, A. C.; CHEVES, T. A.; SWEENEY, J. D. The effect of specimen hemolysis on coagulation test result. *Coagulation and Transfusion Medicine.* 2006, 126, 5, s. 748-755.

[22] LEVI, M.; SCHULTZ, M. Coagulopathy and platelet disorders in critically ill patients. *Minerva Anesthesiologica.* 2010, 76, 10, s. 851-859. ISSN 0375-9393.

[23] LICARI, L. G.; KOVACIC, J. P. Thrombin physiology and pathophysiology. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.* 2009, 19, 1, s. 11-22. ISSN 1479-3261.

[24] LIPPI, G., et al. Influence of centrifuge temperature on routine coagulation testing. *Clinical Chmestry .* 2006, 52, s. 537-538.

[25] LOWENBERG, E. C.; MEIJERS, J. C. ; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med.* 2010, 68, 6, s. 242-51.

- [26] MANEGATTI, M.; PEYVANDI, F. Factor X deficiency. *Semin Thromb Hemost.* 2009, 35, 4, s. 407-15.
- [27] MATÝŠKOVÁ, M.; ZAVŘELOVÁ, J.; HRACHOVINOVÁ, I. *Hematologie pro zdravotní laboranty 2. díl : Krevní srážení*. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1999. 203 s. ISBN 80-7013-278-7.
- [28] MATÝŠKOVÁ, M.;. *Až k současnému pojetí krevního srážení : Prezentace*. Brno : OKH, 2010. 37 s.
- [29] MARTINCIC, D.; KRAVTSOV, V.; GAILANI, D. Factor XI messenger RNA in human platelets. *Blood*. 1999, 94, 10, s. 3397-3404.
- [30] MITROULIS, I., et al. The multivalent activity of the tissue factor-thrombin pathway in thrombotic and non-thrombotic disorders as a target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets*. 2010, 15, 1, s. 75-89.
- [31] MUSZBEK, L., et al. Factor XIII and atherothrombotic diseases. *Semin Thromb Hemost*. 2010, 36, 1, s. 18-33.
- [32] OSMAN, A.; LINHDAL, T. L. . Plasma predilution with addition of depleted plasma in a prothrombin time reagent improves the agreement between different prothrombin time methods. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009, 69, 3, s. 395-400.
- [33] OWENS, A. P.; MACKMAN, N. Tissue factor and thrombosis : The clot starts here. *Thrombosis and Haemostasis*. 2010, 104, 3, s. 432-439. ISSN 0340-6245.
- [34] PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu III. : Fyziologie a patofyziologie hemostázy*. Český Těšín : FINIDR, s.r.o., 2004. 238 s. ISBN 80-86682-03-X.

- [35] PECKA, M., et al. *Praktická hematologie : Laboratorní metody*. Český Těšín : FINIDR, s.r.o., 2010. 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5.
- [36] PECKA, M., MALÝ, J., DEJMKOVÁ, J. *Přehled laboratorní hematologie III. : Hemostáza Imunohematologie*. Český Těšín : Galén, 1998. 152 s. ISBN 80-85824-89-2.
- [37] PERRY, D. J., et al. Point-of-care testing of haemostasis. *Br J Haematol.* 2010, 150, 5, s. 501-14.
- [38] SALVAGNO, G. L.; BERNTORP, E. Thrombin generation testing for monitoring hemophilia treatment : A clinical perspective. *Semin Thromb Hemost.* 2010, 36, 7, s. 780-90.
- [39] SCOTT E. M., et al. Genetic and environmental determinants of fibrin structure and function : relevance to clinical disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* . 2004, 24, s. 1558.
- [40] SINAURIDZE , E. I., et al. A new drug form of blood coagulation factor IX : Red blood cell-entrapped factor IX. *Medical Science Monitor*. 2010, 16, 10, s. PI19-PI26. ISSN 1234-1010.
- [41] *SOP H 02 APTT*. České Budějovice : LABOMA s.r.o., 2010. 6 s.
- [42] *SOP H 04 Q*. České Budějovice : LABOMA s.r.o., 2010. 6 s.
- [43] STAVROU, E.; SCHMAIER, A. H. Factor XII : What does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis and thrombosis. *Thrombosis Research*. 2010, 125, 3, s. 210-215. ISSN 0049-3848.

[44] *Stručná uživatelská příručka : Automatický koagulační analyzátor CEVERON® Alpha*. Technoclone, 2008. 18 s.

[45] THUERLMANN, Ch.; HAEBERLI, A.; ALBERIO, L. . Hemostasis and thrombosis : monitoring thrombin generation by elektrochemistry: development of an amperometric biosensor screening test for plasma and whole blood. *Clinical Chemistry*. 2009, 55, s. 505-512.

[46] WANG, J. W.; EIKENBOOM, J. Von Willebrand disease and Weibel-Palade bodies. *Hamostaseologie*. 2010, 30, 3, s. 150-155. ISSN 0720-9355.

8. Klíčová slova

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas – aPTT

Fibrinogen

Hemostáza

Koagulační analyzátor

Protrombinový čas - PT

Tkáňový faktor

Key words

Activated partial thromboplastin time

Coagulation analyzer

Fibrinogen

Hemostasis

Prothrombin time

Tissue factor

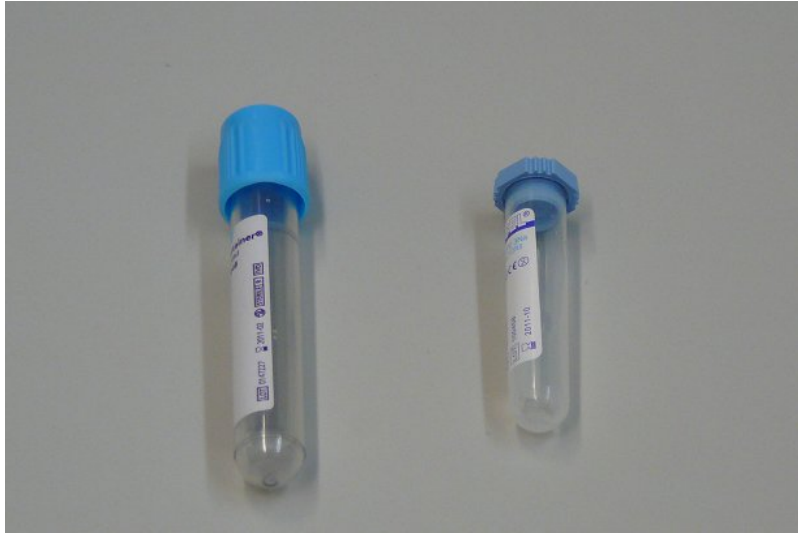
9. Přílohy



Obr. 2: Manuální metoda, vyšetření protrombinového času (Quickův test)



Obr. 3: Automatický koagulační analyzátor CEVERON[®] Alpha



Obr. 4: Odběrové zkumavky používané v laboratoři Laboma s.r.o. (vlevo: zkumavka odběrového systému BD VacutainerTM, vpravo: zkumavka odběrového systému AQUISEL)

Název souboru: F-023 Verifikační-protokol.doc

Metoda: Stanovení APTT Název použité soupravy: DAPTIN
Analyzátor: CEVERON® Alpha Výrobce: Technoclone
Vyhodnotil: Kat. číslo: 5277017
Datum: 13.9. 2010

1. Mezilehlá přesnost

Datum: Vzorek 1 1.7. – 14.10. 2010 Použitý Vzorek 1 Coagulation Control N f. Ceveron
(od - do) Vzorek 2 1.7. – 14.10. 2010 materiál: Vzorek 2 Coagulation Control A f. Ceveron
Vzorek 3 Vzorek 3

	Počet hodnot	Průměr	SD	CV
Vzorek 1	23	1,04	0,029	2,8
Vzorek 2	23	1,96	0,048	2,4
Vzorek 3				

2. Opakovatelnost, bias

Provedl:

Datum: 25.8. 2010

Použitý materiál: Vzorek A = Coagulation Control N f. Ceveron
Vzorek B = Coagulation Control A f. Ceveron
Vzorek C =

Výsledné hodnoty:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek A	1,000	1,000	1,010	1,010	1,000	0,990	1,000	1,000	1,010	1,000
Vzorek B	1,910	1,920	1,910	1,900	1,920	1,920	1,910	1,910	1,910	1,910
Vzorek C										

Intraindividuální biologická variabilita (CV_i) =	2,7
Interindividuální biologická variabilita (CV_g) =	8,6
Celková biologická variabilita =	9,0
Přesnost odvozená z biologických variabilit I_{biol} =	1,4
Bias odvozený z biologických variabilit B_{biol} =	2,3
Celková chyba odvozená z biologických variabilit TE_{biol} =	4,5

Vyhodnocení:

Vzorek	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Jednotky
Průměr	1,002	1,912		
Cílová hodnota	1,000	1,930		
Nejistota ref. materiálu				%
SD	0,006	0,006		
CV	0,631	0,331		%
R(x)	100,200	99,067		%
b	0,200	-0,933		%

Není zadána nejistota referenčního materiálu.

Mezní hodnota nejistoty (%):	20,00
Pramen:	SEKK
Výsledek verifikace:	Vzorek A Vyhovuje
	Vzorek B Vyhovuje
	Vzorek C

3. Kombinovaná nejistota:

$$u_{r,tot} (\%) = 2,877 \quad \text{pro } c = 1,000$$

$$u_{r,tot} (\%) = 2,596 \quad \text{pro } c = 1,930$$

$$u_{r,tot} (\%) = \quad \quad \quad \text{pro } c =$$

Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu při 95% intervalu spolehlivosti:

4. Závěr:

Kombinovaná nejistota je vyhovující vzhledem TMU SEKK. Metoda je vhodná ke klinickému využití.

Platnost do: 5.8. 2011

Obr. 7: Verifikační protokol metody aPTT

Název souboru: F-023 Verifikační-protokol.doc

Metoda: Stanovení INR Název použité soupravy: Technoplastin HIS
 Analyzátor: CEVERON® Alpha Výrobce: Technoclone
 Vyhodnotil: Kat. číslo: 5003022
 Datum: 13.9. 2010

1. Mezilehlá přesnost

Datum: Vzorek 1 1.7. – 14.10. 2010 Použitý Vzorek 1 Coagulation Control N f. Ceveron
 (od - do) Vzorek 2 1.7. – 14.10. 2010 materiál: Vzorek 2 Coagulation Control A f. Ceveron
 Vzorek 3 Vzorek 3

	Počet hodnot	Průměr	SD	CV
Vzorek 1	23	1,04	0,044	4,2
Vzorek 2	23	3,48	0,225	6,5
Vzorek 3				

2. Opakovatelnost, bias

Provedl:

Datum: 25.8. 2010

Použitý materiál: Vzorek A = Coagulation Control N f. Ceveron
 Vzorek B = Coagulation Control A f. Ceveron
 Vzorek C =

Výsledné hodnoty:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek A	1,020	1,010	1,010	1,010	1,020	1,020	1,010	1,010	1,000	1,010
Vzorek B	3,570	3,570	3,550	3,550	3,540	3,540	3,530	3,540	3,550	3,530
Vzorek C										

Intraindividuální biologická variabilita (CV_i) =	4,0
Interindividuální biologická variabilita (CV_g) =	6,8
Celková biologická variabilita =	7,9
Přesnost odvozená z biologických variabilit I_{biol} =	2,0
Bias odvozený z biologických variabilit B_{biol} =	2,0
Celková chyba odvozená z biologických variabilit TE_{biol} =	5,3

Vyhodnocení:

Vzorek	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Jednotky
Průměr	1,012	3,547		
Cílová hodnota	1,000	3,900		
Nejistota ref. materiálu	0,000	0,000		%
SD	0,006	0,014		
CV	0,625	0,400		%
R(x)	101,200	90,949		%
b	1,200	-9,051		%

Není zadána nejistota referenčního materiálu.

Mezní hodnota nejistoty (%):	20,00
Pramen:	SEKK
Výsledek verifikace:	Vzorek A Vyhovuje
	Vzorek B Vyhovuje
	Vzorek C

3. Kombinovaná nejistota:

$$u_{r,tot}(\%) = 4,413 \quad \text{pro } c = 1,000$$

$$u_{r,tot}(\%) = 11,151 \quad \text{pro } c = 3,900$$

$$u_{r,tot}(\%) = \quad \text{pro } c =$$

Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu při 95% intervalu spolehlivosti:

$$\text{pro } c = 1,00 \quad (0,912 - 1,088)$$

$$\text{pro } c = 3,90 \quad (3,030 - 4,770)$$

4. Závěr:

Kombinovaná nejistota je vyhovující vzhledem TMU SEKK. Metoda je vhodná ke klinickému využití.

Platnost do: 5.8. 2011

Obr. 8: Verifikační protokol metody PT

Tabulka 2: Naměřené hodnoty u aPTT

číslo vzorku	aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas)							
	sec.				Ratio			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
1	31,1	30,8	31,0	35,3	0,9	0,9	0,9	1,1
2	43,6	41,2	44,4	50,5	1,3	1,2	1,3	1,5
3	67,6	59,8	62,4	78,8	2,0	1,8	1,9	2,4
4	47,9	45,5	45,3	54,0	1,4	1,4	1,4	1,6
5	39,7	40,5	39,7	43,9	1,2	1,2	1,2	1,3
6	36,8	37,8	37,6	40,6	1,1	1,1	1,1	1,2
7	35,4	35,9	36,8	40,8	1,1	1,1	1,1	1,2
8	55,7	53,5	53,6	60,6	1,7	1,6	1,6	1,8
9	36,5	36,1	35,8	39,9	1,1	1,1	1,1	1,2
10	47,0	47,1	48,0	53,3	1,4	1,4	1,5	1,6
11	33,5	33,2	33,6	37,9	1,0	1,0	1,0	1,1
12	33,2	33,1	34,0	37,5	1,0	1,0	1,0	1,1
13	36,4	37,5	37,6	41,2	1,1	1,1	1,1	1,2
14	37,5	37,3	37,6	44,1	1,1	1,1	1,1	1,3
15	42,7	43,7	44,2	49,4	1,3	1,3	1,3	1,5
16	31,5	31,6	31,6	35,6	1,0	1,0	1,0	1,1
17	53,4	55,3	56,0	61,6	1,6	1,7	1,7	1,9
18	27,7	28,7	29,3	31,3	0,8	0,9	0,9	0,9
19	53,1	50,8	51,7	59,6	1,6	1,5	1,6	1,8
20	36,2	36,9	35,5	40,2	1,1	1,1	1,1	1,2
21	47,0	51,1	48,5	53,4	1,4	1,5	1,5	1,6
22	30,7	30,6	33,0	36,3	0,9	0,9	1,0	1,1
23	40,5	40,4	42,6	47,6	1,2	1,2	1,3	1,4
24	33,8	33,6	33,6	36,1	1,0	1,0	1,0	1,1
25	31,6	32,5	31,6	33,9	1,0	1,0	1,0	1,0
26	42,9	43,0	44,8	49,0	1,3	1,3	1,4	1,5
27	43,2	40,4	45,0	50,0	1,3	1,2	1,4	1,5

číslo vzorku	aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas)							
	sec.				Ratio			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
28	55,2	51,3	55,1	60,4	1,7	1,5	1,7	1,8
29	45,1	44,6	46,2	49,8	1,4	1,3	1,4	1,5
30	36,4	36,2	36,2	38,9	1,1	1,1	1,1	1,2
31	30,9	32,6	32,2	34,0	0,9	1,0	1,0	1,0
32	40,9	43,5	44,0	45,8	1,2	1,3	1,3	1,4
33	40,2	42,9	43,3	48,0	1,2	1,3	1,3	1,5
34	45,2	48,1	46,8	52,1	1,4	1,5	1,4	1,6
35	41,8	44,0	43,9	47,0	1,3	1,3	1,3	1,4
36	26,4	27,1	27,9	30,4	0,8	0,8	0,8	0,9
37	29,6	31,9	30,5	35,7	0,9	1,0	0,9	1,1
38	37,0	36,9	37,5	44,1	1,1	1,1	1,1	1,3
39	30,1	30,2	30,3	35,1	0,9	0,9	0,9	1,1
40	28,5	28,4	28,7	30,4	0,9	0,9	0,9	0,9
41	29,3	28,3	29,4	32,0	0,9	0,9	0,9	1,0
42	31,0	31,3	31,9	34,0	0,9	0,9	1,0	1,0
43	31,4	31,9	32,8	34,5	0,9	1,0	1,0	1,0
44	42,3	41,5	42,5	45,2	1,3	1,3	1,3	1,4
45	32,0	33,0	32,9	34,8	1,0	1,0	1,0	1,1
46	31,3	31,6	31,5	35,2	0,9	1,0	1,0	1,1
47	44,9	44,5	44,4	49,5	1,4	1,3	1,3	1,5
48	54,5	53,9	54,0	56,1	1,6	1,6	1,6	1,7
49	35,3	35,3	35,6	36,3	1,1	1,1	1,1	1,1
50	40,2	39,8	40,3	43,7	1,2	1,2	1,2	1,3

Tabulka 3: Naměřené hodnoty u PT

číslo vzorku	QUICK (protrombinový čas)							
	sec.				%			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
1	12,4	12,0	11,9	12,9	102,1	108,3	110,0	95,2
2	30,1	28,5	28,3	30,2	28,6	30,6	30,9	28,5
3	49,6	48,9	47,1	48,9	16,0	16,2	16,9	16,2
4	27,6	26,4	25,7	27,8	31,9	33,7	34,9	31,6
5	21,6	21,3	20,9	22,4	43,7	44,6	45,7	41,7
6	25,8	25,0	24,7	26,0	34,7	36,1	36,7	34,4
7	26,6	26,2	25,1	27,0	33,4	34,0	35,9	32,8
8	38,9	36,9	37,1	39,1	21,1	22,4	22,3	21,0
9	22,0	21,4	21,4	23,0	42,7	44,3	44,3	40,2
10	26,1	25,6	25,6	27,5	34,2	35,0	35,0	32,0
11	17,3	16,9	16,5	18,3	59,7	61,8	64,0	55,0
12	14,2	13,8	13,8	15,0	80,9	84,8	84,8	74,1
13	21,9	21,6	21,4	23,0	42,9	43,7	44,3	40,2
14	22,5	22,1	21,5	23,3	41,4	42,4	44,0	39,6
15	25,0	23,6	23,3	25,2	36,1	38,9	39,6	35,8
16	16,2	15,6	15,1	16,8	65,8	69,7	73,4	62,3
17	35,9	33,6	33,6	35,0	23,2	25,1	25,1	23,9
18	14,0	13,3	13,5	14,4	82,9	90,3	88,0	79,1
19	29,7	28,2	27,2	29,3	29,1	31,0	32,5	29,6
20	20,6	20,5	20,2	21,3	46,6	47,0	47,9	44,6
21	35,8	36,3	36,0	36,3	23,2	22,9	23,1	22,9
22	13,0	12,9	12,9	14,0	93,9	95,2	95,2	82,9
23	28,1	27,9	27,9	29,2	31,2	31,4	31,4	29,7
24	17,8	18,1	17,4	18,5	57,3	55,9	59,2	54,2
25	13,0	12,9	12,8	13,7	93,9	95,2	96,5	85,9
26	30,7	29,8	29,2	32,4	27,9	29,0	29,7	26,2
27	28,9	28,6	28,1	30,4	30,1	30,5	31,2	28,3

číslo vzorku	QUICK (protrombinový čas)							
	sec.				%			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
28	28,7	27,3	27,8	30,0	30,4	32,3	31,6	28,7
29	33,9	33,6	33,2	35,3	24,8	25,1	25,4	23,6
30	14,8	14,3	14,6	15,4	75,5	80,0	77,4	71,1
31	13,7	13,3	13,4	14,4	85,9	90,3	89,1	79,1
32	30,8	29,6	30,6	31,9	27,8	29,2	28,1	26,7
33	30,3	29,6	29,3	31,5	28,4	29,2	29,6	27,1
34	34,4	33,4	32,9	35,6	24,4	25,2	25,7	23,4
35	26,0	25,2	24,9	26,6	34,4	35,8	36,3	33,4
36	13,4	13,2	13,0	14,1	89,1	91,5	93,9	81,9
37	12,4	12,0	12,1	13,1	102,1	108,3	106,7	92,7
38	22,8	21,9	22,0	23,5	40,7	42,9	42,7	39,1
39	13,8	13,5	13,6	14,5	84,8	88,0	86,9	78,3
40	13,6	13,3	13,5	14,6	86,9	90,3	88,0	77,4
41	12,0	11,6	11,9	13,0	108,3	115,4	110,0	93,9
42	18,8	18,3	18,7	20,0	53,0	55,0	53,4	48,6
43	13,5	13,3	12,9	14,5	88,0	90,3	95,2	78,3
44	28,8	27,7	27,8	29,4	30,2	31,7	31,6	29,5
45	13,5	12,9	12,9	14,5	88,0	95,2	95,2	78,3
46	12,4	12,3	12,4	13,3	102,1	103,6	102,1	90,3
47	30,4	29,9	29,2	32,6	28,3	28,9	29,7	26,0
48	28,5	27,9	27,3	29,4	30,6	31,4	32,3	29,5
49	13,7	12,9	13,1	14,8	85,9	95,2	92,7	75,7
50	32,9	32,1	32,0	34,2	25,7	26,5	26,6	24,5

Tabulka 4: Naměřené hodnoty u PT (pokračování)

číslo vzorku	QUICK (protrombinový čas)			
	INR			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
1	0,98	0,94	0,93	1,03
2	3,10	2,89	2,86	3,12
3	5,94	5,83	5,55	5,83
4	2,77	2,62	2,53	2,80
5	2,02	1,98	1,93	2,11
6	2,54	2,44	2,40	2,56
7	2,64	2,59	2,45	2,69
8	4,33	4,04	4,07	4,36
9	2,06	1,99	1,99	2,19
10	2,58	2,51	2,51	2,76
11	1,51	1,46	1,42	1,62
12	1,17	1,13	1,13	1,25
13	2,05	2,02	1,99	2,19
14	2,12	2,08	2,00	2,22
15	2,44	2,26	2,22	2,46
16	1,39	1,32	1,27	1,45
17	3,90	3,58	3,58	3,77
18	1,15	1,07	1,09	1,19
19	3,05	2,85	2,72	3,00
20	1,89	1,88	1,85	1,98
21	3,89	3,96	3,91	3,96
22	1,04	1,03	1,03	1,15
23	2,84	2,81	2,81	2,98
24	1,57	1,60	1,52	1,65
25	1,04	1,03	1,02	1,11
26	3,18	3,06	2,98	3,41
27	2,94	2,90	2,84	3,14

číslo vzorku	QUICK (protrombinový čas)			
	INR			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
28	2,92	2,73	2,80	3,09
29	3,62	3,58	3,52	3,82
30	1,23	1,18	1,21	1,30
31	1,11	1,07	1,08	1,19
32	3,20	3,04	3,17	3,35
33	3,13	3,04	3,00	3,29
34	3,69	3,55	3,48	3,86
35	2,56	2,46	2,42	2,64
36	1,08	1,06	1,04	1,16
37	0,98	0,94	0,95	1,05
38	2,16	2,05	2,06	2,25
39	1,13	1,09	1,10	1,20
40	1,10	1,07	1,09	1,21
41	0,94	0,90	0,93	1,04
42	1,68	1,62	1,67	1,82
43	1,09	1,07	1,03	1,20
44	2,93	2,78	2,80	3,01
45	1,09	1,03	1,03	1,20
46	0,98	0,97	0,98	1,07
47	3,14	3,08	2,98	3,44
48	2,89	2,81	2,73	3,01
49	1,11	1,03	1,05	1,23
50	3,48	3,37	3,36	3,66