

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta



**Porovnání analyzátorů dvou generací, kontrola kvality a využití pro
akreditace a SLP.**

Bakalářská práce

Vojtěch Samuel Valerián

2008

Vedoucí práce: Mgr. Ivana Malíková

Abstract

The objective of this thesis was to compare measurements in two types of coagulation analyzers by using the various types of software, implementation of a new methodology, its consequent use for diagnostics and implementation of quality inspection for various methodologies. **Methodology:** Measurements were performed by using the coagulation analyzers BCS (Behring Coagulation System) made by the company Dade Behring, Marburg, GmbH. One of the analyzers uses the operation system Windows XP and the second uses OS Mac. The same measurements of individual methods, used for screening of thrombotic states, were performed on both analyzers. We measured coagulation setting prothrombin time, activated partial time, thrombin time, antithrombin III, fibrinogen and D-dimer. We implemented a new methodology for monitoring of heparin (low molecular weight, pentasaccharides or unfractionated heparin) by setting the units of anti Xa inhibition.

Results: Individual coagulation measurements were performed in parallel on both types of analyzers with the same samples. The results were explained and used for the internal check of the laboratory as an interlaboratory comparison. Measurements were performed approximately once a week in three selected patients' samples. The individual correlation quotients in BSC OS Mac and BCS XP were measured for PT = 0.851; APTT = 0.906; TT = 0.985; Fbg = 0.939; AT III = 0.907; D-dimer = 0.476. A new methodology of monitoring of low molecular weight heparin and pentasaccharide by using the kits Coamatic® Heparin and Pefakit PiCT, Arixtra® Pentapharm. Calibration was made by using diluted injection preparation was made for individual kits. Comparison of levels of pentasaccharide and low molecular weight heparin was performed for 157 samples. Correlation quotient between the anti Xa units in low molecular weight heparin and pentasaccharide was 0.806.

Favourable variation quotients were performed by the interlaboratory comparison of the quality inspection. **Conclusion:** Compared analyzers with various software BSC OS Mac and BSC XP do not differ in measured values from the statistical point of view, values of all watched tests also correlate well together. It is possible to use both implemented tests for setting the units of anti Xa inhibition and pentasaccharide, values

also correlate well together. Methods of setting the anti Xa inhibition are used for reliable monitoring of low molecular heparin and may reveal also resistance against low molecular heparin, which can make treatment of thrombophilic states more complicated.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Porovnání analyzátorů dvou generací, kontrola kvality a využití pro akreditace a SLP* vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

Souhlasím s použitím práce k vědeckým účelům.

V Českých Budějovicích 9.5.2008

.....

Podpis studenta

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval mému vedoucímu práce Mgr. Ivaně Malíkové za čas, odborné rady a hlavně trpělivost při tvorbě této práce. Svým rodičům, kteří mě celý život podporují. Petře Matějovské za neutuchající psychickou podporu a trpělivost při korekturách této práce. A všem mým kamarádům, kteří mi jakkoli pomáhali.

Obsah

Úvod.....	7
1. Současný stav.....	8
1.1 Hemostáza.....	9
1.1.1 Krvácivé stavy	9
1.1.2 Trombotické stavy	11
1.1.3. Terapie při trombotických stavech	12
1.2 Plazmatický koagulační systém	13
1.3 Koagulační faktory	14
1.4 Přeměna protrombinu na trombin	16
1.5 Přeměna fibrinogenu na fibrin	17
1.6 Fibrinolytický systém	17
1.7 Inhibitory krevního srážení.....	18
1.8 Inhibitory fibrinolýzy.....	19
1.9 Správná laboratorní praxe	20
2. Cíle práce a hypotézy.....	22
2.1 Cíle práce	23
2.2 Hypotézy	23
3. Metodika	24
3.1 Koagulační stanovení jednotlivých metod.....	24
3.1.1 Protrombinový, tromboplastinový čas (PT; QUICK,).....	24
3.1.2 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT).....	25
3.1.3 Trombinový čas (TT).....	25
3.1.4 Antitrombin III (AT III).....	26
3.1.5 D-Dimer	26
3.1.6 Fibrinogen.....	27
3.2 Vlastní měření.....	29
3.2.1. Analyzátor BCS	29
3.2.2 Kalibrace	30
3.2.3 Kontrolní měření.....	30
3.2.4 Kontrola kvality	31
3.3. Metody pro sledování anti Xa aktivity	32
3.3.1. Pefakit® PiCT.....	32
3.3.2 COAMATIC® Heparin	33
3.3.3 Arixtra.....	34
3.3.4. Dodatek.....	34
3.4. Zpracování dat	35
4. Výsledky	35
5. Diskuse.....	46
6. Závěr	50
7. Použitá literatura	51
8. Seznam zkratk	56
9. Klíčová slova	58
10. Přílohy.....	59

Úvod

Trombotické stavy patří mezi nejčastější příčiny úmrtí v populaci, přitom více než polovina z nich připadá na infarkt myokardu. Trombotické stavy se dělí na dědičné a získané. Důvodem těchto stavů mohou být vedle poruch koagulačních faktorů nebo jejich inhibitorů i poruchy krevních destiček, leukocytů, endoteliálních buněk apod. Podle místa vzniku rozdělujeme trombózy na žilní trombózy, arteriální trombózy, trombotické cévní příhody a syndrom diseminované intravaskulární koagulace ⁽²⁴⁾.

Žilní trombózu způsobuje především zástava proudění krve a hyperkoagulace, ke které dochází při aktivaci plazmatických koagulačních faktorů a při selhání funkce jejich přirozených inhibitorů v krevní plazmě a krevním řečišti. Možnou letální komplikací je utržení trombu s následnou embolizací do plic (80% pacientů s plicní embolií umírá do dvou hodin) ⁽³³⁾. Při vzniku arteriální trombózy se na počátku především uplatňuje aktivace a agregace krevních destiček a dysfunkce endotelu, která je vyvolána ve většině případů aterosklerotickým procesem při zánětu cévní stěny. Trombotické stavy bychom měli umět diagnostikovat, neboť při jejich časném rozpoznání lze vhodně zvolenou profylaktickou léčbou a kontrolou její účinnosti zabránit vzniku nebo opětovného výskytu trombóz ⁽²⁶⁾.

Se získanými trombotickými stavy, které často bývají komplexnější povahy, se setkáváme u pokročilých jaterních onemocnění, nefrotického syndromu, zhoubných nádorových procesů, v pooperačním období, v průběhu těhotenství, v poporodním období nebo u myeloproliferačních onemocnění. Trombotické komplikace bývají často klinickým příznakem v přítomnosti antifosfolipidových protilátek, které se mohou vyskytovat při systémovém onemocnění nebo i ojediněle.

Léčba trombotických stavů, zvláště vrozených, spočívá v prevenci. U lehčích forem se při rizikových situacích podávají antikoagulanty, jako je například heparin. U těžkých forem trombotických stavů je prevence celoživotní a zakládá se na podávání heparinu nebo kumarinových přípravků. Primární léčbou trombotických příhod je antikoagulační léčba heparinem, doplněná podáváním chybějících faktorů v podobě čerstvě mražené plazmy nebo koncentrátů.

Nefrakcionovaný heparin má ovšem řadu nežádoucích účinků, které mohou vést ke komplikacím. Nejčastěji se setkáváme s předávkováním, které se projevuje krvácením

u 5-10 % léčených pacientů. Pro kontrolu podávané dávky stanovujeme APTT. Nefrakcionovaný heparin při metabolických změnách vede k rozdílnosti hladin v plazmě. Někdy může docházet k rezistenci na heparin, což se projevuje tím, že po podání vysoké dávky heparinu (až 40 000 IU) nedochází ke zvýšení APTT. Může docházet k hypersenzitivitě s výskytem alergických projevů. V 60. letech minulého století byly izolovány fragmenty heparinu. Jsou to účinné nízkomolekulární složky, které vykazují méně nežádoucích účinků provázejících léčbu standardním heparinem. Do klinické praxe byly uvedeny jako preparáty nízkomolekulárního heparinu. Liší se různou přípravou, molekulární hmotností a poměrem vazby F Xa a F IIa. Jak ukazuje řada klinických studií, jsou nízkomolekulární hepariny vhodnější než nefrakcionovaný heparin. Mají nižší počet nežádoucích účinků a jednoduchou subkutánní aplikaci. LMWH lze používat jako prevenci i jako dlouhodobou léčbu, např. při komplikovaném těhotenství ⁽²³⁾. I když jsou doporučeny dávky LMWH vztažené na BMI, je vhodné léčbu monitorovat, aby byla ověřena účinnost podávané dávky.

1. Současný stav

1.1 Hemostáza

Hemostáza představuje jeden z mechanismů, který udržuje celistvost vnitřního prostředí. Za fyziologických podmínek zajišťuje tekutost krve v inertním cévním řečišti. V případě porušení souvislosti cévní stěny vede krevním srážením (koagulací) k zástavě krvácení. Hemostatická rovnováha je výsledkem normální funkce cévní stěny, krevních destiček a plazmatických činitelů zahrnujících koagulační a fibrinolytický systém a jejich inhibitory. Narušení této rovnováhy se může projevit jako krvácivý nebo trombotický stav ⁽³¹⁾.

1.1.1 Krvácivé stavy

Krvácivé stavy jsou charakteristické spontánními krvácivými projevy nebo krvácením, které je neúměrné danému stavu. Ke krvácivému stavu dochází při porušení některého z mechanismů hemostatické rovnováhy. Krevní destičky hrají důležitou úlohu při tvorbě primární hemostatické zátky. Proto při sníženém počtu destiček nebo jejich funkční nedostatečnosti se mohou projevovat jako krvácivé stavy. Koagulopatie jsou krvácivé stavy způsobené sníženou koncentrací nebo sníženou aktivitou daného koagulačního faktoru (popřípadě celou řadou faktorů). Mají většinou klasický klinický obraz projevující se spontánním krvácením. Mírnější koagulopatie se projevují pouze při poranění nebo chirurgickém zákroku. Těžké projevy se objevují při poklesu aktivity koagulačního faktoru pod 5%. Z vrozených koagulopatií jsou nejčastější hemofilie, von Willebrandova choroba a autonomní koagulopatie.

Hemofilie A je způsobena nedostatkem nebo nedostatečnou funkčností F VIII. Při Hemofilii B jde o poruchu F IX. Obě tyto hemofilie jsou vázané na pohlavní chromosom X s recesivním typem dědičnosti. Hemofilie se léčí substituční metodou (nahrazení nedostatečného faktoru) ⁽²⁵⁾.

Von Willebrandova choroba je autosomálně dědičná (postihuje ovšem převážně ženy). Příčinou této nemoci je nedostatek nebo porucha von Willebrandova faktoru (vWF). Je narušena primární hemostáza a dochází ke snížení F VIII. Je důležité odlišit vW chorobu od Hemofilie A pomocí agregace destiček (ristocetinem) a měření hladiny

vWF. Pacientům s touto chorobou se podává koncentrát s obsahem vWF a léčí se klinické projevy krvácení⁽²⁹⁾.

Získané koagulopatie se vyznačují tím, že je snížena celá skupina koagulačních faktorů. Jsou častější než koagulopatie vrozené. Vhodná léčba je stavěna tak, že většinou stačí dosáhnout vymizení příznaků. Mezi získané koagulopatie můžeme zařadit poruchy resorpce a využití vitamínu K, cirkulující antikoagulans (CA) a konsumpční koagulopatie (DIC).

Poruchy resorpce a využití vitamínu K vedou k nedostatečné produkci vitamín K dependentních faktorů (F II, F VII, F IX, F X), které se tvoří v játrech. Při krvácení z příčiny nedostatku vitamínu K je nejvhodnější léčba úprava hladin faktorů, transfúzními přípravky s podáváním vitamínu K.

Autonomní koagulopatie je onemocnění, při kterém někteří jedinci mohou tvořit protilátku proti některému z vlastních koagulačních faktorů. Jde většinou o látku proteinové povahy IgG. Inhibiční účinek může být namířen proti jakémukoliv faktoru. U této skupiny onemocnění nefunguje žádná substituční léčba. Léčba je závislá na koncentraci inhibitoru. Při vysoké koncentraci se užívá plazmaferéza a imunosupresní terapie.

Konsumpční koagulopatie (diseminovaná intravaskulární koagulopatie - DIC) představuje poruchu, při které dochází k významné aktivaci hemostázy s tvorbou vnitrocévních mikrotrombů, spotřebě koagulačních faktorů, aktivaci sekundární fybrinolýzy a tendenci ke krvácení. DIC se projevuje sníženou hladinou koagulačních faktorů, krevních destiček, zvýšenou hladinou trombinu, volného monomeru fibrinu a aktivací fybrinolýzy (vysoká hladina D-dimeru). Syndrom DIC je doprovodným jevem závažných onemocnění. Klinicky se většinou vyskytují těžké krvácivé nebo trombotické projevy, často současně. DIC můžeme rozdělit do 3 stádií: 1. Hyperkoagulační, 2. Hypokoagulační a 3. Aktivace fybrinolýzy. U prvního a druhého stádia jsou měřitelné hodnoty základního koagulačního screeningu (AT III, fibrinogen snížen; APTT prodloužen). Ve 3. stádiu již většinou není možné měřit hodnoty na analyzátorech. První a druhé stádium se dá léčit heparinem a substitucí, u třetího se používají antifibrinolytika. DIC může mít i akutní průběh a projevit se přímo jako

krvácivý stav s téměř nesrážlivou krví. Celková léčba je volena podle daného stadia a individuálního stavu pacienta.

1.1.2 Trombotické stavy

Trombotické stavy jsou chorobné stavy, při kterých dochází k intravaskulárnímu srážení (trombózám). Jde vlastně o opak krvácivého stavu. Obecně jde o porušení cévní stěny, hemodynamiky, o poruchy destičkových funkcí, narušení koagulačního a fibrinolytického systému. Tyto stavy může doprovázet řada onemocnění zvláště cévního zaměření, jako jsou tromboembolické stavy (dojde k tvorbě trombu, který se uvolní a následně ucpe některou z cév) ⁽¹⁾. Většinou se jedná o infarkt myokardu, plicní embolii, náhlou cévní příhodu mozkovou nebo žilní trombózy končetin ⁽³⁹⁾. Trombotické stavy můžeme rozdělit do dvou skupin: vrozené a získané.

Vrozené trombotické stavy jsou přesně definované a jejich klinický obraz je charakterizován především žilními trombózami v neobvyklých místech. Postižení bývají již lidé v mladém věku a bývá pozitivní rodinná anamnéza. Mezi rizikové faktory patří porucha v genu protrombinu (F II), defekt F V (faktor V Leiden), PC, PS, AT III, antifosfolipidový syndrom a abnormality fibrinolýzy (t-PA, PAI) ^(1, 36, 38).

Získané trombotické stavy bývají komplexnějšího původu. Setkáváme se s nimi například u nefrotického syndromu, těhotenství a šestinedělí, zhoubných nádorových procesů, v pooperačním období, myeloproliferačním období. Komplikace trombotických stavů obvykle bývají v přítomnosti antifosfolipidových protilátek (APA). APA mají schopnost interferovat na různých místech se systémem krevního srážení. Zvyšuje se riziko opakovaných potratů u postižených žen a větší náchylnost k žilní a arteriální trombóze. Laboratorně se zjišťují jednotlivé hladiny inhibitorů koagulace, fibrinolýzy, aktivace krevních destiček a speciální testy. Léčba je individuální podle stavu pacienta a formy a druhu trombotického stavu. Nejčastěji se podávají celoživotně antikoagulantia (heparin, Warfarin) jako prevence. U lehčích forem se antikoagulantia podávají jen za rizikových situací (těhotenství, operace). Popřípadě se léčba doplňuje chybějícími faktory pomocí koncentrátů.

1.1.3. Terapie při trombotických stavech

Antitrombotická terapie může být rozdělena na terapii antikoagulační, trombolytickou a antiagregační. Je zaměřena na zamezení nadměrného shlukování krevních destiček, zabránění narůstání trombu, případně rozpuštění fibrinové složky a omezení činnosti koagulačního systému. Hemostáza se aktivuje v místě poškozené cévní stěny, jako je odtržený endotel nebo porušený cholesterolový plát. Vzniká tak nástěnný trombus, který ve velkých tepnách, kde je velký tok krve, vytváří tromby obsahující zagregované destičky s krystaly cholesterolu a ateromatózní drtí ⁽⁴⁰⁾. Léčba se formuje jako antiagregační terapie. Ve stagnující krvi se rovněž může aktivovat hemostáza, ovšem léčba je mířená jako antikoagulační. Ve stagnující krvi je velké množství fibrinu a erytrocytů.

Kontrola terapie se provádí pomocí laboratorních testů, které by se měly pohybovat v referenčním rozmezí. Pokud by hodnoty byly příliš vysoké či nízké, nemocný by byl ohrožen krvácivými nebo tromboembolickými stavy.

Antikoagulační terapie zabraňuje tvorbě trombinu, který by následně dopomáhal tvorbě fibrinu (vznik trombu). Inhibuje také koagulační faktory. Léčba je prováděna pomocí heparinu nebo kumarinových přípravků. Heparin patří mezi nepřímá antikoagulantia a s AT III blokuje F X a F II. Používá se spíše při akutních stavech a je možné monitorovat léčbu pomocí APTT, speciálním testem na LMWH (nizkomolekulární heparin) a UFH (nefrakciováný heparin). Kumarinové přípravky působí na F II, F VII, F IX a F X (faktory závislé na vitamínu K). Léčba je stabilní až po několika dnech a kontrolu je možno provádět stanovením protrombinového času (PT). Mezi kumarinové přípravky můžeme zařadit například Warfarin s biologickým poločasem okolo 3 dnů.

Trombolytická terapie aktivuje fibrinolytický mechanismus, který je zaměřen na trombus v cévě. Jde o metodu neinvazivní na rozdíl od chirurgického zákroku trombotických ucpání cév. Terapie je směřována na zprůchodnění cévy a tím zlepšení cirkulačních pochodů v daném orgánu. Terapie se provádí pomocí trombolytik. Patří sem například streptokináza, urokináza, antistreptáza a tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA). Trombolytika jsou indikována při uzávěrech cév (infarkt myokardu - IM), plicní embolii a hluboké žilní trombose. Podávají se buď soustavně nebo jednorázově.

Jednorázově se podávají u IM, a to co nejdříve při projevu potíží a nejpozději do 6 hodin. U dlouhodobé léčby je možná kontrola terapie pomocí trombinového testu.

Antiagregační terapie je založena na inhibici funkce krevních destiček (omezení agregability). Na krevních destičkách je mnoho míst, kde je možné působit a ovlivňovat tak jejich shlukování ⁽²⁷⁾. Aktivace krevních destiček je složitý proces, který zahrnuje interakci agonisty s membránovým receptorem, transport signálu přes membránu do nitra destičky a specifickou odpověď destičky ⁽²⁴⁾. Extracelulární signály aktivace krevní destičky je možno rozdělit do tří skupin. Mezi silné agonisty patří trombin, kolagen, prostaglandiny, tromboxan a faktory ovlivňují destičky (PAF). Mezi slabé agonisty lze zařadit ADP, adrenalin a serotonin. Tito agonisté se projeví až po uvolnění obsahu destičkových granulí ⁽³⁶⁾. Farmakologicky můžeme například omezit degranulaci ADP z denzních granul krevních destiček, narušit cyklus kyseliny arachidonové, provést blokaci aktivace krevní destičky pomocí kyseliny acetylsalicylové (ASA) nebo ticlopidinem inhibovat vazbu destiček navzájem pomocí fibrinogenu. Monitorování léčby se provádí agregačními testy, při kterých se zjišťuje inhibice destiček u jednotlivých podnětů (kolagen, ADP, epinefrin, ristocetin, kyselina arachidonová).

1.2 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku zesíťovaného (nerozpustného) fibrinu. Jedná se o řadu enzymatických reakcí, při kterých dochází limitovanou proteolýzou ke štěpení proenzymů přítomných v krvi na aktivní enzymy. Podstatou tohoto systému je přeměna bílkoviny krevní plazmy fibrinogenu na fibrin, katalyzovaná trombinem. Tento systém se aktivuje stykem s tkáňovým faktorem nebo kontaktem se subendotelovými strukturami. V systému koagulace se uplatňuje kaskádovité zesílení, což znamená, že primární spouštěcí signál je mnohonásobně zesílen. Na každém stupni pak dochází ke zvýšení koncentrace meziproduktu. Fibrin vytváří vláknitou síť, ve které se zachycují krevní buňky a vytváří se stabilní fibrinová zátka. V poslední fázi dochází k retrakci okrajů rány a hojení, na čemž se podílejí krevní destičky.

1.3 Koagulační faktory

Většina faktorů je tvořena v játrech, u některých je zapotřebí k syntéze vitamín K (F II, FV, FX, FIX, protein C a S). Jedná se většinou o glykoproteiny charakteru proenzymů a kofaktorů, které se v plazmě nachází v neaktivní formě a v procesu srážení prodělávají strukturální změny. Deficit, nízká hladina nebo nefunkčnost faktorů vede ke krvácivým projevům.

F I (Fibrinogen)

Je syntetizován v játrech a skládá se ze tří párů peptidových řetězců. Fibrinogen je substrátem pro trombin a plazmin, kromě toho může být štěpen i jinými trombinu podobnými enzymy. Minimální koncentrace pro homeostázu je 0,5 – 1,0 g/l. Fibrinogen patří mezi proteiny akutní fáze (PAF)

F II (Protrombin)

Je složený asi z 500 aminokyselin. Vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K.

F III (Tkáňový faktor, tkáňový tromboplastin)

Jde o extrakt z tkáně, nejvíce obsažený je v mozku, plicích a placentě. Jeho koagulační aktivita závisí na druhu tkáně. Jde o jednořetězový polypeptid a patří mezi membránové proteiny.

F IV (Kalcium)

Chlorid vápenatý je zásadní pro každou fázi hemostázy. Nejmenší nutné množství pro hemokoagulaci je 0,5 mmol/l.

F V (Proakcelerin)

Vzniká v játrech a velmi snadno se váže na povrch membrán.

F VI

Zahrnuje destičkový faktor 3 a 4.

F VII (Prokorventin)

Je glykogen vznikající v játrech za přítomnosti vitamínu K. Jeho hlavní funkcí je přeměna F X na F Xa po exogenním podnětu.

F VIII (Antihemofilický faktor A)

Jde o glykoprotein, který je koagulačně neaktivní. Tento faktor má řadu stejných sekvencí jako F V. V plazmě se F VIII vyvazuje na von Willebrandův faktor (vWF), který jej chrání před biologickým štěpením. Funkčně aktivní funguje jako proteinový kofaktor při tvorbě komplexu F X. Jeho nedostatek nebo dysfunkce může vést k závažnému krvácivému defektu (hemofilie A).

F IX (Christmas faktor)

Je to glykoprotein vznikající v játrech za účasti vitamínu K. Při aktivaci se štěpí na 2 podjednotky.

F X (Stuart – Prower)

Je klíčovým faktorem koagulace, aktivuje se proteolytickým štěpením. Vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K.

F XI (Rosenthalův faktor)

Aktivuje se při kontaktní fázi plazmatického koagulačního procesu, jde o glykoprotein.

F XII (faktor Hageman)

Je to glykoprotein vznikající v játrech. K aktivaci dochází při poškození povrchu cévy. Za normálních fyziologických podmínek s cévní stěnou nereaguje.

F XIII (faktor stabilizující fibrin)

Tvoří se v krevních destičkách nebo játrech, jedná se glykoprotein.

1.4 Přeměna protrombinu na trombin

Tuto přeměnu můžeme podle dřívějších představ rozdělit do dvou cest.

Vnější cesta aktivace protrombinu probíhá při porušení celistvosti cév a úniku krve z nich, kdy dojde ke styku s TF. Při tvorbě protrombinového komplexu touto cestou neprobíhají žádná proteolytická štěpení, ale dochází ke změnám konformace molekul. Tento komplex protrombinu je velmi účinně vyvazován na receptorová místa membrány krevní destičky. Krevní destička má několik tisíc vazebných míst pro protrombinový komplex. Touto vazbou se přeměna na trombin urychlí až 300 000 krát. Smyslem této rychlé produkce trombinu je zajištění koagulace krve v místě poškození cév tak, aby koagulace neprobíhala dále po proudu krve.

Vnitřní cesta *aktivace* protrombinu nastává při kontaktu se subendoteliální strukturou. Sled dějů je zahájen aktivací F XII po jeho kontaktu s poškozeným cévním povrchem (kolagen; destičkový fosfolipid), popřípadě *in vitro* (sklo, kaolin, silica) ^(obr.1). Podle novější teorie se tyto cesty spojují v jednu. Tkáňový faktor je nyní pojímán jako hlavní iniciátor aktivace koagulačního procesu *in vivo* ⁽³⁾. Krev přichází do styku s tkáňovým faktorem na povrchu endoteliálních buněk a monocytů po stimulaci Tumor Necrosis Factor (TNF) endotoxinem, nebo interleukinem 1 (IL 1) ^(13,14). Není jasné, zda koagulace *in vivo* je iniciována nízkou proteolytickou aktivitou F VII nebo přítomností malého množství F VIIa ⁽²⁸⁾. Vzniklý komplex TF+VII je následně nejspíše přeměněn na F Xa na komplex TF+VIIa ⁽³⁵⁾. Tento komplex aktivuje F X a F IX. F Xa generuje malé množství F IIa (trombinu), který aktivuje F VIII a F V. Fosfolipidové komplexy těchto aktivovaných faktorů poté vytváří dostatečné množství trombinu, nezbytné k přeměně fibrinogenu na fibrin ⁽³⁰⁾.

Trombin zvyšuje účinnost F V, F VIII, F X a aktivuje F XIII na F XIIIa, který ovlivňuje polymeraci fibrinu. Rovněž vyvolává nevratnou agregaci destiček ve fázi primární hemostázy. Aktivované destičky vytváří nejen hemostatickou zátku, ale současně poskytují reaktivní fosfolipidový povrch pro tvorbu koagulačně aktivních komplexů. U aktivovaných destiček je narušena asymetrie membránových fosfolipidů, což má za následek odhalení záporně nabitých fosfolipidů, které tvoří vnitřní dvojvrstvu membrány ⁽⁶⁾.

1.5 Přeměna fibrinogenu na fibrin

Vytvořený trombin vyvolává přeměnu fibrinogenu na fibrin, který působením F XIIIa dále polymerizuje na nerozpustný, zesíťovaný fibrin. Takto vytvořený fibrin je nerozpustný v roztoku močoviny a kyselině monochloroctové. Pokud vzniká bez přítomnosti F XIII a Ca^{2+} , je v těchto roztocích rozpustný. Při vzniku fibrinu dochází nejen ke vzniku trojrozměrné sítě, ale také se vytváří během polymerizace nové struktury, které mohou působit jako regulační místa pro některé mechanismy. Trombin štěpí fibrinogen na dva fibrinopeptidy A a B. Uvolněním těchto fibrinopeptidů vznikají monomery fibrinu. Fibrinopeptid B způsobuje vasokonstrikci (zúžení cév), což přispívá k zástavě krvácení.

1.6 Fibrinolytický systém

Lidská krev obsahuje enzymový systém schopný rozpouštět fibrinovou sraženinu. Za normálních fyziologických podmínek tento systém udržuje hemostatickou rovnováhu. Zvýšený fibrinolytický systém může vést ke krvácivým stavům, naopak snížení funkčnosti tohoto systému vede k trombotickým stavům. Fibrinové koagulum omezuje krevní tok a mohlo by dojít k nekontrolovatelné reakci a k uzavření cévy. Fibrinolytický systém obsahuje několik složek. Jednou z nich je plazminogen, který je aktivován zároveň s koagulací. Další složkou je plazmin, proteolytický enzym, který kromě fibrinogenu (a jeho různých podob) štěpí i další složky koagulačního systému, jako jsou fibrinogen, F V a F VIII. Při štěpení se zesíťovaný fibrin štěpí na fragmenty X a Y, které se dále rozpadají na fragmenty nazývané D-dimery. Jejich stanovení je přímým důkazem stanovení štěpení zesíťovaného fibrinu.

Fibrinolýza zprůchodňuje cévy a uvádí je do původního stavu. Je aktivována při porušení endotelu. Přestože aktivace probíhá současně s agregací destiček, celková doba trvání je 48-72 hodin. Rozpuštění fibrinové zátky je záležitostí několika hodin. Za patologických stavů se může tento proces výrazně zkrátit až na několik minut.

Fibrinolýza je nepřetržitě probíhající proces s vyšší aktivitou během dne a při fyzické námaze a s nižší aktivitou během těhotenství. Tento děj má mnoho významů při léčbě, např. rekanalizace cév při trombotických stavech a léčba různých zánětlivých změn

s tvorbou fibrinu. Fibrinolýza probíhá nejen v krvi, ale také v slzách, mateřském mléku, moči a jiných tělních tekutinách.

1.7 Inhibitory krevního srážení

Inhibitory krevního srážení jsou součástí a zároveň i základním regulačním mechanismem koagulace. Pokud by koagulace probíhala nekontrolovaně, tak by v krátké době došlo k masivnímu srážení krve, ucpání cév a následné smrti. Udržování hemokoagulační rovnováhy je základní principem koagulace. Jednou z nejvýznamnějších regulací jsou fyziologické inhibitory koagulačního a fibrinolytického systému. Inhibitory jsou přirozené složky krve a tlumí výše zmíněné mechanismy koagulace. Zabraňují nekontrolovatelnému srážení aktivními složkami procesu. Snížené hladiny inhibitorů (zvláště AT III, proteinu S a C) představují značné riziko vzniku trombóz. Inhibitory můžeme rozdělovat do dvou skupin na přirozené a získané.

Mezi přirozené inhibitory koagulačního systému můžeme např. zařadit: fibrin, antitrombin III (ATIII), heparin, protein C, protein S a α_2 -antiplasmin (inhibitor fibrinolýzy). Trombin se tvoří po dobu koagulace v nadbytku, po ukončení srážení musí být trombin ihned inhibován, aby nedocházelo k dalšímu srážení krve. Všechny inhibitory plazmatického koagulačního systému jsou v plazmě a jejich specifita je nízká. Z inhibitorů krevního srážení se nejvíce uplatňují AT III a α_2 -makroglobulin. Oba jsou v plazmě obsaženy v relativně velké koncentraci. AT III s kofaktorem heparinu odpovídají za 80% inhibiční koagulační aktivity. Trombin je účinně vyvazován fibrinem, který jej adsorbuje na svém povrchu. Při fibrinolýze je vazba vyvázána heparinem a AT III.

Antitrombin III je α_2 -glykoprotein tvořený v játrech. Je jedním z nejdůležitějších fyziologických inhibitorů serinových proteáz (serpinů), které mají centrální úlohu při regulaci hemostatické rovnováhy^(7, 27). AT III vyvazuje trombin a jiné sérové proteinázy v poměru 1:1 za vzniku nevratného komplexu. Antitrombin má opožděný účinek (asi 15-30 minut), rychlost inhibičního komplexu může být urychlena navázáním heparinu nebo proteoglykanů z endoteliálních buněk. AT III inhibuje kromě trombinu (F IIa) a F Xa také jiné složky koagulačního systému (F XIIa, F XIa, F IXa, F VIIIa).

Vyskytuje se nejen v plazmě, ale také v pleurální a paritoneální zánětlivé tekutině. V moči se téměř nevyskytuje (3 µg/den).

Samotný heparin reaguje až po navázání na AT III, s kterým vytváří dimerní komplex, který pak účinně vyvazuje trombin. Heparin jako směs mukopolysacharidů má odlišnou afinitu k AT III. Svými náboji pomáhá vytvořit matrix, která vytváří snadněji komplex AT III*heparin a usnadňuje vazbu na trombin. Z komerčně vyráběných heparinů se váží jen ty hepariny, které mají strukturu pentasacharidů. Heparin je tvořen v žírných buňkách (tkáňové bazofily).

Systém proteinu C je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem ⁽²⁰⁾. Tento systém může inhibovat F Va a F VIIIa.

Protein C je klíčovou složkou koagulace, která je aktivována na povrchu endoteliálních buněk trombinem navázaným k trombomodulinu ⁽¹⁷⁾. Jde o glykoprotein vznikající v játrech za účasti vitamínu K. Tento glykoprotein se může dělit na dvě části, z nichž jedna je vázaná na protein S. Aktivovat protein C je možné několika způsoby. Jedním z nich je působením trypsinu. Nejúčinnější aktivace je vyvolávána *in vivo* na povrchu cévních endotelií, kde je navázán specifický endoteliální receptor trombinu trombomodulin ⁽¹⁹⁾. Vazba přes tento receptor je mnohonásobně rychlejší než se samotným trombinem. Trombomodulin vzniká v endotelu buněk a z nich je uvolňován do krevního oběhu nebo se váže na specifické receptory a stává se součástí membrány. Aktivovaná forma proteinu C (APC) se na rozdíl od účinku AT III štěpí proteolyticky a tím inaktivuje na membráně navázané plazmatické faktory neenzymového původu (F Va a F VIIIa). To vede k potlačení aktivovaného koagulačního procesu ⁽²⁰⁾. Protein S váže protein C k fosfolipidovým povrchům, jako jsou membrány krevní destičky nebo poškozených endotelií. Aktivovaný protein C má profibrinolytickou aktivitu (zvyšuje uvolňování aktivátoru plazminogenu).

1.8 Inhibitory fibrinolýzy

Inhibitory fibrinolýzy tlumí fibrinolytickou aktivitu a zabraňují jejímu šíření po okolí. α_2 -antiplazmin je jedním z nejdůležitějších inhibitorů fibrinolýzy. Jde o glykoprotein serinového typu a s plazminem tvoří komplex 1:1. Antiplazmin je

v plazmě v nadbytku a okamžitě velmi účinně vyvazuje veškerý volný plazmin. Pokud je plazmin vázán na fibrin, není možné, aby tuto vazbu antiplazmin inhiboval.

Mezi inhibitory fibrinolýzy můžeme zařadit nespecifické inhibitory: α_2 -makroglobulin, α_1 -antitrypsin a C1 inhibitor. Obecně můžeme říct, že jde o inhibitory proteáz, jejichž účinek přesahuje rámec koagulačních a fibrinolytických pochodů, kde se také mohou uplatňovat ⁽³¹⁾.

Získané inhibitory jsou patologickým nálezem a nevhodně ovlivňují koagulaci. Ze získaných inhibitorů hrají nejvýznamnější úlohu nespecifické antifosfolipidové protilátky (APA). APA jsou heterogenní protilátky namířené proti negativně nabitým fosfolipidům s makromolekulární látkou bílkovinné povahy. Můžeme sem zařadit lupus antikoagulans (LA) nebo antikardiolipidové protilátky (ACA). LA jsou protilátky namířené proti fosfolipidovým složkám protrombinového komplexu koagulační kaskády ⁽¹⁷⁾. LA může způsobit abnormální nález u APTT.

1.9 Správná laboratorní praxe

Správná laboratorní praxe (SLP) je soubor pravidel tvořící systém práce testovacích zařízení při provádění neklinických studií, bezpečnosti látek a chemických přípravků. Tyto normy se týkají podmínek, za kterých se tyto studie plánují, kontrolují, zaznamenávají a archivují. Správnou laboratorní praxi stanovuje hlava II § 8 a 9 zákona č. 356/2003 Sb. a vyhláška č. 219/2004 Sb. ve znění pozdějších přepisů. Správná laboratorní praxe je informační systém vytvořený pro potřeby klinických laboratoří, pro potřeby klinických oborů s laboratorní složkou a pro podporu práce s laboratořemi spolupracujících informačních systémů. SLP představuje osnovu moderní klinické laboratoře, která je postavena před otázky akreditací, a je nucena pod vlivem měnícího se společenského prostředí přesně určovat podmínky své činnosti a obhájit svou práci a výsledky například před auditorem nebo právníkem. Umožňuje přesně určit pravidla a vzájemné vztahy mezi jednotlivými laboratořemi a lékaři, sestrami či samotnými pacienty. Správná laboratorní praxe se stále vyvíjí díky předním osobnostem a odborníkům z jednotlivých medicínských oborů. Je budována na principu aktuálních norem a předpisů. SLP vytváří systémové přístupy k zpracovávání dat v klinických oborech. Jedná se o metodu encyklopedického charakteru, kde je možno průběžně

zacházet s daty (např.:doplňovat). Soubor nástrojů SLP obsahuje několik složek jako je práce s Národním číselníkem laboratorních položek (asi 15 500 položek), vytváření vlastního lokálního laboratorního číselníku, tvorba vlastních referenčních rozmezí a škál, komunikace s Laboratorním informačním systémem (LIS), tvorba Laboratorní příručky a řady tiskových sestav.

Zásady monitorování shody se zásadami SLP je prováděno pomocí Národního programu shody se zásadami SLP. Tento národní program je založen na kontrolách testovacích zařízení a na jejich auditech, které provádějí národní monitorovací orgány SLP. V oblasti léčiv je orgánem státní správy Státní Úřad pro Kontrolu Léčiv (SÚKL). Po provedené kontrole vystavují inspektoři SLP SÚKL protokol o kontrole. Pokud je testovací zařízení v souladu se zásadami SLP, vydává SÚKL na žádost testovacího zařízení Certifikát správné laboratorní praxe. V oblasti chemických látek a chemických přípravků je orgánem státní správy Ministerstvo životního prostředí ČR (MŽP). Monitorovacími subjekty pro MŽP je Středisko pro posuzování způsobilosti laboratoří ASLAB, Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka a veřejná výzkumná instituce (NIO SLP). Po provedené kontrole je vystaven dokument o výsledku kontroly (Osvědčení o dodržování zásad SLP). Struktury dokumentu od SÚKL a NIO SLP jsou totožné. Intervaly mezi kontrolami testovaných zařízení do Národního programu určují inspektoři a jde zpravidla o dva, maximálně tři roky. Průběh testování má několik bodů:

1. Testovací zařízení, žádající o zařazení do Národního programu, zašle podle příslušnosti certifikát na SÚKL a nebo MŽP s kopií NIO SLP žádost o vydání osvědčení SLP. MŽP písemně pověří NIO SLP provedením vstupní kontroly.
2. Testovací zařízení, žádající o zařazení do Národního programu, zašle SÚKL anebo NIO SLP vyplněný Dotazník pro testovací zařízení.
3. Inspektoři posoudí zaslané dokumenty a podle potřeby si vyžádají doplňující informace anebo testovací zařízení navštíví.
4. Datum kontroly oznamuje monitorovací orgán testovacímu zařízení dopisem.
5. Samotná kontrola testovacího zařízení.
6. Vystavení protokolu o provedené kontrole.
7. Testovací zařízení popíše nápravná opatření k odstranění případných neshod, zjištěných během kontroly.

8. V případě výroku „splněno“ oznámí testovací zřízení způsob a termín zjištěných nedostatků. Inspektorát SLP SÚKL nebo MŽP následně vydá testovacímu zařízení certifikát nebo osvědčení a zařadí jej do Národního programu.

Může jít o tři kategorie kontrol: 1. celková kontrola testovacího zařízení se provádí na požádání o zařazení do Národního programu nebo při periodické kontrole podle rozhodnutí inspektorů. 2. Cílená kontrola slouží k odstranění nedostatků při závěru „nerozhodnuto“. Tuto kontrolu nařizuje vedoucí inspekční skupiny. 3. Audit studie je součástí celkové kontroly, ale může být prováděna samostatně příslušnými správními orgány. Maximální rozsah vlastní kontroly se týká těchto činitelů: organizace a pracovníci, program zabezpečení a jakosti, prostory, biologické testovací systémy, přístroje, materiál a vzorky testovacích systémů, testované a referenční položky, standardní a operační postupy, provedení studie, závěrečná zpráva, audit alespoň jedné ukončené studie, archivace a shromažďování záznamů. Závěrečná hodnocení mohou být „Splněno“ (malé či žádné odchylky), „Nerozhodnuto“ (závažné nedostatky, které ovšem nemají vliv na jednotnost studie) a „Nesplněno“ (závažné nedostatky, které ovlivňují celou studii). Uvedení zařízení v Národním programu SLP znamená, že kontrolované testované zařízení je ve shodě s vyhláškou Ministerstva životního prostředí č. 219/2004 Sb. a tím i se „zásadami správné laboratorní praxe OECD“. Zásady správné laboratorní praxe jsou jediný systém jakosti závazně předepisující metody, které lze použít pro hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a v oblasti léčiv^(4, 37).

2. Cíle práce a hypotézy

2.1 Cíle práce

Cílem práce bylo porovnat dva typy koagulačních analyzátorů s využitím různých softwarů, zavedení nové metodiky a její následné využití pro diagnostiku. Vyjádření přesnosti, správnosti, vyjádření nejistoty měření, zavedení kontroly kvality pro různé metodiky.

2.2 Hypotézy

Předpokládá se, že analyzátory nové generace by měly mít větší možnosti pro zavedení a programování nové metodiky, lepší statistické zpracování výsledků a následného vyhodnocení.

3. Metodika

3.1 Koagulační stanovení jednotlivých metod

Vlastní stanovení jednotlivých metod se provádí na analyzátoru. Pro koagulační rutinní vyšetření se používá citrátová plazma. Odběr venózní krve se provádí do 0,129 mol/l citrátu sodného v poměru 1:10. Následuje centrifugace 15 minut při 3 000 ot./minutu (minimálně 1500xg). Plazma by měla být zpracovávána do 2 hodin po odběru. V případě doby prodlení je plazma mrazena a zůstává stabilní při -18°C po dobu jednoho měsíce. Při delším skladování se vzorky hluboce mrazí při -80°C, stabilita je až několik měsíců.

3.1.1 Protrombinový, tromboplastinový čas (PT; QUICK,)

PT slouží jako citlivý a rychlý screeningový test ve vnější části koagulačního systému, zejména při poruchách F II, FV, FVII, FX. S deficitní plazmou může také sloužit pro zjištění aktivity těchto faktorů.

Při inkubaci plazmy s daným množstvím tromboplastinu a kalcia je vyvolána koagulace, při které se měří čas do vzniku fibrinového vlákna. U vybraných fotometrických přístrojů lze podle nárůstu zákalu po uplynulé koagulaci vypočítat hodnotu fibrinogenu (derivovaný fibrinogen).

Test se provádí při 37°C, kdy se 1 díl (100 μ l) citrátové plazmy smíchá s 2 díly (200 μ l) tromboplastinu (směs tkáňového tromboplastinu s 0,025 mol/l chloridem sodným) a začíná se měřit čas. Výsledek měření se udává v sekundách, v % normy, v protrombin ratio (PR) nebo International Normalised Ratio (INR). $PR = \text{reakční doba vzorku} / \text{reakční doba normální plazmy}$. $INR = PR^{ISI}$ (ISI= International Sensitivity Index). Normální hodnoty se pohybují v rozmezí 0,8 – 1,2 INR; 70 – 130 % normy. V testu bylo použito Tromborelu S jako reagentu. Test je využíván jako terapeutická kontrola při podávání warfarinu nebo podobného léčebného přípravku (kumarinu) ⁽³⁴⁾. Terapeutické hodnoty by měly odpovídat rozsahu 2,0 – 3,0 INR u hluboké venózní trombózy, plicní embolie a arteriálního onemocnění. Rozsah 3,0 – 4,5 by měl být u umělé srdeční chlopně ⁽²²⁾.

3.1.2 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)

APTT podává informace o funkčnosti vnitřní části koagulační kaskády, zejména citlivě zachycuje poruchy F VIII, F IX a kontaktní faktory. Ve spojení s deficitními plazmami je aPTT reagentie určena pro stanovení jednotlivých faktorů endogenního systému a pro diagnosu hemofilie ⁽³²⁾. Kromě toho může být použit pro sledování heparinové terapie. Spouštěcím aktivátorem je kaolin, který zastupuje záporně nabitý povrch poraněné cévy. Pro některé reakce je nutná přítomnost destičkového faktoru 3 (PF3), který se uvolňuje z aktivovaných krevních destiček. U testu aPTT je vyšetřovaná plazma chudá na destičky, a proto je třeba fosfolipidy dodat použitím tkáňového fosfolipidu kefalínu (Parciální Tromboplastin). Výsledná hodnota testu aPTT udává čas (sekundy), který uplyne od spuštění koagulační kaskády vápenatými ionty do vytvoření fibrinové sraženiny. Prodloužení aPTT může být způsobeno například nedostatkem faktorů vnitřní části kaskády (FVIII a FIX), terapií heparinem či předávkováním warfarinem. Test se provádí při teplotě 37°C, kdy 1 díl (100 µl) plazmy se smísí s 1 dílem (100 µl) kefalín-kaolinové směsi. Tento komplex je dále inkubován 180 sekund, a poté je přidán 1 díl (100 µl) chloridu vápenatého o koncentraci 25 mmol. Po přidání vápenatých iontů se spustí stopky a měří se čas do vytvoření fibrinového vlákna. Jako reagent byl v testu použit Pathromtin SL. Normální hodnoty se pohybují mezi 25 – 40 sekundami, záleží ovšem na laboratoři a použitých reagentech. Tato doba se označuje jako aktivovaný parciální tromboplastinový čas ⁽⁴¹⁾.

3.1.3 Trombinový čas (TT)

TT je používán pro sledování inhibice koagulace při heparinizaci a pro kontrolu fibrinolytického účinku při streptokinázové terapii. Mimo jiné je i jedním z nejdůležitějších testů pro rozlišení patologických nálezů.

Test je založen na přidání určitého množství trombinu o určité koncentraci k citrátové plazmě. Čas do vzniku fibrinového vlákna je závislý na množství a kvalitě fibrinogenu. Výsledný čas také mohou ovlivňovat inhibitory. Poruchy fáze koagulace Trombin → Fibrinogen ⇒ Fibrin se vyskytují při inhibici účinku trombinu, jako je zvýšená aktivita AT u heparinizace, při snížené koncentraci fibrinogenu pod 1,0 g/l nebo při poruše polymerace fibrinu. Čím je koncentrace trombinu nižší, tím lze lépe zachytit poruchy

konečné fáze koagulace. Vyšetření se provádí při 37°C, kdy se 1 díl (200 µl) plazmy nechá inkubovat 1 minutu a poté se přidá 1 díl (200 µl) roztoku trombinu (stabilizovaný hovězí trombin s Ca^{2+} ionty). Jako roztok trombinu je v tomto testu použit reagent Tromboclotin. Po přidání se ihned měří čas. Normální čas se pohybuje v rozmezí 16-20 sekund⁽⁴²⁾.

3.1.4 Antitrombin III (AT III)

Je plazmatický inhibitor trombinu, aktivuje F X a tvoří s ním irreverzibilně inaktivní komplex. Inaktivace koagulačních faktorů je výrazně urychlována heparinem. Stanovení fyziologického AT III nám umožňuje diagnostikovat vrozený nebo získaný deficit AT III. Deficit souvisí s vrozeným nebezpečím vzniku trombózy.

V tomto testu se pomocí setu Berichrom Antithrombin AT III ve vzorku naváže na známé množství trombinu za přítomnosti heparinu a přebytečné množství trombinu vytvoří se substrátem p-nitroanilinem zbarvení, které měříme při 405 nm. Při měření ředíme plazmu roztokem PBS v poměru 1:3 (50 µl). Ředěná plazma se smísí s trombinem) a inkubuje se 3 minuty při laboratorní teplotě. Poté se přidají 2 díly (100 µl) substrátu a ihned se začne měřit extinkce. Výsledek je uváděn v % a výpočet se provádí automaticky na základě kalibrační křivky. Normální hodnoty jsou v rozmezí 70 – 140 %⁽²⁾.

3.1.5 D-Dimer

D-dimer je významný plazmatický protein, který je během fibrinolytického procesu uvolňován do cirkulující krve. Proteolytická degradace zesítěvaného fibrinu plazminem představuje ochranný mechanismus namířený proti trombóze tím, že obnovuje průtok krve v žilách po odstranění usazenin fibrinu. Po aktivaci fibrinolytického systému se zesítěvaný fibrin štěpí aktivní proteázou plazminem na fragmenty D a E. Nejmenší jednotkou příčného zesíťování mezi D-doménami je D-dimer, jehož přítomnost ukazuje na reaktivní fibrinolýzu^(10,9). Zvýšené koncentrace D-dimerů ukazují na přítomnost krevní sraženiny a byly popsány u hluboké žilní trombózy v končetinách, DIC a embolie⁽⁸⁾. D-dimer slouží jako marker trombofilních stavů. Jeho hladina odráží aktuální aktivaci systému *in vivo* a není produkována *in vitro*⁽³¹⁾. Tento

test se je založen na reakci polystyrenové částice, na které je navázaná monoklonální protilátka proti příčně zesíťným D-dimerům. Zóna příčného zesíťení je zrcadlově symetrická, tj. epitop pro monoklonální protilátku je přítomen dvakrát. Proto stačí jedna protilátka k vyvolání aglutinační reakce, která je detekována nárůstem turbidity.

D-Dimer PLUS je latexově zesílený turbidimetrický test pro kvantitativní stanovení příčně zesíťného D-dimeru. Test zahrnuje několik reagensů, například D-Dimer PLUS reagent obsahuje polystyrenové částice, monoklonální myší protilátky, lidský sérový albumin, triclin (0,02 mol/l), sacharózu a konzervační prostředek azid sodný.

D-Dimer PLUS akcelerátor je lyofilizát, který se vyrábí ze směsné plazmy vybraných zdravých dárců, pomocí aktivace D-dimerovou preparací a stabilizuje se HEPES pufrům. Kapalně rekonstituční medium obsahuje fyziologicky pufovaný roztok. Akcelerátor a reagent se musí před použitím rekonstituovat. Test je prováděn na koagulačním analyzátoru automaticky. Koncentrace D-dimeru v $\mu\text{g/l}$ je automaticky vyhodnocena z kalibrační křivky. Celkový rozsah měření od 25 do 6400 $\mu\text{g/l}$. Tento rozsah se docílí dvěma metodami, které musí být odděleně kalibrovány (D-dimer low: 50 – 800 $\mu\text{g/l}$, D-dimer high: 750 – 6500 $\mu\text{g/l}$). Pokud koncentrace leží nad měřicím rozsahem, lze vzorek ředit fyziologickým roztokem ⁽¹⁶⁾.

3.1.6 Fibrinogen

Fibrinogen je bílkovina krevní plazmy, která se podílí na srážení krve. Je složená z dimeru jehož podjednotky se skládají z peptidových řetězců. Účinkem thrombinu se fibrinogen štěpí na monomer a ten pak dále za přispění F XIII na nerozpustný fibrin. Stanovení fibrinogenu se provádí metodou dle Clausse (u BCS XP modifikovanou metodou dle Clausse).

Metoda dle Clausse založena na velkém přebytku trombinu, který vyvolá koagulaci citrátové plazmy. Koagulační čas zde závisí na obsahu fibrinogenu ve vzorku. Pomocí setu FibrinogenReagent se metoda provádí s vytemperovaným vzorkem i reagensy na 37°C. Vzorek ředíme v poměru 1:10 roztokem NaCl (0,154 mol/l). Smícháme 100 μl ředěného vzorku a 900 μl pufru. Do zkumavky se napipetuje 1 díl ředěného vzorku (100 μl), inkubuje se 60 sekund při 37°C, poté se přidá 1 díl

trombinového reagentu a hned se stanoví koagulační čas. Koncentraci odečteme z kalibrační křivky ⁽¹⁵⁾.

Kalibrační křivka se sestojí pomocí řady kalibrátorů řaděných v poměru 1:10; 1:20; 1:40 a 1:80 roztokem NaCl. Jako bod nula se používá roztok NaCl. Proměří se hodnoty stejně jako u vzorku. Výsledkem je kalibrační graf. Referenční hodnoty se pohybují v rozmezí 2,00 – 4,00 g/l. Každá laboratoř má vlastní přesně dané referenční hodnoty ⁽¹¹⁾.

Modifikovaná metoda dle Clausse je založena na velkém přebytku trombinu, který vyvolá koagulaci citrátové plazmy. Koagulační čas zde závisí na obsahu fibrinogenu ve vzorku. Metoda se provádí s vytemperovaným vzorkem i reagensy na 37°C. Do zkumavky se napipetuje 1 díl vzorku (100 µl), inkubuje se 60 sekund při 37°C, poté se přidají 2 díly (200 µl) reagentu (Multifibren U) a hned se stanoví koagulační čas. Kalibrační křivka se provádí pomocí kalibračního kitu. Postup zůstává stejný, jen místo vzorku s neznámým obsahem fibrinogenu jsou použity plazmy s přesně danými hodnotami. Očekávané hodnoty u této metody jsou 1,8 – 3,5 g/l. Rozsah měření se pohybuje mezi 0,8 - 12 g/l. Přesnost je testována pomocí normální a patologické plazmy. Variační koeficienty v sérii jsou 2,9 % u normální plazmy a 7,2 % u patologické plazmy ⁽¹²⁾.

Derivovaný fibrinogen je možno vypočítat pomocí Master křivky. Master křivka je experimentální a je k dispozici pouze pro testy Dade Behring. Fibrinogen je vypočítáván z křivky při měření PT pomocí Thromborelu S.

Snížení fibrinogenu může nastat při intravaskulární proteolýze fibrinogenu trombinem (spotřební koagulopatie), při uštknutí jedovatým hadem, při onemocnění jater (snížená produkce), při akutním krvácení či při zvýšeném odbourávání fibrinogenu.

Přechodně zvýšené hodnoty fibrinogenu se mohou vyskytovat pokud se fibrinogen chová jako protein akutní fáze (PAF). Dále se přechodně hypofibrinogenemie mohou vyskytovat po operacích, úrazech, srdečním infarktu a infekcích. Se vzrůstajícím věkem bývá pozorována stoupající koncentrace fibrinogenu. Zvýšená koncentrace fibrinogenu je rizikovým faktorem pro kardiovaskulární choroby.

3.2 Vlastní měření

3.2.1. Analyzátor BCS

Všechna měření, která byla v této práci použita, byla prováděna na dvou typech analyzátorů BCS a BCS XP firmy Dade Behring Marburg GmbH. BCS (Behring Coagulation System) je automatický analyzátor, který provádí kvantitativní testy specifických parametrů v plazmě. Jde o vysokokapacitní (až 350 testů/hod.) koagulometr s možností měření rozptylu světla (turbidimetrie), chromogenních, imunologických a aglutinačních stanovení. Využívá se hlavně v laboratořích s velkým množstvím normálních i patologických vzorků, rutinních, speciálních a statimových testů. Ochrana vzorků proti záměně je zajištěna pomocí automatického čtení čárového kódu (barkódu) umožňujícího pozitivní identifikaci vzorků a reagensů. Otevřený systém umožňuje validaci procedur. Vzorky, reagensie nebo rotory mohou být vkládány kdykoli dle potřeby. Maximální počet vzorků je 100 kusů. Vzorky mohou být vkládány v různých druzích zkumavek (odběrové, eppendorf a další). Analyzátor obsahuje několik následujících funkcí: pomocí dvou pipetorů zajišťuje pipetování všech nezbytných reagensů a vzorků; chlazení reagensů v zabudovaném chladícím boxu; měření v rotorových kyvetách různými vyhodnocovacími metodami a v několika modech (fixed-time, fixed-absorbance a kinetic); inkubace také v kyvetách; kalkulace a vyhodnocení měřených výsledků; automatické odesílání platných výsledků do připojeného počítače (popřípadě systému); správu referenčních křivek a šarží pro jednotlivé reagensie. Celý systém obsahuje dvě jednotky. Jedním je samostatný analyzátor, který načítá vzorky a reagensie, provádí ředění vzorků, kalibrace a měření testů. Druhou částí je počítač umožňující zadávat data, vybírat z programu menu, načítat a ukládat šarže, vypočítávat referenční křivky a výsledky testů a v neposlední řadě komunikovat s LIS (laboratorním informačním systémem).

Měření koagulačního času je hodnota měřená v okamžiku vzniku fibrinové sraženiny (fibrinového vlákna) nebo čas do koncového bodu jiné reakce. Měřený čas je doba od smíchání reagensie se vzorkem. Vznik fibrinu (sraženiny) snižuje prostupnost světla, stoupá zákal ve vzorku. Imunochemické metody jsou určeny pro měření koncentrace proteinů. Vzorek reaguje s protilátkami, které např. mají latexové částice.

Takto formovaný celek vede ke změně zákalu a jedná se o rychlost této změny, která je měřena. Tato metoda vylučuje možnost chyb v měření způsobených nadbytkem antigenů.

3.2.2 Kalibrace

Kalibrace je důležitá pro kvantitativní vyhodnocení měření, je nutné mít kalibrační křivku pro každý test, kde se vyhodnocuje koncentrace nebo aktivita. Tato křivka může být vytvořena pomocí vlastní plazmy, standardní plazmy nebo pomocí kalibračního setu. Kalibrace může být jednobodová v případě lineárních závislostí, nebo vícebodová. Pro vícebodovou kalibraci se používají kalibrační sety. Pokud je použita standardní nebo poolovaná plazma, pak analyzátor může vytvořit jednotlivá ředění. Rozsah měření je možno rozšířit pomocí extrapolace. Výsledky mohou být vypočítány pro všechny měřené hodnoty, které leží v extrapolacním rozsahu (graf 1). Novou kalibrační křivku je možno vytvořit automaticky nebo manuálně. U automatického měření je nutno zadat číslo šarže dané reagentie (popřípadě vytvořit novou šarži), vložit data, pro jaký test je daná křivka měřena. Poté se vloží do analyzátoru všechny potřebné reagentie a standardy. Kalibrace je provedena automaticky. Po vytvoření nové kalibrační křivky je nutno ověřit křivku pomocí kontrol. U manuálního měření je možno vybírat až z 10 možných referenčních křivek. Je možno vybrat si libovolnou referenční křivku pro hodnocení výsledků. Vždy je aktivována jen jedna křivka pro jednu šarži použitých reagentií. Kalibrační křivky musí podléhat několika kritériím: křivka musí být striktně monotónní a může mít odchylku jen do určitého definovaného procenta. Pokud jsou splněna tato kritéria, je křivka platná. Pokud je kalibrační křivka neplatná, analyzátor automaticky opakuje měření podle konfigurace v softwaru.

3.2.3 Kontrolní měření

Kontrolní měření jsou prováděna za účelem vyhodnocení kalibrací a měření vzorku. Můžeme specifikovat všechny testy a přiřadit k nim, zda mají být kontrolovány automaticky, či zda mají být měřeny manuálně. Automatické kontrolní měření může být přiděleno k jakémukoli testu a mohou být nadefinovány různé měřící cykly.

Požadovanou kontrolu lze zadat do pracovního kontrolního listu. Analyzátor kontroluje definici kontroly pro každý požadovaný test a automaticky provádí měření v daném cyklu. Manuálně můžeme požadovat dodatečná kontrolní měření mezi jednotlivými měřeními. Tato měření mohou být prováděna kdykoli. Kontrola výsledku se ukládá do bloku „Control journal“, kde je možné ji zkontrolovat a výsledky jsou zde vyhodnoceny jako platné či neplatné.

3.2.4 Kontrola kvality

Kontrola kvality je založena na analytických metodách s přesně dokumentovanou správností, přesností a nízkou citlivostí na rušivé vlivy. Pro dosažení objektivně porovnatelných výsledků jsou analytické výsledky podrobovány vnitřní a vnější kontrole kvality. U analyzátoru BCS je používán program QC Software (Quality Control).

Kontrola přesnosti

Při kontrole přesnosti je předmětem zájmu rozptyl analytických hodnot a tím může být zajištěna míra správnosti práce. Měla by být prováděna při každé měřicí sérii, která byla provedena za stejných podmínek. Kontrola kvality představuje nejdůležitější garanci měření a bývá proto používána nejčastěji. Začíná preperiodou, kdy je zaznamenávána přesnost, specifická pro danou laboratoř po dobu nejméně 20 dní. Jsou prováděna měření kontrolního vzorku přesnosti pro každý test se stejnou kontrolní šarží. V preperiodě se stanovuje z naměřených hodnot střední hodnota, směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV).

Kontrola správnosti

Představuje ověření jednotlivých analytických výsledků ve vztahu k předem zadané deklarované hodnotě a rozsahu. Deklarované hodnoty jsou stanoveny na základě platných požadavků příslušné země, vycházejí z referenčních nebo analytických metod, jejichž správnost a přesnost byla velice dobře zdokumentována. Kontrola správnosti obvykle představuje měření, které je provedeno samostatně a odděleně od kontrol přesnosti. Hodnota variačního koeficientu periody musí být menší než přednastavená cílová hodnota CV, jinak je perioda neplatná. Během kontroly správnosti zjišťujeme systematické odchylky a můžeme vyloučit neúmyslnou chybu osoby obsluhující

analyzátor. Kontroly správnosti měření se provádějí každý den. Získaný výsledek by měl ležet v povoleném rozsahu. Pro kontrolu kvality se používají různé kontroly, jako je Control Plazma N (normální plazma) a Control Plazma P (patologická plazma) a jejich různé hladiny.

3.3. Metody pro sledování anti Xa aktivity

Heparin se používá k léčbě trombotických stavů jako antikoagulační terapie. Jde o sulfátový glukosamid, který až 2000x zvyšuje účinek AT III. Jedná se zejména o léčbu hluboké žilní trombózy, akutního koronárního syndromu. Podává se jako samotný heparin nebo jako heparinoidy. Heparinoidy mohou být nefrakciované (UHF), nízkomolekulární heparin (LMWH), nebo v podobě pentasacharidu. Obecně pomáhají zvyšovat inhibiční schopnosti přirozených inhibitorů. V praxi není možné kontrolovat a detekovat hladinu, LMWH a pentasacharidů pomocí testu aPTT. Proto se snažíme nalézt test, který by byl schopen detekce heparinu a heparinoidů.

3.3.1. Pefakit® PiCT

Jedním z omezené nabídky testů, je Pefakit® PiCT® (Protrombinázou indukovaný koagulační čas). PiCT je funkční test pro kvantitativní stanovení antikoagulační aktivity nízkomolekulárního heparinu a pentasacharidu v plazmě. Test je prováděn v analyzátoru, ve kterém je se vzorkem plazmy smíchán reagent obsahující definované množství F Xa, fosfolipidů a enzym hadího jedu specificky aktivující F V (RVV-V). Během inkubace 180 sekund dojde k inhibici přidaného F Xa popřípadě F IIa komplexem AT/heparin přítomným ve vzorku. Následná rekalcifikace zahájí tvorbu protrombinázového komplexu a detekuje se čas do vytvoření koagula. K testu je tedy potřeba vyšetřovaná plazma, aktivátor (F Xa, RVV-V, fosfolipidy, hepes pufr a manitol) a startovací reagencie 0,025M CaCl₂. Pro zavedení metody jsou nutné kalibrátory a kontroly (LMWH) pro kontrolu kvality. Při kontrole kvality je použito Pefakit Controls LMWH jako kontrolní materiál při validaci testu. Kontrolní měření se provádí před každým měřením. Samotný test je prováděn po zadání nové metody do analyzátoru automaticky. Při jednom testu je spotřebováno 50 µl vzorku, popřípadě kontroly či kalibrátoru, 50 µl aktivátoru a 50 µl startovací reagencie. Vzorek se

inkubuje s aktivátorem při 37°C 180 sekund. Poté se měří koagulační čas. Tento čas bývá prodloužen se stoupací hladinou LMWH, pentasacharidů nebo danaparoidů. Test je citlivý k anti Xa i anti IIa účinkům AT a není specifický jen pro heparin. V případě záměny terapie anti IIa antikoagulancii za heparin dojde k prodloužení času. Pro kvantifikaci antikoagulační léčby je rozmezí u LMWH 0-1,5 IU/ml. Test má vysokou přesnost a reprodukovatelnost. Pefakit® PiCT® byl testován pomocí kontrol 1 a 2 pro LMWH v sérii 20 měření a 10 dní (den po dni). Variační koeficient (CV) byl $\leq 7\%$ a odchylka od průměru $\pm 0,08$ UI/ml. Při velkém deficitu F V, F II, fibrinogenu a LA jsou koagulační časy zřetelně prodlouženy. Test je také silně ovlivňován protaminem. Koagulační čas se může na různých analyzátorech částečně odlišovat. I tvar křivky může být při ředění kalibrátorů odlišný (záleží na druhu analyzátorů).

3.3.2 COAMATIC® Heparin

Dalším testem je COAMATIC® Heparin. Tento test je založen na stanovení aktivity anti F Xa pomocí komplexu AT*heparin vytvořeného v plazmě. Nejdříve se vytvoří komplex heparinu a antitrombinu čímž vzniká AT*heparin, ke kterému je přidáván F Xa v přebytku. Vzniká komplex F Xa*AT*heparin a zbytkový F Xa. Aktivovaný faktor X je přidán ke směsi neředěné plasmy a chromogenního substrátu S. Vytvoří se komplex AT*heparin se dvěma reakcemi. První je inhibice F Xa a druhá štěpí substrát pNA F Xa. Uvolněný pNA je nepřímo úměrný hladině heparinu ve vzorku. Substrát obsahuje chromogenní směs (Suc-Ile-Glu γ pip – Gly-Arg-pNA) detergent a manitol. Druhou reagensií je faktor Xa o enzymové aktivitě 35nkat. Tato reagensie je směsí hovězího F Xa, Tris pufru, EDTA, NaCl a dextran sulfátu. Vzorek (plazma, kontroly či standardy) se musí před vlastním stanovením naředit 1:3, ředění provádí analyzátor automaticky. Naředěné vzorky 50 μ l se inkubují 120 sekund při 37°C, poté je přidáno 50 μ l substrátu, inkubuje se 120 sekund při 37°C. Poté je odečtena absorbance v kinetickém testu a výsledek vyhodnocen z kalibrační křivky. Kalibrační křivka je sestavena pomocí standardu, plazmy s heparinem o známé koncentraci a normální plazmy.

3.3.3 Arixtra

Zavedení nové metody na stanovení inhibice anti Xa po podání pentasacharidu bylo provedeno pomocí přípravku Arixtra (fondaparinux sodium). Při měření byl použit injekční roztok Arixtra 2,5mg/0,5ml (fondaparinuxu sodného). Jde o syntetickou látku, která specificky inhibuje faktor Xa. Využívá se k prevenci krevních sraženin v cévách nohou a plic po ortopedických operacích. Pokud není lékařem předepsáno jinak, podává se obvykle 2,5 mg jedenkrát denně s.c..

Kalibrační křivka byla vytvořena ředěním injekčního roztoku Arixtra do 5 bodů kalibrace v rozsahu 0,0 – 2,0 µg/ml. Jako ředící roztok byla použita poolovaná plazma dárců. Podle vytvořené kalibrační křivky bylo možné odečítat hodnoty pentasacharidu ze vzorků.

Byl vytvořen soubor 157 vzorků u kterých byly měřeny souběžně hodnoty anti Xa a pentasacharidu. Aktivita anti Xa byla měřena pomocí setu COMATIC® Heparin. Korelační koeficient mezi jednotkami anti Xa a pentasacharidem u Arixtry byl 0.806.

Nyní je již možné využívat komerční set BIOPHEN Arixtra® Calibrator, který obsahuje čtyři kalibrátory o hodnotách (CAL1: 0 µg/ml; CAL2: 0,5 µg/ml; CAL3: 1,0 µg/ml a CAL4: 1,5 µg/ml). Tyto kalibrátory je možné použít po rekonstituci bez dalšího ředění. Pro kontrolu přesnosti měření je využívána BIOPHEN Arixtra® Kontrolní plazma. Jde o dvě hladiny kontroly s hladinou Arixtry $0,40 \pm 0,1$ µg/ml a $1,2 \pm 0,15$ µg/ml.

3.3.4. Dodatek

Vlastní měření byla prováděna na analyzátorech BCS. Byla zavedena nová metoda na měření pentasacharidů pomocí přípravku Arixtra®. Porovnávací měření hladiny nízkomolekulárního heparinu byla měřena pomocí Coamatic® Heparin a hladiny pentasacharidu pomocí přípravku Arixtra®. Porovnával jsem naměřené výsledky pentasacharidu a aktivity anti Xa. Jedním z porovnání bylo vypočtení korelačního koeficientu u souboru 157 vzorků. Dále byly naměřeny hodnoty u vybraných metod PT, APTT, TT, Fbg, AT III a D-dimer na dvou analyzátorech a porovnával jsem výsledky mezi sebou. Pro měření byly použity patientské vzorky,

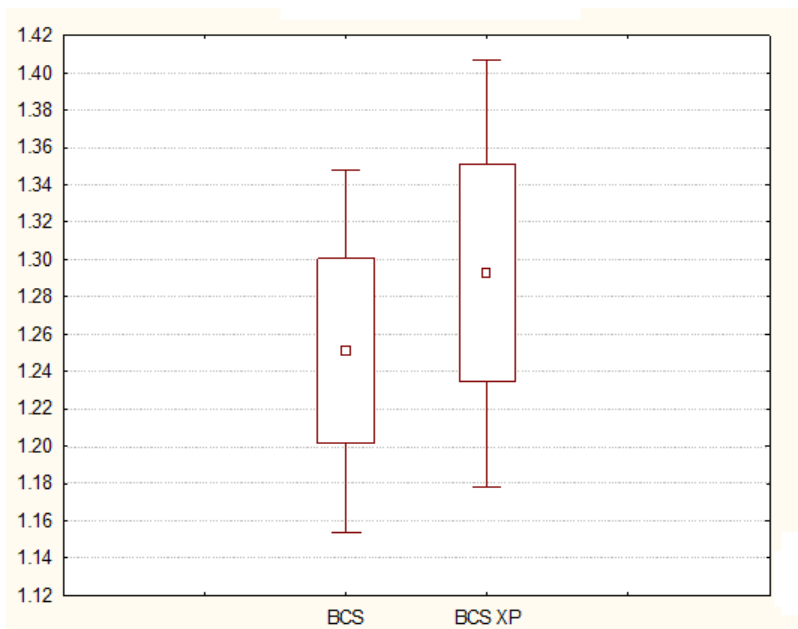
standards, kontroly a vzorky určené pro mezilaboratorní porovnávání, které se využívají pro akreditace.

3.4. Zpracování dat

Data byla zpracována v tabulkovém procesoru Microsoft Office EXCEL 2003 kde byly vytvořeny tabulky a vypočteny statistické hodnoty např.: SD, CV % . Dále byla data statisticky vyhodnocena pomocí programu Statistika 8, kde byly vytvořeny grafy a vypočteny statistické hodnoty jako je korelační koeficient, maximální a minimální hodnoty.

4. Výsledky

Graf 1: Rozsah hodnot měření protrombinového času pro BCS (OS Mac) a BCS XP. Hodnoty jsou naměřeny v jednotkách INR.

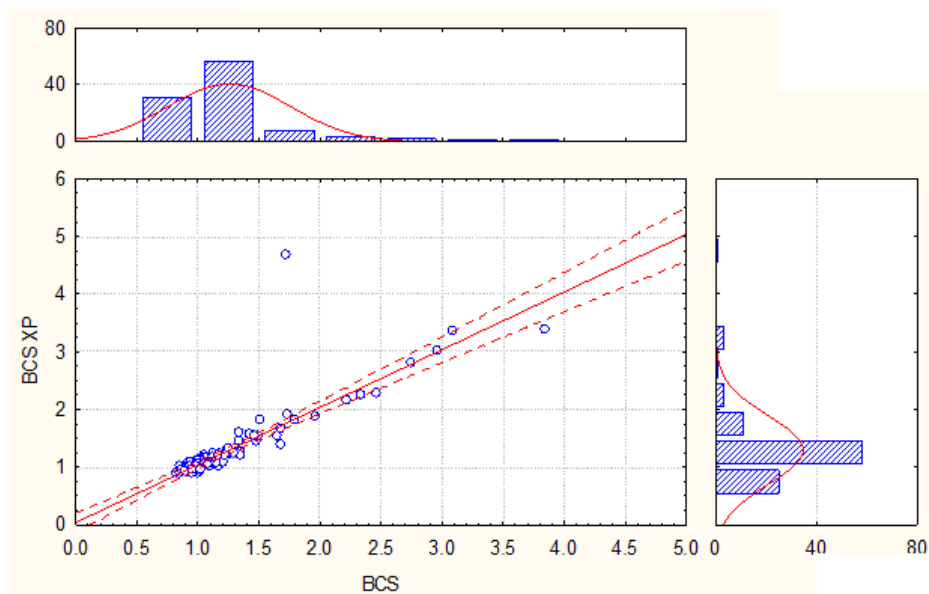


Tabulka 1: Vyhodnocení měření protrombinového času na analyzátoch.

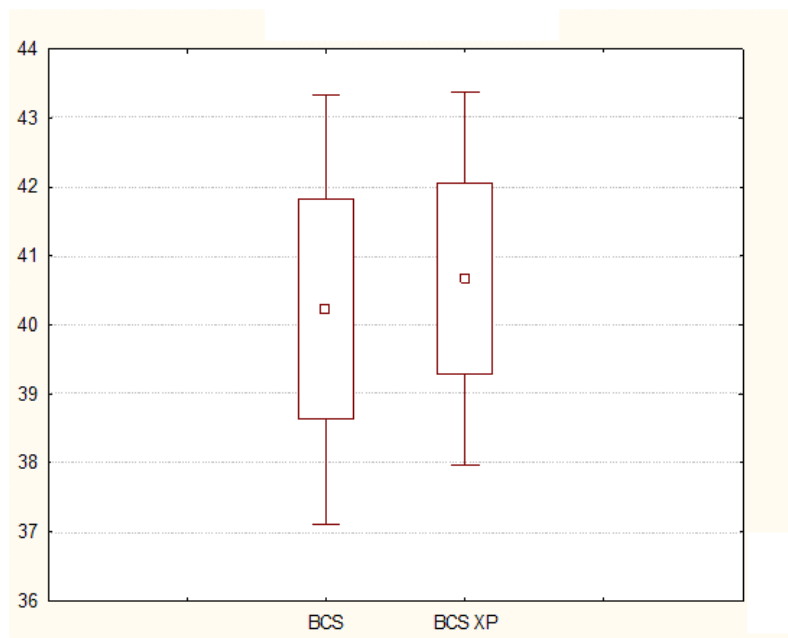
PT	BCS OS Mac	BCS XP
Průměr	1,25	1,29
Medián	1,08	1,09
Maximum	3,85	4,68
Minimum	0,83	0,89
SD	0,050	
CV %	3,24	
Korelační koeficient	0,851	

Tabulka 1 zobrazuje statistické vyhodnocení měření protrombinového času na analyzátoch v INR. Jak je vidět ze statistického hodnocení mají oba dva analyzátory velice blízké hodnoty v průměru mediánu a dobrý korelační koeficient

Graf 2: Rozložení a procentuální výskyt hodnot měření protrombinového času pro BCS (OS Mac) a BCS XP. Hodnoty jsou znázorněny v jednotkách INR.



Graf 3: Rozložení hodnot naměřených na obou analyzátořech metodou aktivovaného parciálního tromboplastinového času (sek.).

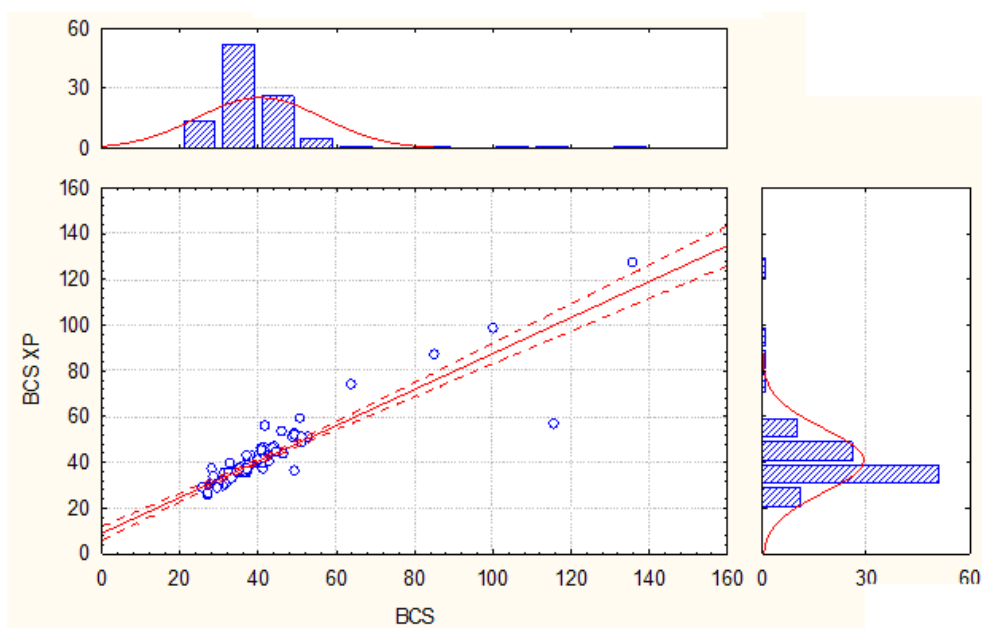


Tabulka 2: Statistické vyhodnocení měření aktivovaného parciálního tromboplastinového času.

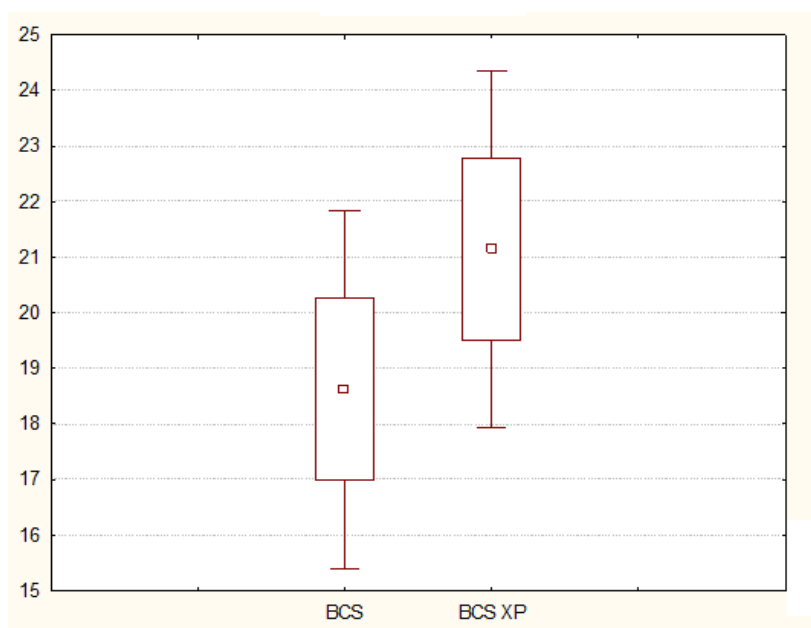
aPTT	BCS OS Mac	BCS XP
Průměr	40,23	40,68
Medián	37,25	37,25
Maximum	135,9	127,6
Minimum	26	25
SD	1,400	
CV %	3,03	
Korelační koeficient	0,906	

Tabulka 2 ukazuje statistické vyhodnocení měření aktivovaného parciálního tromboplastinového času (sek.) na analyzátoch. Je zde patrná shoda téměř ve všech uvedených statistických hodnotách, včetně velmi dobrého korelačního koeficientu.

Graf 4: Rozložení a procentuální výskyt hodnot měření aktivovaného parciálního tromboplastinového času na analyzátoru BCS OS Mac (BSC) a BCS XP. Hodnoty jsou naměřeny v sekundách.



Graf 5: Rozsah a procentuální výskyt hodnot měření trombinového času (sek.) na analyzátoru BCS OS Mac (BSC) a BCS XP.

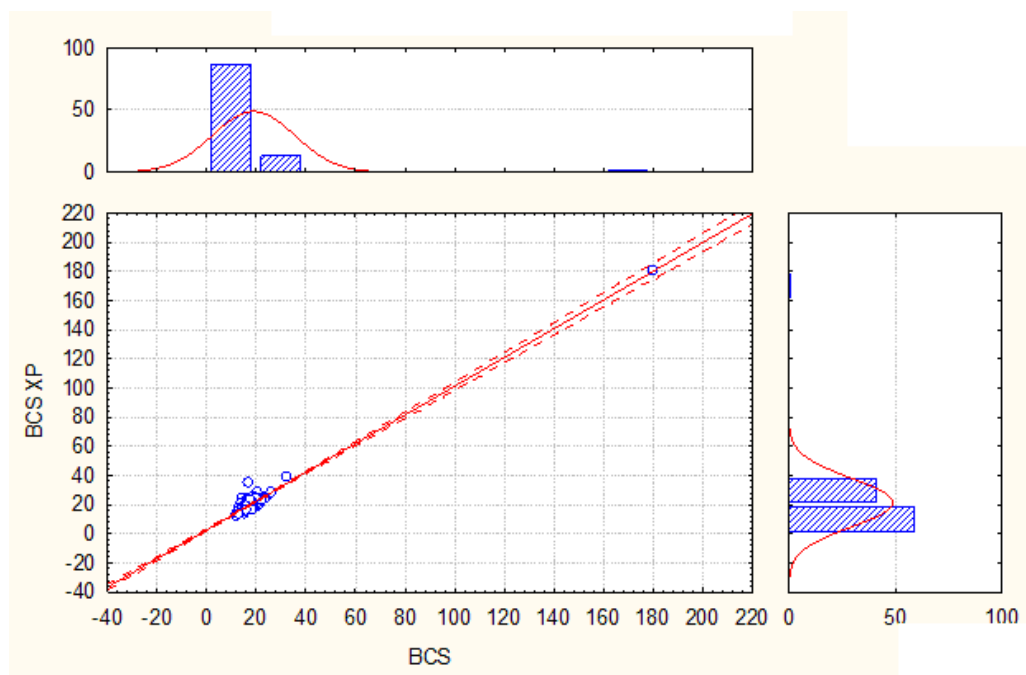


Tabulka 3: Statistické vyhodnocení měření trombinového času na analyzátoch.

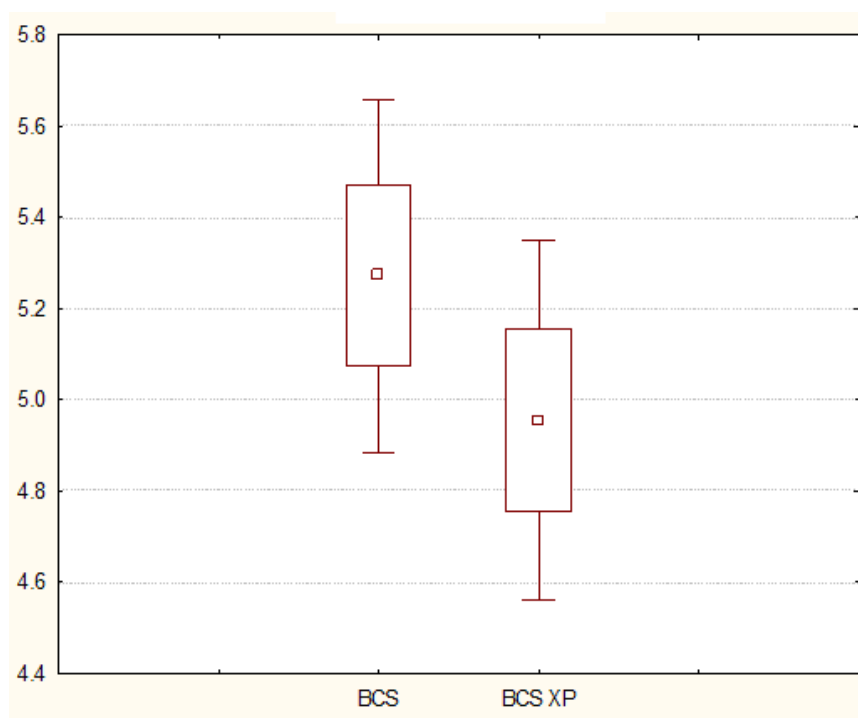
TT	BCS OS Mac	BCS XP
Průměr	18,62	21,13
Medián	16,4	19
Maximum	180	180
Minimum	12,1	12,3
SD	1,400	
CV %	7,31	
Korelační koeficient	0,985	

V tabulce 3 je vidět celkový posun hodnot směrem nahoru u analyzátoru BCS XP. SD zůstává stejná a je vidět velice dobrá korelace při měření. Posun k vyšším hodnotám může být způsoben vyšší citlivostí detekce koagula v závislosti na síle trombinového reagentu.

Graf 6: Rozsah a procentuální výskyt hodnot měření trombinového času (sek.) na analyzátoru BCS OS Mac (BSC) a BCS XP.



Graf 7: Rozsah a procentuální výskyt hodnot měření fibrinogenu na analyzátoru BCS OS Mac (BSC) a BCS XP. Jednotky při měření fibrinogenu jsou g/l.

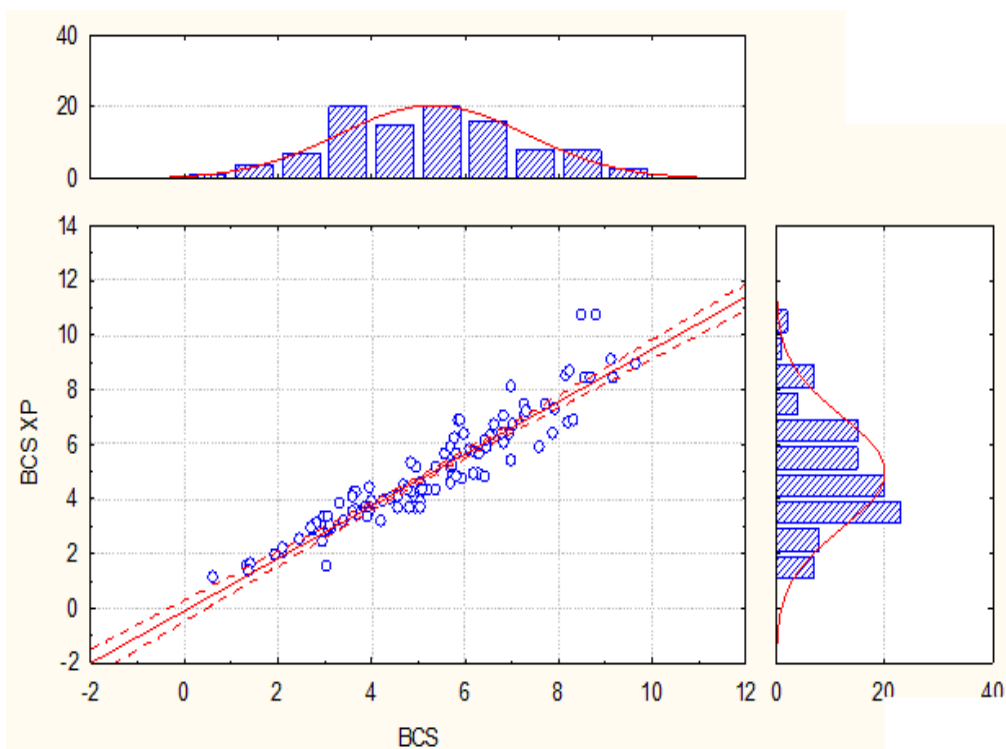


Tabulka 4: Statistické vyhodnocení měření fibrinogenu (g/l) na analyzátorech.

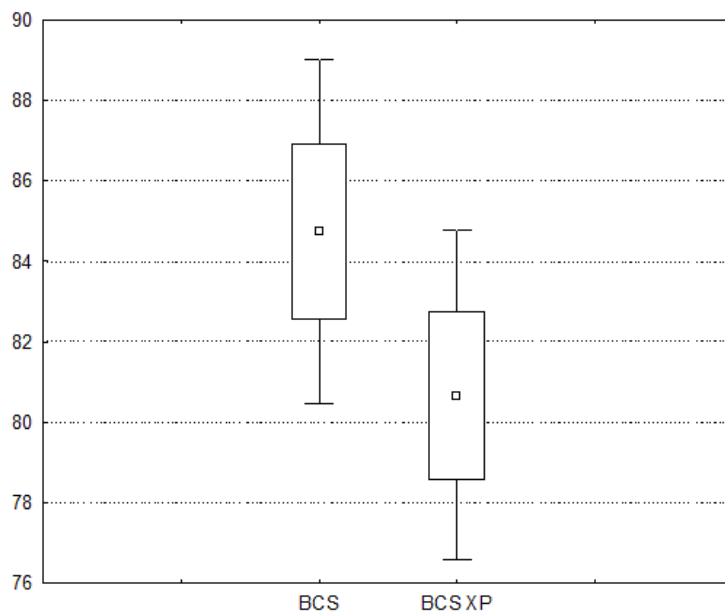
	BCS OS Mac	BCS XP
Průměr	5,27	4,95
Medián	5,16	4,6
Maximum	9,65	10,7
Minimum	0,64	1,1
SD	0,298	
CV %	6,14	
Korelační koeficient	0,939	

Tabulka 4 znázorňuje stejně jako graf 7 posun hodnot u BCS XP směrem dolů. Ovšem korelační koeficient je velmi dobrý.

Graf 8: Rozsah a procentuální výskyt hodnot měření fibrinogenu (g/l) na analyzátorech BCS OS Mac (BSC) a BCS XP.



Graf 9: Rozsah a procentuální výskyt hodnot měření antitrombinu III na analyzátoru BCS OS Mac (BSC) a BCS XP v jednotkách % normy.

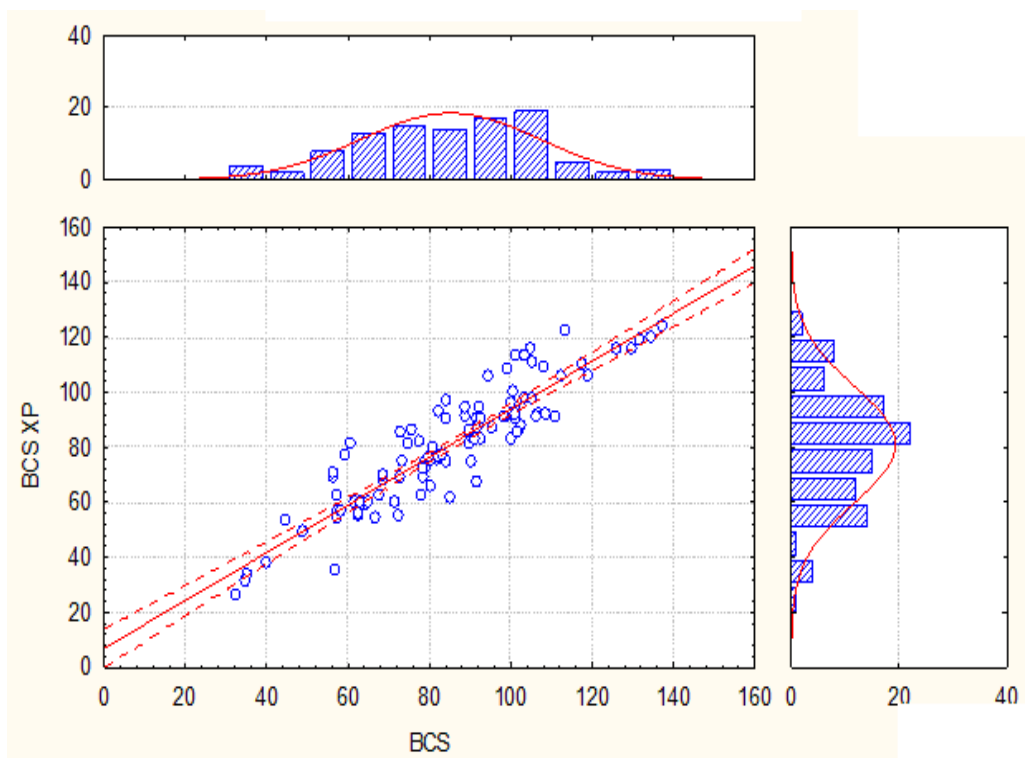


Tabulka 5: Statistické vyhodnocení měření antitrombinu III v % normy na BCS OS Mac a BCS XP analyzátorech.

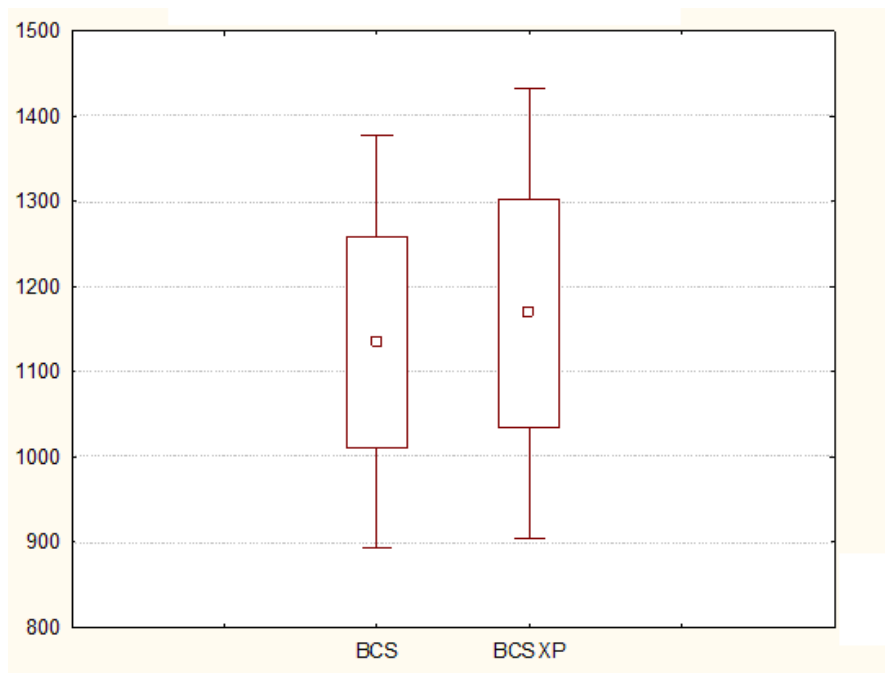
	BCS OS Mac	BCS XP
Průměr	84,75	80,67
Medián	84,4	82,5
Maximum	137,4	124
Minimum	32,6	26
SD	4,21	
CV %	5,26	
Korelační koeficient	0,907	

Tabulka 5 ukazuje statisticky mírnou odchylku u průměru a mediánu. Maximální a minimální hodnoty se výrazně liší. Korelační hodnota 0,907 je velmi dobrá.

Graf 10: Rozsah a procentuální výskyt hodnot měření antitrombinu III v % normy na analyzátorech BCS OS Mac (BSC) a BCS XP



Graf 11: Rozsah hodnot naměřených na analyzátorech BCS OS Mac (BSC) a BCS XP pomocí metody měřící D-dimer.



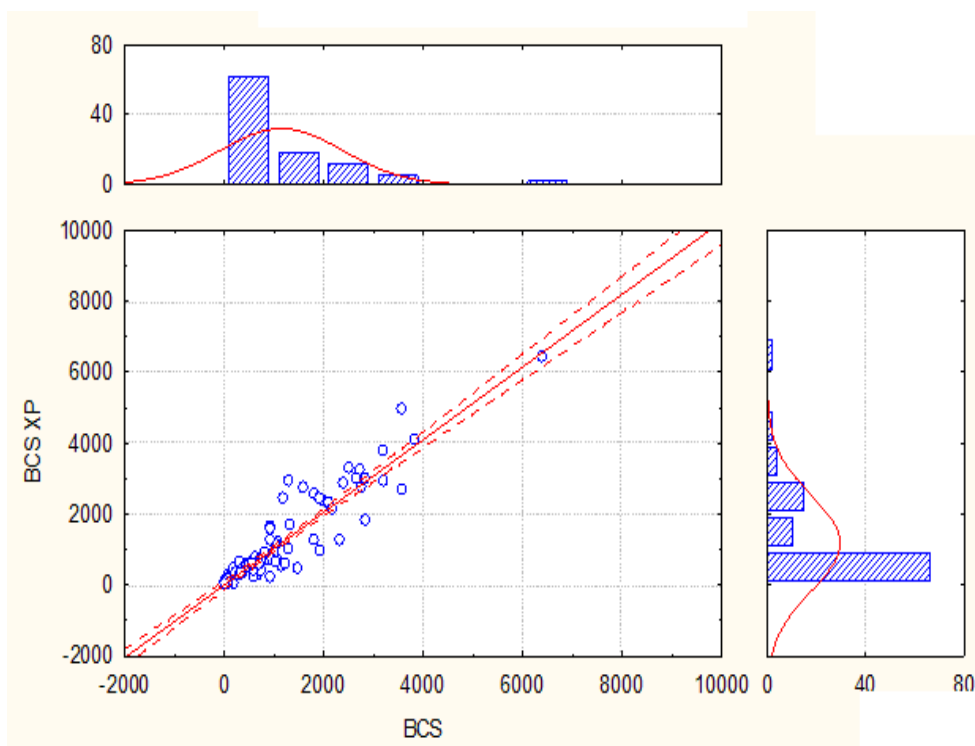
Tabulka

6: Statistické vyhodnocení měření D-dimeru v $\mu\text{g/l}$ na analyzátozech BCS OS Mac (BSC) a BCS XP .

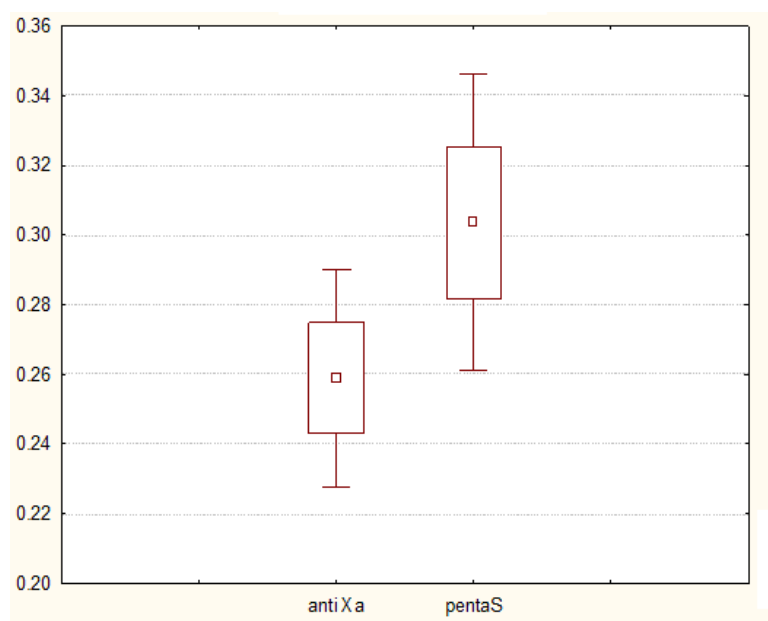
	BCS OS Mac	BCS XP
Průměr	1134,8	1168,5
Medián	771	597
Maximum	6400	6400
Minimum	25	25
SD	141,904	
CV %	17,69	
Korelační koeficient	0,943	

Tabulka 6 zobrazuje velmi podobné hodnoty u obou analyzátorů, které jsou statisticky vyhodnoceny včetně korelačního koeficientu s hodnotou 0,943.

Graf 12 znázorňuje rozložení a procentuální výskyt hodnot měření D-dimeru v $\mu\text{g/l}$ na analyzátozech BCS OS Mac (BSC) a BCS XP



Graf 13: Rozložení hodnot měřených při zavádění nové metodiky pomocí přípravku Arixtra.

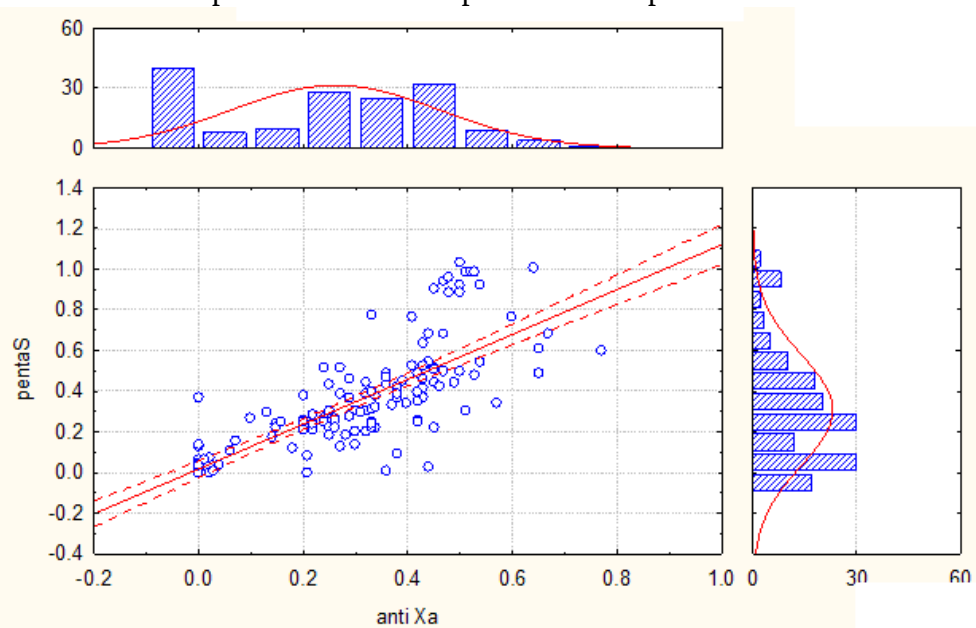


Tabulka 7: Staticky vyhodnocená data pro zavádění nové metody pomocí přípravku Arixtra.

	anti Xa	pentasacharid
Průměr	0,26	0,30
Medián	0,29	0,25
Maximum	0,77	1,03
Minimum	0,00	0,00
SD	0,149	
Korelační koeficient	0,806	

V tabulce 7 je vidět dobrá korelace mezi oběma metodami stanovení.

Graf 14: Rozložení a procentuální zastoupení anti Xa a pentasacharidu.



5. Diskuse

Při hodnocení porovnání koagulačních analyzátorů se používají tabulky, grafy nebo průměry se směrodatnou odchylkou, variační či korelační koeficient. Je potřeba mít k dispozici rozsáhlý sledovaný soubor.

Byl zpracován soubor, který obsahoval 102 vzorků o neznámých hodnotách. Při porovnání dvou koagulačních analyzátorů BCS OS Mac (BCS) a BCS XP byly naměřeny hodnoty následujících stanovení: Protrombinový čas; aktivovaný parciální tromboplastinový čas; trombinový čas; fibrinogen; antitrombin III a D-dimer. Jedná se o stanovení, která se používají při screeningu trombotických stavů. Hodnoty jednotlivých stanovení nebyly známy, proto jsem porovnával výsledky měření z obou analyzátorů mezi sebou. U protrombinového času (PT) byly naměřeny následující hodnoty pro daný koagulometr: BCS průměrná hodnota = 1,25 INR; medián = 1,08 INR; maximum = 3,85 INR; minimum = 0,86 INR; BCS XP průměrná hodnota = 1,29 INR, medián = 1,09 INR, maximum = 4,68, minimum = 0,89 INR. Při porovnání analyzátorů mezi sebou byly naměřeny hodnoty SD = 0,050, CV = 3,24 % a korelační koeficient byl 0,851. Podle výsledků a grafu 1, který znázorňuje průměrné hodnoty se pohybují u BCS kolem 1.25 INR, u BCS XP kolem hodnoty 1.29. Graf 2 nám zobrazuje, že oba dva analyzátory mají většinu naměřených hodnot v oblasti 1,0-1,5 INR a to v zastoupení asi 60 %. Vidíme, že maximální a minimální hodnoty se u jednotlivých analyzátorů liší. Přičemž ostatní hodnoty jako je SD nebo CV zůstávají u obou velmi nízké. Korelační koeficient je poměrně vysoký, což může svědčit o tom, že měření prováděná paralelně dosahují stejných rozpětí hodnot.

Dalším stanovením byl aktivovaný parciální protrombinový čas (aPTT), kde byly naměřeny následující hodnoty: BCS průměrná hodnoty = 40,23 s.; medián = 37,25 s.; maximum = 135,9 s.; minimum 127,6 s.; pro BCS XP průměrná hodnoty 40,68 s.; medián = 37,25 s.; maximum = 127,6 s.; minimum = 13,92 s. Při porovnávání analyzátorů mezi sebou byly naměřeny hodnoty SD = 1,400, CV= 3,03 % a korelační koeficient byl 0,906. Podle těchto výsledků a grafu 3 a 4 je vidět, že analyzátory měří hodnoty s minimálním rozdílem a 80 % naměřených hodnot leží v rozmezí hodnot 30-

45. Hodnoty mají minimální rozpětí a téměř shodný průměr. Je vidět, že analyzátory v měření aPTT vykazují minimální rozdíly hodnot.

Při dalším porovnání se měřily hodnoty trombinového času (TT). U analyzátoru BCS jsem získal tyto hodnoty: průměrná hodnota = 18,62 s.; medián = 16,4 s.; maximum = 180 s.; minimum 12,1 s. U koagulometru BCS XP byly změřeny tyto hodnoty: průměr = 21,13 s.; medián = 19 s.; maximum = 180 s.; minimum = 12,3 s. Po porovnání obou analyzátorů byla vypočtena SD = 1,4, CV = 7,31 % a korelační koeficient 0,985. Po vyhodnocení těchto výsledků a grafů 5 a 6, lze konstatovat, že jeden z analyzátorů měří vyšší hodnoty trombinového času. Zde je patrné, že většina hodnot u BCS se pohybuje mezi hodnotami 10-20 a to v zastoupení asi 85%. Přičemž u BCS XP je patrný větší výskyt naměřených hodnot v rozmezí 20-30. Dle hodnoty korelačního koeficientu spolu analyzátory velmi dobře korelují.

Dále byly porovnávány hodnoty koncentrace fibrinogenu. U analyzátoru BCS byly naměřeny následující hodnoty: průměr = 5,27 g/l; medián = 5,16 g/l; maximum = 9,65 g/l; minimum = 0,64g/l. U analyzátoru BCS XP byly hodnoty: průměr = 4,95 g/l; medián = 4,6 g/l; maximum = 10,7 g/l; minimum = 1,1 g/l. Při porovnání obou analyzátorů byla vypočtena SD = 0,298, CV 6,13 % a korelační koeficient 0,939. Naměřené hodnoty na obou analyzátozech spolu dobře korelují. Je patrné, že hodnoty u BCS XP jsou měřeny standardně nižší. Ovšem naměřené hodnoty mají stejně velký průměr měření. Podle této a ostatních hodnot je patrné jiné nastavení kalibrační křivky u jednoho z analyzátorů, která může ovlivňovat hodnotu naměřeného fibrinogenu. Při podezření na chybně změřenou hladinu fibrinogenu se používá metody „derivovaného fibrinogenu“. Tato hodnota je vypočítávána z křivky pro stanovení PT. Není proto zatížena chybami, ke kterým může docházet při ředění vzorku při stanovení fibrinogenu metodou dle Clausse. Jde pouze o experimentální výpočet pro analyzátory BCS a prozatím se tato metoda nepoužívá při mezilaboratorní kontrole (slouží jako pomocný ukazatel správnosti).

Dalším stanovením bylo měření hladiny antirombinu III (AT III). Na analyzátoru BCS byly zjištěny tyto hodnoty: průměr = 84,57 %; medián = 84,4 %; maximum = 137,4 %; minimum = 32,6 % normy; na BCS XP: průměr = 80,67 %; medián = 82,5 %; maximum = 124 %; minimum = 26 % normy. Při porovnání výsledků

na obou analyzátorech bylo vypočteno $SD = 4,21$, $CV 5,26 \%$ a korelační koeficient $0,907$. Jak je vidět z naměřených hodnot a grafů 9 a 10. Je velký posun směrem dolů u měřených metod na analyzátoru BCS XP. Přičemž dolní hodnoty průměru BCS se kryjí s horními hodnotami u BCS XP. Dále znázorňuje velmi velké rozložení výsledků u antitrombinu III v celém rozsahu měření. U BCS OS Mac je největším zastoupením hodnot okolo 100% - 110% , u BCS XP okolo hodnot 90% . Může to být ovšem způsobeno částečně odlišně nastavenou kalibrační křivkou u daného koagulometru. Vysoká hodnota korelačního koeficientu nám opět ukazuje, že výsledky z obou analyzátorů jsou na sobě závislé.

Posledním porovnávaným měřením bylo stanovení koncentrace D-dimeru. Na analyzátoru BCS byly naměřeny následující hodnoty: průměrná hodnota $1134,8 \mu\text{g/l}$; medián = $771 \mu\text{g/l}$; maximum = $6400 \mu\text{g/l}$; minimum = $25 \mu\text{g/l}$; na analyzátoru BCS XP : průměr = $1168,5 \mu\text{g/l}$; medián = $597 \mu\text{g/l}$; maximum = $6400 \mu\text{g/l}$; minimum = 25 . Po porovnání obou analyzátorů jsem vypočetl následující statistické hodnoty $SD = 141,90$, $CV = 17,69$ a korelační koeficient $0,943$. U naměřených hodnot a grafu 11 a grafu 12 vidíme, že analyzátory měří hodnoty bez významných odchylek s většinou naměřených hodnot D-dimeru okolo 1000.

Porovnání dvou koagulačních analyzátorů BCS a BCS XP by mělo sloužit k možnému vyloučení chyb, ke kterým by mohlo docházet při měření na různých typech analyzátorů. Toto srovnání by měla provádět každá laboratoř, ve které se měří koagulační parametry na více analyzátorech a získaná měření by měla být mezi sebou dobře porovnatelná. Vyšší variační koeficienty následně upozorňují na nedostatky a chyby při měření, které je potřeba následně řešit.

Měření byla prováděna s periodou jednoho týdne (stejný den v týdnu) a všechna naměřená data byla nasbírána během 34 týdnů. V tomto delším časovém úseku jsme chtěli vyloučit ovlivnění analyzátoru změnou okolní teploty.

Při porovnání výsledků naměřených na dvou analyzátorech není možné vyloučit chybu při odběru vzorku. Preanalytickou fází je potřeba hodnotit odděleně a není možné ji zahrnout do výše uvedených porovnání. Pokud je správně provedena kalibrace metody, je možné při provedených porovnáních odhalit chybu ve výsledcích, která by mohla způsobena užitím diagnostických setů s různou šarží. Porovnávané analyzátory

mají platný validační protokol, pro kontrolu kvality byly použity certifikované kontrolní materiály s udaným rozmezím hodnot. Všechny koagulační analyzátory mohou vykazovat mírné odchylky měření při jednotlivých stanoveních. Míru přesnosti a správnosti nám ukazují SD a CV, porovnání jednotlivých metod mezi sebou vyjadřujeme hodnotou korelačního koeficientu.

Při zavádění nové metody byl shromážděn soubor 157 vzorků. U většiny byl podán přípravek Arixtra 2,5 mg / 0,5 ml (fondaparinuxum sodium). U všech vzorků byly změřeny hodnoty aktivity anti Xa pomocí testu je COAMATIC® Heparin a hodnoty pentasacharidu kitem PefakitPICT, který byl nakalibrován pomocí preparátu Arixtra. Na analyzátoru byly naměřeny následující hodnoty: pro anti Xa: průměrná hodnota = 0,26; medián = 0,29; maximum = 0,77; minimum = 0,00. Hodnoty pentasacharidu odpovídaly: průměr = 0,30; medián = 0,25; maximum = 1,03; minimum = 0,00. Po společném výpočtu jsme získali SD = 0,419 a korelační koeficient 0,806. Podle těchto výsledků lze říci, že hodnoty obou měřených metod spolu dobře korelují.

6. Závěr

Byla provedena měření u 102 vzorků. U každého vzorku byly změřeny následující metody: PT, aPTT, TT, Fbg, AT III a D-dimer. U každého byla vypočítána SD, CV % a korelační koeficient. Porovnané analyzátory BCS OS Mac a BCS XP firmy Dade Behring spolu dobře korelují.

Byla zavedena nová metodiky stanovení anti Xa a pentasacharidu s použitím přípravku Arixtra. Při stanovení jednotek inhibice anti Xa a pentasacharidu bylo dosaženo hodnot, které spolu dobře korelují.

7. Použitá literatura

1. ALVING B. M., *The hypercoagulable states*, Hosp. Pract., 28, 1993.
2. ABILDGAARD U., .Antithrombin and related inhibitors of coagulation. In:Poller L., ed. *Recent Advances in blood coagulation*. Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone,1981.
3. ANDREE M. A. H., NEMERSON Y., *Tissue factor: Regulation of activity by flow and phospholipid surfaces*. Blood Coagulat. Fibrinolysis, 6, 1995
4. ASLAB, <http://aslab.vuv.cz/slp.php>
5. BARROWCLIFT T., THOMAS D. P., Antithrombin III and heparin. In: BLOOM A. L., THOMAS D. P., *Haemostasis and thrombosis*, Edinburg, Churchill Livingstone, 1987
6. BEVERS E. M., COMFURIUS P., et al., *The nature of bindings site for protrombinase at the platelet surface as revealed by lipolytic enzymes*. Eur. J. Biochem., 122, 1982.
7. BERROWCLIFF T. W., THOMAS D. P., *Antitrombin III and heparin*. Edinburgh, Churchill livingstone 1987.
8. BOVILL E. G., *Disseminated intravascular coagulation: pathophysiology and laboratory diagnosis*, Fibrinolysis 7, 1993.
9. BOUNEMAX H., MOERLOOS P. DE, PERRIER., ET AL., *Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous tromboembolism: An overview*. Thromb, Haemostas., 71, 1994
10. BUDZYNSKI A. Z., et al., *Antigenic markers on fragment DD, a unique plazmic derivate of human crosslinked fibrin*, Blood 54, 1979.

11. COOK N. S. & UBBEN D., *Fibrinogen as a Major Risk Factor in Cardiovascular Disease*. TiPS 11, 1991.
12. COOPER J. & DOUGLAS A. S., *Fibrinogen Level as a Predictor of Mortality in Survivors of Myocardial Infarction*. Fibrinolysis 5, 1991.
13. CONKLING P. R., GREEMBERG C. S., WEINBERG J. B., *Tumor necrosis faktor inducess tissue factor-like activity in human leukomia cell line U 937 and peripheral blood monocytes*. Blood, 72, 1988.
14. COZZOLINO F., TORCIA M., MILIANI A., et al., *Potential role if interleukin 1 as the trigger for diffuse intravascular coagulation in acute nonlymphoblastic leukemia*. Amer, J. Med., 84, 1988.
15. CREMER P., et al., *Diagnose und Labor* 42, 1992.
16. DATI F., et al., *Klin. Lab.* 39, 1993.
17. DEBIZE G. B., MASSIGNOND D., COUER P., *Antiphospholipid antibodies and thrombotic risk: realtionship to thrombomodulin, D-dimer and prothrombin fragment 1+2*. Nouv, Rev, Franc, Hematol., 37, 1995.
18. DEMPFLE C. E., KELLER A., KIRCHNER A., HEENE D. L., *The Influence of Hirudin on Plazma Fibrinogen Assays*. Haemost. 80, 1998.
19. ESMON E. L., OWEN W. G., ESMON C. T., *Isolation of membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C*. J. Biol. Chem., 257, 1982.
20. ESMON CH. T., *Protein S a protein C*. Biochemistry, Trends, Cardiovasc. Med., 2, 1992.
21. ERNST E., RESCH K. L., *Ann. Intern. Med.* 118, 1993.
22. HIRSH J., POLLER L., DEYKIN D., LEVINE M., DALEN J. E., *Optimal Therapeutic Range of Oral Anticoagulants*. Chest 95, 1989.

23. KRČOVÁ V. a kol., *Komplikace dlouhodobé léčby heparinem v těhotenství*. Hemoto-onkologická klinika FNO; porodnicko-gynekologická klinika FNO; II.interní klinika FNO, 2003.
24. KRÍŽOVÁ P., *Adheze a aktivace lidských krevních destiček*, disertační práce, Praha, 2007.
25. KUBEŠ R., *Hemofilická artropatie a další postižení pohybového aparátu krvácivými stavy*, 2002.
26. KVASNIČKA J., *Žilní a tepenná trombofilie*, I. interní klinika, Oddělení klinické hematologie a Trombotické centrum Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Interv. Akut. Kardiol. 2, 2003.
27. LECHNER K., KYRLE P. A., *Antitrombin III Concentrates – Are they clinically useful?* Thromb. Haemost., 83, 1995.
28. MACIK B. G., MORRISSEY J. H., *Determination of activated factor VII levels in plasma using a clotting assay specific for F VIIa*. Blood, 78, 1991.
29. MATÝŠKOVÁ M., SMEJKAL P., *Von Willebrandova choroba –dělení a klinika*, OKH FN Brno, 2001.
30. OSTEROUD B., RAPAPORT S. I., *Activation F IX by the reaction product of tissue factor and F VII: Additional pathway for initiating blood coagulation*. Proc, Natl.Acad.Sci, 73, 1977.
31. PECKA M. a kol., *Přehled laboratorní hematologie III.*. Galén, Hradec Králové, 1998.

32. POLLER L., THOMSON J.M., The activated partial thromboplastin time (APTT)
In: Jespersen J., Bertina R.R., Haverkate F. A. *Manual of Laboratory Techniques*,
Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA, 1992.
33. PŘEROVSKÝ I., *Prevence a terapie akutní žilní trombózy*, IKEM, Zdroj: Lékařské
listy, 2004.
34. QUICK A. J., *A Study of the Coagulation Defect on hemophilia an in Jaundice*.
Am.J.med. Sci.190, 1935.
35. RAO L. V. M., RAPAPORT S. I., *Activation F VII bound to tissue factor, a key
early step in the tissue factory pathway of blood coagulation*. Proc, Natl.Acad.Sci,
USA, 85, 1988.
36. STEFANO V. DE, FINAZZI G., MANNUCCI P. M., *Inherited trombophilia:
Pathogenesis, clinical syndromes and management*, Blood, 87, 1996.
37. SLP, http://www.sekk.cz/SLP/SLP_popis.htm
38. SVENSON P. J., DAHLBACK B., *Resistans to activated protein C as a a basis
for venous thrombosis*. N. Engl. J. Med., 330, 1994.
39. TABERNERO M. D., THOMAS J F., ALBERCA I., et al., *Incidence and clinical
characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis*. Amer. J.
Hematol., 36, 1991.
40. TOPOL J., et al., *Long-term protection from myocardial ischemie events in a
randomized trial of brief Intergrin blockade eith percutaneus coronary intervention*.
Jama 278, 1997.

41. THOMAS L.(ed), *Partielle Thromboplastinzeit, Labor und Diagnose* (4.erw.Auflage), Med. Verl.-Ges, Marburg, 1992.
42. TROMBOCLOTIN ®, http://www.medcorp.com.br/medcorp/upload/downloads/28100530_20063298536.pdf

8. Seznam zkratek

Použité zkratky:

ACA = antikardiolipidové protilátky

ADP = adenosindifosfát

ASLAB = Středisko pro posuzování způsobilosti laboratoří

APA = antifosfolipidové protilátky

APC = aktivovaný protein C

APTT = aktivovaný parciální tromboplastinový čas

ASA = kyselina acetylsalicylová

BCS = Behring coagulation systems

BMI = body mass index

CA = cirkulující antikoagulans

Fbg = fibrinogen

IL = interleukin

IM = infarkt myokardu

LA = lupus antikoagulans

LIS = laboratorní informační systém

LMWH = nízkomolekulární heparin

MŽP = Ministerstvo životního prostředí

OECD = Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj

PAI = inhibitor tkáňového aktivátoru plasminogenu

PAF = proteiny akutní fáze

PC = protein C

PF = destičkový faktor

PS = protein S

PT = protrombinový čas

S.C. = subcutánně

SLP = správná laboratorní praxe

SÚKL = Státní úřad pro kontrolu léčiv

TNF = tumor necrosis factor

UI = mezinárodní jednotky

UFH = nefrakciovaný heparin

t-PA = tkáňový aktivátor plasminogenu

9. Klíčová slova

Trombofilní stavy

Koagulace

BCS

Heparin

Key words

Thrombotic state

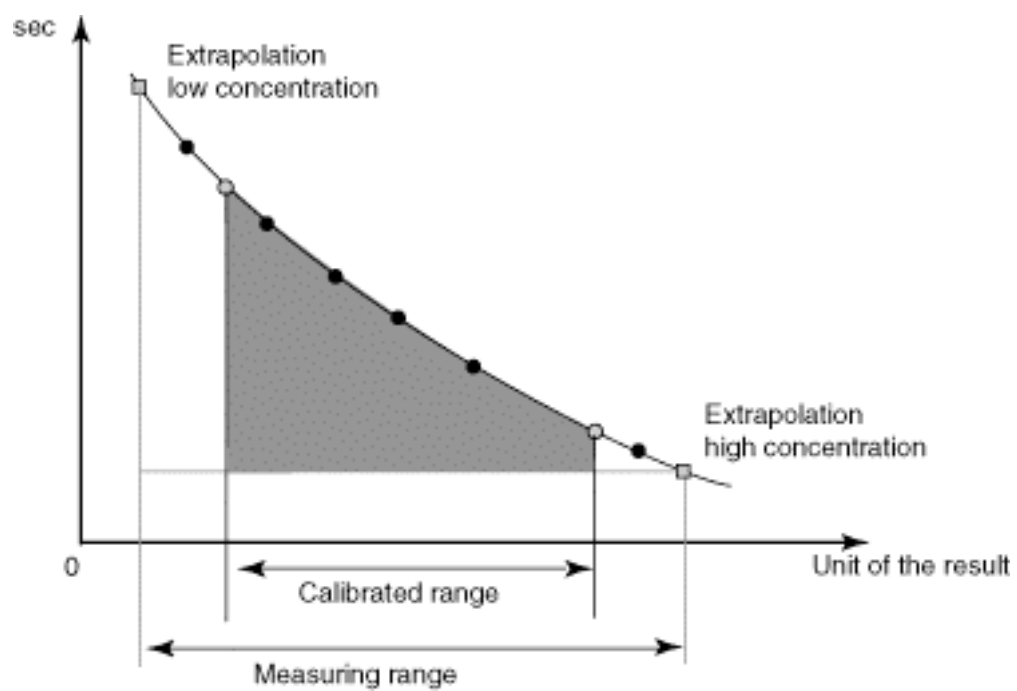
Coagulation

Behring Coagulation systems

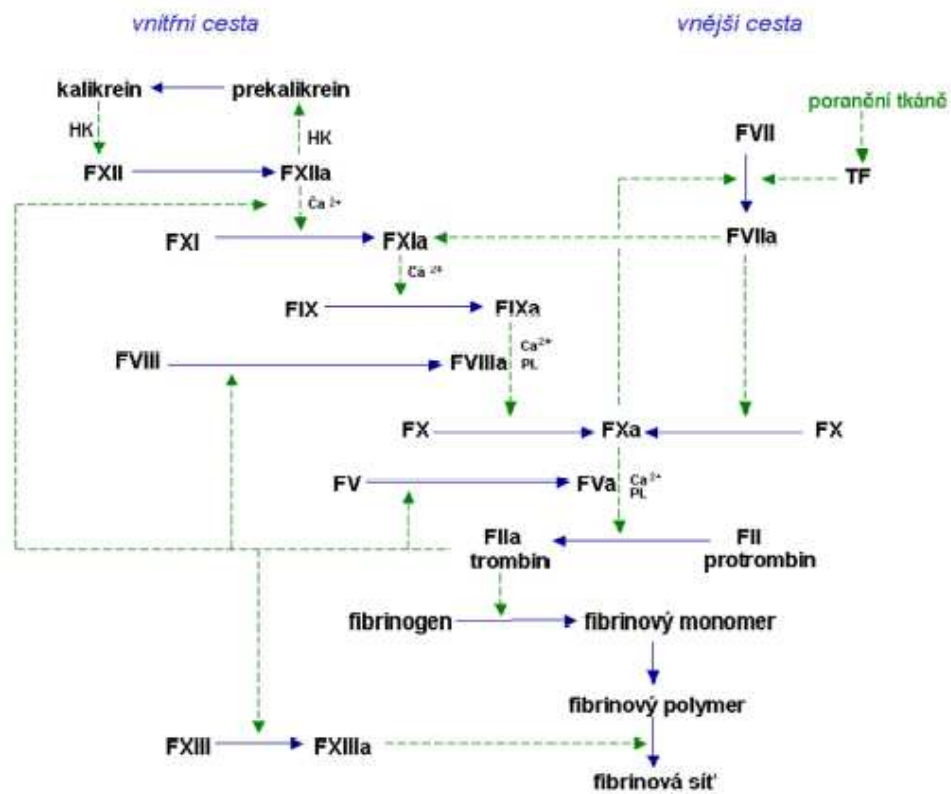
Heparin

10. Přílohy

Graf 1: Extrapolaxní křivka



Obr.1: Schéma koagulační kaskády



Tabulka 1: Data naměřená při mezilaboratorním porovnání

číslo vzorku	INR		APTT		TT		Fbg	
	BCS OS Mac	BCS XP	BCS OS Mac	BCS XP	BCS OS Mac	BCS XP	BCS OS Mac	BCS XP
1	1.06	1.06	37.1	38.3	17.7	21.9	5.87	6.9
2	1.09	1.12	38.4	40.4	17.5	22.9	6.98	8.1
3	1.11	1.17	46.4	43.6	14.6	21.1	5.92	6.9
4	2.22	2.16	49.2	52.6	24.7	24.9	1.36	1.5
5	1.1	1.09	38.8	42.7	13.6	15.3	6.63	6.7
6	1.02	1.03	28.1	30.6	14.2	16.4	6.12	5.8
7	1.24	1.3	37.3	39.6	15.8	22.8	2.77	2.8
8	1.03	1.1	41.4	42.6	17.1	21.4	5.57	5.6
9	1.06	1.16	28.4	29.2	17.5	24.5	3.33	3.8
10	1.11	1.09	32.2	32.8	16	22.3	7.3	7
11	1.18	1.14	40.1	40.3	14.9	23.5	4.71	4.5
12	1.18	1.16	35.8	36.4	16.9	34.9	6.84	7
13	0.91	0.93	28.4	37.3	18.8	24	6.94	6.4
14	0.97	0.99	37.3	35.3	18.1	21.6	7.03	6.7
15	1.06	1.1	40.9	38.9	15.5	21.2	4.94	4.1
16	1.19	1.16	37.7	41.2	16.5	19.7	6.23	5.7
17	0.99	1.02	30.7	32.1	14.6	16.8	8.15	8.5
18	1.02	1.03	34.4	35.3	14	20.5	3.95	3.5
19	0.85	1.02	27.2	25.6	17.3	21.2	5.38	4.3
20	1.05	1.2	41.5	36.6	16.8	23.7	3.9	3.7
21	0.92	1.09	31.6	30.7	17.3	22.2	6.49	5.9
22	1.02	1	37.2	36.1	15.9	21.4	8.5	10.7
23	0.83	0.89	32.5	32.1	14.2	20.1	6.55	6.3
24	0.98	1.05	31.4	30.7	16.7	20.9	3.39	3.2
25	1.27	1.23	41.8	45.1	20.9	28.1	4.02	3.9
26	1.02	1.03	35.8	37.5	17	23.1	5.73	4.8
27	0.87	0.92	32.1	32.9	14.8	18	5.22	4.3
28	1.25	1.31	44.4	46.6	13.3	17.5	6.42	6.1
29	1.34	1.45	49	51	16	20.9	1.44	1.6
30	0.97	1.09	27	28.6	15.1	18.2	4.22	3.2
31	0.94	1.08	27	28.3	18.2	16.2	3.7	3.6
32	1.51	1.81	41.9	45.8	21.8	19.8	3.73	3.4
33	1.34	1.6	33.3	36.4	20.5	18.5	5.05	4.6
34	1.05	1.17	100.4	98.4	19.3	23.7	4.58	4.1
35	1.45	1.54	44.6	45.3	16.5	19.7	3.65	4.2
36	0.9	0.98	36.7	36.8	13.9	16.1	3.02	3.3
37	1.03	1.15	35.2	36.6	20.1	23.2	4.97	5.1
38	1.42	1.57	32.9	34.4	14.5	16.1	3.07	3.3
39	0.94	1.09	40.6	43.6	20.6	23.4	5.69	5.9
40	1	0.9	32.1	31.1	17.6	17.7	8.83	10.7
41	1.14	1.09	31.8	31.6	21	21.9	4.56	3.7
42	1.05	1.01	40.2	40.3	16.4	17.1	5.38	5.1
43	0.99	0.99	36.6	36.4	19	25.1	5.72	5.1
44	1.68	1.65	52.9	50.9	32.1	38.7	0.64	1.1
45	0.86	0.89	36.4	36	13.6	16.6	8.25	8.7
46	1.17	1.03	36.7	36.7	12.4	13.3	3.7	4.2
47	0.96	0.9	27.5	28.3	20.5	23	3.62	3.5
48	1.01	0.93	38.3	38.3	16.3	18	2.12	2
49	1.07	1.04	49.5	36.1	15.1	16.7	5.79	6.2
50	1.01	0.99	33.2	32.6	16.2	19.9	7.73	7.4
51	0.99	0.97	37.6	40.9	14.9	17.2	7.29	7.4
52	1.21	1.21	28.9	30.8	19	21.2	4.88	4.2
53	1.1	1.08	44	46.1	17.1	19.7	5.06	3.9
54	1.32	1.27	85	86.9	180	180	1.41	1.4

55	1.72	4.68	51.4	51	17.4	19	3.06	1.5
56	1.01	0.95	37.4	37.9	16.9	20.2	6.31	4.9
57	1.68	1.4	44.7	44.3	15.5	17.1	3.99	4.4
58	1.15	1.12	31.6	31.6	17.1	18.7	3.97	3.7
59	1.19	1.22	39.4	39.4	18.2	19.7	3.1	2.8
60	0.9	0.92	30.9	29.7	12.8	14.4	6.85	6
61	1.21	1.08	39.8	40.6	15.9	16	2.86	3.1
62	1.16	1.07	35.5	36.4	26.5	28.4	7.89	6.4
63	1.1	1.02	34.4	36.4	15.9	17	3.96	3.5
64	1.36	1.26	41.5	39.2	19.8	18.3	6.3	5.6
65	1.35	1.2	36.6	36	19.8	18.5	8.2	6.8
66	1.65	1.54	40.8	45.7	16.8	16	1.95	1.9
67	1.03	1.1	36.4	35.4	19.2	19	6.19	4.9
68	0.88	0.95	30.3	29.3	15.8	16.5	4.93	3.7
69	0.87	0.96	29.3	29.4	14.7	15.2	8.33	6.9
70	1.8	1.8	49.2	51.3	18.5	21.7	5.1	4.3
71	1	1.12	36	35.8	14.5	15.4	4.4	4
72	0.9	0.93	26	28.4	16.1	16.5	5.7	4.6
73	0.99	1.04	42.9	40.5	23.5	23.8	9.65	8.9
74	0.99	0.99	33	34.8	17.6	16.7	5.06	3.7
75	1.01	1.05	37.6	38.3	22.7	22.6	6.99	5.4
76	1.23	1.2	33.4	34.5	15.7	17.4	5.94	4.7
77	2.75	2.8	41.8	55.7	12.9	14.3	3.6	4.1
78	1.13	1.22	42	41.5	16.9	20.1	2.13	2.2
79	1.12	1.17	135.9	127.6			3.15	2.9
80	1.04	1.03	33.7	35	15.4	16	6.45	4.8
81	1.48	1.45	40.2	40.2	18.8	19	9.18	8.4
82	0.96	0.94	31.4	35.2	15.8	16.9	3.93	3.3
83	1.17	1.19	32.6	35.6	20.3	23.6	4.81	3.7
84	0.98	0.99	29.9	31.2	15.9	17	7.6	5.9
85	0.97	0.99	35.1	37.2	17.1	21	4.83	3.7
86	0.99	0.99	37.4	37	16.2	19.3	5.73	5.2
87	3.85	3.4	63.8	73.6	18.4	21.7	5.99	6.4
88	2.34	2.26	115.9	56.4	16.4	17.2	6.79	6.4
89	0.99	1.01	37.3	42.8	15.8	16.4	9.15	9.1
90	2.96	3.02	50.7	59.5	16.3	17.2	4.86	5.3
91	3.09	3.34	51.2	48.4	17.7	22.5	7.31	7.2
92	0.94	1.01	29.6	28.4	14.7	16.7	2.96	2.4
93	1.74	1.9	41.4	41.8	16	18.8	4.78	4.3
94	0.96	0.94	39.8	40.8	14.9	14.4	8.56	8.4
95	1.96	1.89	51.3	50.7	18.1	16.2	4.27	3.9
96	1.5	1.54	33.2	32.8	15.1	13.9	8.68	8.4
97	1.1	1.074	33	39	15.6	16.3	5.81	5.6
98	1.09	1.06	37.4	42.7	14.4	15.7	7.94	7.3
99	1.47	1.54	41.1	44.9	12.1	12.3	2.46	2.5
100	1.02	0.94	27.3	26.6	15.7	16.1	5.83	4.8
101	1.29	1.23	28.7	33.5	15.9	16.1	3.12	3
102	2.47	2.28	46.2	53.7	13.4	14	2.74	2.9

Tabulka 2: Data naměřená při mezilaboratorním porovnání - pokračování

číslo vzorku	AT III		D-dimer	
	BCS OS Mac	BCS XP	BCS OS Mac	BCS XP
1	79.9	75	1077	1176
2	80.5	76.3	2411	2877
3	103.7	98	554	629
4	57.2	57	6400	6400
5	100.6	100	600	482
6	91.8	90	3215	2896
7	89.7	81	82.9	133
8	62.8	55	1042	1148

9	78.6	69	2758	3019
10	79.1	75	2730	3241
11	105.5	98	96	310
12	79.1	72	688	627
13	102.3	86	1992	2393
14	92.9	83	2663	2994
15	102.5	88	70	94
16	48.8	49	3195	3770
17	72.9	69	304	522
18	92.2	88	2390	2870
19	132	119.1	657	524
20	98.7	91.5	150	291
21	81.7	75.8	576	597
22	61.7	60	2846	2955
23	67.7	62	441	555
24	92.5	90	73	25
25	35.2	34	1824	2529
26	100.3	83	2789	2766
27	84.4	75	207	469
28	57.5	54	808	714
29	64.4	59	25	66
30	106.6	92	110	181
31	95.5	87	114	232
32	90.4	84	70	137
33	68.9	69	702.5	702
34	134.5	120	940	1630
35	39.9	38	3819	4074
36	78.5	72	393	520
37	101.2	94.5	19293	967
38	68.6	68.1	679	269
39	117.8	109.8	604	216
40	101.4	90	763	409
41	126.1	116	1346	1712
42	74.7	81	331	409
43	58.5	57	627	774
44	32.6	26	3561	4952
45	91.2	83	329	632
46	72.4	55	931	1563
47	101.7	85	725	581
48	78	62	2859	1819
49	80.4	66	437	527
50	111.2	91	229	341
51	66.8	54	3574	2704
52	62.9	59	2130	2316
53	137.4	124	358	430
54	73.3	75	6400	6400
55	35	31	1196	2437
56	129.9	116	933	200
57	89	91	46.1	25
58	98.3	91	814	884
59	91.9	87	56	56
60	100.3	96	699	629
61	82.6	76	53	62
62	83.3	77	98	86
63	90.1	85	77	80
64	65	60	1069	684
65	80	76	1163	517
66	63	60	2528	3288
67	90.1	86	696	555
68	101.4	92	933	1277
69	112.5	106	890	680
70	57	35.4	4214	25
71	92	67.3	172	95
72	85	61.6	117	1250

73	106.2	91	1590	2756
74	119	106	1302	2906
75	108.8	92	1470	449
76	71.4	60	1230	587
77	90.3	75	69	70
78	62.6	56	77	140
79	56.4	69.2	6400	734
80	80.9	79.8	1290	1044
81	44.5	53.7	751	733
82	104.8	115.6	1021	876
83	56.7	70.9	2334	1265
84	59.1	77.4	590	417
85	57.2	62	964	697
86	77.7	82.1	1913	2451
87	108.3	109.3	451	504
88	113.3	122	711	568
89	82.2	93	492	525
90	84.4	97	199	25
91	60.5	81	1835	1249
92	101	113	187	41
93	94.5	106	402	343
94	75.9	86	560	562
95	103.6	113	84	33
96	88.9	94	2181	2101
97	105.6	111	320	286
98	68.7	70	837	898
99	84.2	90	25	25
100	92.1	94	352	316
101	73	85	1040	667
102	99.2	108	25	25

Tabulka 3: Naměřená data při zavádění nové metody Arixtra

vzorek č.	antiXa	PentaS
1	0.00	0.000
2	0.00	0.017
3	0.00	0.000
4	0.00	0.046
5	0.00	0.017
6	0.00	0.008
7	0.00	0.000
8	0.00	0.010
9	0.02	0.000
10	0.00	0.000
11	0.00	0.013
12	0.00	0.036
13	0.00	0.047
14	0.00	0.000
15	0.00	0.000
16	0.00	0.053
17	0.00	0.058
18	0.21	0.000
19	0.00	0.000
20	0.00	0.018
21	0.00	0.007
22	0.02	0.074
23	0.00	0.022
24	0.00	0.000
25	0.36	0.005
26	0.00	0.000
27	0.00	0.000
28	0.00	0.016
29	0.00	0.000
30	0.38	0.093

31	0.00	0.033
32	0.00	0.000
33	0.00	0.039
34	0.00	0.016
35	0.21	0.082
36	0.00	0.000
37	0.04	0.032
38	0.00	0.033
39	0.00	0.039
40	0.00	0.000
41	0.00	0.041
42	0.03	0.006
43	0.00	0.021
44	0.00	0.000
45	0.30	0.139
46	0.07	0.158
47	0.21	0.216
48	0.20	0.252
49	0.36	0.491
50	0.34	0.373
51	0.51	0.981
52	0.28	0.185
53	0.44	0.534
54	0.29	0.371
55	0.20	0.247
56	0.22	0.284
57	0.30	0.133
58	0.00	0.369
59	0.30	0.200
60	0.65	0.490
61	0.52	0.984
62	0.49	0.444
63	0.32	0.200
64	0.14	0.177
65	0.38	0.426
66	0.30	0.301
67	0.33	0.251
68	0.24	0.513
69	0.15	0.237
70	0.15	0.217
71	0.43	0.366
72	0.26	0.265
73	0.50	1.029
74	0.45	0.903
75	0.47	0.935
76	0.24	0.267
77	0.34	0.222
78	0.33	0.771
79	0.10	0.267
80	0.24	0.249
81	0.13	0.291
82	0.27	0.388
83	0.27	0.126
84	0.33	0.221
85	0.22	0.209
86	0.25	0.215
87	0.45	0.222
88	0.53	0.475
89	0.30	0.203
90	0.25	0.432
91	0.60	0.765
92	0.32	0.304
93	0.29	0.459
94	0.01	0.063

95	0.06	0.110
96	0.33	0.240
97	0.42	0.482
98	0.00	0.034
99	0.00	0.131
100	0.42	0.255
101	0.25	0.184
102	0.43	0.414
103	0.25	0.298
104	0.77	0.595
105	0.41	0.525
106	0.29	0.270
107	0.32	0.382
108	0.33	0.308
109	0.45	0.443
110	0.20	0.379
111	0.42	0.391
112	0.64	1.006
113	0.37	0.329
114	0.16	0.250
115	0.47	0.498
116	0.40	0.339
117	0.44	0.679
118	0.43	0.460
119	0.26	0.255
120	0.42	0.243
121	0.53	0.988
122	0.54	0.924
123	0.38	0.366
124	0.48	0.887
125	0.18	0.118
126	0.41	0.767
127	0.43	0.635
128	0.51	0.301
129	0.45	0.512
130	0.34	0.323
131	0.42	0.353
132	0.44	0.024
133	0.65	0.604
134	0.54	0.545
135	0.45	0.508
136	0.36	0.434
137	0.33	0.391
138	0.50	0.916
139	0.32	0.444
140	0.00	0.139
141	0.20	0.207
142	0.36	0.470
143	0.22	0.238
144	0.26	0.215
145	0.38	0.380
146	0.31	0.292
147	0.48	0.959
148	0.44	0.539
149	0.47	0.677
150	0.43	0.526
151	0.27	0.515
152	0.50	0.884
153	0.57	0.336
154	0.50	0.495
155	0.39	0.449
156	0.46	0.422
157	0.67	0.679