

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Porovnání výsledků základního koagulačního vyšetření
provedeného ve třech různých laboratořích ze stejného
vzorku krve**

bakalářská práce

Autor práce: Alena Fálová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Vedoucí práce: MUDr. Karel Blažek Ph.D.

Datum odevzdání práce: 14.8.2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použité literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 14.8.2013

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucímu mé práce MUDr. Karlu Blažkovi PhD. za jeho přínos této práci, dále laboratoři STAFILA pod vedením MUDr. Marie Ládové, a laboratoři Medipont vedenou MUDr. Rostislavem Fryšem za spolupráci při tvorbě této práce.

Abstrakt

Základní koagulační vyšetření se provádí v každé hematologické laboratoři. Tato vyšetření by se měla provádět všem pacientům, kteří mají podstoupit operační zákrok a pacientům léčeným antikoagulanty. Koagulační vyšetření umožňují zjistit, zda se jedná o poruchu vnější či vnitřní cesty koagulační kaskády. Konečná diagnóza se stanoví speciálními testy. K základním koagulačním vyšetřením patří protrombinový čas, aktivovaný parciální tromboplastinový čas a fibrinogen. Principem koagulačních metod je určení času potřebného k detekci fibrinového vlákna od přidání reagensie ke vzorku testované plazmy. Testy používané v hemostáze lze rozdělit na globální, skupinové a specifické. Na vyšetření se používají zkumavky s antikoagulačním činidlem, v případě hemostázy se jedná o citrát sodný. Při každém vyšetření je nutné dodržet správný poměr krve a citrátu ve zkumavce, neboť při jeho nedodržení nelze vyšetření provést. Velmi důležitá je také preanalytická část, jež obsahuje soubor postupů a činností, kterými projde vzorek od odběru po jeho zpracování, díky čemuž lze získat reprodukovatelné výsledky. V současné době se koagulační vyšetření provádějí v laboratořích na multifunkčních analyzátoch. K tomuto vyšetření se standartně používá venózní krev. U novějších, přenosných koagulometrů, na kterých se měří protrombinový čas u pacientů léčených antikoagulanty, však stačí pouze odběr krve z prstu.

Tato práce je zaměřena na porovnání měření jednoho vzorku na třech různých koagulometrech, ve třech různých laboratořích. Pro každý analyzátor byly použity různé, výrobcem doporučené tromboplastiny s různým ISI (International sensitivity index - mezinárodní index citlivosti). Reagensie na aktivovaný parciální tromboplastinový čas byly ze stejných důvodů taktéž od různých výrobců. Bylo změřeno 50 náhodně vybraných vzorků, neboť ne každá žádanka má uvedený údaj s diagnózou pacienta. Každý vzorek jsem změřila týž den, do 4 hodin po odběru, aby byly dodrženy zásady správné laboratorní praxe. Vzorky byly svozovou službou svezeny do laboratoře Synlab czech s.r.o., kde byly také primárně změřeny na koagulometru Sysmex CA 1500. Další měření jsem provedla v laboratoři Stafila s. r.o. na koagulometru ACL Elite PRO a poslední měření v laboratoři Medipont s.r.o. na koagulometru START 4. Všechna měření byla statisticky vyhodnocena. Byly vypočteny

průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, které ukazují, že se výsledky od sebe příliš neliší. Dosažená hladina významnosti u INR (international normalised ratio – mezinárodní normalizovaný poměr) a aktivovaného parciálního tromboplastinového času byla zhodnocena jako statisticky významná, což znamená, že se jednotlivé výsledky z daných koagulometrů liší. I když jsou odchylky mezi různými přístroji statisticky významné, nemají větší klinický význam. Pouze u protrombinového času v sekundách z měření vyplývá, že se výsledky z koagulometrů od sebe neliší. Totéž platí při hodnocení koagulometrů mezi sebou. Lze konstatovat, že změřené výsledky jsou na různých přístrojích statisticky rozdílné, nicméně nemají větší klinický význam. Z daných zjištění plyne, že doporučení pro lékaře je, aby pro vyšetřování protrombinového času a aktivovaného parciálního tromboplastinového času využívali stále stejnou laboratoř.

Summary

Basic coagulation tests are carried out in every laboratory of hematology. Every patient who is about to undergo a surgery, or is treated with anticoagulants, should be examined this way. Coagulation tests allow to find out, if the patient is suffering from outer or from inner coagulation cascade disorder. Final diagnosis is carried out using specialized tests. The basic tests include prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen. The principle of coagulation tests is determination of the time needed for detection of fibrin fiber after addition of reagent to the sample of tested plasma. Tests used in hemostasis can be global, group and specific. For the test, test tubes with an anticoagulant are used. In hemostasis, the anticoagulant used is trisodium citrate. It is always necessary to keep the same blood/citrate ratio. The preanalytical part, which consists of specific actions the sample undergoes from its obtaining to the analysis itself, is also very important. Nowadays, the coagulation tests are run in laboratories using multifunctional analysators. Blood samples are obtained from a vein. Small, portable coagulometers are used for measuring prothrombin time for patients treated with anticoagulants. Blood for this test can be obtained from the fingertip.

This thesis is focused on comparing the measurement of a sample on three different coagulometers. Different thromboplastins with different ISI (International Sensitivity Index) were used. Reagents for activated partial thromboplastin time were also purchased from different producers. In this bachelor thesis, fifty randomly chosen samples were tested, because not every application form has the patient's diagnosis stated. Every sample was tested that very day, within four hours from taking the blood. Samples were primarily tested in laboratory Synlab Czech s.r.o., using coagulometer Sysmex CA. Other measurements were carried out in laboratory Stafila s.r.o. using coagulometer ACL Elite PRO and in laboratory Medipont s.r.o. using coagulometer START 4. All measurements were statistically evaluated. Average values and standard deviation were calculated, and shows, that the values do not differ significantly. Level of significance in INR test (international normalized ratio) and in activated partial thromboplastin time was evaluated as statistically significant, yet without bigger clinical importance. Only in prothrombin time, measured in seconds, results from coagulometers

does not differ. The same can be applied when comparing coagulometers with each other. Based on my findings, it is recommended for the doctors to use the same laboratory for testing the prothrombin time and activated partial thromboplastin time. At the same time, it is necessary to say, that the differences measured in this thesis are so minor, that they have no practical clinical importance.

Obsah

Úvod.....	10
1.Současný stav – teoretická část.....	11
1.1 Enzymatická kaskáda	11
1.2 Hemostáza	12
1.3 Koagulační faktory.....	13
1.3.1 Kofaktory.....	18
1.3.2 Inhibitory hemostázy	18
1.4 Úloha cévní stěny a trombocytů v koagulaci	22
1.5 Koagulopatie	22
1.6 Koagulační vyšetření.....	23
1.6.1 Testy používané v hemostáze	25
2. Cíl práce a hypotézy	28
2.1 Cíl práce	28
2.2 Hypotézy	28
3. Materiály a metody	29
3.1 Preanalytická část.....	29
3.2 Analytická část.....	31
3.3 Postanalytická fáze.....	31
3.4 Principy analyzátorů použitých v této práci.....	32
3.5 Měření kontrol.....	34
3.5.1 Vnitřní kontrola kvality	35
3.5.2 Aritmetický průměr	36
3.5.3 Směrodatná odchylka	36
3.5.4 Dosažená hladina významnosti	36
3.5.5 Rozptyl	36
4. Výsledky	37
4.1 Výpočet výsledků.....	37
4.2 Výsledky	38
4. Diskuze	46
5. Závěr	48

Seznam použité literatury	49
Klíčová slova	52
Přílohy.....	53

Úvod

Základní koagulační vyšetření se provádí v každé hematologické laboratoři. Mělo by být provedeno všem pacientům, kteří jdou na operační zákrok. Dalším důvodem, proč se vyšetření dělají, je sledování pacientů s antikoagulační léčbou, nebo s klinickými projevy koagulopatie. K vyšetření hemostázy slouží metody, jež zjišťují účast složek plazmatického koagulačního a fibrinolytického systému v celém procesu hemostázy.

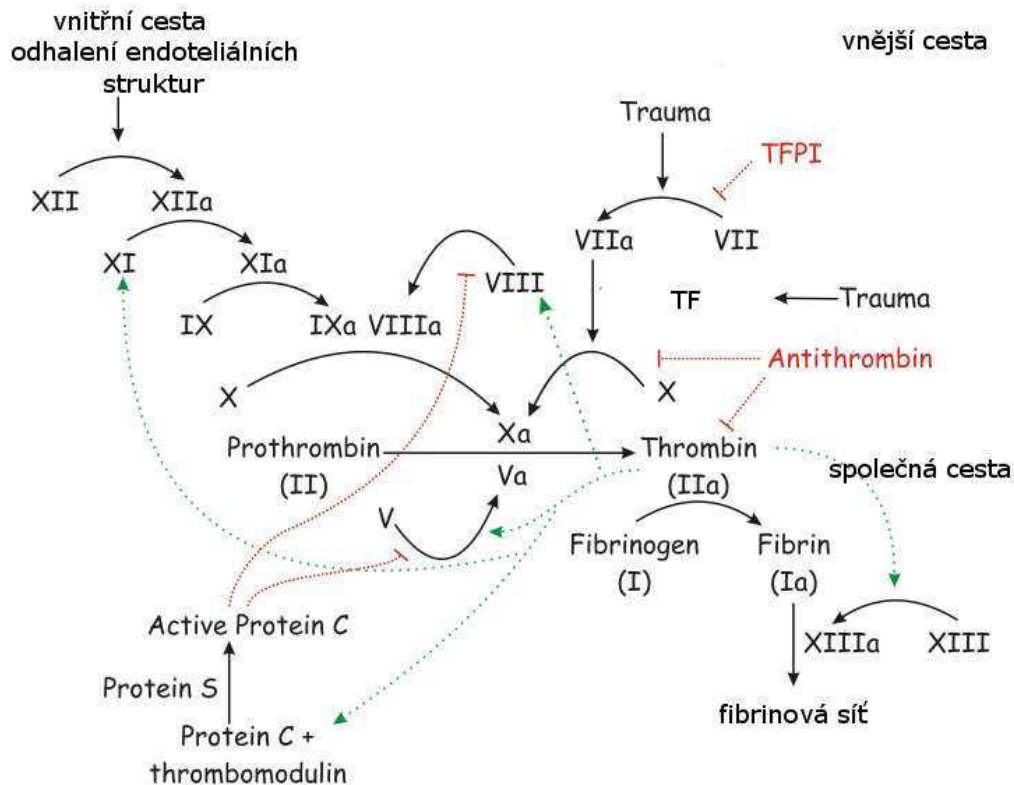
V současné době existuje řada komerčně dostupných koagulometrů, které je možné rozdělit je do dvou kategorií. První kategorií jsou malé a přenosné, kde postačí kapilární krev odebraná z prstu. Druhou skupinou jsou velká, multifunkční zařízení (Shah et.al.2011). Přenosné zařízení se používá zejména u pacientů léčených antikoagulanty. Multifunkční analyzátory se používají jak ke sledování léčených pacientů, tak i pro diagnostické vyšetření hemostázy. Moderní koagulační diagnostika je stále složitější. Screeningové testy, jako např. protrombinový čas (PT), aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) a fibrinogen jsou důležité pro posouzení základní hemostázy (Casella et.al.2009). Mezi novější metody koagulačního vyšetření patří například systém CoaguChek XS, což je monitorování metodou POCT (Point-of care testing).

Cílem této práce bylo porovnat naměřené hodnoty základního koagulačního vyšetření (PT, aPTT) ze stejného vzorku krve. Práce byla provedena ve třech různých laboratořích, na třech různých typech koagulometrů. Byly to ACL Elite PRO od firmy Instrumentation Laboratory, Sysmex CA 1500 od firmy Siemens a poloautomatický koagulometr START 4 od firmy Stago. Bylo vybráno 50 vzorků, jež byly svezeny do laboratoře Synlab czech s. r. o. Vzorky byly vybrány zcela náhodně, neboť ne každá žádanka má uvedený údaj s diagnózou pacienta. Každý vzorek byl vyšetřen týž den do 4 hodin po odběru, aby byly dodrženy zásady správné laboratorní praxe.

1.Současný stav – teoretická část

1.1 Enzymatická kaskáda

Jedná se o systém koagulačních faktorů s kofaktory a inhibitory koagulace, fibrinolytický systém a jeho inhibitory, systém prekalikrain-kinonogenový a systém komplementu. V hemostáze mají největší význam první dva zmiňované. Systém komplementu má význam při aktivaci koagulace zánětem (Penka, Bulíková 2009). Podle teorie ze 60.let se koagulační kaskáda dělí na zevní a vnitřní systém a to podle způsobu aktivace (Schéma obou systémů je uvedeno na obrázku č. 1) (Matýšková 1999). Oba systémy se spojují při aktivaci FX na Xa a společně generují trombin. Vnější cesta aktivace nastává stykem s TF (tkáňový faktor) při poruše celistvosti cév a úniku krve do okolích tkání. TF/ FVIIa je komplex, který přímo dokáže aktivovat FX a FIX (Kasthuri et al. 2010). Vnitřní cesta aktivace nastává při kontaktu se subendoteliálními strukturami a většinou není porušena celistvost cév (Pecka 2004). V devadesátých letech bylo prokázáno, že primární je zevní cesta oproti vnitřní cestě a velký význam mají faktory kontaktu v aktivaci systému kalikreinu, kininu a komplementu (Penka, Tesařová 2011).



Obr. Č. 1: Schéma MacFarlaneova modelu hemokoagulace (upraveno dle www.wikipedia.org)

1.2 Hemostáza

Hemostáza je enzymatický proces, který vede k tvorbě krevní sraženiny v místě poranění. Proces je rozdělen do tří částí:

(a) primární hemostáza, která začíná okamžitě po endotelálním poškození a je charakterizována vazokonstrikcí, adhezí a agregací destiček, což vede k vytvoření bílé zátky

(b) sekundární hemostáza je definována jako vznik fibrinu prostřednictvím koagulační kaskády. Koagulační kaskáda je rozdělena do tří cest: vnitřní, vnější a společné cesty. Vnitřní cesta zahrnuje faktory kontaktní aktivace F XII, FXI, HMWK (vysokomolekulární kininogen), prekalikrein, FIX, FVIII. Vnější cesta zahrnuje tkáňový faktor (TF) a FVII, který aktivuje FX. Obě cesty se pak spojí ve společnou, která

zahrnuje FXa zprostředkovanou generaci trombinu z protrombinu a následné generování fibrinu z fibrinogenu.

(c) fibrinolýza je proces, při kterém dochází k rozložení fibrinové sraženiny. Centrálním enzymem je plazmin. Důležitým aktivátorem plazminu je plazminogen. Inhibitorem fibrinolýzy je PAI (inhibitor aktivátoru plazminogenu) a alfa2-antiplazmin. Nedostatky těchto inhibitorů mohou mít za následek zvýšení fibrinolýzy (van Herrewegen et al. 2012).

1.3 Koagulační faktory

Koagulační faktory tvoří plazmatický koagulační systém. Cílem tohoto systému je přeměna fibrinogenu na fibrin, který stabilizuje destičkový trombus a vytvoří s dalšími krevními buňkami definitivní trombus (Kubisz et al. 2006). Koagulační faktory se podílejí na zástavě krvácení, což je velmi komplexní děj (Penka, Tesařová et al. 2011). Mezi faktory, jež se tvoří v játrech, patří protrombin, fibrinogen a faktory VII, IX, XI, XII. Pro tyto faktory je nezbytný vitamin K (Mačák, Mačáková, Dvořáčková 2012). Ten je nutný pro karboxylaci gama karboxyglutamového zbytku, jinak není faktor schopný vazby na Ca^{2+} a fosfolipidy (Matýšková 1999). Koagulační faktory jsou glykoproteiny s charakterem proenzymů a kofaktorů. V plazmě se nachází v neaktivní formě a v procesu srážení prochází strukturálními změnami. Deficit, nízká hladina nebo nefunkčnost faktorů vede ke krvácivým projevům (Pecka 2004). Koagulační faktory F II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein jsou tzv. serinové proteázy. Mají aminokyselinu serin v aktivním místě enzymu, tj. obsahují katalytickou triádu-AK serin, histidin a kyselinu aspartamovou (Matýšková 1999).

Faktor I, fibrinogen

Fibrinogen je glycoprotein, jenž je syntetizován v játrech. Přeměna fibrinogenu na fibrin je katalyzována trombinem a hraje klíčovou roli ve formování a stabilizaci sraženiny (Franchini et al. 2012). Fibrinogen má tři vazebná místa na Ca^{2+} ionty. Pokud jsou všechna obsazena, fibrinogen je chráněn před štěpením plazminem. Vazba fibrinogenu s plazmatickými faktory ovlivňuje proces formace fibrinu a jeho

rozpuštění. Vrozené defekty v molekule fibrinogenu jsou příčinou vzniku onemocnění hypofibrinogenemie a dysfibrinogenemie (Matýšková 1999).

Faktor II, protrombin

Protrombin je krevní protein, který je zapotřebí při hemokoagulaci. Je také nazýván faktor II (Varga a Moll 2004). Skládá se ze 4 oblastí: fragment 1, fragment 2, a A a B řetězce α -trombinu. Je tvořen v játrech, jeho aktivní formou je trombin. Ten působí jak prokoagulačně, tak antikoagulačně (Matýšková 1999). Generace α -trombinu je dosaženo působením protrombinázy. Trombin je zapotřebí při přeměně fibrinogenu na fibrin, který je primárním cílem koagulační kaskády (Henriksen et al. 1998).

F III, tkáňový faktor, tromboplastin

Tkáňový faktor (TF) je transmembránový glykoprotein, který patří mezi cytokinové receptory. TF má 263 aminokyselin se třemi hlavními doménami:

- (1) extracelulární doména, která se váže k FVII / FVIIa a substrátům
- (2) transmembránové domény, které slouží jako membránové kotvy
- (3) terminální cytoplazmatická oblast

TF slouží jako primární iniciátor in vivo koagulace. TF / FVIIa aktivuje FIX a FX a vede k tvorbě trombinu a generaci fibrinu (Boles et al. 2010). Nachází se v organismu na buňkách, které se fyziologicky nedostanou do kontaktu s krví. K takovému kontaktu dochází pouze při porušení nebo poranění cévy (Penka, Tesařová et al. 2011).

Faktor IV (Ca^{2+})

V dnešní době už se nepoužívá název FIV. Vápenaté ionty zprostředkovávají vazby komplexů (protrombokináza, vnější tenáza) přes fosfolipidy přítomné v membráně krevních destiček. Jsou též důležité při stabilizaci vazeb na fibrinové síti (Kubisz et al 2006).

Faktor V, proakcelerin

Je homologní s FVIII. Komplex kofaktoru s Ca^{2+} a PL (fosfolipidy) zvyšuje rychlost aktivace faktorů. Nachází se v plazmě a alfa granulích trombocytů (Penka, Tesařová et al. 2011). Je částečně proteolyticky štěpen a je uložen vázáný na bílkovinně multimerin uvnitř těchto granulí. Faktor V hraje klíčovou roli jako kofaktor v protrombinázovém komplexu, který štěpí a aktivuje protrombin na trombin, což vede ke vzniku krevní sraženiny. Faktor V Leiden (FVL) je název konkrétní genové mutace, která může vést k vrozenému hyperkoagulačnímu stavu s vážnými klinickými důsledky. Nadměrná srážlivost, která se vyskytuje u této poruchy FV nejčastěji způsobuje hlubokou žilní trombózu (Pujol et al. 2012).

Faktor VI

Na počátku 40. let 20. století byl objeven faktor V a jeho aktivovaná forma, faktor VI. Aktivní forma faktoru V byla dříve označována jako aktivovaný faktor V, faktor Va.

Faktor VII, prokonvertin

Syntetizován v játrech, má krátký biologický poločas (4-5 hodin). Je přítomen i v séru (Matýšková 1999). Cirkuluje jako jednořetězový glykoprotein o 406 AK. FVII je proteolyticky štěpen na aktivní serinovou proteázu FVIIa (Penka 2004). V aktivním stavu tvoří komplex s TF na povrchu trombocytu (Versteeg et al 2001). Koagulační faktor VII (FVII), po aktivaci na faktor VIIa, tvoří v přítomnosti vápenatých iontů a tkáňového faktoru (TF) komplex zvaném vnější tenáza $[\text{VIIa.TF.Ca}^{2+}.\text{PI}]$, který katalyzuje přeměnu FIX na FIXa a FX na FXa.

Faktor VIII

Tento faktor je součástí vnitřního koagulačního systému. Spolu s F IXa, fosfolipidy a vápenatými ionty aktivuje FXa. Jedná se o glykoprotein tvořený v játrech, slezině, RES a ledvinách (Lenting et al.1998). V plazmě koluje navázán na von Willebrandův faktor (vWF), z vazby se uvolňuje kontaktem s fosfolipidy nebo

trombinem. Působením trombinu dochází ke štěpení FVIII. V koagulační kaskádě působí v komplexu zvaném tenáza. FVIII je v komplexu s vWF. Je před biologickým štěpením chráněn APC (aktivovaný protein C) a FXa (Penka, Tesařová et al. 2011).

Faktor IX

Skladba molekuly je homologní, má dlouhý biologický poločas, nalzáme jej i v séru (Matýšková 1999). Může být aktivován FXIa, nebo koagulačně aktivovaným komplexem [VIIa.TF.Ca²⁺.PI]. FIXa tvoří koagulačně aktivní komplex tzv.vnitřní tenázu, jež aktivuje FX na FXa (Pecka 2004).

Faktor X, Stuart-Prower

Je tvořen v játrech jako dvouřetězový glykoprotein, nachází se také v séru, biologický poločas je udáván okolo 40 hodin (Matýšková 1999). Aktivace FX na FXa probíhá za pomoci tenázy. K zástavě krvácení je třeba minimálně 20% jeho koagulační aktivity. FXa je součástí komplexu protrombinázy .Protein Z (PZ) slouží jako kofaktor pro inaktivaci FXa na fosfolipidovém povrch (Pecka 2004). PZ je jednořetězový glykoprotein, a je syntetizován v játrech, přičemž jeho biologický poločas v plazmě je 2,5 dne (Matýšková 1999).

Faktor XI, Rosenthalův faktor

Jedná se o dvouřetězový glykoprotein tvořený v játrech, biologický poločas je do 60 hodin (Matýšková 1999). Faktor XI je zymogen plazmové proteázy (FXIa), který napomáhá formaci fibrinu a stabilitě tím, že aktivuje faktor IX. Faktor XI má strukturální a mechanické vlastnosti, odlišné od ostatních koagulačních proteáz. Molekulové domény tvoří strukturu s vazebnými místy pro krevní destičky a vysokomolekulární kininogen (Gailani e .al. 2009).

Minimální hladina pro koagulaci je 15-20% aktivity (Pecka 2004). Aktivní forma FXI přispívá k hemostáze při aktivaci FIX (Emsley et al. 2010).

Faktor XII, Hagemanův faktor

Vyskytuje se v plazmě i v séru, biologický poločas je 50-70hodin. Zvýšená hladina je v těhotenství a po menopauze (Matýšková 1999). Je to glykoprotein, jenž je ve své neaktivní formě zymogen. Aktivací se z něj stává serinová proteáza, která je schopna aktivovat FXI a prekalikrein. Aktivace FXII je spouštěcím mechanismem tzv. vnitřní cesty v MacFarlaneově modelu koagulace. Má schopnost se sám aktivovat po kontaktu s negativně nabitými povrchy (kolagenová vlákna odkrytá při poškození cévy) (Renné and Gailani 2007).

V hemostáze nebyl považován FXII za důležitý, protože jeho nedostatek není spojen s krvácením. V současné době víme, že je naopak spojen s vyšším rizikem trombózy. FXII je vícedoménový protein, který obsahuje dvě fibronektinové sekvence, dvě epidermální oblasti růstového faktoru, na prolin bohatou doménu a katalytickou doménu, která při proteolýze přemění v plazmě serinové proteázy. Faktor XII je produkt z jednoho genu, chromozomu 5. FXII se skládá z lehkého a těžkého lehkého řetězce, které drží pohromadě pomocí disulfidových vazeb (Stavrou et al. 2010).

Faktor XIII, stabilizující fibrin

Nachází se v plazmě vázáný na molekulu fibrinogenu, v buněčných komponentách, v placentě a játrech. Trombocyty obsahují asi 50% celkové aktivity F XIIIa (Pecka 2004).

Faktor XIII (FXIII) je aktivován trombinem za vzniku aktivní transglutaminázy, FXIIIa podstatně mění vlastnosti fibrinu zavedením intramolekulární vzájemné vazby mezi fibrinovými vlákny. Nedostatek FXIII se projeví krvácením, opožděným hojením ran a spontánními potraty. (Fraser e .al. 2011).

Prekalikrein

Gama globulin tvořený v játrech, v plazmě cirkuluje navázaný na vysokomolekulární kininogen. Molekula je složena z jednoho těžkého a dvou lehkých řetězců (Matýšková 1999).

1.3.1 Kofaktory

Vysokomolekulární kininogen (HMWK)

Je to substrát a kofaktor plazmy kallikrein-kininového systému. HMWK je přítomen v plazmě, váže se na krevní destičky. Působí jako kofaktor při aktivaci FXII kalikreinem. Inhibuje vazbu trombinu na trombocytech, které slouží jako antitrombotické bílkoviny in vivo. HMWK inhibuje adhezi neutrofilů na krevních kompatibilních površích, a zvyšuje fibrinolýzu. Proenzym prekallikrein po aktivaci tvoří aktivní enzym plazmový kallikrein, který může štěpit HMWK na dva řetězce. K vazbě řetězců dochází na krevních destičkách nebo endoteliálních buňkách, kde je kallikrein aktivován (Pixley e .al. 2011)

Fibrinolytický systém

Fibrinolýza je přísně regulovaný proces, při kterém dochází k formaci trombu. Aktivace fibrinolytického systému vede k přeměně proenzymu plasminogenu na proteolytický enzym plazmin. Plazmin degraduje fibrinové tromby, což má za následek uvolnění různých degradačních produktů fibrinu, včetně D-dimeru. Plazminogenná aktivace je zprostředkována jedním ze dvou aktivátorů plasminogenu, tkáňovým aktivátorem plasminogenu (tPA), nebo urokinázou (uPA). tPA je syntetizován vaskulárními endoteliálními buňkami a makrofágy, může být prokázán téměř ve všech tkáních kromě jater (Krone et. al. 2010). Jednou z nejdůležitějších rolí, kterou fibrinolýza má, je modulace angiogeneze a remodelace cév. Důležitým inhibítorem fibrinolýzy je TAFI (trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy). Jde o proenzym, který po aktivaci odštěpuje ze substrátu C-terminální lysin. Ten má vazebná místa na fibrinových vláknech. Na ně se s vysokou afinitou váže molekuly tPa a plasminogenu. Dalším významným inhibítorem je PAI (inhibitor aktivátorů plasminogenu) (Penka, Bulíková 2009). Za fyziologických podmínek není v plazmě fibrinolytická aktivita běžnými testy prokazatelná (Pecka 2004).

1.3.2 Inhibitory hemostázy

Inhibitory v organismu slouží k zabránění nekontrolovaného srážení krve a k udržení koagulační rovnováhy. Jsou to přirozené složky krve. Rozdělit je můžeme podle původu, specifity a systému. Serpiny je skupina inhibitorů serinových proteáz,

kteře jsou důležitým regulačním faktorem v hemostáze. Nadměrné štěpení může mít závažné důsledky, a to většinou ve formě diseminované intravaskulární koagulace (DIC).

Antitrombin III

ATIII je glykoprotein o 424 aminokyselinách, tvořen v játrech. Jedná se o neúčinnější antikoagulant, který je schopen neutralizovat účinek trombinu a aktivovaného faktoru X (Pecka 2004). Není schopen vázat samotný FVIIa, je však také inhibítořem komplexu TF-FVIIa (Matýšková 1999). Bylo také prokázáno, že může působit jako heparin kofaktor, čímž se zvyšují jeho antikoagulační vlastnosti. Ve vztahu k tromboembolické nemoci hraje důležitou roli v rámci cévní koagulace, plicní embolie a hluboké žilní trombózy. Koncentrace antitrombinu III může být snížena v případě vrozeného deficitu proteinu, při heparinové léčbě, u podvýživy, a v pooperační fázi. Riziko pooperační žilní trombózy zdůrazňuje potřebu predikce a stanovení antitrombinu III. V současné době je vyšetřován jako potenciálně užitečný ukazatel rizika tromboembolie (Gray et al. 1981).

Heparinový kofaktor II, HCII

Je přítomen na cévním endotelu a je syntetizován endotelovými buňkami a játry. Jeho aktivita je namířena pouze proti trombinu (Pecka 2004). HCII inhibuje arteriální trombózy. Může chránit proti ateroskleróze a před některými druhy rakoviny (Verhamme 2012).

C1-inhibitor, C1INH

Je nejmocnějším inhibítořem faktorů kontaktu, zasahuje do systému komplementu, inhibuje plazmin. Syntetizuje se v játrech, byl zjištěn také v alfa granulích trombocytů (Penka, Tesařová et al. 2011).

Alfa2-antiplazmin

Je inhibítoř fibrinolýzy, který je také schopen inhibovat koagulační enzymy (Matýšková 1999).

Inhibitor aktivovaného PC

Je tvořen v játrech nezávisle na vitamínu K. Jeho účinek je 30x zvyšován heparinem (Matýšková 1999).

Alfa1-antitrypsin

Inhibuje FXa a je silným inhibitorem APC. Hlavní význam je v inhibici protáz slinivky břišní a bílých krvinek (Pecka 2004).

Nexin proteáz 1, PN-1

Byl identifikován jako faktor, který váže trombin na fibroblastech. Inhibice trombinu je potencována heparinem a dermatem sulfátem (Matýšková 1999).

Protein C

Glykoprotein, jehož vznik je závislý na vitamínu K, je tvořen v hepatocytech i v endotelu. Koncentrace stoupá s věkem. Protein C je zymogen, který se skládá ze dvou polypeptidových řetězců, má dlouhý biologický poločas (Matýšková 1999) a jeho aktivace probíhá na endotelu. Aktivuje ho trombin, společně s kofaktory, proteinem S a fosfolipidy. V aktivním stavu se jedná o serinová proteáza. Tento antikoagulant proteolyticky štěpí FVa a FVIIIa (Mosnier et al 2007). Protein C je fyziologický antikoagulační faktor a podílí se například na komplikacích sepse. U 40 % až 60 % pacientů s těžkou sepsí je hladina proteinu C nízká (Levi 2011).

Protein S, PS

Je uložen v endotelu a alfa granulích krevních destiček, 40 % je k nalezení volně v plazmě a zbytek je vázán s C4-bBP složkou komplementu. Protein S podporuje vazbu APC na fosfolipidy, přímo inhibuje protrombinázu a tenázu, inhibuje aktivitu TF (Penka, Tesařová). Je kofaktorem proteinu C a pomáhá mu štěpit FVa a FXIIa (Castoldi and Hackeng 2008). Protein S je K-dependední jednořetězový glykoprotein (Matýšková 1999).

C4b-vázající protein , C4-bBP

Je regulační protein cesty komplementu, vysokomolekulární protein složený ze 6-7 alfa řetězců. Protein S v komplementu zprostředkovává vazbu C4-bBP na povrch buněk. C4-bBP patří mezi proteiny akutní fáze (Pecka 2004).

Trombomodulin

Thrombomodulin (TM) je transmembránový glykoprotein, který blokuje interakci trombinu a prokoagulačních bílkovin substrátů. Působí jako vaskulární endoteliální buněčný receptor pro trombin, který aktivuje protein C. Aktivovaný protein C inaktivuje faktory Va a VIIIa a inhibuje trombin. Hraje důležitou roli u antikoagulačního stavu endotelu. Tkáňový faktor (TF) je zásadní kofaktor pro zahájení zevní koagulační cesty. Komplex TF s faktory VII a VIIa aktivuje faktory IX a X a takto aktivované faktory přispívají ke vzniku trombinu na povrchu buněk (Hvang et al. 2011).

EPCR, receptor pro protein C na endotelu

Transmembránový protein, homologní s HLA I.třídy, spolupůsobí v imunitní odpovědi. Zvyšuje aktivaci PC na endotelu a snižuje antikoagulační působení APC (Penka, Tesařová 1999).

TFPI, inhibitor zevní koagulační cesty, inhibitor tkáňového faktoru

Jeho největším zdrojem je endotel, in vitro je syntetizován játry, monocyty a plícemi. Patří mezi kuniny. TFPI je navázán na lipoproteiny. Hladina TFPI se zvyšuje po poranění, je vychytáván z plazmy játry a ledvinami. TFPI přímo inhibuje FXa, reakce je urychlována heparinem. Je důležitý při regulaci koagulace vyvolané tkáňovým faktorem. Chybění TFPI může způsobit rozvoj DIC (Matýšková 1999).

Alfa2-makroglobulin

Nespecifický inhibitor, který inhibuje jakoukoli proteázu. Je tvořen hepatocyty a makrofágy, nachází se v plazmě i extravaskulárně. Má schopnost inhibovat proteinázy všech tříd. Působí též jako imunologický regulátor (Penka, Tesařová 1999).

1.4 Úloha cévní stěny a trombocytů v koagulaci

Cévní stěna reaguje na poranění cévy vazokonstrikcí. Základní složkou subendotelu cévní stěny je kolagen, který plní úkol v adhezi a aktivaci trombocytů. Adenozinfosfát a tkáňový faktor jsou důležité v aktivaci trombocytů a hemokoagulaci. Trombocyty jsou součástí primární hemostázy. Podílejí se na tvorbě destičkového trombu a jejich povrch je zároveň místem interakce koagulačních faktorů, jsou zdrojem látek účastnících se hemostázy a její regulace a jsou přímo schopné aktivovat FIX a FXI. Adheze vede v průběhu koagulace k aktivaci trombocytů. Aktivované trombocyty jsou schopné agregace. Ta je zprostředkována fibrinogenem, který se váže na trombocytový receptor GP IIb/IIIa. Tato vazba je stabilní - jedná se o primární agregaci. Trombospondin stabilizuje vazbu mezi fibrinogenem a trombocyty, primární agregace přechází v sekundární agregaci. Konečným výsledkem je vznik „bílého“ destičkového trombu (Kubisz et al. 2006). Nemoci krevních destiček mohou být způsobeny změnou počtu trombocytů. Snížení počtu trombocytů se nazývá trombocytopenie, zvýšení počtu trombocytóza, eventuálně trombocytémie, a funkční nedostatečnost trombocytopenie. Současně může docházet ke změnám jak v počtu tak ve funkci. U trombocytopenií a trombocytopenií se mohou vyskytovat krvácivé projevy (Pecka 1996).

1.5 Koagulopatie

Koagulopatie jsou krvácivé stavy, kde je příčinou snížená koncentrace nebo aktivita plazmatických koagulačních faktorů. Rozlišujeme koagulopatie vrozené a získané (Pecka 2004). Koagulopatie se vyznačují typickým klinickým obrazem, spontánním krvácením do kůže a tkání a tvořením hematomů. (Navrátil et al. 2008).

Získané koagulopatie se objevují při nízké tvorbě faktorů nebo při imunokoagulopatiích. Mohou být také způsobeny nedostatkem vitamínu K nebo jeho inhibicí. Konsumpční koagulopatie je porucha srážení, charakterizovaná akutní nebo chronickou aktivací trombinu, tvorbou mikrosraženin a aktivací trombocytů, což je doprovázeno hyperfibrinolýzou (Silbernagl et al. 2012). Krvácivý stav nastává také při otráveních jedy (kumarinovými preparáty) a u předávkování antikoagulanty (dikumariny)

(Navrátil et al. 2008). Snížení tvorby koagulačních faktorů se objevuje zejména u onemocnění jater, při antikoagulační léčbě (Hrubiško et al. 1983).

Vrozené defekty koagulačních faktorů jsou většinou vzácné a jedná se převážně o defekt jen jednoho faktoru. Mezi nejčastější koagulopatie patří hemofilie A a B (Pecka 2004). Hemofilie A je způsobena nedostatkem FVIII a hemofilie B nedostatkem FIX. Jde o dědičné choroby s recesivním typem dědičnosti, vázané na chromozóm X, postihuje tedy jedince mužského pohlaví (Hule et al. 1969).

Význačné místo zaujímá von Willebrandova choroba, je charakterizována nedostatkem von Willebrandova faktoru (součást komplexu faktoru VIII). Při snížené aktivitě FVIIIc je porušena sekundární plazmatická srážlivost a narušená funkce adheze trombocytů (Karges Wolfram, Al Dahouk Sascha 2011). Onemocnění je dědičně přenosné (Hrubiško, Hule 1970).

1.6 Koagulační vyšetření

Základní koagulační vyšetření umožní zjistit, zda se jedná o poruchu vnitřní či vnější koagulační kaskády. Definitivní diagnóza se provádí specializovanými testy, které umožňují stanovení hladiny jednotlivých koagulačních faktorů. Zjišťuje se také defekt adheze a agregace trombocytů, případně povrchových destičkových antigenů a obsahu sekretorických granulí.

Screeningové testy, jako např. protrombinový čas (PT), aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) a fibrinogen jsou důležité pro posouzení základní hemostázy. Měření PT, aPTT a fibrinogenu se provádí pomocí citrátové plazmy, jsou to nejčastěji používané laboratorní testy u pacientů s podezřením na koagulopatii. Protrombinový čas (PT) slouží k detekci poruchy zahrnující aktivitu faktorů I, II, V, VII, X a k monitorování léčby. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) slouží k detekci vnitřní cesty srážení (FXII, XI, IX, VIII) a k monitorování antikoagulačního účinku heparinu (Casella et al. 2009). PT a aPTT nedávají žádné informace o in vivo interakci destiček s koagulačními faktory (Tanaka et al. 2009).

Laboratorní metody používané k diagnostice poruch hemostázy lze rozdělit podle principu stanovení metody na koagulační, nefelometrické, turbidimetrické, fotometrické a imunologické (Matýšková 1999). Laboratorní vyšetření je možné

rozdělit i schématicky na základní koagulační vyšetření, koagulační testy při krvácení, specifické vyšetření složek hemostázy a pomocná vyšetření jež nesouvisí s hemostázou (Navrátil 2008).

Koagulační testy

Základem koagulačních testů je stanovení času k vytvoření fibrinového vlákna, měřeného od přidání startovací regencie k testovanému vzorku. Časy se porovnávají s časem kontrolní plazmy (Pecka 2004) Typy koagulačního stanovení jsou manuální a přístrojové. Principem manuálního stanovení je detekce prvního fibrinového vlákna pomocí háčku ve vodní lázni (37st. C). Nyní se používají optické koagulometry, elektricko- mechanické a háčkové nebo kuličkové koagulometry (Pecka et al. 2010).

Nefelometrické , turbidimetrické testy

Jsou to fotooptické, zákalové metody, kdy sledujeme množství odraženého světla na koloidních částicích .U turbidimetrických metod se zjišťuje průchod světla vzorkem. U nefelometrie intenzita rozptýleného záření ve směru kolmém na dopadající paprsek (Matýšková 1999).

Fotometrické metody

Základem je stanovení intenzity zbarvení v důsledku štěpení specifického chromogenního substrátu. Měření se provádí při vhodné vlnové délce (Matýšková 1999). Používají se k posouzení koagulační aktivity serinových proteáz a inhibitorů koagulačního systému. Problémem u toho vyšetření může být chylózní plazma (Pecka et al. 2010)

Imunologické metody

Jsou založeny na reakci antigen-protilátka. Požívají se metody: ELISA, EID, LIA, RIA, latex-aglutinační testy, hemaglutinační testy (Matýšková 1999). V případě metody ELISA se zjišťuje množství látky pomocí antigenu, nezjišťuje se její funkčnost. U metody LIA (světelná nebo laserová imunoanalýza) se množství látky se zjišťuje

pomocí detekce antigenu. Jde o metodu kvantitativní. Aglutinační testy jsou metody semikvantitativní (Pecka et al. 2010).

1.6.1 Testy používané v hemostáze

Globální testy

Globální testy popisují celý srážecí process, nicméně v poslední době jsou nahrazovány testy skupinovými (Matýšková 1999).

Mezi tyto testy patří například doba srážlivosti nativní krve (LEE-WHITE), doba krvácení, test konzumpce protrombinu, retrakce koagula, thromboelastografické vyšetření, fibrinolýza plné krve, nebo euglobulinová lýza.

- Doba srážlivosti nativní krve (LEE-WHITE): Měří se čas od odběru až po sražení krve, ve vodní lázni při 37st. C.
- Krvácení, doba krvácivosti: Orientační metoda, která informuje zejména o funkci trombocytů.
- Rezistence krevních kapilár: Zjišťují odolnost stěny vlásečnic při zvýšeném tlaku uvnitř cév.
- Test konzumpce protrombinu: Dvoufázová metoda, hodnotí schopnost měnit protrombin na trombin.
- Trombin generační test: Test, který posuzuje tvorbu trombinu v čase.
- Tromboelastografické vyšetření: Hodnotí kvalitativní a kvantitativní údaje charakteristické pro vytvoření krevní sraženiny a kinetiku jejího růstu. Sleduje její stabilitu, pevnost a schopnost retrakce.
- Fibrinolýza: Tento test udává celkovou schopnost fibrinolytického systému.
- Euglobulinová lýza: Poskytuje orientační informaci o lytické aktivitě euglobulinové frakce (Pecka et al. 2010)

Skupinové testy

- PT-protrombinový čas: Základním skupinovým testem je tromboplastinový test-protrombinový čas (PT). Monitoruje zevní koagulační systém (Matýšková 1999). PT představuje čas v sekundách, potřebný k vytvoření sraženiny po

přidání tromboplastinu a Ca^{2+} iontů do citrátové plazmy (Herrewegen et al. 2012). Výsledky se vyjadřují v sekundách s udáním času denního normálu, nebo jako poměr časů $R = \text{čas testované plazmy} / \text{čas normálu}$, v % normální koagulační aktivity. Lze také vypočítat INR (mezinárodní normalizovaný poměr), který je vypočítán za použití mezinárodního indexu citlivosti (ISI), který je charakteristický pro použité tromboplastiny, a střední hodnoty protrombinového času. ISI je mezinárodní index citlivosti a vyjadřuje citlivost používaného tromboplastinu stanovenou oproti mezinárodnímu tromboplastinu. Dnes se uvádí výrobcem reagentů (Matýšková 1999). U pacientů užívajících perorální antikoagulační léky je léčba sledována stanovením protrombinového času (PT) a výsledek se udává v INR (international normalised ratio – mezinárodní normalizovaný poměr). Světová zdravotnická organizace (WHO) již na počátku 80. let doporučila používat jako jednotky pro měření koagulace INR namísto jednotek Quickova času. Hodnota INR se vypočítá z protrombinového času a mezinárodního indexu citlivosti (ISI) tromboplastinu, který daná laboratoř používá. Účelem je vyrovnat rozdíly v různě používaných tromboplastinech a analyzátorech, jež jsou používány v různých laboratořích. Pacient tak může dostat stejné výsledky bez ohledu na to, kde se krevní test prováděl (de Miguel D et al. 2003)

- Aktivovaný parciální tromboplastinový čas aPT: Jedná se o test, který monitoruje vnitřní koagulační systém (Matýšková 1999). Princip testu spočívá v přidání parciálního tromboplastinového činidla k citrátové plazmě. K němu se poté se přidá roztok chloridu vápenatého a měří se čas potřebný k vytvoření první sraženiny (Herrewegen et al. 2012). Výsledky se udávají v sekundách s udáním denního normálu a jako poměr časů $R = \text{čas testované plazmy} / \text{čas normálu}$ (Matýšková 1999). aPTT je laboratorní test běžně používaný k monitorování léčby heparinem (Boroumand et al. 2010). Fyziologicky prodloužený čas nacházíme u novorozenců (Matýšková 1999).
- Trombinový test (TT) - zkoumá třetí fázi koagulace, tj. štěpení fibrinogenu trombinem. Přidáním enzymu trombinu k testované plazmě dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin. Výsledky se vyjadřují v sekundách, normální hodnoty jsou 12-16 s. (Penka et al. 2009)

- Reptilázový test: Jedná se o modifikaci trombinového testu, monitoruje štěpení fibrinogenu. Jako reagent se používá reptiláza (hadí jed), která vykazuje aktivitu podobnou trombinu (odštěpuje z fibrinogenu pouze fibrinopeptidy A za vzniku modifikované formy fibrinu). Test není ovlivněn přítomností heparinu ve vyšetřované plazmě. Výsledky se vyjadřují nejčastěji v sekundách nebo jako poměr časů testované plazmy a plazmy normálu (R). K prodloužení časů testu dochází nejčastěji u kvalitativních a kvantitativních poruch fibrinogenu, poruchy polymerizace fibrinu, nebo při zvýšené hladině fibrin/fibrinogen degradačních produktů. (Penka et al. 2009).

Specifické testy

Mezi tyto testy řadí stanovení funkční aktivity složek koagulačního a fibrinolytického systému, a fibrinogenu. Testy jsou jednofázové, nebo za pomoci substrátů (metody přímé a nepřímé detekce).

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo porovnat naměřené hodnoty základního koagulačního vyšetření (PT, aPTT) ze stejného vzorku krve ve třech různých laboratořích, na třech různých koagulometrech v týž den, do 4 hodin po odběru.

2.2 Hypotézy

Hypotéza předpokládá, že naměřené hodnoty budou vykazovat minimální rozdíly.

3. Materiály a metody

Vzorky, které byly použity pro tuto práci byly získány v laboratoři Synlab czech s.r.o. Do této laboratoře jsou sváženy svozovou službou od terénních lékařů. Bylo náhodně vybráno 50 patientských vzorků. Do souboru byli zařazeni pacienti bez ohledu na možnou léčbu. Důvodem je, že tato léčba není na žádance vždy uvedena (ač by uvedena být měla). V souboru jsou tak pacienti sledovaní pro některý druh antikoagulační léčby, tak i zdravé osoby (předoperační vyšetření). Tyto vzorky jsem týž den a do 4 hodin po odběru nejprve změřila v laboratoři Synlab czech s .r .o. pak v laboratoři Stafila s. r. o. a poté v laboratoři Medipont s. r. o. U všech vzorků byl změřen protrombinový čas (PT) a aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT).

3.1 Preanalytická část

Obsahuje soubor postupů a činností, kterými projde vzorek od okamžiku odběru, do okamžiku zpracování vzorku. Zahrnuje mimo jiné přípravu pacienta před odběrem, vlastní odběr s identifikací pacienta, uložení a transport materiálu do laboratoře.

Na krevní vzorky pro biologickou analýzu se nejčastěji používají zkumavky ze skla nebo plastu. Ty musí splňovat přísná kritéria pro dobu použitelnosti a podmínky uchovávání. Obsah zkumavky závisí na typu analýzy. Pro koagulační vyšetření obsahují antikoagulační činidlo. Antikoagulačním činidlem může být heparin, EDTA (ethylendiamin tetraacetic acid) nebo citrát. V hemostáze je to nejčastěji citrát sodný 0,109 – 0,129 M. Je nutné dodržet správný poměr odebírané krve a citrátu, je to poměr 1:9. Vzorky by neměly obsahovat tkáňové fragmenty, které mohou ovlivnit výsledky testů (PT, aPTT). Některé zkumavky pro hemostázu mají proti destičkové přípravky. Koagulační testy jsou citlivé na nedodržení správného postupu v preanalytické fázi (Schved et al. 2002).

Přesná standardizace v preanalytické a analytické fázi je rozhodující pro dosažení správnosti a přesnosti výsledků .Velký vliv na výsledek má nedodržení

přesného poměru krve ve zkumavce a nepromíchání krve (Lippi et al. 2004). Vzorky s viditelnou hemolýzou by neměly být používány u testů jako je aPTT a PT (Laga et al. 2006).

Důležitou součástí preanalytické fáze u testů hemostázy je centrifugace. Nejčastěji centrifugujeme při 2500g po dobu 15 minut. Při vysoké rychlosti 11000g po dobu 2 minut se výsledky PT, aPTT nemění. (Boudaoud et al. 2006).

Nejúčinnější způsob, jak se vyhnout chybám, je mít zavedený kompletní systém řízení kvality v ISO 15189 (Lai et al. 2012). Preanalytické postupy zahrnují náležitosti pro odběr primárních vzorků, sledování primárních vzorků, identifikaci jednotlivce, sledování vzorků během dopravy (Lai et al. 2012).

Výsledky koagulačního vyšetření může ovlivnit řada fyziologických i nefyziologických faktorů, které se mohou vyskytnout při manipulaci s biologickým materiálem. Pacient má být proto relaxován a v klidu. Je-li pacient rozrušený, je nutné ho nechat alespoň 15 minut v klidu, než začneme s odběrem. Proto je důležité poskytnout pacientovi klidné, příjemné prostředí, které zajistí, že pacient je před odběrem vzorku uvolněný.

Vlivy, které mohou mít vliv na výsledek vyšetření, jsou různé - pohlaví, věk, váha, složení stravy, léky, choroby, fyzický a psychický stres, nebo například vliv psychotropních látek (káva, drogy). Výsledek koagulace mohou ovlivnit též některé léky. Například: kyselina valproová snižuje hladinu fibrinogenu, a faktoru VIII, v případě asparaginasy klesají hodnoty fibrinogenu, AT III, proteinu C a proteinu S, antibiotika zase působí proti vstřebávání vitamínu K tím, že likvidují střevní bakterie. Výsledek koagulačních testů a tím i jejich spolehlivost závisí i na technice odběru. Při příliš dlouhém zaškrcení paže se uvolňují aktivátory fibrinolýzy a tím se zvyšuje fibrinolytická aktivita krve. Dlouhý odběr krve, tenké kanyly nebo prudké vypuštění krve vedou ke vzniku stop trombinu a tím k aktivaci koagulačních faktorů. Při intenzivnější tvorbě fibrinu je pak známa in vitro spotřeba fibrinogenu, koagulačních faktorů a trombocytů. Toto může být považováno za spotřební koagulopatii. Hirudin a ostatní přímé trombinové inhibitory prodlužují protrombinový čas. U vzorků od

pacientů s hematokritem větším než 55% se doporučuje nastavení antikoagulačního poměru dle výpočtu: $C = 1,85 \cdot 10^{-3} \times (100 - Hct) \times V$; kde: C = objem roztoku citrátu (ml); V = objem krve v odběrové zkumavce (ml); Hct = hematokrit pacienta (%). Vysoký hematokrit může způsobit falešně delší výsledky testů. Po odběru je nutné vzorek promíchat a pak provést transport do laboratoře. Transport vzorku musí být proveden co nejrychleji. Stabilita vzorku citrátové krve při transportu při +18 až + 25 °C je dle typu vyšetření 4-6 hodin.

Při příjmu do laboratoře se provede přezkoumání vzorku (ověření shodnosti a úplnost identifikačních údajů, správnost odběru), zápis do LIS (Laboratorní Informační Systém) a označení vzorků čárovým identifikačním kódem.

Po příjmu a identifikaci materiálu se provede centrifugace citrátové krve (cca 2500g po dobu 15min).

3.2 Analytická část

Analytická fáze začíná vložení vzorku do analyzátoru. Každá laboratoř má své vlastní standardní operační postupy (SOP). Obsahují jak postupovat při přípravě diagnostických reagensů, zhotovení kalibrací, provedení kontrol a vlastní provedení měření.

Kontrola kvality v oblasti laboratorní medicíny se vztahuje na všechny postupy běžně používané v laboratořích pro sledování rutinního testování. Cílem je zjistit případné chyby a opravit je dříve, než jsou vydány výsledky. Zejména vnitřní kontroly kvality (IQC) a externí hodnocení kvality (EHK) jsou programy, které slouží k hodnocení a zlepšování kvality v laboratorní medicíně. (Plebání 2008).

3.3 Postanalytická fáze

Patří sem systém komunikace mezi indikujícím lékařem a laboratoří. Funguje na způsobu svozové služby, jež dopravuje výsledky vyšetření zpět lékařům v tištěné

podobě, probíhá i elektronický přenos výsledků, konzultace a telefonické hlášení patologických hodnot.

3.4 Principy analyzátorů použitých v této práci

Vyšetření byla provedena na těchto přístrojích s rozdílným principem a způsobem měření:

Sysmex CA 1500, Siemens (Synlab s. r. o.)

Princip: Sysmex CA 1500 je plně automatický koagulační analyzátor. Pracuje na fotometrickém principu měření. Jako světelný zdroj slouží halogenová lampa, která emituje bílé světlo. Měří se při vlnové délce 405 nm. Motor točí s filtry tak, že podle zvoleného testu se v dráze lampy nachází příslušný filtr. Filtrované světlo se dostává přes čtyři světelné vodiče ke kyvetám v měřících polohách. Kyvety a jejich obsah světlo rozptylují. Jestliže se v kyvetě uskuteční koagulační reakce, změní se světelná propustnost (transmise) obsahu kyvety. Jako důkazová reakce slouží při této metodě přeměna fibrinogenu na fibrin. Náhlou tvorbou koagula se prudce redukuje transmise světla. Měříme čas srážení- tj. dobu od přidání startovací reagentie po začátek srážení.

Koagulometricky stanovujeme: aPTT, PT

Používané reagentie:

- Thromborel S 10 x 10ml, Siemens healthcare diagnostics
- Dade Actin FS Activated PTT Reagent 10 x 10 ml, Siemens healthcare diagnostics
- Calcium chloride (CaCl₂) Solution (0,025 mol/l), Siemens healthcare diagnostics
- CA CLEAN II, Siemens healthcare diagnostics
- Controlplazma N, Siemens healthcare diagnostics
- Ci-Trol 2 P, Siemens healthcare diagnostics
- PT-Multicalibrator, Siemens healthcare diagnostics

Detaily o přístroji jsou uvedeny v přílohách.

ACL Elite PRO, Comesa (Stafila s.r.o.)

Princip: ACL Elite PRO používá nefelometrie k detekci krevních sraženin. Analyzátor měří množství světla rozptýleného ve vzorku v úhlu 90°. V chromogenním kanálu je zdrojem světla halogenová lampa, ze které záření směřuje do reakční kyvety v rotoru pomocí křemenného optického vlákna a zaostřovacího systému. Volba vlnové délky pro analýzu se provádí pomocí úzkopásmového filtru se středem v 405 nm.

Používané reagensy:

- HemosIL RecombiPlasTin 2G, výrobce Instrumentation Laboratory
- HemosIL aPTT SP(Liquid), výrobce Instrumentation Laboratory,
- Chlorid vápenatý, výrobce Instrumentation Laboratory,
- Clean; 0,1 N HCl, čisticí roztok, výrobce Instrumentation Laboratory
- Wash-R emulze - 1000 ml, výrobce Instrumentation Laboratory
- Kalibrační plazma, výrobce Instrumentation Laboratory

Detaily o přístroji jsou uvedeny v přílohách.

START 4, Stago (Medipont s.r.o.)

Princip: Určení vzniku koagula je založeno na stanovení změny velikosti rozkyvu kuličky. To je snímáno indukčním senzorem. Dráha kuličky je v kyvetě vymezena zakřivením dna kyvety. Kývavého pohybu kuličky je dosaženo pomocí elektromagnetického pole tvořeného dvěma nezávislými cívkami. Intenzita magnetického pole se může měnit v závislosti na testu, který bude prováděn (PT, aPTT). Tento pohyb je vyhodnocován algoritmem, který vypočte příslušnou hodnotu koagulačního času. Pro měření PT a aPTT musí být reagentie i plazma vytemperovány na 37°C (Uživatelská příručka 1998).

Používané reagentie: K měření se používá sada činidel Néoplastine CI Plus obsahující

- Néoplastine CI Plus – činidlo 1, lyofilizovaný tromboplastin
- Rozpouštědlo – činidlo 2, obsahuje vápník
- PTT automate – lyofilizované činidlo, obsahuje kefalin (náhrada krevních destiček)
- Unicalibrátor – kalibrační plazma
- Coag control N + P – normální a abnormální kontroly

Detaily o přístroji jsou uvedeny v přílohách.

3.5 Měření kontrol

V každé dané laboratoři v rámci správné laboratorní praxe se před spuštěním analýzy patientských vzorků měří denní kontroly. Kontrola normální, která je ve fyziologických mezích a kontrola patologická, která je mimo toto rozmezí. Správné výsledky kontrol nám dávají ujištění, že ten který analyzátor měří správně. Všechny změřené kontroly jsou vytištěny a zaarchivovány. Laboratoře se také účastní externího hodnocení kvality (EHK). SEKK (Systém externí kontroly kvality), jakožto akreditovaný poskytovatel EHK, provádí tuto činnost v souladu s požadavky normy ISO 17043. EHK probíhá formou tzv. cyklů. Každý cyklus EHK spočívá v tom, že účastníkům cyklu jsou rozeslány neznámé vzorky a po účastnících je požadováno, aby v těchto vzorcích provedli určitá měření, zkoumání nebo testy a jejich výsledky spolu s dalšími doplňujícími informacemi zaslali SEKKu (SEKK – mezilaboratorní hodnocení na území České republiky).

3.5.1 Vnitřní kontrola kvality

Jedná se o systém, který má zvýšit pravděpodobnost, že výsledky vydané laboratoří jsou validní a použitelné pro lékaře při léčbě i diagnostice pacienta. Cílem vnitřní kontroly kvality je minimalizovat a odhalit chyby. Účelem je získání výsledku, jež má mít přibližnou hodnotu pravdivé hodnoty, aby byl splněn zamýšlený účel (Pecka 2010).

Validace

Základním aspektem je, že metoda splňuje potřeby uživatelů laboratorních služeb (klinický aspekt). U metod s CE značkou to dokládá výrobce. Dalším aspektem je validace vlastního analytického postupu (základní znaky analytické metody). Hlavním cílem validace je hodnocení analytických a výkonnostních znaků metod a průkaz, že bylo dosaženo požadované úrovně těchto znaků. V laboratorní medicíně to znamená, že výsledky měření jsou efektivním nástrojem diagnostiky, terapie a prevence. Validace metod je v klinických laboratořích vyžadována normami řízení kvality (ISO 17025, ISO 15189) (Fridecký 2004)

Validace je potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Validace potvrzuje, že měřicí postup/měřicí systém/výrobek IVD MD (In vitro diagnostic – medical device) je schopen plnit požadavky na ně kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací. (Fridecký 2004)

Verifikace

Účelem laboratorní verifikace metod je potvrzení, že získané hodnoty analytických a výkonnostních znaků jsou ve shodě s hodnotami deklarovanými výrobcem a že jich lze v konkrétní laboratoři docílit za běžných podmínek rutinní činnosti. Předmětem verifikace je schopnost realizovat měřicí proces v konkrétní

laboratoři v daném čase a prostoru. Rozhodujícím výstupem verifikace by měla být seriózně odhadnutá hodnota nejistoty měření(Fridecký 2004).

3.5.2 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr AM se vypočítá jako podíl součtu všech naměřených hodnot ku počtu měření.

3.5.3 Směrodatná odchylka

Vypovídá o tom, jak moc se od sebe navzájem liší výsledky v souboru zkoumaných čísel. Je-li malá, jsou si soubory většinou navzájem podobné. Naopak velká směrodatná odchylka signalizuje velkou vzájemnou odlišnost. Směrodatná odchylka je nejužívanější míra variability.

3.5.4 Dosažená hladina významnosti

Dosažená hladina významnosti (p) - pravděpodobnost obdržených dat odporujících nulové hypotéze, za předpokladu, že je nulová hypotéza pravdivá. Je-li p hodnota menší než 5%, pak výsledek je statisticky významný, je-li p hodnota menší než 1% mluvíme o vysoké statistické významnosti.

Obvyklá praxe pokládá statisticky významný výsledek za skutečný efekt a v důsledku toho za klinicky důležitý a naopak. Toto však nemusí být oprávněné. Někdy může být rozdíl statisticky významný, ale klinicky nevýznamný a naopak.

3.5.5 Rozptyl

Vyjadřuje velikost rozptýlení hodnot kolem její střední hodnoty

4. Výsledky

4.1 Výpočet výsledků

U protrombinového času (PT) se hodnoty uvádějí v sekundách s udáním času denního normálu, v hodnotách Ratio (R), což je poměr času testované plazmy a čas normálu a jako hodnota INR což je mezinárodní normalizovaný poměr a jeho hodnota se spočte jako: $INR = R^{ISI}$. ISI je mezinárodní index citlivosti a vyjadřuje citlivost daného tromboplastinu vůči mezinárodnímu standardnímu tromboplastinu. Hodnota ISI musí být určena pro každou šarži tromboplastinu a v dnešní době je vždy uváděna výrobcem reagentie. aPTT vyjadřujeme v sekundách a jako R, což je poměr času testované plazmy a času normálu (Penka et al. 2003).

U reagentií použitých v laboratoři Synlab s.r.o. je rozmezí na výsledkovém listě následující: INR: 0,8-1,2 , aPTT : 22-28sec. ISI použitého tromboplastinu 1,06 a denní normál N = 10,9 sec., u aPTT N=26,4sec.

V laboratoři Stafila s.r.o. je rozmezí na výsledkovém listě následující: INR 0,8-1,2, aPTT 24-35sec. ISI použitého tromboplastinu 0,97 a denní normál N=11,9, u aPTT N=28,4sec.

V laboratoři Medipont s.r.o. je rozmezí na výsledkovém listě následující: INR: 0,8-1,2, aPTT= 28-36, ISI použitého tromboplastinu 1,29, a denní normál N=13,5, aPTT N= 32,0sec.

4.2 Výsledky

V tabulce uvádím naměřené hodnoty 50-ti náhodně vybraných vzorků na třech různých koagulometrech. Každý vzorek byl změřen do 4 hodin od odběru.

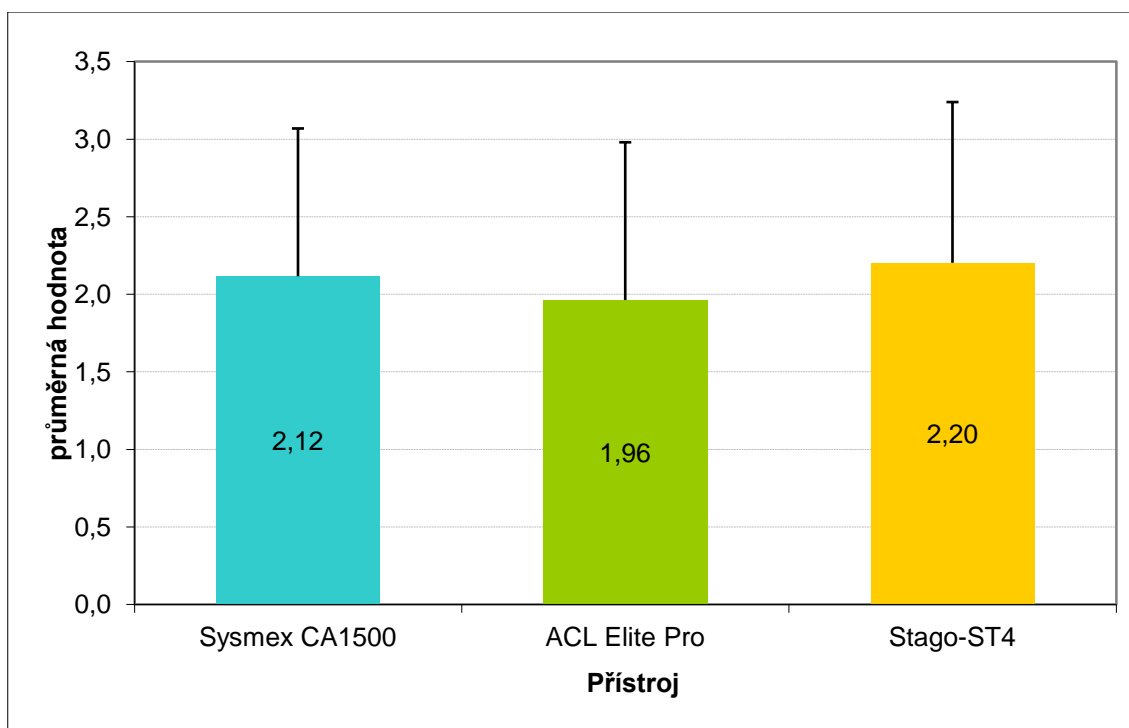
Tabulka 1: Naměřené hodnoty protrombinového času (PT) a aPTT

vzorek	Sysmex CA1500 Quick			ACL Elite Pro			Stago-ST4		
	Sec.	INR	APTT	Sec.	INR	APTT	Sec.	INR	APT T
1	26	1,17	46,9	25,2	2,19	39,1	23,4	1,97	59,6
2	10,3	0,94	23	9,2	0,79	32,1	10,8	0,88	38,6
3	21,3	2,02	35,5	20,6	1,79	30,7	20,8	1,75	40,5
4	14,4	1,34	37,7	12,8	1,11	34,6	14,2	1,26	44,6
5	30,7	2,98	41,1	32,9	2,87	36,8	26	2,78	50,7
6	24,1	2,31	43,5	23,7	2,06	34,1	23,7	2,47	46,3
7	18,2	1,71	27,9	16,7	1,45	25,5	18,5	1,78	33,7
8	25,1	2,46	36,3	26,4	2,3	34	25,2	2,67	43,5
9	31,7	3,08	44,2	32,1	2,8	31,6	28,7	3,17	45,7
10	34,1	3,33	49,1	36,8	3,21	40,2	31,3	3,55	55,2
11	28,9	2,79	41,4	26,4	2,3	35,1	26,9	2,91	49,5
12	13,9	1,29	30,8	13	1,12	34,5	14,6	1,31	47,2
13	20,6	1,95	35,5	18,7	1,62	28,5	20	1,97	42
14	11,7	1,07	29,9	10,8	0,93	32,3	12,1	1,02	38,7
15	11,2	1,02	27,2	10,8	0,93	28,5	12,1	1,02	35,4
16	11,3	1,03	25,1	10,7	0,92	23,6	12,6	1,08	30,2
17	30,7	2,98	46,3	31,4	2,73	47,5	29,7	3,31	61,4
18	30,9	3	39,1	30,7	2,67	41,8	28,7	3,17	52,3
19	49,8	4,97	53,7	59,5	5,21	57,6	43,9	5,53	68,2
20	23,7	2,27	32,4	23,2	2,01	37,4	23,1	2,38	47
21	17,4	1,63	34,3	14,8	1,28	29,1	16,9	1,58	46,1
22	23,1	2,2	38,8	28,7	2,5	36,2	21,7	2,2	50,2
23	17,9	1,68	28,7	17,6	1,52	25	18,3	1,76	38,6
24	31,4	3,05	38,3	35,5	3,1	33,7	30,5	3,43	50,5
25	10,9	1	24,2	10,6	0,91	25,1	12,9	1,11	34,6
26	25,3	2,43	35,9	24,8	2,15	33,4	24,2	2,53	49,1
27	18,3	1,72	33,1	15,5	1,34	37,6	21,6	2,18	40,3
28	11,9	1,09	28,7	10,9	0,94	32,8	11,8	0,99	34,6
29	47,5	4,73	50,7	58,8	5,15	43	42,4	5,28	73,7
30	12,1	1,11	32,2	11,9	1,03	35,5	13,6	1,19	44,9
31	24,4	2,34	40,9	23,6	2,05	36,1	23,3	2,41	48,5
32	18,6	1,75	33,7	16,9	1,46	32,9	19,4	1,9	41,9
33	21,6	2,05	32,7	20,9	1,81	30,6	21,5	2,17	39

34	23,6	2,26	42,8	22,4	1,94	37,4	23,1	2,38	52,7
35	27,7	2,67	39,5	28	2,43	33	27	2,92	44,9
36	23,7	2,27	42,3	25,7	2,23	33,9	23,4	2,42	43,7
37	12	1,1	26,1	12,2	1,05	29,4	12,7	1,09	37,3
38	12	1,1	28,1	10,7	0,92	27,4	13,6	1,19	36,1
39	11,7	1,07	30,7	10,4	0,9	27,5	13,1	1,13	38,5
40	11,5	1,05	27,8	10,3	0,89	26,1	12,9	1,11	35,7
41	18,8	1,77	37,8	16,6	1,44	30,7	18,4	1,77	47,2
42	12,1	1,11	29,9	11,4	0,98	32,4	12,3	1,04	39,6
43	29,1	2,82	42,3	29,3	2,55	36,9	27	2,92	50,7
44	33,7	3,29	46,6	31,7	2,76	47,5	29,8	3,33	63,1
45	28,4	2,74	39,2	26	2,26	37,7	21,5	2,17	52,7
46	32,7	3,19	38,3	31,4	2,73	38,3	27,4	2,98	49,1
47	12,4	1,14	28,8	11,9	1,03	27,1	14	1,24	37,8
48	26,5	2,55	36,5	24,9	2,16	35,8	23,4	2,42	47,2
49	19,1	1,8	35,2	17,1	1,48	25,5	18,3	1,76	50,8
50	34,1	3,33	33,9	47	4,1	34,6	31	3,51	35,9

Tabulka 2: Průměr, rozptyl a směrodatná odchylka u INR

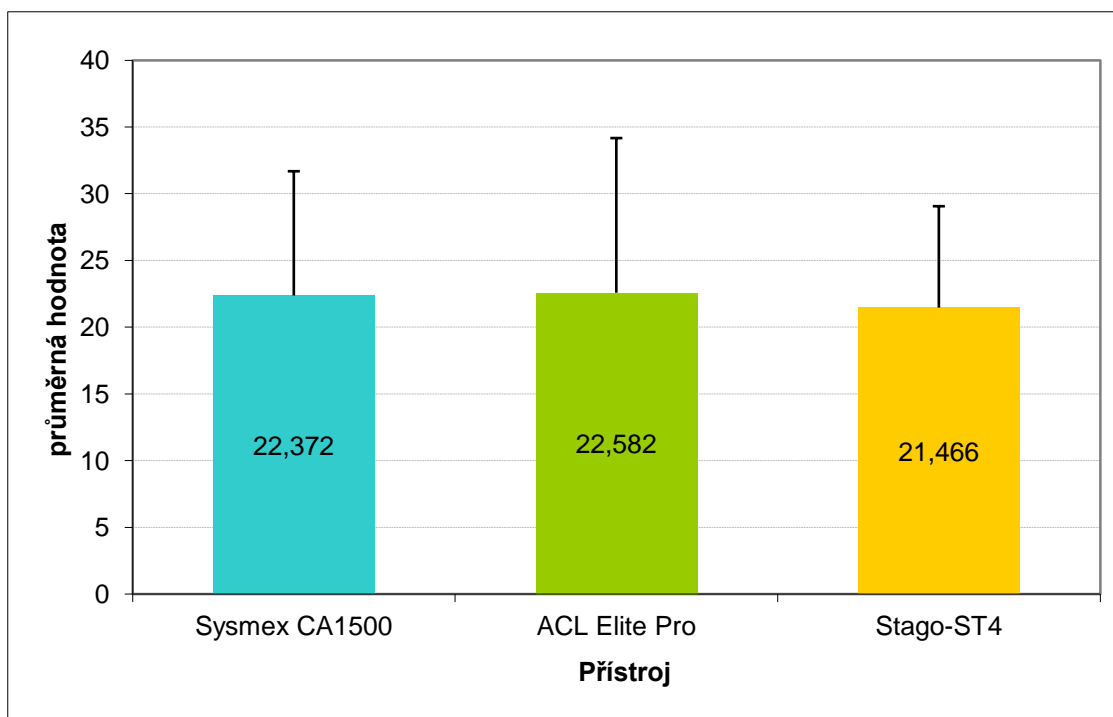
Přístroj	Počet	Průměr	Rozptyl	Sm. odchylka
Sysmex CA1500	50	2,12	0,91	0,95
ACL Elite Pro	50	1,96	1,03	1,02
Stago-ST4	50	2,20	1,07	1,04



Obr. č. 2: Průměr naměřených hodnot INR v závislosti na koagulačním přístroji

Tabulka č. 3: Aritmetický průměr, rozptyl a směrodatná odchylka u měření PT

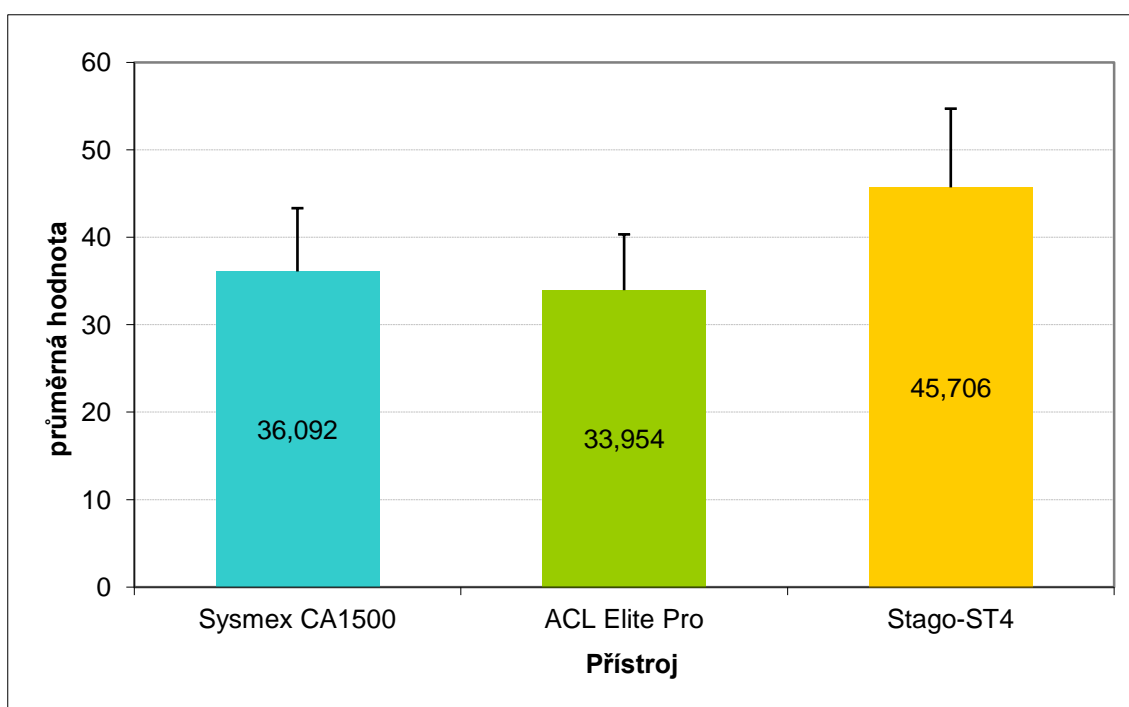
Přístroj	Počet	Průměr[s]	Rozptyl[s]	Sm. odchylka
Sysmex CA1500	50	22,372	86,8	9,3
ACL Elite Pro	50	22,582	134,3	11,6
Stago-ST4	50	21,466	57,8	7,6



Obr. č. 3: Průměr naměřených hodnot PT v sekundách v závislosti na koagulačním přístroji

Tabulka č. 4: Průměr, rozptyl a směrodatná odchylka uvedená v sekundách u aPTT

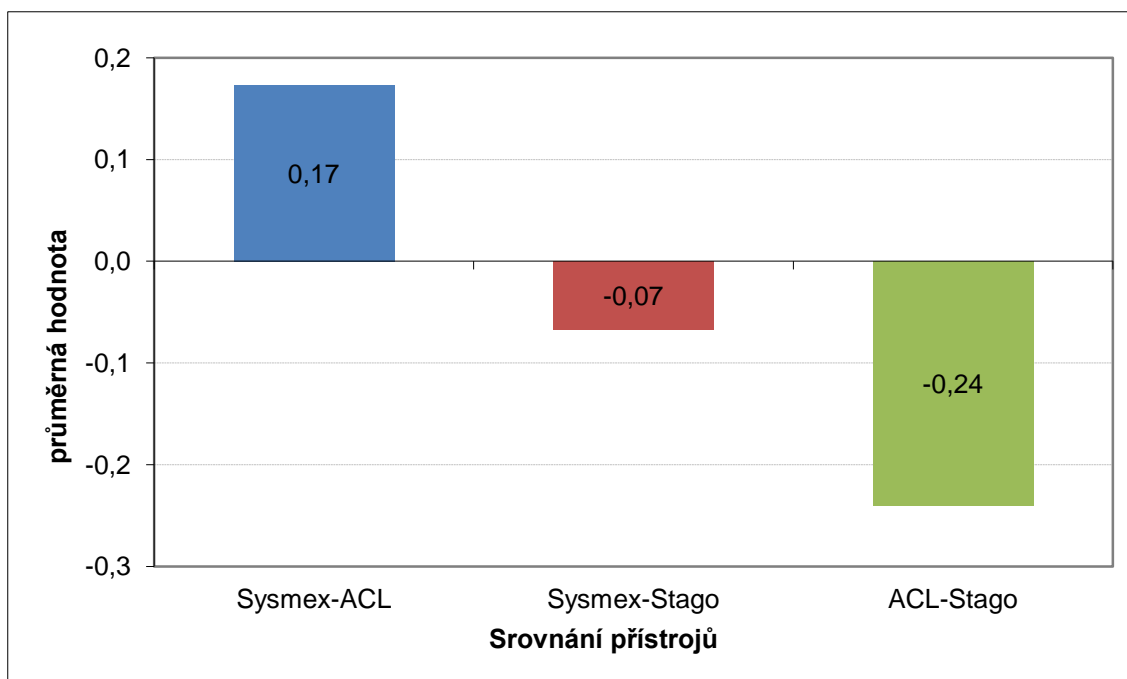
Přístroj	Počet	Průměr	Rozptyl	Sm. odchylka
Sysmex CA1500	50	36,092	52,43	7,24
ACL Elite Pro	50	33,954	40,73	6,38
Stago-ST4	50	45,706	81,13	9,01



Obr. č. 4: Průměr naměřených hodnot aPTT v sekundách v závislosti na koagulačním přístroji

Tabulka č. 5: Průměr, směrodatná odchylka a dosažená hladina významnosti u INR

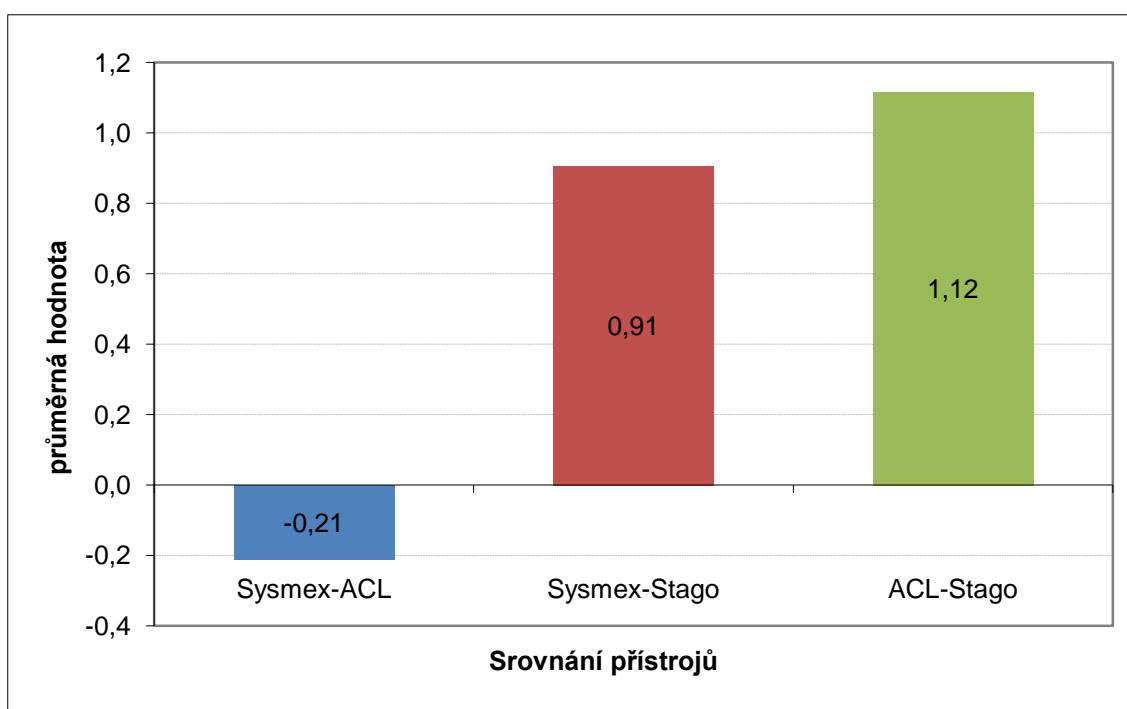
	rozdíl naměřených hodnot		dosažená
	průměr	sm. odchylka	hladina významnosti
Sysmex-ACL	0,17	0,23	0,1%
Sysmex-Stago	-0,07	0,20	2,0%
ACL-Stago	-0,24	0,24	<0,1%



Obr. č. 5 : Rozdíl průměrných naměřených hodnot PT v INR, porovnání přístrojů mezi sebou

Tabulka č. 6 : Průměr, směrodatná odchylka a dosažená hladina významnosti v sekundách u PT

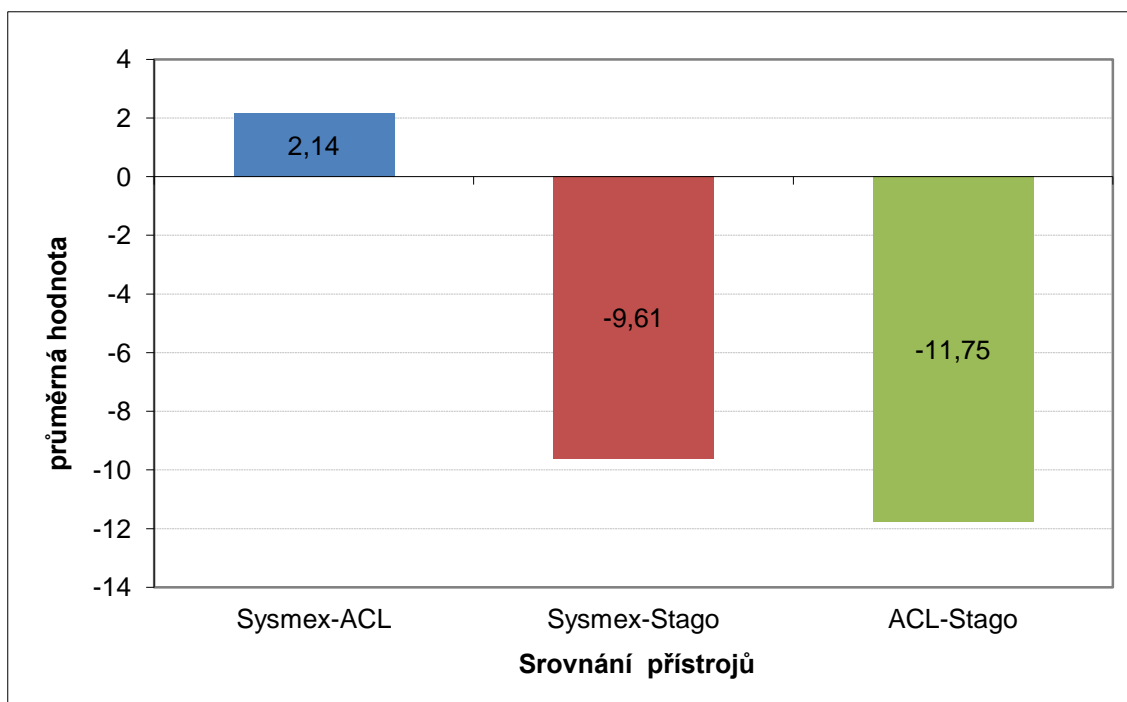
	rozdíl naměřených hodnot		dosažená
	průměr	sm. odchylka	hladina významnosti
<i>Sysmex-ACL</i>	-0,21	3,26	91,8%
<i>Sysmex-Stago</i>	0,91	2,16	100,0%
<i>ACL-Stago</i>	1,12	4,62	28,2%



Obr. č. 6 : Rozdíl průměrných naměřených hodnot PT v sekundách, porovnání přístrojů mezi sebou

Tabulka č. 7 : Průměr, směrodatná odchylka a dosažená hladina významnosti v sekundách u aPTT

	rozdíl naměřených hodnot		dosažená
	průměr	sm. odchylka	hladina významnosti
<i>Sysmex-ACL</i>	2,14	4,58	0,5%
<i>Sysmex-Stago</i>	-9,61	4,29	<0,1%
<i>ACL-Stago</i>	-11,75	5,17	<0,1%



Obr. č. 7: Rozdíl průměrných naměřených hodnot aPTT v sekundách, porovnání přístrojů mezi sebou

4. Diskuze

Hlavním cílem mé práce bylo porovnat naměřené hodnoty koagulačního vyšetření (PT, aPTT) ze stejného vzorku krve, ve třech různých laboratořích, na třech různých typech koagulometrů. Byly použity různé typy reagensů s různým ISI (International Sensitivity Index) – mezinárodní index senzitivity. ISI je charakteristika každé šarže tromboplastinu, povinně uváděná výrobcem na každém balení. U tromboplastinu Tromborel S bylo ISI 1,06, u RecombiPlasTin 2G bylo použito ISI 0,97 a Neoplastine CL Plus měl ISI 1,29. Doporučení použití INR bylo publikováno i u nás již v r. 1987.

Hodnota INR se počítá z pacientova koagulačního času. Tento výpočet zahrnuje hodnotu ISI. ISI hodnotu vypočítává každý výrobce porovnáním s mezinárodním standardním tromboplastinem. Tímto opatřením je kompenzována odlišná citlivost různých reagensů na trhu. Vzorec pro výpočet INR: Koagulační čas pacienta nejprve dělíme koagulačním časem normálu. Protože však různé tromboplastiny mají podle svého původu různou citlivost, musíme do výpočtu zahrnout vypočtený faktor senzitivity (ISI) příslušného tromboplastinu. ISI je exponent, kterým se vypočtený podíl umocní.

Krevní vzorky pro analýzu z plazmy byly odebrány ze žíly do zkumavek obsahujících citrát sodný (0,129 M) a centrifugovány při 2500 otáčkách 15 minut (Karon et al. 2008).

Vzorky byly vybrány náhodným výběrem, což znamená, že byly vybrány zcela náhodně a nezávisle na jakémkoliv parametru. Všechny porovnávané analyzátory mají platný validační protokol. Pro kontrolu kvality byly použity certifikované kontrolní materiály s udaným rozmezím hodnot.

Při porovnání tří koagulometrů: Sysmex CA 1500, ACL Elite PRO a Start 4 byly naměřeny hodnoty těchto vyšetření: protrombinový čas a aktivovaný parciální tromboplastinový čas.

U protrombinového času byly naměřeny tyto hodnoty, pro ten který koagulometr: Sysmex CA 1500 : průměr INR = 2,12, sm. odch. = 0,9, průměr v sekundách = 22,372, sm. odch. = 9,3; ACL Elite Pro : průměr INR = 1,96, sm. odch. = 1,02, průměr v sekundách = 22,582, sm. odch. = 11,6 ; Start 4 : INR = 2,20, sm. odch. = 1,04, průměr v sekundách = 21,466, sm. odch. = 7,6. Při porovnání výsledků z těchto tří analyzátorů mezi sebou byly dosažené hladiny významnosti méně jak 5%. To znamená, že se jednotlivé koagulometry mezi sebou v hodnotách INR statisticky významně liší. I přes použití systému INR došlo k rozdílu při vyšetření stejné plazmy různými tromboplastiny a různými koagulometry. Vyjádření výsledku protrombinového času formou INR je základním předpokladem k tomu, aby lékař mohl úspěšně léčit pacienty (Kessler 2005).

Je důležité si uvědomit, že rozdílné hodnoty INR mohou nastat už chybou v preanalytické fázi (chybný odběr krve, nepromíchání vzorku ihned po odběru, nedodržení poměru krev:citrát) (Karon et al. 1995).

Naměřené hodnoty v sekundách u PT jsou ve shodě, neboť dosažená hladina významnosti je > 5%. I při porovnání koagulometrů mezi sebou je shoda, jak ukazuje tabulka č. 6, kde dosažená hladina významnosti je také > 5%.

Dalším měřením byl aktivovaný parciální protrombinový čas (aPTT), kde jsou naměřené hodnoty následující : Sysmex CA 1500 : průměr v sekundách = 36,092, sm. odch. = 7,24; ACL Elite Pro : průměr v sekundách = 33,954, sm. odch. = 6,38; Start 4, průměr v sekundách = 45,706, sm. odch. = 9,01. Při porovnání analyzátorů mezi sebou, byly dosažené hladiny významnosti méně jak 5%. To znamená, že se jednotlivé výsledky mezi sebou liší.

I pro tuto metodu používá každá z daných laboratoří různé reagenty. Jsou to Actin FS, aPTT Liquid SP a PTT Automate 5. Mají různé denní normály a různá rozmezí při uvedení výsledku na výsledkovém listě.

5. Závěr

Cílem mé práce bylo porovnat naměřené hodnoty základního koagulačního vyšetření (PT, aPTT) ze stejného vzorku krve ve třech různých laboratořích, na třech různých typech koagulometrů. To bylo provedeno u 50 vzorků v časovém období od 11. 9. 2012 až 14. 9. 2012.

U hodnot, které jsem naměřila byly vypočítány průměrné hodnoty, směrodatné odchylky. Metodou Anova s opakováním byly vypočítány dosažené hladiny významnosti. Z těchto vyplývá, že se INR a aPTT v sekundách od sebe liší. U porovnání jednotlivých přístrojů mezi sebou je dosažená hladina významnosti vypočtena za pomoci metody: Post-hoc test- Bonferroni a ukazuje, že se i tyto jednotlivé přístroje mezi sebou liší.

Laboratorní praxe tedy ukazuje, že koagulační vyšetření provedené v různých laboratořích, týž den, od stejného pacienta vykazují různé hodnoty. To zpochybňuje spolehlivost provedených vyšetření v dané laboratoři a lékaře mohou uvádět tyto výsledky v nejistotu.

Seznam použité literatury

- BOLES, J., MACKMAN, N. Role of tissue factor in thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus*, 2010, vol. 19, no. 4, p. 370–378.
- BOUDAOU L, L., et al. St[Rapid centrifugation for routine coagulation testing]. *Ann Biol Clin*, 2006, vol. 64, no. 4, p. 315–317.
- CASELLA, S., et al. Assessment of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen concentration on equine plasma samples following different storage conditions.. *J Vet Diagn Invest*, 2009, vol. 21, no. 5, p. 674–678.
- CASTOLDI, E., HACKENG, T. Regulation of coagulation by protein S. *Curr. Opin. Hematol.*, 2008, vol. 15, no. 5, p. 529–536.
- DE MIGUEL, D., et al. Capillary whole blood testing by a new portable monitor. Comparison with standard determination of the international normalized ratio.. *Am J Clin Pathol.*, 2003, vol. 120, no. 1, p. 28–33.
- EMSLEY, J., et al. Structure and function of factor XI.. *Blood*, 2010, vol. 115, no. 13, p. 2569–2577. ISSN 0006-4971.
- FRANCHINI, M., LIPPI, G. Fibrinogen replacement therapy: a critical review of the literature. *Blood Transfus*, 2012, vol. 10, no. 1, p. 23–27.
- FRASER, S., BOOTH, N., MUTCH, N. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through α 2-antiplasmin cross-linking. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 23, p. 6371–6374.
- FRIDECKÝ, B.; et al. www.cskb.cz. <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--validace-a-verifikace-metod>.
- GAILANI, D., SMITH, S. Structural and functional features of factor XI. *J Thromb Haemost.*, 2009, vol. 7, no. 1, p. 75–78.
- GRAY, S., et al. Relation between postoperative antithrombin III concentrations and site of operation.. *J Clin Pathol.*, 1981, vol. 34, no. 6, p. 599–601.
- HENRIKSEN, R., et al. Prothrombin Greenville, Arg517=Gln, Identified in an Individual Heterozygous for Dysprothrombinemia. *Blood*, 1998, vol. 91, no. 6, p. 2026–2031.
- HRUBIŠKO, M, HULE, V. 1970 : Hematológia a transfúzia krvi. 3. vydání, Osveta, Martin, 476 pp

HRUBIŠKO, M., et al. *Hematologie a krevní transfúze krve II. : Krevní transfúze. 1.* . Praha: Avicentrum, 1983. 208 s.. ISBN 08-056-83.

HWANG, S., et al. Thrombomodulin phenotype of a distinct monocyte subtype is an independent prognostic marker for disseminated intravascular coagulation. *Crit Care*, 2011, vol. 15, no. 2, p. 113.

KARGES, W., et al. *Vnitřní lékařství*. Grada Publishing a.s., 2011. 426 p. ISBN 8024731088, 9788024731087.

KARON, B., et al. Accuracy of capillary whole blood international normalized ratio on the CoaguChek S, CoaguChek XS, and i-STAT 1 point-of-care analyzers.. *Am j Clin Pathol.*, 2008, , no. 130, p. 88–92.

KASTHURI, R., et al. Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor as Key Regulators of Global Hemostasis: Measurement of Their Levels in Coagulation Assays. *Semin Thromb Hemost*, 2010, vol. 36, no. 7, p. 764–771.

KRONE, K., ALLEN, K., et al. Impaired Fibrinolysis in the Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep*, 2010, vol. 12, no. 1, p. 53–57.

KUBISZ, P., et al. *Hematológia a transfuziológia*:. 1st ed. Grada Publishing a.s., 2006. 323 p. ISBN 8024717794, 9788024717791.

LAGA, A., et al. The effect of specimen hemolysis on coagulation test results.. *Am J Clin Pathol.*, 2006, vol. 126, no. 5, p. 748–755.

LAI, Y., et al. Analysis of factor influencing the generation of unqualified clinical samples and measures to prevent this generation. *Ann Lab Med.*, 2012, no. 32, p. 216–219.

LENTING, P., et al. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function. *Blood*, 1998, vol. 92, no. 11, p. 3983–3996.

LEWIS, M. Treatment with recombinant human activated protein C: one size does not fit all. *Crit Care*, 2011, vol. 15, no. 1, p. 105.

LIPPI, G., et al. Effect of specimen collection on routine coagulation assays and D-dimer measurement.. *Clin Chem.*, 2004, vol. 50, no. 11, p. 2150–2152.

LIPPI, G., et al. Influence of centrifuge temperature on routine coagulation testing.. *Clin Chem.*, 2006, vol. 52, no. 3, p. 537–538.

MAČÁK, J., et al. *Patologie - 2., doplněné vydání*. 2nd ed. Grada Publishing a.s., 2012. 347 p. ISBN 802473530X, 9788024735306.

MATÝŠKOVÁ, M., et al. *Hematologie pro zdravotní laboranty 2. díl : Krevní srážení..* Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1999. 203 p. ISBN 80-7013-278-7.

MOSNIER, L., ZPOLOVIC, B., GRIFFIN, J. The cytoprotective protein C pathway.. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 8, p. 3161–3172.

NAVRÁTIL, L., et al. *Vnitřní lékařství - Pro nelékařské obory Zdravotnické* . Grada Publishing as, 2008. 424 s.. ISBN 8024723190, 9788024723198.

PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu III. : Fyziologie a patofyziologie hemostázy*. Český Těšín: FINIDR,s.r.o., 2004. 238 p. ISBN 80-86682-03-X.

PECKA, M., et al. *Praktická hematologie: Laboratorní metody*. Český Těšín: FINIDR,s.r.o., 2010. 343 p. ISBN 978-80-903871-9-5.

PENKA, M. *Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) Malá monografie*. Grada Publishing a.s., 2003. 231 p. ISBN 8024703416, 9788024703411.

PENKA, M., et al. *Hematologie I*. Grada, 2001. ISBN 80-247-0023-9.

PENKA, M., et al. *Neonkologická hematologie* . 2nd ed. Grada Publishing, as, 2009. 420 s.. ISBN 8024722992, 9788024722993.

PENKA, M., et al. *Hematologie transfuzní lékařství I - Hematologie* . Grada Publishing, as, 2011. 421 s.. ISBN 8024734591, 9788024734590.

PEREZ-PUJOL, S., ARAS, O., ESCOLAR, G. Factor V Leiden and Inflammation. 2012, vol. 10, no. 1155,

PIXLEY, R., et al. Interaction of high-molecular-weight kininogen with endothelial cell binding proteins suPAR, gC1qR and cytokeratin 1 determined by Surface Plasmon Resonance (BiaCore). *Thromb Haemost.*, 2011, vol. 105, no. 6, p. 1053–1059.

PLEBANI, M., et al. Quality control in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost*, 2008, vol. 34, no. 7, p. 642–646.

RENNÉ, T., GAILANI, D. Role of Factor XII in hemostasis and thrombosis: clinical implications.. *Expert review of cardiovascular therapy*, 2007, vol. 5, no. 4, p. 733–741.

SHAH, S., ROBINSON, I. Patients' perspectives on self-testing of oral anticoagulation therapy: kontent analysis of patients' internet blogs. *BMC Health Serv Res*, 2011, vol. 11, p. 25.

SCHVED, J., et al. Sample collection for velus blood testing in haemostasis. *Ann Biol Clin*, 2002, , no. 60, p. 731–733.

SMITH, N., et al. Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE Consortium. *Circulation*, 2010, vol. 121, no. 12, p. 1382–1392

STAVROU, E., SCHMAIER, A. Factor XII: What Does It Contribute To Our Understanding Of The Physiology and Pathophysiology of Hemostasis & Thrombosis. *Thromb Res.*, 2010, vol. 125, no. 3, p. 210–215.

TANAKA, K., KEY, N., LEVY, J. Blood coagulation:hemostasis and trombin regulativ. *Anesth Analg*, 2009, no. 108, p. 1433–1446.

VAN HERREWEGEN, F., et al. Clinical practice:the bleeding child.Part II: disorders of secondary hemostasis and fibrinolysis. *Eur J Pediatr*, 2012, no. 17, p. 207–214

VARGA, E., MOLL, S. Prothrombin 20210 Mutation (Factor II Mutation). *Circulation*, 2004, vol. 110, p. 15–18.

VERHAMME, I. Fluorescent reporters of thrombin, heparin cofactor II, and heparin binding in a ternary complex. *Anal Biochem*, 2012, vol. 421, no. 2, p. 489–498.

Klíčová slova

Koagulační analyzátory

Protrombinový čas - PT

Hemostáza

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas - aPTT

ISI mezinárodní index citlivosti

INR mezinárodní normalizovaný poměr

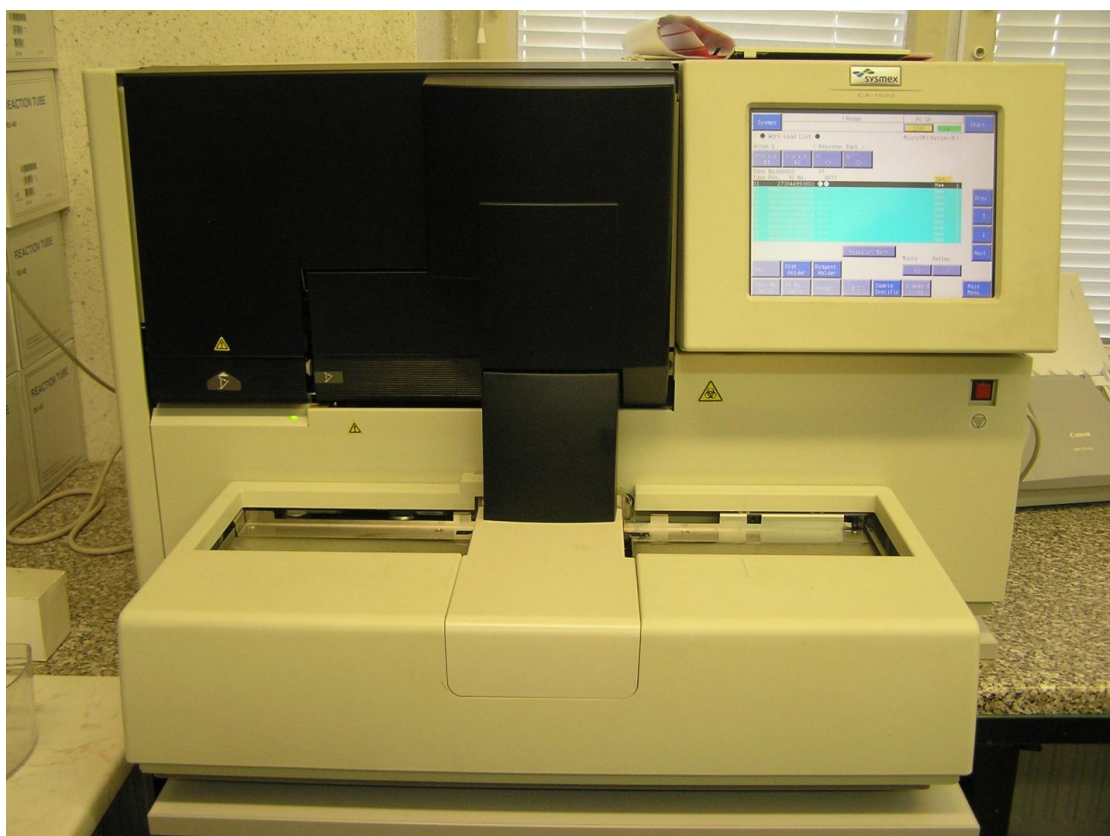
Přílohy

Sysmex CA 1500

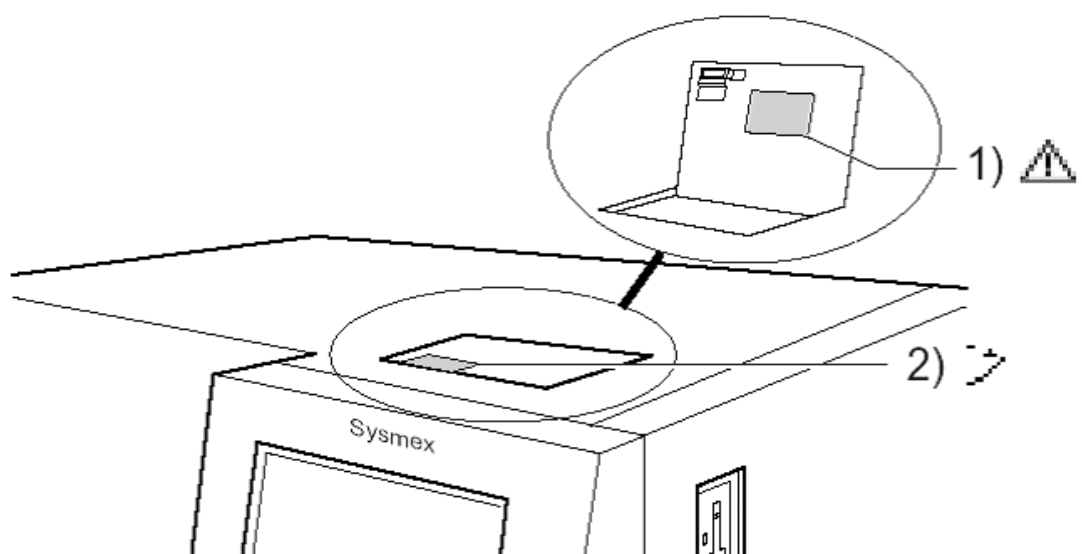
Popis přístroje:

Plně automatický koagulační analyzátor umožňující analyzovat vzorky s použitím srážecích, chromogenních a imunoassay detekčních metod.

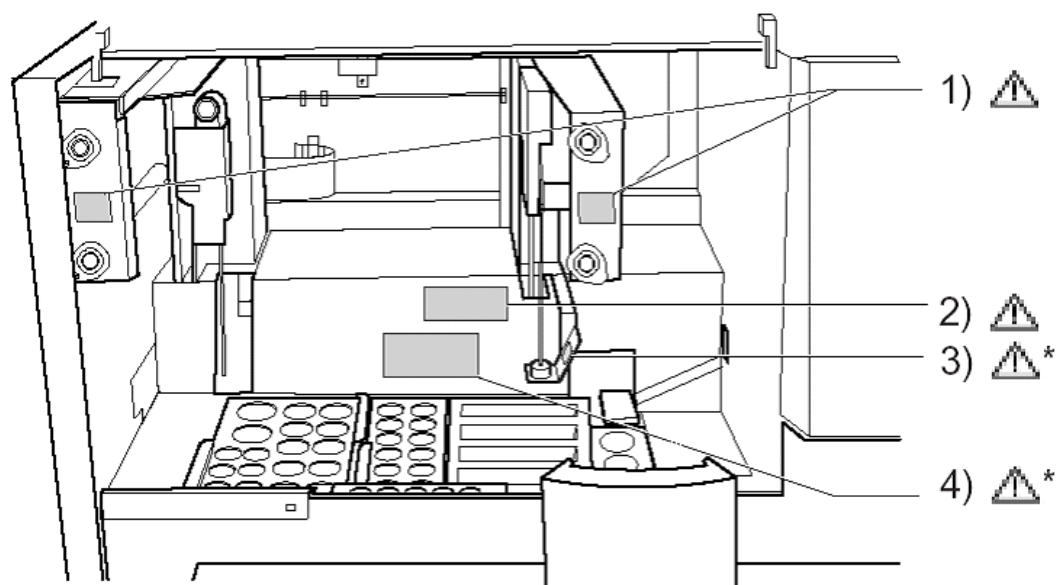
Přístroj je tvořen vlastním analyzátozem, který je tvořen tělem analyzátoru, pohyblivými rameny pipetoru, podavačem vzorků (racků) a řídicí jednotkou - počítačem. Analyzátor pracuje na fotometrickém principu měření. (Uživatelský manuál 2010).



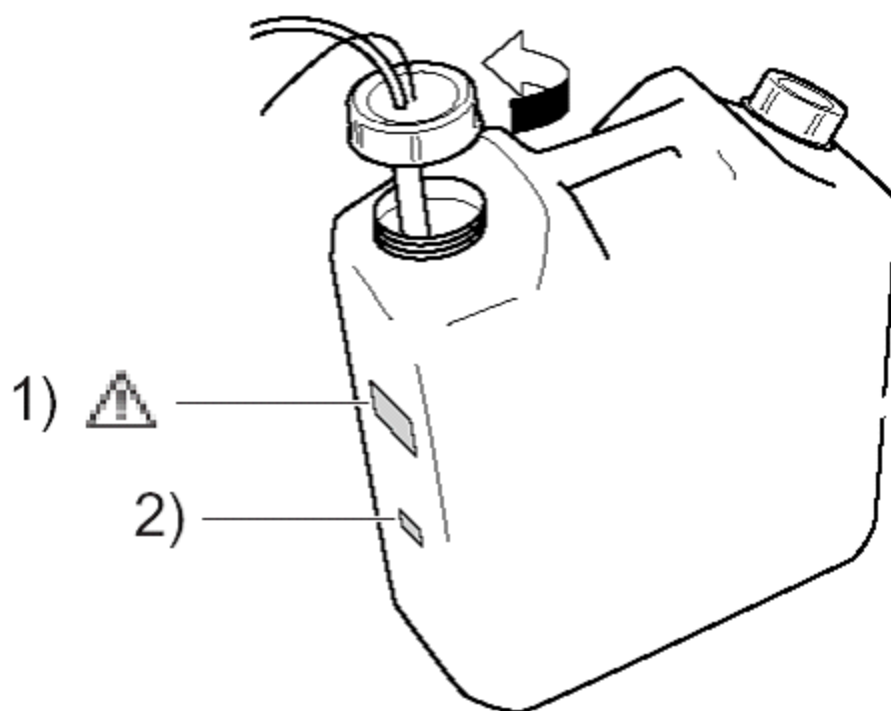
Obr. č. P1: Sysmex CA 1500



Obrázek č. P2: Náhled krytu přístroje

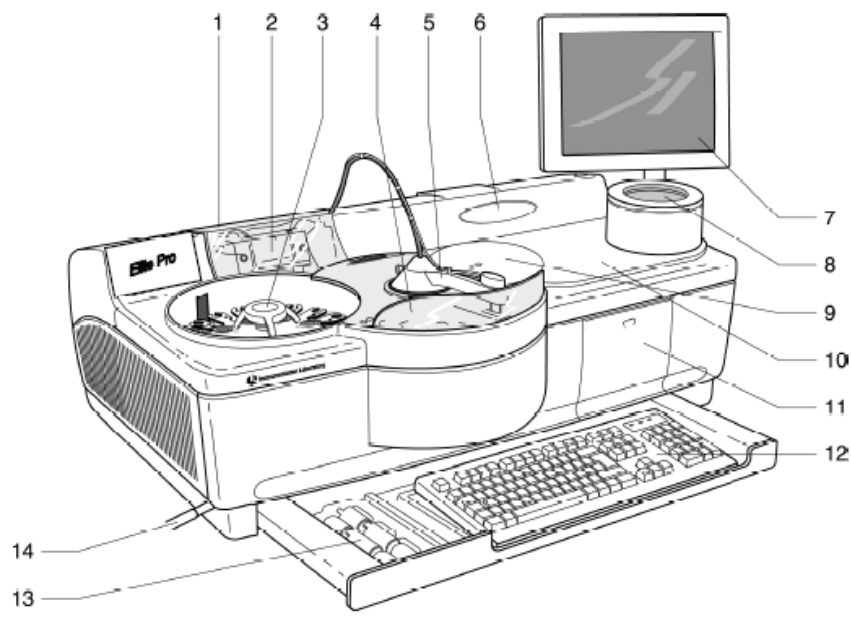


Obrázek č. P3: Pohled dovnitř přístroje



Obrázek č. P4: Zásobní nádoba

ACL Elite Pro



- | | | |
|--------------------|-----------------------|---------------------------------|
| 1. Wash-R Emulsion | 5. Sampling Arm | 10. Rotor Transport (Elite Pro) |
| 2. Dilutors | 6. Floppy Disk Drive | 11. Rotor Waste Area |
| 3. Sample Tray | 7. LCD | 12. Keyboard |
| 4. Reagent Area | 8. Rotor Stack Area | 13. Adapters Area |
| | 9. Rotor Holder Cover | 14. Liquid Waste Outlet |

Obrázek č. P5: Schéma přístroje.



Obrázek č. P6: ACL Elite PRO

Obrázky převzaty z <https://www.beckmancoulter.com/ucm/idc/groups>

Start 4

Popis přístroje:

Je účinný poloautomatický stolní koagulometr, který je integrován s patentovanou STAGO elektro-mechanickou metodou detekce sraženin. Tento model provádí koagulační, chromogenní a imunologické metodiky v náhodném režimu přístupu. Analyzátor je lehký a kompaktní, ideální pro nízké až střední počty testovaných vzorků. Tento přístroj lze také používat jako záložní optický systém detekce sraženin.

Činidlo 1 se předeřeje na 37° a následně se smíchá s činidlem 2. Výsledný roztok se nechá 30 minut stabilizovat při pokojové teplotě a pak lehce promíchá aby se získala homogenní suspenze. 0,1 ml plazmy se napipetuje do kyvet a nechá se inkubovat přibližně 2 minuty. Poté je zahájeno měření, což rozpohybuje detekční kuličky. Přidá se 0,2 ml namíchaného roztoku z lahvičky pro činidlo 1 automatickou pipetou. Po krátké době začne roztok koagulovat kuličky se zastaví, a koagulometr vytiskne výsledek měření. (Uživatelský manuál 1998).



Obrázek č. P7: Start 4