



Možnosti vyšetřování faktoru VIII

Petr Sadílek

IV. interní hematologická klinika FN Hradec Králové



Koagulační faktor VIII

- Antihemofilický faktor A – defekt, deficit či specifická protilátka – hemofilie A
- Gen pro FVIII – na pohlavním chromozomu X
- V plazmě vázán na vWF – ochrana před štěpením
- Aktivace limitovanou proteolýzou trombinem
- Kofaktor v komplexu vnitřní tenázy
- Přirozený inhibitor – systém proteinu C
- Fyziologické meze – funkční aktivita: 50-150 %
- Zvyšuje se při zánětech, chronických infekcích, stresu



Stanovení faktoru VIII – dříve

1. Jednofázová koagulační metoda

- K ředěné vyšetřované plazmě se přidá **FVIII deficitní plazma**
- Přidá se libovolná APTT reagencie citlivá k faktorům vnitřní cesty a po inkubaci CaCl_2
- Změří se koagulační čas, který **je závislý na aktivitě FVIII přítomném ve vyšetřované plazmě**
- Odečtem času z kalibrační křivky získáme hodnotu aktivity FVIII v %



Stanovení faktoru VIII – dříve

1. Jednofázová koagulační metoda

- Siemens Healthineers nabízí 3 APTT reagencie, které lze využít ke stanovení aktivity FVIII
 - **Actin FS**
 - **Actin FSL**
 - **Pathromtin SL**
- Deficitní plazmu
 - **Coagulation factor VIII Deficient Plasma**



Stanovení faktoru VIII – dříve

2. Dvoufázová chromogenní metoda

- K ředěné vyšetřované plazmě se přidá **FX, FIXa, trombin, fosfolipidy, vápenaté ionty a chromogenní substrát**
- Změří se absorbance při 405 nm
- Odečtem absorbance z kalibrační křivky získáme hodnotu aktivity FVIII v %
- Reagencie mohou obsahovat humánní či bovinní složky
- Chromogenní metodu lze s výhodou použít v případě interferencí ovlivňujících koagulační stanovení



Stanovení faktoru VIII – dříve

2. Dvoufázová chromogenní metoda

- Siemens Healthineers nabízí set k chromogennímu stanovení aktivity FVIII
 - **Factor VIII Chromogenic Assay**
- Složky tohoto setu jsou bovinního původu (FIXa, FX)
- Chromogenní stanovení je obecně dražší než koagulační
- Není tak citlivé k interferencím jako koagulační stanovení



Stanovení faktoru VIII – dnes

- Nelze použít na všechno 1 metodu jako dříve
- V případě některých nových přípravků FVIII k léčbě hemofilie A s prodlouženým biologickým poločasem významně záleží na použité APTT reagensii (zejména na aktivátoru); ani chromogenní metoda nemusí dávat správné výsledky
- Výsledky se při použití nevhodných reagensií někdy až zásadně liší od správných
- Některé reagensie nadhodnocují výsledek aktivity FVIII, jiné naopak podhodnocují



Stanovení faktoru VIII – dnes

- Doporučená metoda stanovení FVIII ke sledování nastavení antihemofilické léčby přípravkem s prolongovaným účinkem je uvedena v SPC přípravku
- Zásadní rozdíly ve výsledcích jsme pozorovali při použití různých metod u přípravku **JIVI**
 - damoktokog alfa pegol (**JIVI Bayer AG**)
 - PEGylovaný rekombinantní humánní koagulační FVIII
 - Dle SPC – křemičitanové aktivátory – podhodnocení;
kaolinové aktivátory – nadhodnocení výsledků



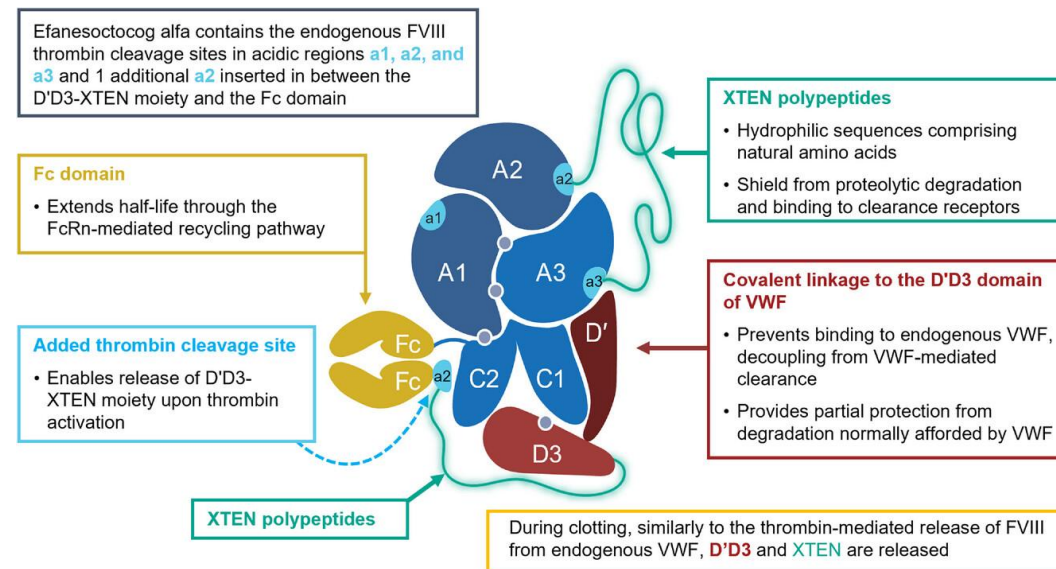
JIVI – porovnání metod stanovení FVIII

	Actin FSL Siemens	Pathromti n SL Siemens	STA PTT A Stago	STA CK Prest Stago	Chromogeni c Assay Siemens
FVIII (%) Vzorek A	41,5	47,0	11,0	60,0	21,8
FVIII (%) Vzorek B	37,3	44,7	9,4	53,0	18,0



EFANESOCTOCOG ALFA (Altuvect® Sobi)

- Rekombinantní fúzní protein F VIII a vWF
- Neváže se na vWF v plazmě pacienta
- Výrazně delší biologický poločas (2,5 – 3x oproti běžným přípravkům obsahujícím F VIII)



Laboratorní stanovení

- Vyšetření aktivity F VIII
- Koagulačně x chromogenně
- Velká variabilita výsledků v závislosti na použitých reagentech
- Některé hodnoty falešně zvyšují (Actin FS, chromogenní metoda – cca 2-2,5x), jiné falešně snižují (SynthASil – cca o 30 %)
- V současné době je doporučována k monitorování metoda koagulační s APTT reagenty Actin FSL (Siemens)



Altuvocť – porovnaní metod stanovení FVIII

	Actin FS	Actin FSL	Pathromtin SL	STA PTT A	STA CK Prest
	Siemens	Siemens	Siemens	Stago	Stago
FVIII (%)					
Vzorek A	264,6	153,6	169,4	138,0	199,0
FVIII (%)					
Vzorek B	45,4	26,0	36,7	30,0	55,0
FVIII (%)					
Vzorek C	19,0	10,8	17,5	14,0	21,0



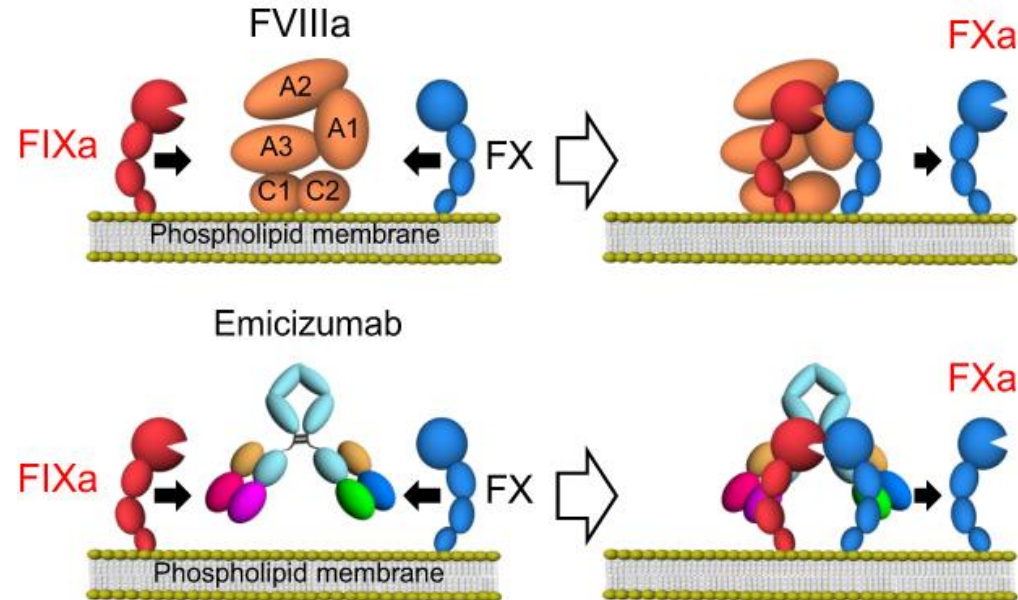
Pacienti užívající efanesoctokog alfa ve FN HK

- Zatím 1 pacient
- Uvádět léčbu na žádance (správný výběr metody v laboratoři)
- Nejlepší telefonická domluva lékaře s laboratoří



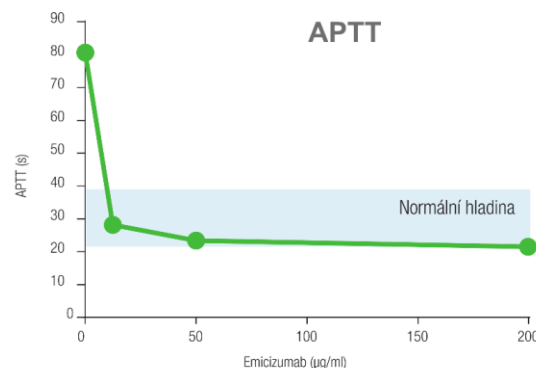
EMICIZUMAB (Hemlibra® Roche)

- Rekombinantní humanizovaná bispecifická monoklonální protilátka
- Propojuje faktor IXa s faktorem X – nahrazení faktoru VIIIa v komplexu vnitřní tenázy

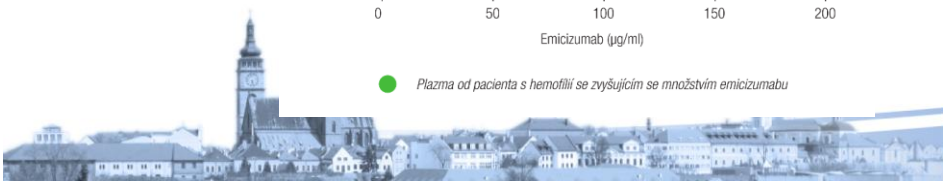
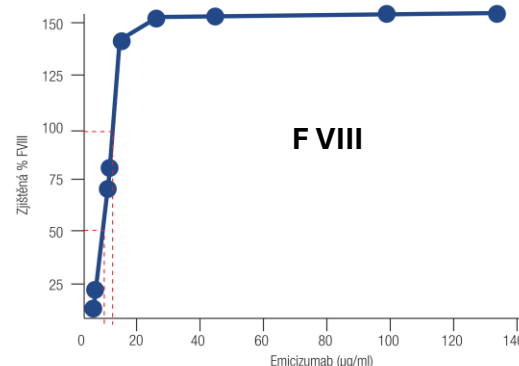


Ovlivnění koagulačních testů emicizumabem

- Výrazně zkracuje APTT (normální hodnoty)
- Zvyšuje aktivitu faktorů měřených koagulační metodou na principu APTT (F VIII, IX, XI, XII)
- Inhibitor F VIII stanovený koagulačně Bethesda metodou je falešně negativní
- efekt přetrvává až 6 měsíců po podání poslední dávky



● Plasma od pacienta s hemofilií se zvyšujícím se množstvím emicizumabu



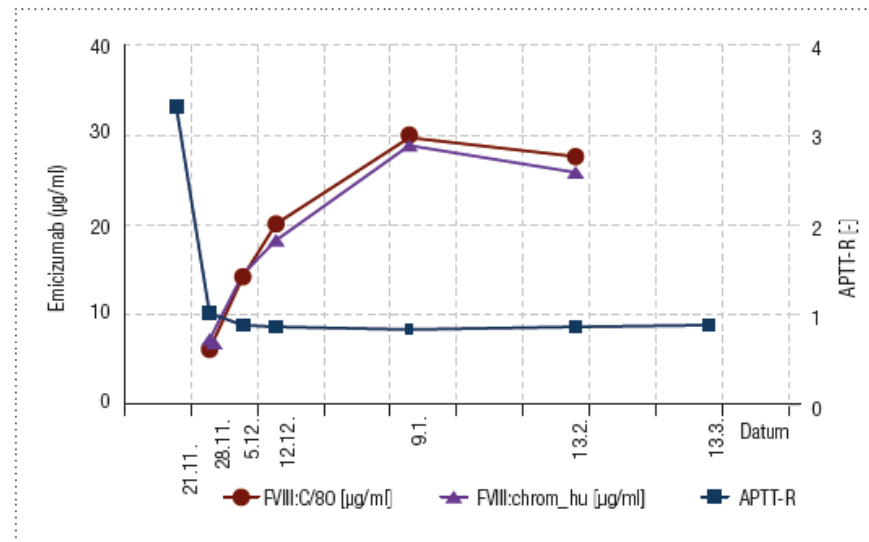
Laboratorní možnosti

- Stanovení koncentrace emicizumabu
- Stanovení vlastního F VIII pacienta při léčbě emicizumabem či infuzně podaného F VIII
- Stanovení inhibitoru F VIII při léčbě emicizumabem
- Správnost výsledku závisí na výběru vhodné metody
- Nutno uvádět léčbu emicizumabem na žádance!
- I v případě, že už pacient emicizumab neužívá



Stanovení koncentrace emicizumabu

- Koagulačně x chromogenně
- Koagulačně jedině při vyšším ředění vzorku (1:80)
- Chromogenně jedině s reagensiemi humánního původu
- Terapeutické meze: 37,8 – 69,2 $\mu\text{g/ml}$ (Zdroj: SPC léčiva)

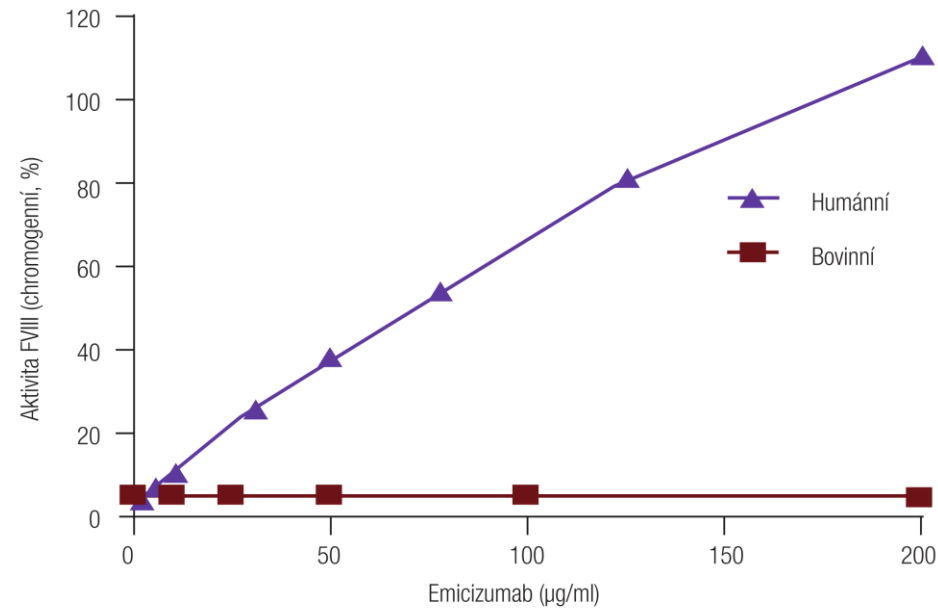


Obr. 9 Porovnání modifikované jednofázové metody stanovení FVIII a chromogenní metody stanovení FVIII pro určení hladiny emicizumabu.



Stanovení F VIII a INFVIII při léčbě emicizumabem

- Jedině reagensií necitlivou na emicizumab
- Chromogenní metodou s bovinními faktory



Pacienti užívající emicizumab ve FN HK

- 7 pacientů dlouhodobě
- 4 pacienti se získanou hemofilií A
- Pozor na správnou interpretaci výsledků laboratorních testů (některé značně ovlivněny)
- Uvádět léčbu na žádance (správný výběr metody v laboratoři)
- Nejlepší telefonická domluva lékaře s laboratoří



ZÁVĚR

- Nová antihemofilika – velký benefit pro pacienty
- Komplikace pro lékaře – správná interpretace výsledků, výrazné ovlivnění některých koagulačních testů (Hemlibra)
- Komplikace pro laboratoř – nestačí mít 1 metodu „na všechno“, výběr správné metody je zásadní
- Nutnost uvádět léčbu na žádance – často se neděje!
- Ideálně telefonická domluva mezi lékařem a laboratoří





Děkuji Vám za pozornost

