



LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA FXIII

Petr Sadílek

IV. interní hematologická klinika FN Hradec Králové



Faktor XIII

- Faktor stabilizující fibrin
- Tetramer – 2 podjednotky A, 2 podjednotky B
- Aktivován trombinem v přítomnosti Ca^{2+} a fibrinu
- Odštěpení aktivačních peptidů a disociaci podjednotek B
- Konformační změna FXIII-A2 – obnažení aktivního místa
→ transglutamináza
- Spojuje lysinový zbytek jednoho γ -řetězce fibrinu s glutaminovým zbytkem jiného γ -řetězce za vzniku zesíťovaného fibrinu (uvolnění amoniaku)



Funkce faktoru XIII

- Vznik stabilního nerozpustného fibrinu (následně DDI)
- Stabilizace extracelulární matrix
- Remodelace tkání
- Růst kostí/chrupavek
- Angiogeneze
- Hojení ran
- Udržení těhotenství

Schroeder V, Kohler HP. Factor XIII: structure and function. SeminThrombHemost 2016;42(04):422–428



Deficit F XIII

- Vrozený: velmi vzácný - autosomálně recesivní typ dědičnosti
- časně

krvácení z pupečníku

novorozenců

- Získaný: vzácný - ze zvýšené ztráty
- ze zvýšené spotřeby
- z nedostatečné tvorby
- na imunitním

podkladě – autoprotilátky

- Deficit typu I – kvantitativní defekt



Laboratorní diagnostika deficitu faktoru XIII

SSC Subcommittee ISTH guidelines:

1. kvantitativní funkční test stanovení aktivity F XIII
2. stanovení antigenu F XIII – ELISA, LIA
3. směsné testy – průkaz inhibitoru
4. analýza zesíťování fibrinu
5. genetické testování

Kohler HP, et al. Factor XIII And Fibrinogen SSC Subcommittee Of The ISTH. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. J ThrombHaemost 2011;9 (07):1404–1406



A. Screeningové kvalitativní testy

- Stále ještě používané, dobře dostupné, orientační testy
- Testuje se rozpustnost fibrinového koagula
- Vysrážení fibrinu pomocí CaCl_2 nebo trombinu
- Vystavení různým chemickým látkám (5M močovina, 2% kyselina octová, 1-5% kyselina monochloroctová)
- Sleduje se rozpustnost koagula v pravidelných časových intervalech po dobu 24 hodin
- Došlo/nedošlo k rozpuštění koagula za 24 hodin



A. Screeningové kvalitativní testy

- + Dostupné, levné, jednoduché
- Orientační, neposkytují kvantitativní výsledek, nízká senzitivita i specifita, závislé na koncentraci fibrinogenu v plazmě, nelze je použít při hyperfibrinolýze, dokážou odhalit pouze klinicky významné deficity F XIII



B. Kvantitativní testy funkční aktivity F XIII

- Měly by být vyšetřovány jako první
- Fotometrické testy transglutaminázové aktivity F XIII
- Měří se množství amoniaku uvolněného během transglutaminázové reakce katalyzované F XIIIa
- Indikátorová reakce uvolněného amoniaku s NAD(P)H katalyzovaná glutamátdehydrogenázou
- Měří se absorbance při 340 nm



B. Kvantitativní testy funkční aktivity F XIII

+ Komerčně dostupné sety, rychlé, automatizovatelné,

kvantitativní výsledky (v %, příp. IU/ml)

- Nízká senzitivita (LOQ cca 3-5 % aktivity F XIII),
interference – amoniak uvolněný při jiných dějích falešně
nadhodnocuje aktivitu F XIII, lipemická plazma falešně
zvyšuje aktivitu F XIII x ikterická plazma aktivitu F XIII
falešně snižuje,
lze vyšetřit pouze na koagulometrech s vlnovou délkou

340 nm



Berichrom F XIII Assay (SIEMENS Healthineers)

- Komerčně dostupný set k vyšetření aktivity F XIII
- Na automatických koagulometrech CS-2500, CS-5100, CN-3000, CN-6000
- Výsledek během 13 minut
- Rozsah měření: 5,5-150 %
- 20 μ L vzorku
- Stabilita reagensí v přístroji: 96 hodin
- Počet analýz ze setu: 200



Berichrom F XIII Assay (SIEMENS Healthineers)

- Součástí setu je trojice lahvíček:
 - Activator reagent – trombin, CaCl_2 , inhibitor srážení
 - Activator diluent – NADH
 - Detection reagent – glutamát dehydrogenáza, F XIIIa substrát, glycin-ethylesterhydrochlorid, α -ketoglutarát
- Kalibrace se provádí na Standard Human Plasma
- Kontrola kvality – Control Plasma N a Control Plasma P



C. Kvantitativní testy antigenu F XIII

- Vyšetřovat v případě snížené funkční aktivity
- K odlišení typu deficitu I a II
- Využívají specifické polyklonální nebo monoklonální Ab proti tetrameru F XIII nebo proti podjednotce A či B
- Imunoturbidimetrie
- ELISA



C. Kvantitativní testy antigenu F XIII

- + Komerčně dostupné sety,
 - imunoturbidimetrie - rychlá, automatizovatelná na běžný koagulometr,
 - kvantitativní výsledky (v %, příp. koncentrační jednotky)
- Interference v plazmě



D. Testy na přítomnost autoprotilátek

- Snížená aktivita F XIII může být způsobena přítomností autoprotilátek proti některým jeho podjednotkám
- Směsné testy – detekce neutralizujících protilátek namířených proti podjednotce A
- „Binding assay“ – detekce vazby neneutralizujících protilátek namířených proti podjednotce A nebo B (ELISA) – tyto protilátky vedou po navázání na F XIII k jeho odstranění z cirkulace
- Kvantifikace inhibitoru – Bethesda metoda



E. Analýza zesítěvání fibrinu

- Gelová elektroforéza – detekce tvořících se γ - γ dimerů a vysokomolekulárních α - a γ - multimerů účinkem F XIIIa; u pacientů s deficitem F XIII byla prokázána absence dimerizace γ -řetězců
- Trombelastografie – do určité míry citlivá na funkci F XIII, který ovlivňuje viskoelastické vlastnosti fibrinové sraženiny

Allan P, et al. Evidence that fibrinogen γ' directly interferes with protofibril growth: implications for fibrin structure and clot stiffness. J ThrombHaemost 2012;10(06):1072–1080



F. Analýza genových mutací v genech pro F XIII

- Pomocí molekulárně biologických metod (PCR-RFLP, real-time PCR)
- Detekce kauzálních mutací a polymorfismů v genech kódujících podjednotky F XIII (A, B)
- V současné době je známa celá řada mutací s různou lokalitou jejich nejčastějšího výskytu

Muszbek L, et al. Assessment of factor XIII. Methods Mol Biol. 2017;1646:277-293



G. Další experimentální metody vyšetření F XIII

- Sledování aktivace F XIII – ELISA detekující aktivační peptid, odštěpující se z N-konce podjednotky A při aktivaci F XIII trombinem
- Monitorování generace F XIIIa – fluorogenní test založený na měření izopeptidázové aktivity transglutamináz (štěpení izopeptidové vazby – nárůst intenzity fluorescence)

Ortner E, et al. Sensitive and selective detection of free FXIII activation peptide: a potential marker of acute thrombotic events. Blood 2010;115(24):5089–5096



ZÁVĚR

- Deficit koagulačního F XIII je vzácný
- Běžnými koagulačními testy není odhalitelný
- Dostupnost specifických laboratorních vyšetření je omezená
- Screeningové orientační testy dnes nejsou doporučovány
- Dostupné komerční kity jsou pouze pro vyšetření aktivity a antigenu F XIII
- Vyšetření aktivity F XIII je možné pouze na koagulometrech s vlnovou délkou 340 nm
- Na ostatních koagulometrech je možné vyšetřit pouze antigen F XIII
- U deficitu typu I spolu aktivita a antigen silně korelují x u deficitu typu II nikoli (nutno vyšetřit aktivitu i antigen F XIII)





Děkuji Vám za pozornost

