

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

BSNT. PHAN TRÚC

CHUYÊN ĐỀ

CÁC XÉT NGHIỆM ĐÔNG MÁU

Tp. Hồ Chí Minh, 5/2018

PHẦN 1. BỘ XÉT NGHIỆM SÀNG LỌC

PHẦN GIỚI THIỆU

Những xét nghiệm (test) sàng lọc về tình trạng đông máu (haemostasis) như PT, APTT để xác định một người có nguy cơ chảy máu trong chấn thương hay khi can thiệp thủ thuật, có thể đưa đến nhầm lẫn. Những xét nghiệm này có thể cho ra kết quả bình thường ở những bệnh nhân thậm chí có xáo trộn đông máu đáng kể. Một điều rất quan trọng cần nhớ rằng một xét nghiệm ở tại LABO là xét nghiệm in vitro và có thể không phản ánh chính xác cơ chế đông máu bên dưới.

Test sàng lọc quan trọng nhất trong haemostasis là tiền sử chảy máu của bệnh nhân (nếu điều này được xem như là một test), việc sử dụng chống đông (bao gồm cả kháng ngưng tập tiểu cầu) và bất kỳ tiền sử gia đình nào gợi ý chảy máu có xu hướng do rối loạn di truyền.

Đề nghị một xét nghiệm sàng lọc trước khi thu thập tiền sử và thăm khám toàn diện là không phù hợp.

Việc sử dụng bảng câu hỏi được thiết kế đã cho thấy hiệu quả trong bệnh von Willebrand type 1, và gần đây bằng việc sử dụng hàng loạt câu hỏi với bệnh nhân nghi ngờ rối loạn chảy máu đã cho ra được những kết quả vô giá.

Test được xem là test sàng lọc gồm PT và APTT. Nồng độ Fibrinogen và Thời gian Thrombin (TT) không được xem là test sàng lọc đầu tay, mặc dù nó được thực hiện phổ biến.

Một điều quan trọng là số lượng tiểu cầu luôn phải được kiểm tra ở mọi bệnh nhân được điều tra haemostatic.

Bài 1. PROTHROMBIN TIME (PT)

1. PT là xét nghiệm cơ bản để theo dõi các chất kháng vitamin K đường uống như warfarin, phenidione (xem phần INR)
2. PT có thể xem như một test sàng lọc kháng đông lupus (LA – Lupus anticoagulants) (xem phần Test ức chế thromboplastin của mô). Tuy nhiên, nhìn chung PT tương đối không nhạy với LA vì nồng độ cao PL trong xét nghiệm sẽ trung hòa kháng thể kháng PL.
3. PT là nền tảng cho phương pháp xét nghiệm 1 giai đoạn, được dùng để xác định các yếu tố VII, V, X, II. PT tương đối không nhạy với suy giảm nhẹ các yếu tố.
4. Một số biến thể của FVII (FVII Padua, FVII Yamomoto) có thể đưa ra các giá trị FVII khác nhau, phụ thuộc vào nguồn cung cấp TF (xem phần xét nghiệm FVII)
5. Một PT bình thường không loại trừ được một bất thường đông máu đáng kể, vì PT bình thường trong cả hemophilia A, B nặng hoặc suy giảm FXI nặng.
6. Mọi quan hệ giữa PT và suy giảm yếu tố là không tuyến tính, nhưng nó sẽ kéo dài theo hàm mũ ở nồng độ yếu tố thấp hơn.
7. PT ngắn lại được thấy ở nhiều bệnh nhân sử dụng rVIIa (NovoSeven)
8. Trong lịch sử, PT cũng được thực hiện bằng cách sử dụng nọc độc rắn Russel viper pha loãng (dRVV – tham khảo thêm ở phần xét nghiệm kháng đông lupus) thay cho nguồn TF từ não. Một RVV-PT bình thường nhưng “Brain” PT kéo dài, chỉ ra suy giảm yếu tố VII.
9. PT sẽ kéo dài với các thuốc ức chế trực tiếp Xa và IIa đường uống mới.
10. Chỉ số prothrombin (PI – Prothrombin Index) được tính từ PT chứng/PT bệnh nhân x 100.
11. Phương pháp Owren để đo PT đã được pha loãng trước khi ước tính, thể tích mẫu trong phản ứng hỗn hợp cuối cùng là 5%.

I. GIỚI THIỆU

PT được giới thiệu bởi Quick năm 1935 và thường được gọi là “thời gian Prothrombin của Quick”. PT đã được phát triển để đo Prothrombin (yếu tố II) và do đó trở thành tên gọi cho

test. Tuy nhiên, sau này rõ ràng nó nhạy với bất thường các yếu tố II, V, VII, X và Fibrinogen.

PT khác với APTT, nó đo hoạt tính con đường đông máu ngoại sinh và con đường chung. Việc phân chia dòng thác đông máu thành ngoại sinh, nội sinh, và con đường chung là cổ điển và ít có giá trị trong in vivo, tuy nhiên nó vẫn hữu ích khi diễn giải các kết quả xét nghiệm ở LABO.

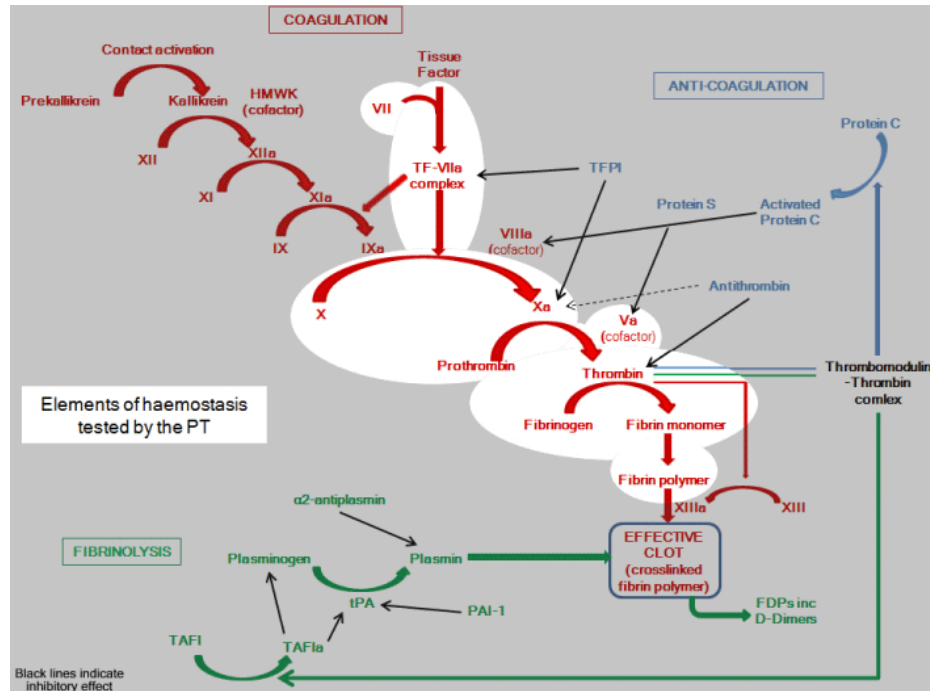
PT là test 1 giai đoạn (One-stage) dựa trên thời gian cần cho cục fibrin tạo thành sau khi thêm yếu tố mô TF (trước đây gọi là tissue thromboplastin), phospholipid, calcium để phục hồi calci, huyết tương nghèo tiểu cầu.

Thuật ngữ Thromboplastin có nguồn gốc dùng để mô tả một cơ chất trong huyết tương giúp chuyển prothrombin thành thrombin. Trong quá khứ, thromboplastin được chiết xuất từ não hoặc những cơ quan khác và những bộ phận này chứa số lượng lớn yếu tố mô TF và phospholipid (PL). TF có tính đặc hiệu loài, hầu hết LABO hiện nay sử dụng TF người tái tổ hợp với ISI gần 1 và tách khỏi nguồn cung chung với PL. Thromboplastin động vật được chiết xuất từ não thỏ.

TF trong lịch sử được xem là yếu tố III khi danh pháp protein đông máu tạo ra.

II. NGUYÊN LÝ

PT đo hoạt tính đông máu của con đường ngoại sinh và con đường chung, vì vậy nó phụ thuộc vào hoạt tính chức năng của các yếu tố VII, X, V, II và Fibrinogen. Sơ đồ sau cho thấy dòng thác đông máu và các yếu tố ảnh hưởng lên PT.



III. PHƯƠNG PHÁP

Huyết tương nghèo tiểu cầu (PPP) được trộn với TF (có chứa phospholipid) ở 37 độ C và cho dư lượng calcium chloride (25mM) vào để khởi động quá trình đông máu. Trong kỹ thuật làm bằng tay, khi calcium được đưa vào, một đồng hồ bấm giây được bấm và dừng khi cục máu đông tạo thành. Thời gian PT được tính từ khi cho calcium vào đến khi tạo thành cục đông fibrin (fibrin clot). Trong các hệ thống tự động, sự tạo thành cục đông được xác định một cách tự động nhưng nguyên lý vẫn như vậy.

Thuốc thử	Giải thích
PPP	Xem phần “Những biến đổi tiền phân tích (Pre-analytical variables)
TF (chứa phospholipid)	TF gắn với FVII và khởi động quá trình đông máu. Phospholipid ngoại sinh được dùng để thay thế phospholipid tiểu cầu.
Calcium	Phục hồi calci.

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

PT thường được thực hiện cùng với một loạt các xét nghiệm khác như APTT và có thể bao gồm TT và Fibrinogen.

Bất thường	Phân tích
PT kéo dài đơn độc	Giảm yếu tố VII.
PT kéo dài cùng với các bất thường đông máu khác	Suy giảm vitamin K Các chất đối kháng vitamin K (như warfarin, phenidione, rodenticides....) Bệnh lý gan Kém hấp thu (dẫn đến suy giảm vitamin K) Nồng độ cao của heparin không phân đoạn Những chất ức chế thrombin trực tiếp như lepirudin, argatroban Bệnh lý mất fibrinogen máu hoặc rối loạn chức năng fibrinogen Rối loạn đông máu do pha loãng (như truyền máu khối lượng lớn) Suy giảm nhiều yếu tố đông máu (như bệnh lý suy giảm FV+VIII) Bất thường chu trình vitamin K (như những đột biến trong gene VKORC1) Bất thường NST (mất gene F7 và F10 định vị trên nhánh dài NST số 13 do mất đoạn, sẽ gây suy giảm yếu tố FVII và FX)
PT ngắn lại	Sau điều trị rVIIa

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Khoảng tham chiếu phụ thuộc vào những vấn đề sau:

- Nguồn yếu tố mô TF (người, thỏ,...)
- Công nghệ thực hiện (bằng tay, máy tự động)
- Phương pháp xác định điểm cuối (quang học, cơ học)

Mỗi LABO nên thành lập một khoảng tham chiếu riêng, tuy nhiên nhìn chung giá trị PT bình thường rơi vào 13-15 giây.

VI. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Trong trường hợp PT kéo dài đơn độc, các xét nghiệm sàng lọc còn lại bình thường (APTT, TT, Fib), test hợp lý nhất theo suy luận được đề nghị là xét nghiệm yếu tố VII.

Suy giảm FVII là hiếm và thường gặp bối cảnh PT kéo dài cùng với các bất thường sàng lọc khác như APTT. Bảng ở trên đã cho thấy các khả năng, từ đó định hướng tiếp cho xét nghiệm. Tiền sử dùng thuốc và thăm khám lâm sàng là tối quan trọng.

Nhớ rằng, Warfarin và những chất kháng vitamin K đường uống khác làm kéo dài PT đáng kể nhưng có thể chỉ kéo dài APTT một vài giây (trừ trường hợp quá liều).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Girolami, A., et al., Factor VII Padua 2: another factor VII abnormality with defective ox brain thromboplastin activation and a complex hereditary pattern. *Blood*, 1979. 54(1): p. 46-53.
2. James, H.L., et al., The dysfunction of coagulation factor VII Padua results from substitution of arginine-304 by glutamine. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1172(3): p. 301-5.
3. Marchetti, G., et al., Detection of two missense mutations and characterization of a repeat polymorphism in the factor VII gene (F7). *Hum Genet*, 1992. 89(5): p. 497-502.
4. Takamiya, O., et al., Factor VII activity and antigen in a patient with abnormal factor VII. *Clin Lab Haematol*, 1988. 10(2): p. 159-65.
5. Quick AJ. The Thromboplastin Reagent for the Determination of Prothrombin. *Science*. 1940;92(2379):113-4.

Bài 2. ACTIVATED PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME (APTT)

1. Chất hoạt hóa APTT như kaolin, silica,... nên được chọn lọc để đảm bảo rằng phản ứng đủ nhạy để phát hiện suy giảm nhẹ các yếu tố VIII, IX, XI (mức 0,35-0,4IU/ml). Không có chất hoạt hóa nào đủ nhạy để xác định suy giảm yếu tố ở mức độ rất nhẹ (mức 0,4-0,5IU/ml) và một APTT bình thường không loại trừ được những trường hợp suy giảm yếu tố nhẹ.
2. Nếu phương pháp đo mật độ quang được sử dụng để theo dõi cục máu đông, APTT có thể bình thường giả tạo nếu huyết tương bệnh nhân đục (như tăng bilirubin máu, tăng lipid máu)
3. Dạng sóng hai pha: việc sử dụng phương pháp quang học cho phép cả định tính và định lượng mức ánh sáng truyền qua dựa trên dạng sóng thu được, không đơn thuần là một con số về thời gian đơn độc. Đánh giá phổ biến nhất của hình ảnh này là dạng sóng APTT hai pha gặp ở bệnh nhân DIC. Dạng sóng này do sự tạo thành một phức hợp đại phân tử giữa CRP và VLDL. Dạng sóng hai pha là nhạy và đặc hiệu trong DIC, mặc dù nó cũng nhìn thấy trong những tình trạng khác mà không đủ tiêu chuẩn chẩn đoán DIC, dù sao thì những trường hợp này cho bằng chứng về một bệnh lý đông máu.
4. Suy giảm FXIII không làm kéo dài PT cũng như APTT.
5. APTT có thể dùng để xác định kháng thể kháng PL (như LA) những trường hợp này, thuốc thử sử dụng phải nhạy với LA và nồng độ thấp PL.
6. Khi chọn PL để xét nghiệm APTT, điều quan trọng cần lựa chọn thuốc thử nhạy với suy giảm yếu tố. Một số LABO chọn thuốc thử APTT kém nhạy với LA (nếu có) để tránh nó ảnh hưởng đến các yếu tố. Trong những trường hợp như vậy, một thuốc thử thay thế cần được sử dụng nếu APTT được dùng để sàng lọc LA.
7. APTT có thể làm cho xét nghiệm suy giảm yếu tố tăng hoặc giảm độ nhạy cũng như độ đặc hiệu phụ thuộc vào các thời gian ủ khác nhau. Ví dụ, một thời gian ủ ngắn khoảng 2 phút làm test rất nhạy trong xác định mức của các yếu tố tiếp xúc trong khi một thời gian ủ dài làm cho việc xác định các yếu tố này rất kém nhạy. Nhiều LABO ấn định thời gian ủ là 5 phút. Nếu nghi ngờ suy giảm yếu tố tiếp xúc, so sánh kết quả với thời gian ủ ngắn hơn và dài hơn có thể hữu ích. Một điều thú vị

cần chú ý là mức độ kéo dài của APTT có thể gợi ý bất thường bên dưới. Ví dụ APTT kéo rất dài >120 giây thì phù hợp với suy giảm yếu tố tiếp xúc hơn là FVIII hay IX. Ngược lại, một APTT trong vùng 70-80 giây thì phù hợp để giữ chẩn đoán haemophilia A hoặc B thể nặng hơn là suy giảm yếu tố tiếp xúc. Điều này được minh họa qua ví dụ người A: FXII:C<1 IU/dL (các xét nghiệm khác bình thường), APTT 180s; người B: FVIII:C<1 IU/dL (những xét nghiệm khác bình thường), APTT 75s.

8. APTT thường được dùng để theo dõi bệnh nhân sử dụng heparin không phân đoạn (UFH). Tuy nhiên APTT rất nhạy với mức yếu tố VIII – một protein pha cấp. Nếu FVIII tăng thì APTT có thể ngăn lại một cách nhầm lẫn và không phản ánh đúng mức chống đông. Những trường hợp này, xét nghiệm anti-Xa nên được sử dụng để theo dõi dùng chống đông.
9. APTT là nền tảng cho xét nghiệm các yếu tố VIII, IX, XI và XII. Mặc dù yếu tố II, V, X cũng có thể xác định bằng hệ thống dựa vào APTT, nhưng nó chủ yếu dùng phương pháp dựa vào PT 1 giai đoạn.
10. APTT được dùng để sàng lọc sự hiện diện của một số chất ức chế các yếu tố đông máu bao gồm FVIII và FIX.
11. Ở bệnh nhân nhận được nồng độ rất cao UFH (như trong phẫu thuật bắt cầu tim phổi) APTT có thể không xác định được. Trong những trường hợp này, theo dõi tình trạng heparin hóa bằng một xét nghiệm khác – thường là thời gian cục máu đông hoạt hóa (ACT – Activated Clotting Time)
12. Ở bệnh nhân sử dụng UFH và dùng APTT để theo dõi, rất quan trọng cần phải tách huyết tương khỏi các tế bào máu trong vòng 60 phút từ lúc thu thập. Yếu tố 4 tiểu cầu (PF4 – Platelet factor 4) tiết ra từ tiểu cầu sẽ trung hòa heparin và dẫn đến giảm giả tạo APTT và vì vậy không ước đoán chính xác mức độ heparin hóa.
13. Máu được thu thập vào EDTA và được xử lý như một mẫu huyết tương chứa citrate, tương tự như chất ức chế yếu tố VIII. APTT kéo dài và thất bại để trở về bình thường khi làm mix test với huyết tương bình thường, mức FVIII:C giảm nhưng FIX và VWF bình thường.
14. Ribaroxaban và Dabigatran sẽ kéo dài APTT.

I. GIỚI THIỆU

APTT khác với PT, nó đo hoạt tính con đường đông máu nội sinh và con đường chung. Việc phân chia dòng thác đông máu thành ngoại sinh, nội sinh, và con đường chung là cổ điển và ít có giá trị trong in vivo, tuy nhiên nó vẫn hữu ích khi diễn giải các kết quả xét nghiệm ở LABO.

Thuật ngữ Thromboplastin trong test này chỉ việc tạo thành một phức hợp từ nhiều yếu tố khác nhau trong huyết tương, có chức năng chuyển prothrombin thành thrombin và tiến tới tạo cục máu đông.

Thuật ngữ “Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)” xuất phát từ dạng ban đầu của test này (giới thiệu năm 1953) trong đó chỉ có nồng độ phospholipid trong test được kiểm soát (chống lại nồng độ phospholipid và các chất hoạt hóa bề mặt) và tên gọi “partial thromboplastin” được dùng trong lúc chuẩn bị phospholipid, thứ mà có thể gia tốc cục máu đông nhưng không thể điều chỉnh thời gian đông máu bị kéo dài ở huyết tương bệnh nhân ưa chảy máu. Về bản chất, thuật ngữ “partial” có ý nghĩa rằng chỉ có sự hiện diện phospholipid mà không có TF.

APTT còn được biết đến như là:

1. Thời gian đông máu Kaolin Cephalin (KCCT – Kaolin Cephalin Clotting Time), dùng nhằm nhận với thời gian đông máu Kaolin (KCT – Kaolin Clotting Time) là một test sàng lọc cho LA nhưng không chứa Cephalin. Cephalin là một chất thay thế phospholipid tiểu cầu.
2. Thời gian Thromboplastin từng phần với Kaolin (PTTK – Partial Thromboplastin Time with Kaolin)

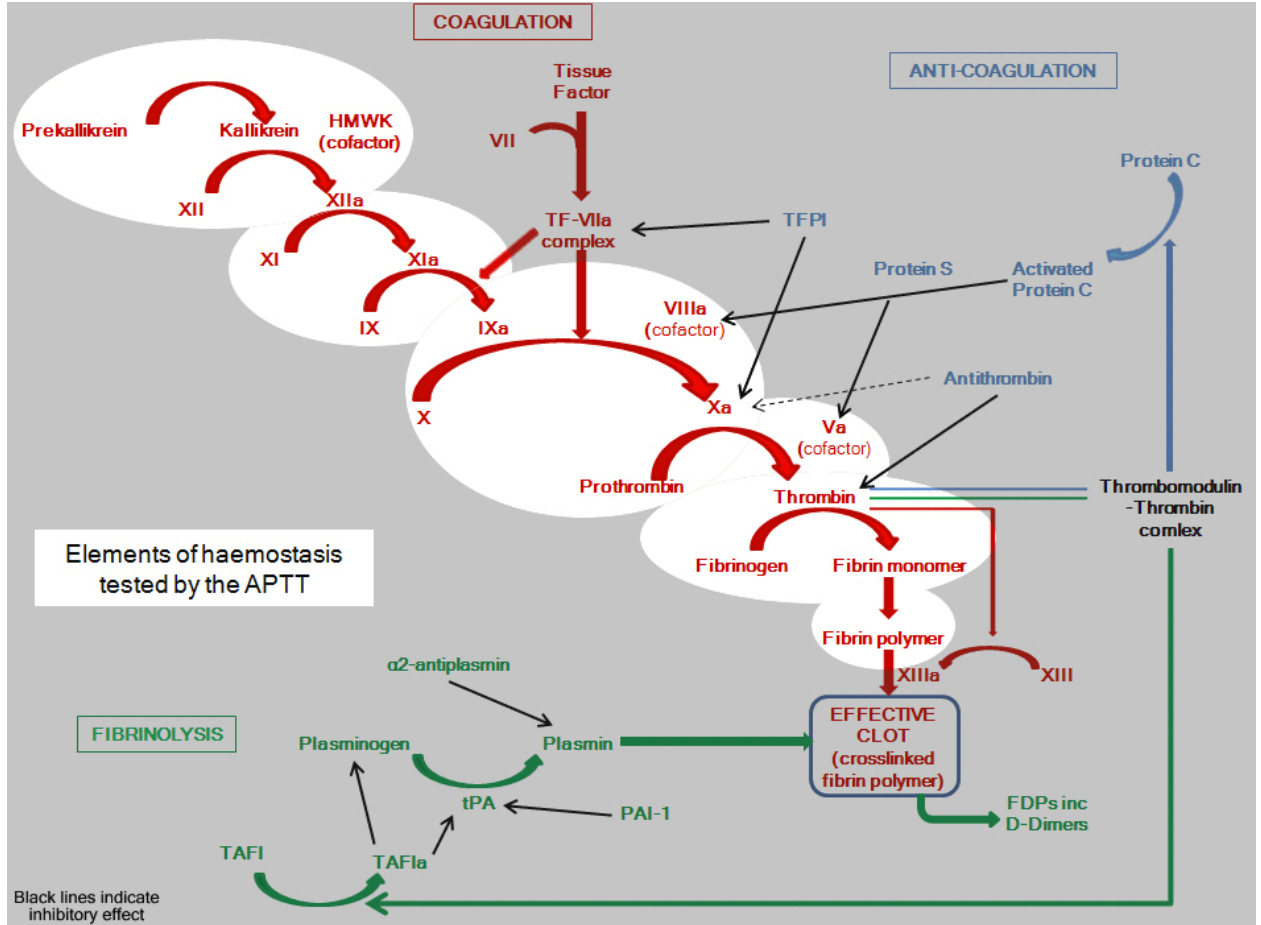
Trong lịch sử, Kaolin được dùng như một chất hoạt hóa bề mặt. Nó gắn trực tiếp với FXII dẫn đến sự hoạt hóa trên bề mặt thành XIIa. XIIa cắt XI thành XIa nhưng trong tình trạng thiếu calcium, sự hoạt hóa những yếu tố kế tiếp không xảy ra. Kaolin hiếm khi được dùng khi APTT được đo tự động vì khả năng cản quang của nó làm khó khăn cho việc xác định điểm cuối bằng quang học, Những chất hoạt hóa phổ biến được dùng trong các hệ thống phân tích tự động gồm silica và ellagic acid ở kích thước micro.

Cephalin là một chất thay thế phospholipid, nó thay cho phospholipid tiểu cầu trong test này (một điều cần nhớ rằng test này sử dụng huyết tương nghèo tiểu cầu vì vậy đòi hỏi phải bổ sung phospholipid để quá trình đông máu có thể xảy ra)

II. NGUYÊN LÝ

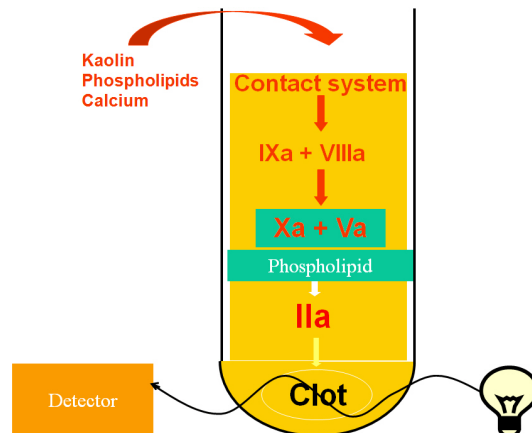
Huyết tương nghèo tiểu cầu (PPP) được ủ ở 37 độ C, sau đó phospholipid (cephalin) và chất hoạt hóa tiếp xúc (như Kaolin, silica hoặc ellagic acid micro hóa) được cho vào, theo sau bởi calcium (tất cả đều được làm ấm 37 độ C trước). Thêm calcium bắt đầu khởi động đông máu và bắt đầu đo thời gian. APTT là thời gian tính từ lúc cho calcium vào đến khi tạo thành cục máu đông.

Hầu hết LABO hiện này đo APTT bằng phương pháp tự động, việc xác định điểm cuối dựa vào mức ánh sáng đi qua ở một ngưỡng nhất định. Sơ đồ sau cho thấy dòng thác đông máu và các yếu tố ảnh hưởng lên APTT.



III. PHƯƠNG PHÁP

Sơ đồ APTT được trình bày bên dưới:



Huyết tương nghèo tiểu cầu (PPP) được ủ ở 37 độ C, sau đó phospholipid (cephalin) và chất hoạt hóa tiếp xúc (như Kaolin) được cho vào, theo sau bởi calcium (tất cả đều được làm ấm 37 độ C trước). Thêm calcium bắt đầu khởi động đông máu và bắt đầu đo thời gian. APTT là thời gian tính từ lúc cho calcium vào đến khi tạo thành cục máu đông. Thời gian ủ dao động từ 2 đến 10 phút (xem phần bình luận)

Thuốc thử	Giải thích
PPP	Xem phần “Những biến đổi tiền phân tích (Pre-analytical variables)
Chất hoạt hóa bề mặt	Kaolin, Micronized silica, Celite, Ellagic acid
Phospholipid	Như Cephalin – để thay thế phospholipid tiểu cầu.
Calcium	Calcium cần cho đông máu xảy ra. Khi mẫu máu được thu thập, calcium bị loại bỏ bằng quá trình chelate hóa khi nó tiếp xúc với sodium citrate và tái phục hồi calcium là cần cho đông máu xảy ra trở lại

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

APTT thường được thực hiện cùng với một loạt các xét nghiệm khác như PT và có thể bao gồm TT và Fibrinogen.

Bất thường	Phân tích
APTT kéo dài đơn độc	<ul style="list-style-type: none"> - Suy giảm các yếu tố hoặc XII, XI, IX và VIII. Tuy nhiên, APTT có thể bình thường nếu chỉ suy giảm nhẹ các yếu tố này. Nhìn chung, mức yếu tố phải dưới 20-40% thì APTT mới kéo dài (xem phần bình luận để biết về ảnh hưởng của thời gian ủ). - Suy giảm yếu tố tiếp xúc (như suy giảm prekallikrein) - Chất ức chế yếu tố đông máu mắc phải – phổ biến nhất là chống lại trực tiếp FVIII và có thể là tự kháng thể (như Haemophilia A] hoặc dị kháng thể (trong Haemophilia A nặng phơi nhiễm với FVIII ngoại sinh như dùng FVIII cô đặc để điều trị chảy máu). Chất ức chế chống lại các yếu tố khác hiếm, nhưng cũng có thể xảy ra (như FV). - Kháng đông lupus (LA) – LA chống lại phospholipid và có thể dẫn đến APTT kéo dài đơn độc. Mặc dù PT cũng đòi hỏi phospholipid, nhưng nồng độ phospholipid thường cao, đủ để trung hòa LA, nên PT không kéo dài.
PT kéo dài cùng với APTT	<ul style="list-style-type: none"> - Suy giảm vitamin K - Bệnh gan do: <ul style="list-style-type: none"> + Kém hấp thu vitamin K (một vitamin hòa tan trong chất béo) và có thể dẫn đến giảm gamma carboxyl hóa những yếu tố đông máu phụ thuộc vitamin K. + Giảm tổng hợp các yếu tố đông máu.

	<p>+ Một rối loạn fibrinogen máu mắc phải do thay đổi thành phần sialic acid của fibrinogen. Điều này tương tự hiện tượng nhìn thấy ở trẻ mới sinh, nên còn gọi là “fibrinogen bào thai”</p> <p>- Chất ức chế thrombin trực tiếp gồm Hirudin, Argatroban và Dabigatran.</p> <p>- DIC (do tiêu thụ các yếu tố)</p> <p>- Truyền máu khối lượng lớn dẫn đến bệnh lý đông máu do pha loãng</p> <p>- Ở bệnh nhân sử dụng liệu pháp tiêu sợi huyết, APTT có thể kéo dài do giảm mức fibrinogen.</p> <p>- Trong suy giảm nhiều yếu tố đông máu, APTT trở nên kéo dài với sự giảm không nặng trong mỗi yếu tố.</p> <p>- Suy giảm kết hợp các yếu tố (như bệnh suy giảm FV+VIII)</p> <p>- Suy giảm yếu tố con đường chung, FII, FV, FX, Fibrinogen.</p>
APTT tăng rõ so với PT	<p>- UFH: nó làm kéo dài đáng kể APTT nhưng PT thường chỉ kéo dài nhẹ. Trong trường hợp UFH quá nhiều, PT cũng kéo dài.</p> <p>- Kháng thể kháng phospholipid (trong một số trường hợp PT cũng có thể kéo dài mặc dù không phổ biến vì nồng độ PL cao trong thuốc thử PT)</p> <p>- Chất ức chế yếu tố đông máu mắc phải như FV, FX</p>
PT kéo dài rõ so với APTT	<p>Warfarin – APTT có thể chỉ kéo dài nhẹ vài giây ở bệnh nhân sử dụng chống đông warfarin ổn định, nhưng ở bệnh nhân quá liều APTT cũng kéo dài đáng kể.</p>
APTT ngắn	<p>- Một phản ứng pha cấp sẽ làm tăng FVIII lên cao (xem phần bình luận số 8).</p> <p>- Trở ngại trong thu thập mẫu máu dẫn đến hoạt hóa đông máu ngay trong ống thu thập.</p>

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Thời gian đông đối với APTT nằm trong khoảng 27-35 giây. Tuy nhiên, giá trị này biến thiên giữa các LABO và phụ thuộc vào một số các yếu tố bao gồm phương pháp đo (cơ học hay tự động), loại chất hoạt hóa cũng như thời gian ủ.

VI. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

1. Mix test (nghiên cứu hỗn hợp: Mix study) Trộn huyết tương bệnh nhân với huyết tương người bình thường với tỷ lệ 1:1 có thể giúp phân biệt giữa suy giảm yếu tố và tồn tại chất ức chế. Nếu mix test không điều chỉnh được APTT rút ngắn khoảng 3-4 giây thì điều này dẫn đến nghi vấn cao:
 - a. Một chất ức chế yếu tố đông máu như kháng thể kháng FVIII mắc phải
 - b. Kháng thể kháng phospholipid như kháng đông lupus

Trong thực hành, nhiều LABO hiện đại, nghiên cứu mix test được thay thế bởi xét nghiệm yếu tố và sàng lọc LA là một quá trình hoàn toàn tự động.

Nghiên cứu hỗn hợp đã được điều tra mở rộng bởi Chang và cs (xem tài liệu tham khảo) và đưa đến công thức được dùng để tính phần trăm hiệu chỉnh của APTT hoặc PT kéo dài trong tỷ lệ hỗn hợp 4:1 với huyết tương chứng, cho thấy độ nhạy và đặc hiệu tốt hơn nhiều trong việc xác định kháng đông và suy giảm yếu tố, cũng như tốt hơn so với tỷ lệ 1:1. Phần trăm hiệu chỉnh (Percent Correction) được tính theo công thức sau:

$$\text{Percent Correction} = \frac{\text{PP PT [or APTT]} - 50 : 50 \text{ Mix PP PT [or APTT]}}{\text{PP PT [or APTT]} - \text{CNP PT [or APTT]}} \times 100$$

Trong đó PP (Patient Plasma) là huyết tương bệnh nhân và CNP (Control Normal Plasma) là huyết tương chứng.

Bảng sau tóm tắt diễn giải kết quả APTT trong nghiên cứu hỗn hợp tỷ lệ 4:1

% hiệu chỉnh trước ủ	% hiệu chỉnh sau ủ	Hướng đến
≥50%	>10%	Suy giảm yếu tố
<50%	>10%	Suy giảm yếu tố nhẹ
≥50%	≤10%	Chât ức chế yếu tố
<50%	≤10%	Kháng đông lupus

2. Dựa vào báo phân tích kết quả ở trên, tùy bối cảnh hướng đến để đề nghị xét nghiệm phù hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chopin, N., et al., Activated partial thromboplastin time waveform analysis: a new tool to detect infection? Crit Care Med, 2006. 34(6): p. 1654-60.
2. Dempfle, C.E., et al., Utility of activated partial thromboplastin time waveform analysis for identification of sepsis and overt disseminated intravascular coagulation in patients admitted to a surgical intensive care unit. Crit Care Med, 2004. 32(2): p. 520-4.
3. Smith, E.Y., L.A. Charles, and E.M. Van Cott, Biphasic activated partial thromboplastin time waveform and adverse events in non-intensive care unit patients. Am J Clin Pathol, 2004. 121(1): p. 138-41.
4. Toh, C.H. and A.R. Giles, Waveform analysis of clotting test optical profiles in the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation (DIC). Clin Lab Haematol, 2002. 24(6): p. 321-7.
5. Toh, C.H., et al., Biphasic transmittance waveform in the APTT coagulation assay is due to the formation of a Ca(++)-dependent complex of C-reactive protein with very-low-

density lipoprotein and is a novel marker of impending disseminated intravascular coagulation. *Blood*, 2002. 100(7): p. 2522-9.

6. Toh, C.H., et al., Early identification of sepsis and mortality risks through simple, rapid clot-waveform analysis. Implications of lipoprotein-complexed C reactive protein formation. *Intensive Care Med*, 2003. 29(1): p. 55-61.

8. Margolis J. The Kaolin Clotting Time: a rapid one-stage method for diagnosis of coagulation defects. *Journal Of Clinical Pathology*. 1958;11(5):406-9.

9. Chang, S.H., et al. (2002) A "percent correction" formula for evaluation of mixing studies. *Am J Clin Pathol*, 117, 62-73.

THROMBIN TIME (TT)

1. Sử dụng TT để theo dõi điều trị UFH: TT là một xét nghiệm dựa trên tạo thành cục máu đông (clot-based assay), vì vậy trong quá khứ, một số LABO sử dụng TT để theo dõi điều trị UFH. Điều này được thực hiện bằng cách cho một lượng thrombin đã biết vào PPP và đo thời gian tạo thành cục máu đông. Dưới những điều kiện nhất định, heparin tạo ra sự kéo dài TT phụ thuộc liều, có đồ thị dạng nửa logarit (semi-log). Hiện nay, nó không còn được sử dụng cho mục đích này, mà thay bằng APTT.
2. Đối với bệnh nhân phẫu thuật bắt cầu tim phổi, nhận được một lượng lớn UFH (8-10IU/mL) nghĩa là cả TT và APTT đều không xác định được do cục máu đông không thể hình thành, và những xét nghiệm khác cần được thực hiện để theo dõi mức độ chống đông. Trong trường hợp đó, người ta sử dụng ACT (Activated Clotting Time, đọc ở phần Miscellaneous Tests). Ở bệnh nhân có APTT kéo dài trước khi phẫu thuật bắt cầu, như bệnh nhân suy giảm nặng yếu tố XII, ACT có thể nhầm lẫn. Khi đó đo mức anti-Xa có thể có giá trị.
3. TT thường được dùng để xác định có hay không sự hiện diện của heparin trong mẫu máu, trước khi nó được đem đi sử dụng cho các xét nghiệm đông máu phức tạp hơn. Một mẫu máu với TT kéo dài và thời gian reptilase (Reptilase Time) bình thường, hầu như có thể kết luận sự có mặt của UFH.
4. Một số test khác có thể dùng để kết luận có hay không sự hiện diện của heparin trong một mẫu với TT kéo dài gồm: Test hiệu chỉnh Protamine sulfate và Test xanh Toluidine.
5. Protamine sulphate là một thuốc thử tích điện dương, sẽ trung hòa UFH (và FDP). Ngược lại Xanh Toluidine cũng sẽ hiệu chỉnh thời gian TT kéo dài ở một số trường hợp rối loạn fibrinogen máu.

I. GIỚI THIỆU

Thrombin Time (hay Thrombin Clotting Time) là một xét nghiệm được thực hiện một cách rộng rãi mặc dù nó không cần thiết trong danh sách các xét nghiệm sàng lọc. Reptilase Time (RT) cũng là một test được thực hiện phổ biến, tương tự như TT nhưng sử dụng chất hoạt hóa khác (nọc độc rắn độc chứ không phải là thrombin)

*Reptilase là một enzyme tìm thấy trong nọc độc của rắn Bothrops, có hoạt tính tương tự thrombin. Không như thrombin, reptilase đề kháng với sự ức chế của antithrombin III, vì vậy RT không kéo dài trong mẫu máu có chứa heparin, hirudin, hoặc chất ức chế thrombin trực tiếp (DTI)

II. NGUYÊN LÝ

TT chỉ liên quan đến việc cho thrombin của người hoặc của bò vào PPP. Vì vậy nó phản ánh sự chuyển fibrinogen thành fibrin, nhưng nó cũng nhạy để xác định sự hiện diện của một số chất ức chế trong huyết tương như heparin.

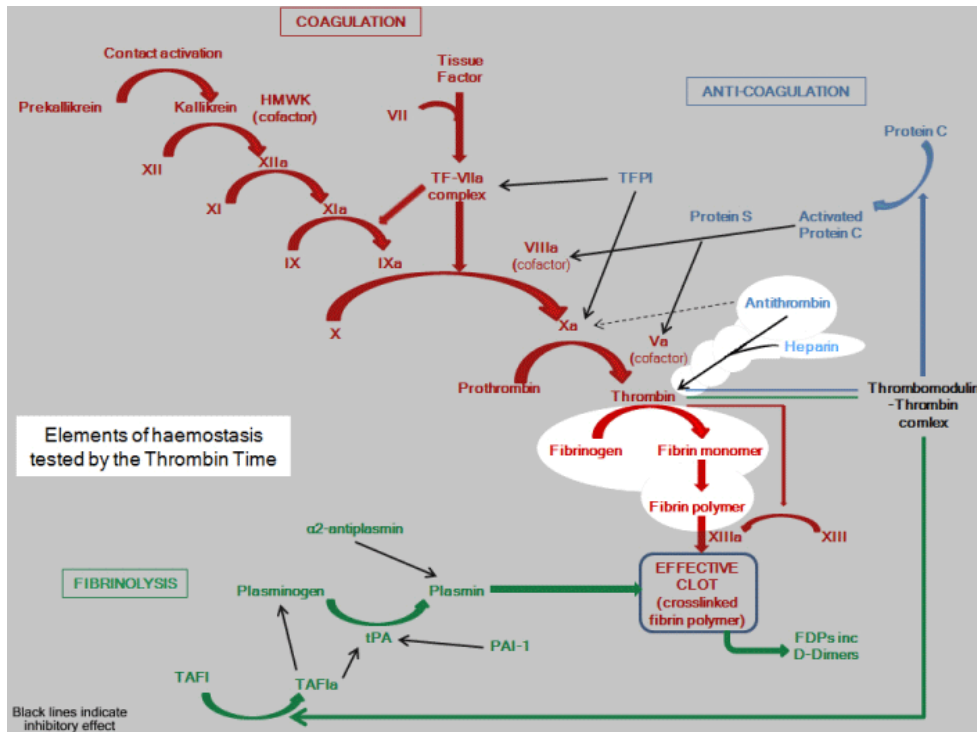
TT cắt fibrinogen, tiết ra fibrinopeptide A (FpA) và fibrinopeptide B (FpB). Sản phẩm phân cắt chính, FpA được từ từ fibrinogen sau amino acid 16 hoặc đôi lúc là 19 và FpB là sản phẩm được cắt ra tại amino acid số 14.

III. PHƯƠNG PHÁP

Thrombin người (hoặc bò) được cho vào PPP tại 37 độ C và thời gian tạo thành cục đông của fibrin được ghi lại. Phục hồi calcium huyết tương là không cần thiết.

Thuốc thử	Giải thích
PPP	Xem phần “Những biến đổi tiền phân tích (Pre-analytical variables)”
Thrombin người hoặc bò (IIa)	Trong quá khứ Thrombin bò thường được sử dụng, nhưng hiện nay hầu hết đã được thay thế bằng thrombin người.

Sơ đồ bên dưới cho thấy những giai đoạn liên quan đến TT



IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Nhìn chung, TT sẽ kéo dài khi mức fibrinogen có chức năng <1 g/L .

Bất thường	Phân tích
Suy giảm fibrinogen bẩm sinh	- Bệnh không có hoặc giảm mức fibrinogen máu (afibrinogen/hypofibrinogen) - Bệnh rối loạn chức năng (dysfibrinogen) hoặc cả số lượng và chức năng (hypo-dysfibrinogen) mức fibrinogen máu.
Suy giảm fibrinogen mắc phải	- DIC - Sau liệu pháp tiêu sợi huyết - Bệnh gan - Bệnh ác tính
Một số thuốc chống đông làm kéo dài TT	- UFH - LMWH không gây kéo dài TT trừ trường hợp nồng độ rất cao - Hirudin - Argatroban - Warfarin không ảnh hưởng lên TT - TT không được khuyến cáo sử dụng để theo dõi các chất ức chế thrombin trực tiếp.
Tăng mức FDP	Điều này tương tác với sự polyme hóa của fibrin, và ở nồng độ cao có thể dẫn đến kéo dài TT.
Paraprotein	Có thể tương tác với sự polymer hóa fibrin, gây kéo dài TT.
Giảm albumin máu	Điều này có thể dẫn đến kéo dài cả TT và reptilase time. Sự kéo dài này là một hiện tượng xảy ra trong in vitro, và có thể hiệu chỉnh thời gian TT và RT bằng cách tăng nồng độ albumin trong ống nghiệm.
Amyloidosis	Kéo dài cả TT và RT cũng thấy trong bệnh nhân amyloidosis, do ức chế sự chuyển fibrinogen thành fibrin.
Phối nhiễm với thrombin bò	Bệnh nhân đã phối nhiễm với thrombin bò, có nguy cơ phát sinh chất ức chế làm kéo dài TT phụ thuộc thrombin bò. Nếu kháng thể phản ứng chéo với thrombin người, TT phụ thuộc thrombin người cũng có thể kéo dài. RT bình thường với những chất ức chế này.
Những chất chống đông bệnh lý	Những chất chống đông giống heparin đã được báo cáo (dù hiếm) ở những bệnh nhân có bệnh lý ác tính hoặc những rối loạn khác, dẫn đến PT kéo dài nhưng RT bình thường.
Tăng fibrinogen máu	Tăng fibrinogen máu đôi lúc có thể liên kết với TT (và RT) kéo dài. Cơ chế chưa rõ nhưng có thể phản ánh tương tác giữa liên kết fibrin và lượng fibrinogen quá mức.
Fibrinogen bào thai (Fetal fibrinogen)	TT ở trẻ sơ sinh thường kéo dài do sự hiện diện fetal fibrinogen. Rất quan trọng phải nhớ rằng khi điều tra hemostasis ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, phải sử dụng khoảng tham chiếu thích hợp.

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Mỗi LABO phải xây dựng một khoảng tham chiếu riêng, nhìn chung TT nằm trong khoảng 13-15 giây.

VI. THROMBIN TIME LIỀU CAO (HiTT – High Dose Thrombin Time)

HiTT là một biến thể của TT, sử dụng một lượng lớn thrombin để đánh giá UFH ở liều được sử dụng trong phẫu thuật bắt cầu (CPB). HiTT đánh giá giai đoạn cuối cùng của con đường đông máu, chuyển fibrinogen thành fibrin và vì vậy, ít bị ảnh hưởng bởi các biến số tác động lên ACT. Ngược lại với ACT, HiTT không bị ảnh hưởng bởi các thuốc tiêu sợi huyết, hạ thân nhiệt, pha loãng máu, giảm nhẹ fibrinogen hoặc mức cao FDP. Tuy nhiên, test này không thể dùng để đo mức nền ở các mẫu máu không có chất chống đông vì nồng độ cao thrombin dẫn đến thời gian tạo cục đông rất ngắn, không thể đo được. Hạn chế này có thể vượt qua bằng cách thực hiện TT chuẩn, chứa nồng độ thấp thrombin.

VII. XÉT NGHIỆM ỨC CHẾ THROMBIN HEMOCLOT (Hemoclot Thrombin Inhibitor Assay)

Hemoclot Thrombin Inhibitor Assay là một xét nghiệm định lượng, dựa vào tạo cục máu đông để đo Hirudin và những chất ức chế thrombin trực tiếp khác (Direct Thrombin Inhibitors –DIT) bao gồm Argatroban và Dabigatran. Xét nghiệm bằng cách trộn hỗn hợp huyết tương bệnh nhân pha loãng (mức pha loãng tùy thuộc vào nồng độ DTI, ví dụ, nồng độ cao thì pha loãng 1:20; nồng độ thấp thì 1:8) với huyết tương người bình thường. Cục máu đông bắt được tạo ra khi cho một lượng cố định (nhưng đủ dư) α thrombin và đo thời gian tạo cục máu đông. Thời gian tạo cục máu đông tỷ lệ trực tiếp với nồng độ của chất ức chế trực tiếp thrombin hiện diện trong huyết tương. Một đường cong chuẩn được xây dựng từ hàng loạt huyết tương của người bình thường với các mức nồng độ DTI khác nhau. Trên đồ thị, nồng độ DTI trên trục X, thời gian cục máu đông trên trục Y. Từ đồ thị này nồng độ của DTI có thể xác định.

VIII. TÓM TẮT CÁC XÉT NGHIỆM HỖN HỢP VỚI TT

TT được hiệu chỉnh với:			
Huyết tương thường	Xanh Toluidine	Protamine Sulphate	Giải thích
Không	Có	Có	Hiện diện heparin
Có	Không	Không	Thiếu fibrinogen
Thay đổi	Không	Có	Mức cao FDP
Thay đổi	Không	Có	Một số rối loạn fibrinogen

Xanh Toluidine là một chất gắn và ức chế heparin, hiếm được sử dụng ngày nay. Protamin sulfate là protein tích điện dương gắn và trung hòa heparin, làm mất hoạt tính chống đông của nó. Trong thực hành, phản ứng hiệu chỉnh hiếm khi được thực hiện. RT được sử dụng phổ biến để loại trừ tạp nhiễm heparin trong trường hợp TT kéo dài một cách bí ẩn.

IX. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Bảng sau tóm tắt những nguyên nhân làm TT và/hoặc RT kéo dài. Điều này có thể có ích cho việc hướng dẫn đưa ra quyết định tiếp theo tùy bối cảnh lâm sàng.

	Thrombin Time	Reptilase Time
Hiện diện UFH	Tăng (T)	Bình thường (BT)
Hiện diện LMWH	Có thể kéo dài ở một số trường hợp	BT
Hiện diện DTI	Tăng	BT
Warfarin	BT	BT
Giảm/mất fibrinogen	T	T
Rối loạn fibrinogen máu	T	T
DIC	T	T
Bệnh gan	T	T
Chất chống đông giống heparin	T	BT
Paraprotein trong máu	T	T
Liệu pháp tiêu sợi huyết	T	T
Sơ sinh	T	T
Amyloid	T	T
Tăng fibrinogen máu	T	T
Giảm albumin máu	T	T

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. For a discussion of fibrinogen structure and sites of the thrombin (and plasmin) cleavage sites - see: www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm.
2. Kramer, B., et al., Screening of dysfibrinogenaemia using the fibrinogen function versus antigen concentration ratio. *Thromb Res*, 1994. 76(6): p. 577-9.
3. Lee, M.T., et al., Transient hemorrhagic diathesis associated with an inhibitor of prothrombin with lupus anticoagulant in a 1 1/2-year-old girl: report of a case and review of the literature. *Am J Hematol*, 1996. 51(4): p. 307-14.
4. Abshire, T.C., et al., The prolonged thrombin time of nephrotic syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1995. 17(2): p. 156-62.
5. Gandrille, S., et al., A study of fibrinogen and fibrinolysis in 10 adults with nephrotic syndrome. *Thromb Haemost*, 1988. 59(3): p. 445-50.
6. Toulon, P., et al., Fibrin polymerization defect in HIV-infected patients--evidence for a critical role of albumin in the prolongation of thrombin and reptilase clotting times. *Thromb Haemost*, 1995. 73(3): p. 349-55.

Bài 4. FIBRINOGEN (FIB)

1. Nếu phương pháp mật độ quang được sử dụng để theo dõi cục máu đông, kết quả đọc thấp giả tạo có thể xảy ra nếu huyết tương bệnh nhân bị đục (tăng bilirubin, tăng lipid máu)
2. Ở những nơi có thể, xét nghiệm không nên được thực hiện trong vòng 4 giờ ở những mẫu máu từ người có sử dụng UFH hoặc mẫu máu lấy từ đường truyền động mạch/ tĩnh mạch có chứa heparin.
3. Nồng độ cao của UFH (>0.8 IU/mL) có thể dẫn đến đánh giá thấp mức fibrinogen thật sự.
4. Khi đồng thời xét nghiệm miễn dịch và chức năng fibrinogen được thực hiện, cùng tiêu chuẩn nên được xác định để đảm bảo các kết quả có thể so sánh.
5. Xác định fibrinogen dựa vào PT tương đối dễ và rẻ tiền, nên được thực hiện phổ biến. Tuy nhiên, nó phụ thuộc cao vào thuốc thử cũng như máy phân tích, vì vậy kết quả không thể so sánh giữa các LABO cũng như giữa các thời điểm nếu LABO đó thay đổi hóa chất hoặc nâng cấp máy. Y văn cũng ghi nhận phương pháp này đánh giá quá mức lượng fibrinogen trong một số tình huống như DIC hoặc suy gan. Khuyến cáo ở Anh hiện tại không sử dụng phương pháp này trong thực hành huyết học thường quy.
6. Hiệu giá fibrinogen là xét nghiệm hiếm khi được dùng, trong đó huyết tương được pha loãng ở nhiều mức với dung dịch đệm trước khi thêm vào thrombin. Hiệu giá được báo cáo tại độ pha loãng cuối cùng mà tạo ra được cục máu đông sau một khoảng thời gian nhất định. Test này mất thời gian, không chính xác và không được khuyến cáo.
7. Nhớ rằng có thể mức fibrinogen thấp một cách đáng kể với PT và APTT bình thường – đừng nhầm lẫn trong suy nghĩ rằng mức Fibrinogen bình thường ở người có PT và APTT bình thường.

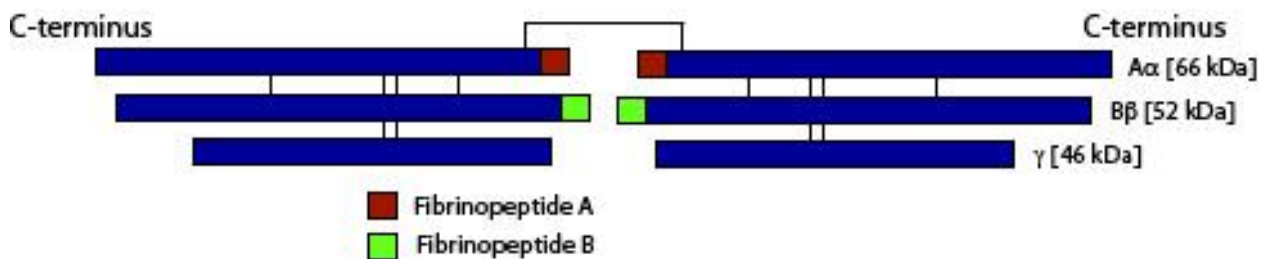
I. GIỚI THIỆU

Khiếm khuyết fibrinogen có thể là về số lượng (giảm hoặc tăng fibrinogen máu) hoặc chất lượng (rối loạn chức năng fibrinogen máu – dysfibrinogenaemia). Rối loạn chức năng fibrinogen máu di truyền là bệnh hiếm gặp với chỉ 250-300 case được báo cáo trên toàn thế

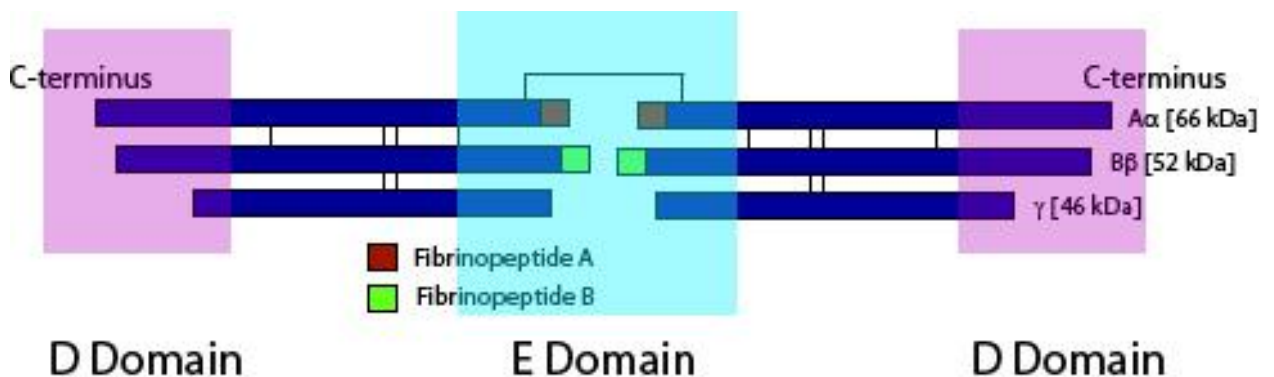
giới nhưng một suy giảm chức năng fibrinogen mắc phải thì phổ biến hơn, đặc biệt trong bệnh lý gan, khi mà phân tử fibrinogen được glycosyl hóa quá mức làm ảnh hưởng đến hoạt động chức năng của nó. Tăng mức FDP cũng ảnh hưởng đến hoạt động của fibrinogen.

Mức fibrinogen là một thành phần hữu ích trong điều tra xu hướng dễ chảy máu hoặc PT/APTT kéo dài không giải thích được. Tăng mức Fibrinogen có tương quan với tăng nguy cơ huyết khối trên các nghiên cứu dân số, mặc dù ý nghĩa của nó trên mỗi bệnh nhân là không rõ.

Cấu trúc của Fibrinogen được trình bày bên dưới



Fibrinogen gồm 3 bộ đôi polypeptide: 2 chuỗi $A\alpha$, 2 chuỗi $B\beta$ và 2 chuỗi γ . Chúng liên kết với nhau bởi 29 cầu nối disulphide theo cách mà vùng N tận của 6 chuỗi polypeptide gặp nhau tạo thành domain E ở trung tâm. Vùng C tận của 3 chuỗi mỗi bên, xoắn lại với nhau theo kiểu α -helix, tạo ra domain D ở 2 đầu, cho ra cấu trúc đặc trưng của fibrinogen.



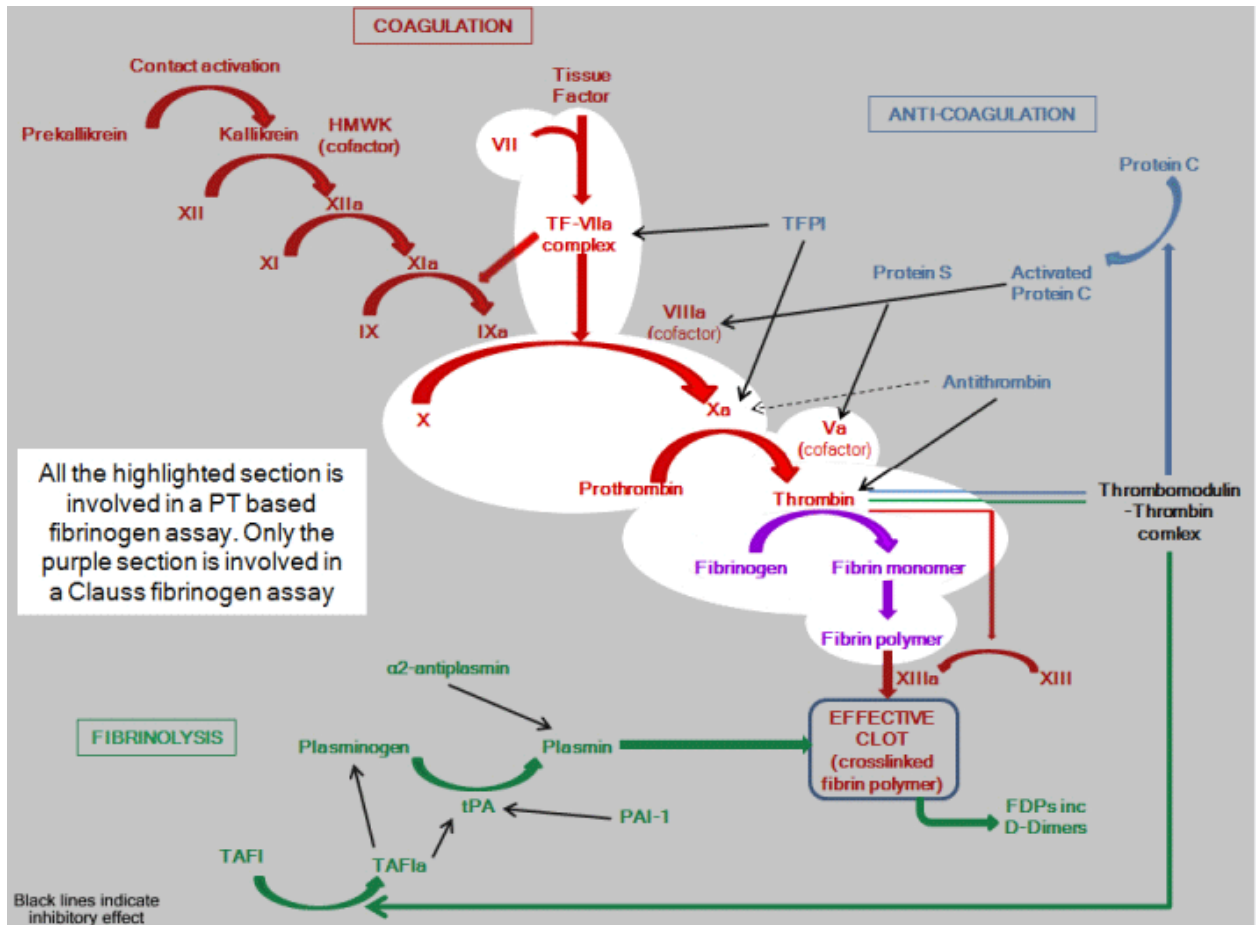
Sự hoạt hóa fibrinogen bởi thrombin cắt 2 chuỗi peptide ngắn ở vùng N tận của chuỗi $A\alpha$ và $B\beta$ – Những peptide này còn được biết là Fibrinopeptide A (FpA) và B (FpB) tương ứng. Loại bỏ những chuỗi trên, sẽ tạo ra những peptide mới ở đầu N tận trong chuỗi $A\alpha$ và $B\beta$, thuộc domain E còn được biết như là “knob (quả nắm)”. Những knob này tương tác một cách tự động với các D-Dimer tạo thành dạng fibrin polymer hóa. Dưới tác động của yếu tố XIIIa, liên kết chéo giữa các chuỗi fibrin polymer hóa này tạo thành mạng lưới fibrin polymer hóa liên kết chéo.

II. NGUYÊN LÝ

Có một số phương pháp để đo mức fibrinogen trong huyết tương mặc dù trong thực hành, hầu hết LABO sử dụng phương pháp Clauss.

Phương pháp	Nguyên lý
Clauss	Một xét nghiệm chức năng dựa trên thời gian tạo cục đông fibrin
Xét nghiệm Fib dựa vào PT	Lượng fibrinogen được suy ra từ PT
Miễn dịch	Phương pháp miễn dịch, đo kháng nguyên fibrinogen hơn là chức năng
Phân tích trọng lượng (Gravimetric)	Phương pháp dựa trên trọng lượng cục máu đông

Sơ đồ sau trình bày cơ sở của phương pháp xác định Fibrinogen bằng Clauss và bằng dựa vào PT.



III. PHƯƠNG PHÁP

4 phương pháp đo fibrinogen được tóm tắt dưới đây

Thuốc thử	Giải thích
-----------	------------

Xét nghiệm Clauss	<ul style="list-style-type: none"> - Huyết tương pha loãng được đông bởi nồng độ cao thrombin. Huyết tương pha loãng (thường là 1:10 nhưng có thể thay đổi nếu nồng độ fib quá cao hoặc quá thấp) để làm giảm tối thiểu ảnh hưởng của “những chất ức chế” trong huyết tương như heparin, tăng FDP... - Việc sử dụng nồng độ cao thrombin (điển hình là 100U/mL) đảm bảo rằng thời gian cục đông độc lập với nồng độ thrombin ở các mức fibrinogen khác nhau. - Test này đòi hỏi huyết tương tham chiếu với một mức fibrinogen đã biết được chuẩn hóa theo tiêu chuẩn quốc tế. Đường cong chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng huyết tương tham chiếu này, chuẩn bị thành hàng loạt các độ pha loãng khác nhau trong dung dịch đệm (1:5 đến 1:40) để cho ra một khoảng các giá trị fibrinogen. Thời gian đông (CT – Clotting time) của mỗi độ pha loãng được xác định, và kết quả CT(s)/nồng độ fibrinogen (g/L) được ghi lại trên đồ thị log-log. Nồng độ 1:10 được xem như 100%. Có một quan hệ tuyến tính giữa CT trong vùng 10-50s. - Huyết tương pha loãng (1:10) nghèo tiểu cầu của bệnh nhân được ủ ở 37 độ C, phospholipid và thrombin được bổ sung theo sau bởi calcium (tất cả đều được làm ấm đến 37 độ C). Thời gian cục đông tính từ lúc đổ calcium vào. Thời gian tạo thành cục đông được so sánh với đường cong chuẩn, từ đó nồng độ fibrinogen được suy ra. - Hầu hết LABO sử dụng phương pháp tự động, trong đó sự tạo thành cục đông xảy ra khi mật độ quang của hỗn hợp vượt quá một ngưỡng nhất định.
Xét nghiệm Fib dựa vào PT	<p>PT được xác định bằng đo sự thay đổi mật độ quang ở các mức huyết tương pha loãng khác nhau với nồng độ fibrinogen đã biết. Những thay đổi ở mỗi mức fibrinogen khác nhau này được dùng để xây dựng đường cong chuẩn. Một PT được thực hiện với huyết tương nghèo tiểu cầu của bệnh nhân và nồng độ fibrinogen được suy ra từ sự thay đổi mật độ quang khi so sánh với đường cong chuẩn.</p> <p>“Fibrinogen suy ra” là xét nghiệm đơn giản và rẻ tiền, được dùng rộng rãi. Tuy nhiên, test có thể cho ra kết quả nhầm lẫn trong một số rối loạn và không được khuyến cáo sử dụng thường quy ở LABO.</p>
Xét nghiệm miễn dịch học	<ul style="list-style-type: none"> - Xét nghiệm dựa trên ELISA, khuyết tán miễn dịch phóng xạ (radial immunodiffusion) và điện di là những cách thức chính. - Xét nghiệm miễn dịch đo nồng độ hơn là hoạt tính của fibrinogen

	- Chúng có giá trị trong điều tra các rối loạn fibrinogen bẩm sinh, rối loạn mà dẫn tới có sự khác biệt giữa hoạt tính chức năng và mức kháng nguyên.
Xét nghiệm trọng lượng	1. Trọng lượng cục đông: tương tự như phương pháp Clauss, nhưng thay vì dùng thời gian tạo cục đông, phương pháp này ép cục máu đông (để loại bỏ huyết tương và các chất thừa), rửa, làm khô và cân. Xét nghiệm này khó làm về mặt kỹ thuật và tiêu tốn thời gian. 2. Protein có thể đông Thrombin được cho vào huyết tương mà không có calcium và cục đông tạo thành được rửa, sau đó ly giải trở lại bằng thuốc thử kiềm, sau đó được tiến hành phân tích quang phổ (bước sóng điển hình là 282nm). Vì cục đông hầu hết là fibrin, nên nồng độ fibrin đo được tương đương với nồng độ fibrinogen
TEG	Đàn hồi cục máu đông đã được sử dụng để đo hoạt tính chức năng của fibrinogen (xem thêm ở bài riêng)

Khuyến cáo hiện tại cho việc lựa chọn xét nghiệm fibrinogen tùy thuộc bối cảnh lâm sàng khác nhau như sau:

Bối cảnh lâm sàng	Chỉ định xét nghiệm
Điều tra chảy máu	Clauss
Nghi ngờ rối loạn chức năng Fib	Clauss và protein có thể đông và miễn dịch
Những rối loạn chảy máu thêm vào bên cạnh fib (như DIC)	Clauss
Liệu pháp tiêu sợi huyết	Clauss
Mức fib rất cao	Clauss hoặc miễn dịch.

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Nhìn chung, TT sẽ kéo dài khi mức fibrinogen có chức năng <1 g/L .

Bất thường	Phân tích
Mức Fib giảm trong:	- DIC do tiêu thụ các yếu tố đông máu - Bệnh gan do giảm tổng hợp (lưu ý còn có fib bất thường về mặt chức năng do gắn nhiều silic acid trong bệnh lý gan) - Truyền máu khối lượng lớn gây bệnh lý đông máu do pha loãng - Suy giảm fib di truyền (không có/giảm/rối loạn chức năng = giảm cả số lượng + hoạt tính) - Sau liệu pháp tiêu sợi huyết - Một số bệnh nhân sau điều trị asparaginase
Mức Fib tăng trong:	- Tăng theo độ tuổi - Giới nữ, mang thai, thuốc tránh thai - Phụ nữ sau mãn kinh

	<ul style="list-style-type: none"> - Phản ứng pha cấp - Bệnh lý ác tính lan tỏa (có thể giảm nếu đi kèm với DIC)
--	--

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Khoảng tham chiếu của Fibrinogen nằm trong khoảng 1.5-4 g/L.

VI. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Mức fibrinogen thường được diễn giải trong bộ xét nghiệm với PT, APTT. Nếu xét nghiệm fib dựa vào cục máu đông giảm đáng kể thì cả PT, APTT sẽ kéo dài. Tuy nhiên, phải nhớ rằng giảm fibrinogen máu không loại trừ được các khiếm khuyết của dòng thác đông máu thêm vào như trong DIC.

Ngược lại, nếu PT và APTT đều kéo dài nhưng xét nghiệm fibrinogen dựa vào cục máu đông bình thường thì hướng tới bất thường ở phần trên của dòng thác đông máu, khi đó xét nghiệm các yếu tố đông máu và mix test có thể hữu ích.

Nếu xét nghiệm fibrinogen dựa vào cục máu đông hướng tới giảm fibrinogen nhưng không tìm được lý do cho điều này và một bối cảnh lâm sàng tương ứng (như tiền sử dễ chảy máu gia đình, vết thương chậm lành, chảy máu cuống rốn kéo dài), khi đó xét nghiệm miễn dịch sẽ hữu ích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Inherited abnormalities of Fibrinogen:

www.emedicine.com/ped/topic3042.htm

2. Guidelines on Fibrinogen assays

Mackie *et al.* Guidelines on fibrinogen assays. Br J Haematol 2003; 121 (3):396-404

or www.bcsghguidelines.com/pdf/fibrinogenassays0503.pdf

3. Hill *et al.* Diagnosis, clinical features and molecular assessment of the dysfibrinogenemias. Haemophilia 2008;14:889-897.

4. Hanss, M. and F. Biot, A database for human fibrinogen variants. Ann N Y Acad Sci, 2001. 936: p. 89-90.

5. Bolton-Maggs, P.H., et al., The rare coagulation disorders--review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. Haemophilia, 2004. 10(5): p. 593-628.

6. Peyvandi, F., et al., Rare coagulation deficiencies. Haemophilia, 2002. 8(3): p. 308-21.

7. Gandrille, S., et al., A study of fibrinogen and fibrinolysis in 10 adults with nephrotic syndrome. *Thromb Haemost*, 1988. 59(3): p. 445-50.
8. Henschen, A.H., Human fibrinogen--structural variants and functional sites. *Thromb Haemost*, 1993. 70(1): p. 42-7.
9. Toulon, P., et al., Fibrin polymerization defect in HIV-infected patients--evidence for a critical role of albumin in the prolongation of thrombin and reptilase clotting times. *Thromb Haemost*, 1995. 73(3): p. 349-55.
10. Krammer, B., et al., Screening of dysfibrinogenaemia using the fibrinogen function versus antigen concentration ratio. *Thromb Res*, 1994. 76(6): p. 577-9.
12. Palareti G, Maccaferri M. Specific assays of hemostasis proteins: fibrinogen. *Ric Clin Lab*. 1990 20(2):167-76.
13. Carroll, R.C., Craft, R.M., Chavez, J.J., Snider, C.C., Kirby, R.K. & Cohen, E. (2008) Measurement of functional fibrinogen levels using the Thrombelastograph. *J Clin Anesth*, 20, 186-190.

PHẦN TỔNG KẾT

SL Tiểu cầu	PT	APTT	TT	Fib	Diễn giải
BT	BT	BT	BT	BT	<ul style="list-style-type: none"> - Bình thường - Giảm yếu tố XIII - Bệnh vWD thể nhẹ - Rối loạn chất lượng tiểu cầu - Các vấn đề của mô liên kết (như Ehlers Danlos) - Suy giảm các yếu tố đông máu nhẹ.
BT	T	BT	BT	BT	Suy giảm yếu tố VII
BT	BT	T	BT	BT	<ul style="list-style-type: none"> - Suy giảm FXII, XI, IX, VIII - Bệnh vWD (nếu FVIII giảm) - Kháng đông lupus (thỉnh thoảng một LA rất mạnh hoặc LA có hoạt tính chống prothrombin có thể dẫn tới kéo dài PT. Tương tự, một LA có thể liên kết với giảm tiểu cầu) - Suy giảm các yếu tố tiếp xúc khác (Prekallikrein, HMWK)
BT	T	T	BT	BT	<ul style="list-style-type: none"> - Suy giảm các yếu tố của con đường chung - Suy giảm nhiều yếu tố đông máu (như FV+VIII) - Kháng vitamin K - Suy giảm vitamin K hoặc đột biến 1 trong những gene mã hóa những enzyme quan trọng liên quan đến chuyển hóa vitamin K. - Đôi khi một LA rất mạnh có thể kéo dài PT, nhưng hiếm, vì lượng PL lớn trong xét nghiệm PT làm trung hòa LA.
G	T	T	T	G	<ul style="list-style-type: none"> - DIC - Truyền máu khối lượng lớn - Bệnh gan
G	BT	BT	BT	BT	<ul style="list-style-type: none"> - Các vấn đề tiểu cầu tiên phát (như ITP) - MPV (Thể tích trung bình tiểu cầu) có thể hữu ích trong thành lập nguyên nhân giảm tiểu cầu. +MPV tăng liên quan đến phá hủy tiểu cầu ở ngoại biên (như ITP) +MPV giảm liên quan đến suy tủy xương +Thay đổi MPV cũng gặp ở một số rối loạn di truyền của tiểu cầu (như hội chứng Wiskott Aldrich)

**PHẦN 2. BỘ XÉT NGHIỆM
CHỨC NĂNG TIÊU CẦU**

PHẦN GIỚI THIỆU

I. GIỚI THIỆU

Đánh giá bệnh nhân chảy máu bất thường đòi hỏi khai thác tiền sử chảy máu, thăm khám lâm sàng, tiền sử dùng thuốc và tiếp theo là nghiên cứu các xét nghiệm.

Những rối loạn về số lượng và chức năng tiểu cầu khá phổ biến ở những bệnh nhân chảy máu và có thể không phân biệt được trên lâm sàng với những rối loạn huyết học khác. Có lẽ vì sự phức tạp của tiểu cầu và khó khăn trong điều tra chúng, nên chúng ta chỉ chẩn đoán các rối loạn chức năng tiểu cầu.

Những xét nghiệm điều tra rối loạn tiểu cầu gồm:

- Đánh giá số lượng và kích thước tiểu cầu (MPV)
- Đánh giá hình thái tiểu cầu (Phết máu ngoại biên – Blood film)
- Sàng lọc chức năng tiểu cầu như ACT, BT, PFA-100
- Light Transmission Aggregometry (Máy ghi lại đồ thị ngưng tập tiểu cầu nhờ lượng ánh sáng xuyên qua)
- Đánh giá nucleotide tiểu cầu
- Flow cytometry (đánh giá sự có mặt hoặc vắng mặt glycoprotein màng tiểu cầu)
- Những điều tra đặc hiệu hơn liên quan đến các nghiên cứu ở LABO.

Mục đích của bài này để giới thiệu cho bạn đọc sự phức tạp của điều tra chức năng tiểu cầu và làm cách nào điều tra một bệnh nhân nghi ngờ rối loạn chức năng tiểu cầu.

Có một số bình luận xuất sắc về những vấn đề của tiểu cầu mà chúng tôi giới thiệu ở các mục tương ứng.

II. NGUYÊN LÝ

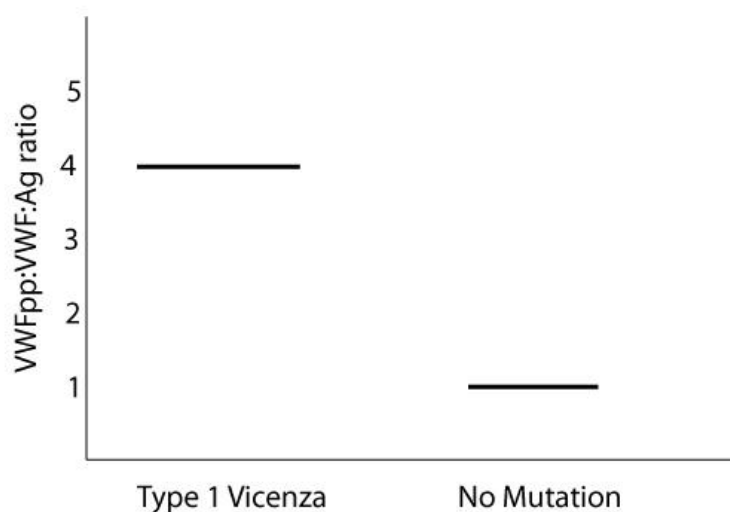
Đây không phải là một danh sách toàn diện các rối loạn chức năng tiểu cầu nhưng rất hữu ích để bạn có một dàn ý, từ đó các rối loạn chức năng tiểu cầu khác được thêm vào.

Rối loạn	Chẩn đoán có thể
Bất thường các receptor cho các protein kết dính với tiểu cầu [Rối loạn kết dính tiểu cầu]	<ul style="list-style-type: none"> - Bernard Soulier Syndrome [BSS] - Hội chứng Velo-Cardio-Facial [VCF] - Bệnh Glanzmann [Glanzmann's Thrombasthenia – GTT] - Không có fibrinogen di truyền (dù không phải là bệnh lý tiểu cầu tiên phát, nhưng fibrinogen cần cho tương tác tiểu cầu – tiểu cầu) - Bệnh von Willebrand hoặc bệnh giả von Willebrand. - Khiếm khuyết thụ thể Collagen
Bất thường các receptor cho các agonist hòa tan (những chất được tiết ra trong quá trình hoạt hóa tiểu cầu)	<ul style="list-style-type: none"> - Khiếm khuyết thụ thể TxA2 - Khiếm khuyết α-adrenergic - Khiếm khuyết thụ thể P2Y12 (Di truyền hoặc do thuốc như Clopidogrel)

Bất thường hạt tiểu cầu	<ul style="list-style-type: none"> - Suy giảm hạt đặc - Suy giảm hạt α di truyền hoặc mắc phải - Hội chứng tiểu cầu xám - Rối loạn tiểu cầu Quebec
Bất thường bài tiết tiểu cầu hoặc con đường dẫn truyền tín hiệu (Khiếm khuyết bài tiết các thành phần trong hạt TC)	<ul style="list-style-type: none"> - Khiếm khuyết bài tiết tiên phát - Khiếm khuyết ngưng tập, tương tự như rối loạn kho chứa tiểu cầu [SPD- Storage Pool Disorders] nhưng thành phần trong hạt cũng như sự tạo TxA2 bình thường - Epinephrine - Thromboxane - ADP - Collagen - Khiếm khuyết hoạt hóa protein G (tín hiệu nội bào) - Linh tinh
Bất thường chuyển hóa Arachadonic Acid	<ul style="list-style-type: none"> - Khiếm khuyết COX - Thuốc - Suy giảm tổng hợp Thromboxane.
Rối loạn cơ chế tiền đông của tiểu cầu	Hội chứng Scott
Khiếm khuyết khung xương tiểu cầu	<ul style="list-style-type: none"> - Rối loạn liên quan MYH9 - Hội chứng Wiskott-Aldrich

III. KẾT QUẢ

Ở những bệnh nhân type 1 do tăng đào thải, tỉ số VWFpp/VWF:Ag có xu hướng tăng (khoảng bằng 4). Điều này gợi ý VWFpp có thời gian bán hủy bình thường nhưng của VWF trưởng thành thì giảm, nó bị đào thải nhanh chóng do đột biến bên trong protein VWF trưởng thành.



Type 1C có chức năng VWF-tiểu cầu bình thường, mức VWF huyết tương 6-10IU/dl và sự hiện diện của những multimer kích thước siêu lớn.

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

VWFpp có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm máu O và các nhóm còn lại. Giá trị tham khảo từ 55-219IU/dl, tỉ số VWFpp/VWF:Ag có kỳ vọng bằng 1.

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Những cá nhân bất thường tỷ số VWFpp/VWF:Ag hướng đến bệnh VWD type 1 do tăng đào thải. Sử dụng DDAVP cũng giúp ích chẩn đoán.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, et al. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3344-51.
2. Nossent AY, VANM, NH VANT, Rosendaal FR, Bertina RM, JA VANM, et al. von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2006 Dec;4(12):2556-62.
3. Sztukowska M, Gallinaro L, Cattini MG, Pontara E, Sartorello F, Daidone V, et al. Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter Von Willebrand factor survival in patients with type 1 and type 1c von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2008 Sep;143(1):107-14.
4. Gadisseur A, Berneman Z, Schroyens W, Michiels JJ. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease type 1/2E (2A subtype IIE), type 1c von Willebrand disease and mild type 1 caused by mutations in the D3, D4, B1-B3 and C1-C2 domains of the von Willebrand factor gene. Role of von Willebrand factor multimers and the von Willebrand factor propeptide/antigen ratio. *Acta Haematol*. 2009;121(2-3):128-38.

Bài 1. LIGHT TRANSMISSION AGGREGOMEYTRY [LTA]

(Tạm dịch: ĐỒ THỊ NGỪNG TẬP DƯA TRÊN ÁNH SÁNG XUYỀN QUA)

I. GIỚI THIỆU

Xét nghiệm chức năng tiểu cầu là khó, tiêu tốn thời gian và đối diện với hàng loạt các vấn đề gây nhiễu trước khi phân tích.

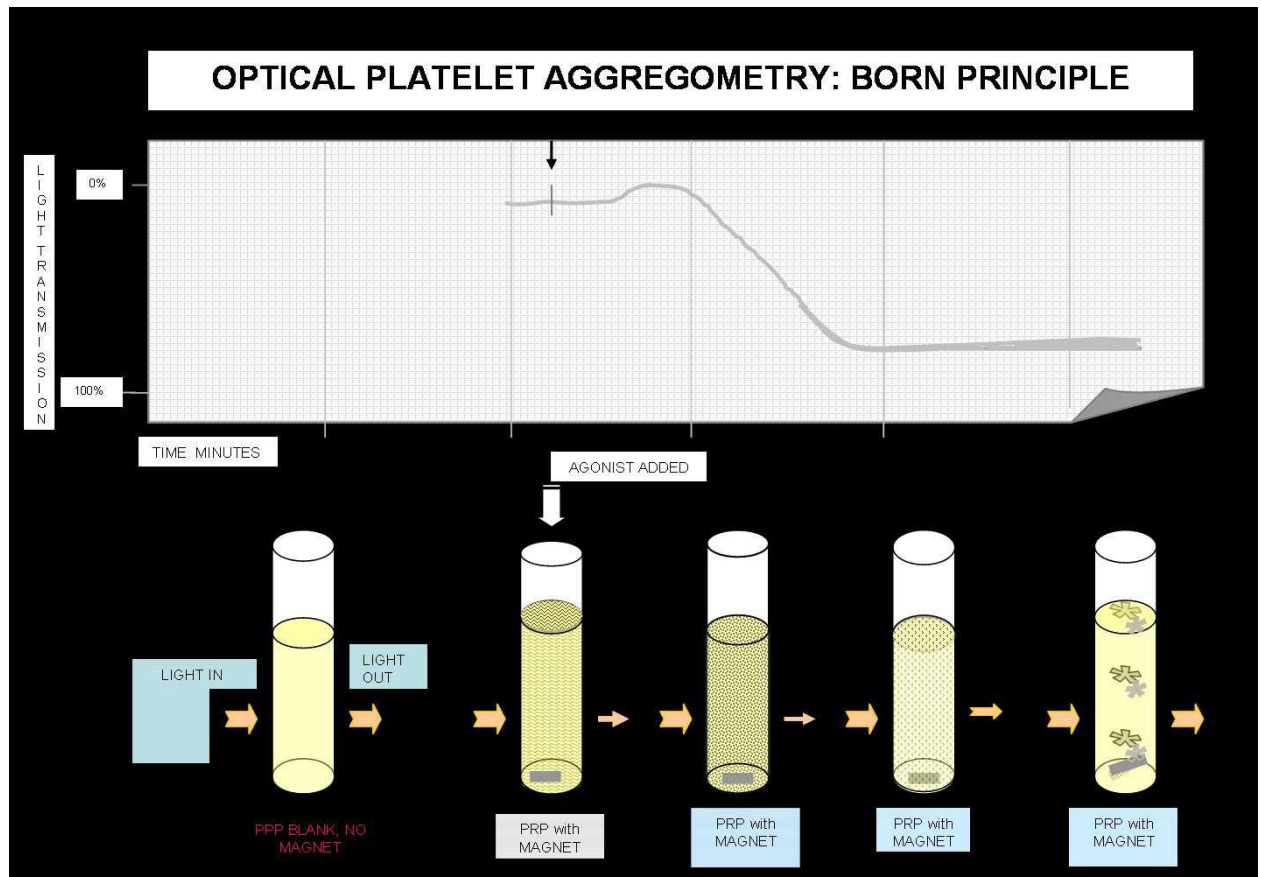
Trước khi quyết định thực hiện bất cứ xét nghiệm chức năng tiểu cầu nào, cần xem xét:

Vấn đề	Giải thích
Tiền sử và thăm khám lâm sàng	Một số hội chứng như Hermansky Pudlak syndrome, Cheddiak Higashi syndrome, Wiskott-Aldrich syndrome, Velocardiofacial Syndrome (VCFS), Noonan syndrome, MYH9-related disorders – liên kết với bất thường chức năng tiểu cầu và bạn có thể có một số gợi ý từ việc khai thác tiền sử và thăm khám lâm sàng.
Tiền sử dùng thuốc	Một lượng lớn thuốc, và một số loại thức ăn có thể tương tác với chức năng tiểu cầu.
Công thức máu (FBC) và phết máu ngoại biên (Blood film)	<p>1. Xem xét giảm tiểu cầu giả tạo do ngưng kết lạnh hoặc tiểu cầu vệ tinh. Khoảng 0.1% người khỏe mạnh có giảm tiểu cầu giả tạo liên quan đến EDTA và rất cần thiết loại trừ tình trạng này trước khi tiến hành các xét nghiệm nghiên cứu chức năng xa hơn. Hiện tượng tương tự cũng đã được báo cáo với việc sử dụng citrate và heparin làm chống đông. Một phết máu ngoại biên có thể xác định sự kết tụ tiểu cầu và cung cấp đầu mối chẩn đoán.</p> <p>2. MPV là một thông số thường bị bỏ qua trong FBC nhưng có thể cung cấp một cách nhìn sâu hơn trong nguyên nhân gây giảm tiểu cầu:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nó có thể là đầu mối chẩn đoán trong một số trường hợp (tiểu cầu lớn di truyền, hội chứng Bernard Soulier) - Một người với MPV tăng, đếm tiểu cầu bằng phương pháp miễn dịch có thể chính xác hơn và cho ra kết quả cao hơn hẳn. - MPV có thể cho biết vòng đời của tiểu cầu – một MPV tăng gợi ý tăng thải tiểu cầu như ITP hoặc giảm tiểu cầu thai nghén. - MPV có thể giảm trong một số trường hợp của hội chứng Wiskott-Aldrich và một số trường hợp suy tủy xương. <p>3. Phết máu ngoại biên có thể hữu ích cả trong chẩn đoán giảm tiểu cầu giả tạo cũng như các vấn đề tiểu cầu tiên phát như hội chứng tiểu cầu xám. Trong một số trường hợp giảm tiểu cầu như bất thường May Hegglin – Blood film cho thấy sự hiện diện của thể Dohle (màu xanh xám, hình oval, ưa kiềm, thể vùi ở ngoại vi bào tương tế bào neutrophil)</p>

II. NGUYÊN LÝ

Test ngưng tập tiểu cầu đo khả năng hoạt hóa và ngưng tập tiểu cầu – tiểu cầu với các agonist khác nhau trong in vitro. Born aggregometry cổ điển sử dụng huyết tương giàu tiểu cầu, nhưng máu toàn phần cũng có thể sử dụng.

Trong Born aggregometry, PRP được đổ vào cuvette ở 37 độ C, và cuvette được đặt giữa một nguồn sáng và một tế bào quang điện. Khi agonist được cho vào, tiểu cầu ngưng tập, giảm hấp thụ ánh sáng, lượng ánh sáng truyền qua tăng lên và điều này được xác định bởi một tế bào quang điện.



III. NHỮNG YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN MẬT ĐỘ ÁNH SÁNG XUYỀN QUA

Vấn đề	Giải thích
Những biến đổi tiền phân tích	<p>* Những thuốc có thể tương tác với chức năng tiểu cầu bao gồm aspirin, kháng viêm, kháng tiểu cầu đặc hiệu bao gồm clopidogrel và imidazole. Tuy nhiên, nhiều thuốc vai trò của nó không ức chế chức năng tiểu cầu nhưng thực tế nó vẫn tương tác như kháng sinh, chống trầm cảm, chẹn beta....</p> <p>* Thức ăn:</p>

	<ul style="list-style-type: none"> - Chế độ ăn giàu chất béo có thể dẫn đến sự hiện diện của chylomicra trong huyết tương và tương tác sự xuyên qua ánh sáng trong test aggregometry. - Những loại khác như tỏi, nghệ, caffeine. <p>* Số lượng tiểu cầu: người có số lượng tiểu cầu quá cao hoặc quá thấp cũng cần được điều chỉnh để trở về khoảng $200-400 \times 10^9/L$. Tiểu cầu quá cao có thể điều chỉnh với PPP. Tiểu cầu $<200 \times 10^9/L$ cần được đưa lên để làm giảm tối thiểu mức ảnh hưởng. Mặc dù về logic có thể ly tâm tăng cường ở trường hợp tiểu cầu cao, nhưng việc này có thể dẫn đến hoạt hóa tiểu cầu, nên không được khuyến cáo.</p> <p>* Nhiệt độ: Mẫu máu cho test này nên được lưu trữ ở nhiệt độ phòng</p> <p>* pH: Ngưng tập tiểu cầu nên được thực hiện ở pH sinh lý.</p> <p>* Nồng độ fibrinogen: Tiểu cầu chỉ có thể ngưng tập (mặc dù nó có thể kết dính) nếu fibrinogen có mặt, vì vậy rất quan trọng phải kiểm tra mức fibrinogen trước khi thực hiện test aggregometry.</p> <p>* Chống đông: Những guideline hiện tại đề nghị rằng mẫu cho test aggregometry cần được thu thập trong citrate. Tuy nhiên, những dữ liệu gần đây cho thấy heparin có thể bảo quản tiểu cầu trong 24 giờ.</p>
Chuẩn bị huyết tương giàu tiểu cầu (PRP)	<ul style="list-style-type: none"> - Tiểu cầu rất nhạy và có thể sẵn sàng hoạt hóa trong quá trình chuẩn bị PRP - Chống đông: Máu tĩnh mạch được thu thập trong ống 3.2%/0.109M citrate theo tỉ lệ 1:9 - Máu toàn phần nên được xử lý trong vòng 4 giờ - Mẫu máu cho test aggregometry nên được giữ ở nhiệt độ phòng – làm lạnh có thể dẫn đến hoạt hóa tiểu cầu. - Vận chuyển mẫu đến LABO tại nhiệt độ phòng. PRP được chuẩn bị bằng cách ly tâm tại 20 độ C, 150-200g, khoảng 10-15 phút. PRP được loại bỏ một cách cẩn thận và đặt trong một ống nhựa đầy nắp. PRP nên được lưu trữ ở nhiệt độ phòng. PPP cũng có thể được chuẩn bị bằng cách ly tâm 2700g trong 15 phút.
Agonist	<p>* Thêm các agonist tiểu cầu vào PRP dẫn đến hoạt hóa tiểu cầu, thay đổi hình dạng từ dạng đĩa thành dạng hình cầu có gai, liên kết với sự tăng mật độ ánh sáng xuyên qua. Chỉ có 2 ngoại lệ là epinephrine, nó không gây thay đổi hình dạng và ristocetin nó gây kết dính chứ không phải ngưng tập (không gắn với fibrinogen).</p> <p>* Có 2 type agonist:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Agonist mạnh: như collagen, thrombin, TxA2; chúng trực tiếp gây ngưng tập tiểu cầu, tổng hợp TxA2 và bài tiết hạt trong tiểu cầu. - Agonist yếu: như ADP, epinephrine; chúng dẫn đến ngưng tập nhưng không gây bài tiết. Việc bài tiết cũng có thể xảy ra sau ngưng tập đối với các agonist yếu, khi sự tổng hợp TxA2 nội sinh

	<p>được khởi động nhờ tương tác tiểu cầu – tiểu cầu xảy ra trong quá trình ngưng tập.</p> <p>* Những agonist mạnh, khi dùng với nồng độ thấp, có thể hoạt động như agonist yếu, nhưng những agonist yếu, thậm chí khi dùng ở nồng độ cao, cũng không thể tạo ra hoạt tính như agonist mạnh.</p> <p>* Một số agonist yếu, ở nồng độ tới hạn, đường cong ngưng tập tiểu cầu sẽ có dạng sóng 2 pha: pha ngưng tập tiên phát và pha ngưng tập thứ phát (thường không thuận nghịch). Sóng ngưng tập thứ phát có thể không xảy ra và sóng tiên phát có thể tan rã trở lại. Ở nồng độ cao (trừ epinephrine) 2 sóng ngưng tập kết hợp lại và chỉ nhìn thấy 1 sóng và dạng sóng 2 pha biến mất.</p> <p>Đáp ứng ngưng tập với agonist sẽ được khuếch đại bằng việc tạo ra TxA2 từ màng phospholipid và sự bài tiết ADP từ hạt đậm đặc (vì ADP và TxA2 chính là các agonist)</p>
--	---

IV. NHỮNG AGONIST ĐƯỢC SỬ DỤNG PHỔ BIẾN TRONG LTA

Trong thực hành, nhiều LABO sử dụng một số agonist cũng như một số độ pha loãng khác nhau, tuy nhiên việc lựa chọn agonist cũng như nồng độ của nó phụ thuộc vào kết quả của test ban đầu cũng như bất thường nghi ngờ. Không phải tất cả LABO bắt buộc phải sử dụng các mức nồng độ như trong bảng dưới.

Agonist	Nồng độ làm việc	Bình luận
ADP	Liều thấp: 2.5, 5 μ M Liều cao: 10 μ M	<p>ADP gắn với receptor tương ứng trên bề mặt tiểu cầu. Kết quả gắn ban đầu sẽ dẫn đến việc bài tiết calcium nội bào, làm thay đổi hình dáng tiểu cầu và tạo ra sóng ngưng tập tiên phát. Sóng thứ phát phản ứng sự tiết ADP từ hạt tiểu cầu.</p> <p>ADP liều thấp chỉ tạo ra sóng tiên phát và có thể đảo ngược. ADP và arachidonic acid được xem như các agonist nhẹ.</p> <p>ADP gắn vào 2 receptor G-protein: P2Y1 và P2Y12. ADP gắn với P2Y1 dẫn đến hình dạng và khởi động sóng nguyên phát thông qua huy động calcium. P2Y12 được xem như receptor thuộc loại “major” và chịu trách nhiệm cho việc ngưng tập tiểu cầu toàn diện nhờ ức chế adenyl cyclase.</p> <p>P2Y12 cũng là đích của clopidogrel. Với cả ADP và Arachidonic acid, sóng thứ phát bị ức chế bởi aspirin và NSAID.</p>
Collagen	1.4 μ g/mL	Collagen gắn với receptor GpVI và GpIa/IIa dẫn đến phóng thích hạt, tổng hợp TxA2 và sau đó hoạt hóa GpIIb/IIIa dai dẳng.

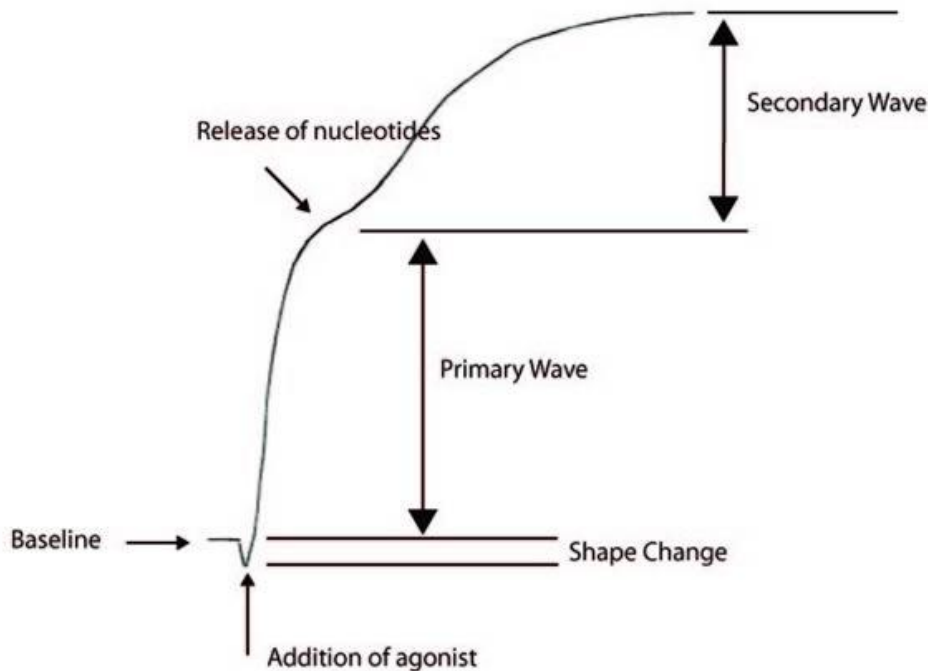
		GpIa/IIa receptor liên quan đến kết dính tiểu cầu. GpVI receptor liên quan đến tín hiệu nội bào và tổng hợp TXA2. Một pha chậm được quan sát khi cho collagen vào PRP và thường <1 phút.
Ristocetin	Liều thấp: 0.5mg/dl Liều cao: 1.5, 5mg/dl	Ristocetin liều cao sẽ gây ra kết dính tiểu cầu thông qua VWF và phức hợp GpIb-IX-V (không gây ra ngưng tập được). Liều thấp không gây ra kết dính được.
Adrenalin	5, 10 μ M	Adrenalin gắn với receptor α 2-adrenergic trên bề mặt tiểu cầu dẫn đến sự ức chế adenylyl cyclase và bài tiết calcium. Ngưng tập tiểu cầu với adrenaline là tương tự với ADP khi khởi đầu sóng tiên phát, sự tiết ADP từ hạt đặc tiểu cầu tạo ra sóng ngưng tập thứ phát bền vững. Như ADP, sóng thứ 2 sẽ bị ức chế bởi aspirin và NSAID. Adrenaline được xem như agonist yếu. Tuy nhiên, khiếm khuyết tín hiệu thông qua α 2-adrenergic liên kết với rối loạn chảy máu. Một tỷ lệ nhỏ dân số không luôn luôn tạo ra ngưng tập đầy đủ với adrenalin do sự biến động tự nhiên trong số thụ thể của adrenaline.
Acid arachidonic	500 μ g/mL	Arachidonic acid là tiền thân của TXA2 trong tiểu cầu. Arachidonic acid được chuyển thành TXA2 bởi Cyclooxygenase và thromboxane synthase. TXA2 là chất cảm ứng cho ngưng tập tiểu cầu bằng việc phóng thích hạt, nhiều TXA2 được tạo ra hơn và dẫn đến hoạt hóa GpIIb-IIIa dai dẳng.
Thrombin	Liều thấp: 50nmol/L Liều cao: 100nmol/L	Thrombin là chất hoạt hóa sinh lý tiềm năng nhất của tiểu cầu và PAR1 (Protease-activated Receptor), PAR4. PAR1 và PAR4 là thành viên của nhóm thụ thể bắt cặp với G-protein xuyên màng 7 lần (G protein-coupled receptor) được hoạt hóa bằng cách cắt domain đầu N tận, tạo ra đầu N tận mới => hoạt hóa tiểu đơn vị G và tín hiệu nội bào. Thrombin tạo ra ngưng tập tiểu cầu ở liều thấp nhưng liều này thì không đủ tạo ra sự ngưng tập đầy đủ. Ở nồng độ cao hơn sẽ ngưng tập đủ.

V. PHƯƠNG PHÁP

Bước	
1	Aggregometry được thực hiện tại 37 độ C.
2	Máy Aggregometer được chuẩn hóa bởi: <ul style="list-style-type: none"> - Một đường cong chứa PRP với 0% ánh sáng truyền qua - Một đường cong thứ 2 chứa PPP với 100% ánh sáng truyền qua

3	<p>Tiểu cầu chỉ ngưng tập nếu chúng được hoạt hóa (với agonist) và tiếp xúc với nhau – vì vậy chúng phải được khuấy trong khi test diễn ra. Nếu không khuấy sẽ dẫn tới không hoặc giảm đáng ngưng tập tiểu cầu.</p> <p>Kiểm tra ngưng kết tiểu cầu tự động (SPT – Spontaneous Platelet Aggregation): SPT hiếm khi xảy ra ở người bình thường, nhưng gặp trong một số trường hợp VWD, đái tháo đường, rối loạn lipid máu và nhiều rối loạn khác, vì vậy nên được làm ở mọi trường hợp bằng cách cho PRP chưa pha loãng vào máy aggregometer và khuấy trong 15 phút. Trong trường hợp SPA, pha loãng PRP có thể loại bỏ hiện tượng này, và nếu số lượng TC vẫn $>200 \times 10^9/L$ thì test ngưng tập có thể tiếp tục</p>
4	<p>Nhìn chung, $270\mu L$ PRP được thêm vào cuvette của aggregometry và ủ ấm ở $37^\circ C$ cho tới khi đạt đường ổn định.</p> <p>$30\mu L$ agonist được thêm vào và đáp ứng được ghi lại</p> <p>Test được lặp lại với một panel các agonist.</p>

Quỹ đạo ngưng tập sau cho thấy hiện tượng ngưng tập hai pha kinh điển.



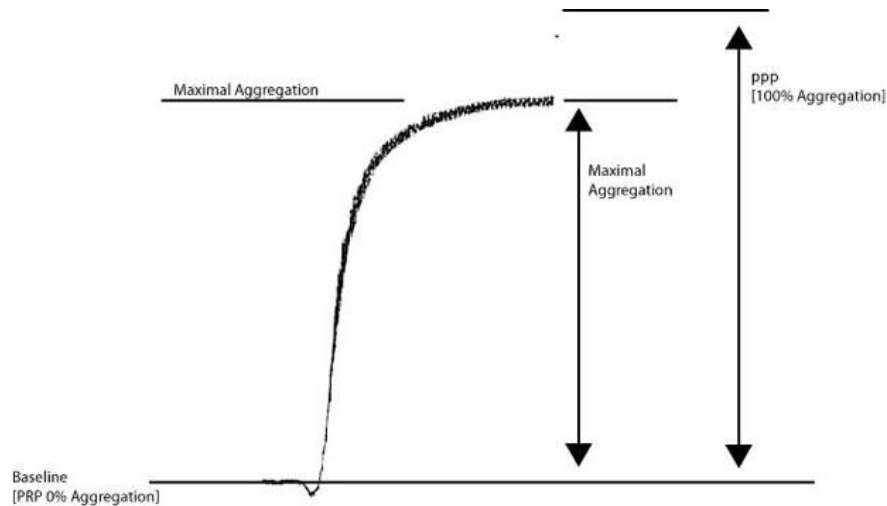
1. Đường mức nền (Baseline)
2. Thêm agonist – điều này dẫn đến thay đổi hình dạng tiểu cầu, giảm hấp thụ ánh sáng
3. Sóng thứ 1 (tiên phát)
4. Tiết nucleotide
5. Sóng ngưng tập thứ phát

Adrenaline và ADP liều thấp cho đường cong ngưng tập 2 pha kinh điển trong khi đó những agonist khác chỉ có sóng đơn, không thể phân biệt sóng thứ 1 khỏi sóng thứ 2

VI. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

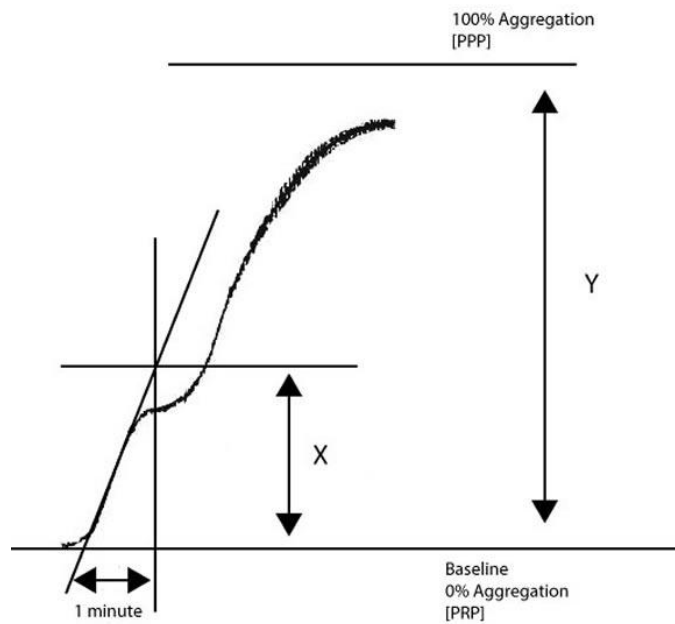
1. Tính toán hệ số góc hoặc tốc độ ngưng tập

Quan sát hình sau



Trước đây, phân trăm ngưng tập cực đại được báo cáo khi phân tích đường cong ngưng tập. Để tính % ngưng tập cực đại, ta lấy khoảng cách từ baseline đến mức ngưng tập cực đại (X) chia cho khoảng cách từ baseline đến mức ngưng tập 100% (Y).

Hiện nay ta tính qua độ dốc (slope = hệ số góc). Lập tỷ số X/Y như hình vẽ bên dưới



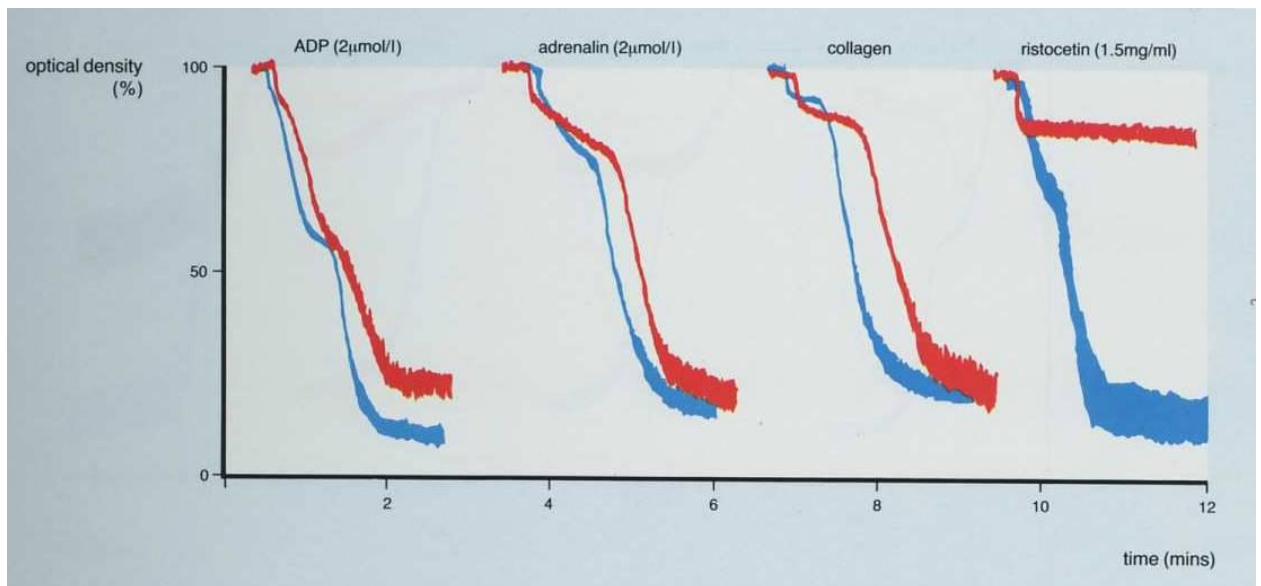
2. Phân tích quỹ đạo ngưng tập tiểu cầu

Diễn giải quỹ đạo ngưng tập tiểu cầu là một vấn đề khó. Một số bất thường được khảo sát gồm:

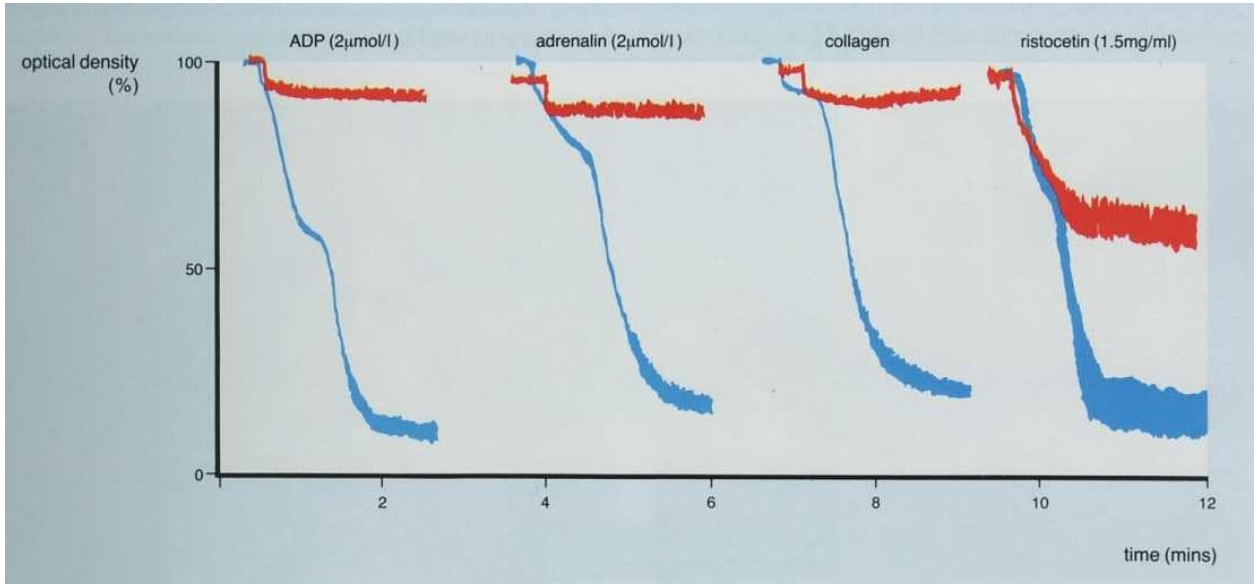
- Bệnh Glanzmann (hoặc afibrinogenaemia)
- Hội chứng Bernard-Soulier (hoặc VWD)
- Rối loạn kho chứa (hoặc khiếm khuyết bài tiết)
- Ảnh hưởng của Aspirin (hoặc khiếm khuyết giống aspirin)
- Ảnh hưởng của Clopidogrel.

Quỹ đạo ngưng tập của một số rối loạn được vẽ dưới đây. Chứng: màu xanh, bệnh nhân: màu đỏ.

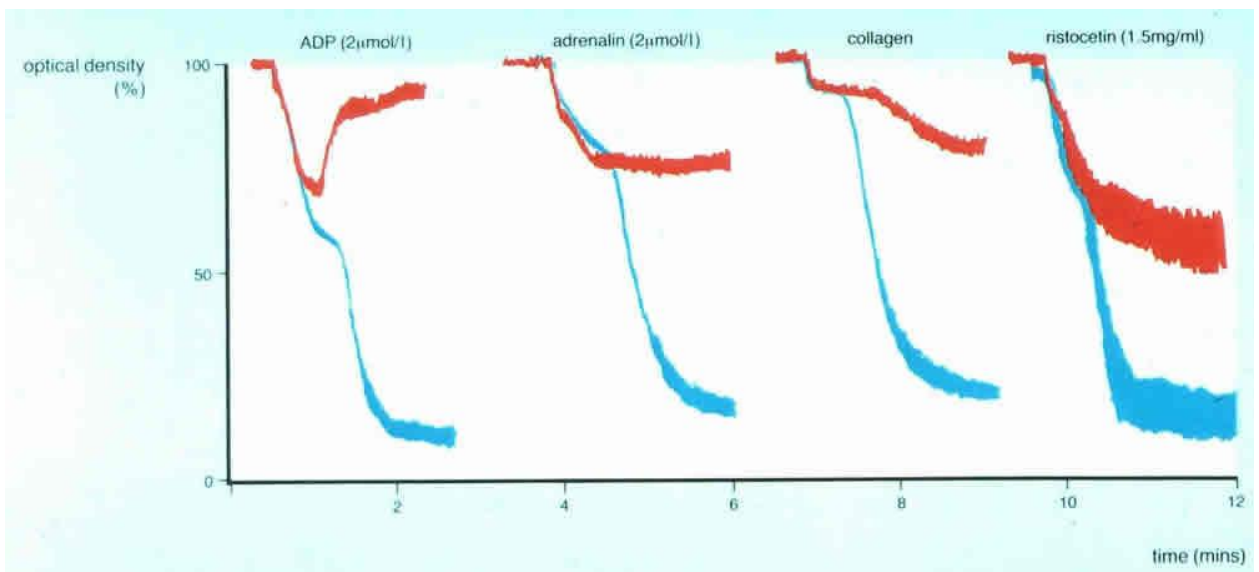
- a. Bất thường duy nhất là không kết dính với ristocetin. Có thể VWD hoặc BSS.



- b. Ngược với tình trạng trên, chỉ duy nhất kết dính tiểu cầu với ristocetin diễn ra. Không ngưng tập được với ADP, Adrenaline hoặc collagen. Chẩn đoán có thể là bệnh Glanzmann hoặc afibrinogenaemia. Nhớ rằng, kết dính tiểu cầu với ristocetin xảy ra không phụ thuộc vào fibrinogen.



- c. Ở bệnh nhân này, sóng thứ 1 quan sát được với ADP, Adrenaline và Collagen và chỉ kết dính một phần với ristocetin. Điều này gợi ý suy giảm khả năng tiết trong bối cảnh hoặc rối loạn kho chứa hoặc thiếu hụt tiết nucleotide.



Tóm tắt:

Rối loạn	Đặc điểm LTA
Glanzmann's Thrombasthenia HOẶC afibrinogenaemia	Vắng hoặc giảm ngưng tập đáng kể với tất cả agonist trừ ristocetin. Với ristocetin chỉ xảy ra kết dính tương ứng sóng nguyên phát, không xảy ra ngưng tập được.

Bernard Soulier Syndrome HOẶC Von Willebrand Disease	Vắng hoặc giảm đáng kể kết dính tiểu cầu với ristocetin
Rối loạn kho chứa HOẶC khiếm khuyết bài tiết	Chỉ ngưng tập tiên phát với ADP, Adrenalin, Collagen và kết dính một phần với ristocetin
Aspirin (hoặc khiếm khuyết con đường COX)	Không ngưng tập với arachidonic acid Chỉ ngưng tập tiên phát với ADP Giảm hoặc không ngưng tập với Collagen.
Clopidogrel	Không ngưng tập với ADP
2B VWD hoặc bệnh giả VWD	Ngưng tập với ristocetin liều thấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, et al. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3344-51.
2. Nossent AY, VANM, NH VANT, Rosendaal FR, Bertina RM, JA VANM, et al. von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2006 Dec;4(12):2556-62.
3. Sztukowska M, Gallinaro L, Cattini MG, Pontara E, Sartorello F, Daidone V, et al. Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter Von Willebrand factor survival in patients with type 1 and type 1b von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2008 Sep;143(1):107-14.
4. Gadisseur A, Berneman Z, Schroyens W, Michiels JJ. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease type 1/2E (2A subtype IIE), type 1b von Willebrand disease and mild type 1 caused by mutations in the D3, D4, B1-B3 and C1-C2 domains of the von Willebrand factor gene. Role of von Willebrand factor multimers and the von Willebrand factor propeptide/antigen ratio. *Acta Haematol*. 2009;121(2-3):128-38.

Bài 2. XÉT NGHIỆM PFA-100

1. PFA-100 có giá trị tiên đoán âm cao, một kết quả PFA-100 bình thường có thể loại trừ hầu hết các rối loạn cầm máu ban đầu, vì thế hạn chế những xét nghiệm xa hơn không cần thiết.
2. Nếu PFA-100 bất thường thì test ngưng tập tiểu cầu cổ điển được thực hiện để xác định nguyên nhân bên dưới.

I. GIỚI THIỆU

PFA-100 là một hệ thống phân tích chức năng tiểu cầu trong đó máu toàn phần chống đông citrate được hút vào với tốc độ cắt cao (high shear rate) thông qua một vỏ (dùng 1 lần) có chứa khe hở, mà bên trong được phủ bởi hoặc collagen và epinephrine (CEPI) hoặc collagen và ADP (CADP). Những agonist tạo ra kết dính tiểu cầu, sự hoạt hóa và ngưng tập làm nghẽn nhanh dòng chảy và thời gian đóng closure time (CT) được ghi lại.

II. LỢI ÍCH CỦA HỆ THỐNG PFA-100

- Chỉ cần dùng một lượng nhỏ máu chống đông citrate (800 μ L) và vì vậy, test này hữu ích trong điều tra chức năng tiểu cầu ở trẻ em.
- Kỹ thuật đơn giản, nhanh và tự động.
- PFA-100 được thiết kế để sàng lọc những vấn đề của cầm máu kỳ đầu và thay thế thời gian máu chảy, được chuẩn hóa tốt hơn.
- Đo chức năng tiểu cầu tại tốc độ dòng chảy cao (high shear rate) phù hợp với sinh lý trong cơ thể hơn là đo bằng LTA đo trong trạng thái low shear rate.
- Tương đối ít nhạy với thiếu hụt các yếu tố đông máu.
- Giá trị tiên đoán âm cao.

III. MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG LÊN KẾT QUẢ PFA-100

Yếu tố	Tác động
Nồng độ citrate	LABO phải sử dụng một nồng độ citrate cố định
Thời gian thu thập mẫu	Cách lấy mẫu và thời gian vận chuyển đến LABO. Test này phải được thực hiện trong vòng 4h kể từ lúc thu thập.
Haematocrit	CT sẽ càng tăng khi Hct càng thấp. Ngược lại, CT ngắn lại ở trẻ sơ sinh do Hct cao.
Số lượng tiểu cầu	CT sẽ tăng cao khi số lượng tiểu cầu $<100 \times 10^9/L$
Nhóm máu và mức VWF	CT ngược với hoạt tính VWF huyết tương, nó sẽ tăng hơn ở nhóm O cùng vì lý do mức VWF thấp hơn.
Thuốc	Thuốc ức chế COX như Aspirin và NSAID thường kéo dài CT của CEPI nhưng không kéo dài với CADP. Ảnh hưởng block receptor ADP của clopidogrel là không tiên đoán được. Ức chế GpIIb/IIIa sẽ kéo dài đáng kể cả 2 test.

Suy giảm chức năng tiểu cầu mắc phải	Phẫu thuật bắt cầu tim phổi Bệnh gan Tăng ure máu
Một số thức ăn	Tạo ra dương tính giả, đặc biệt là CEPI.

Đề kháng với aspirin: PFA-100 thường được dùng để thành lập sự hiện diện của đề kháng aspirin. Tỷ lệ đề kháng aspirin không được biết, nhưng ước chừng 5-60%. Cơ chế đề kháng chưa rõ, nhưng giả thuyết bao gồm dung nạp kém, hấp thu aspirin kém, tăng độ nhạy của tiểu cầu với agonist, tăng hoạt tính COX, đa hình gene của GpIIIa và enzyme COX. Đề kháng aspirin phụ thuộc liều gập ở một số bệnh nhân, và có thể khắc phục bằng cách tăng liều.

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Bảng sau tóm tắt một số bất thường được báo cáo với PFA-100

Disorder	CT Collagen-ADP	CT Collagen-EPI
Normal	N	N
Aspirin and NSAIDs	N	↑
ADP receptor disorders including the use of Clopidogrel	N or ↑	N or ↑
BSS	↑	↑
GTT	↑	↑
VWD	↑	↑
Platelet-Type VWD	↑	↑
Dense Granule Deficiency	N or ↑	N or ↑
Primary Secretion Defects	N or ↑	N or ↑
Gray Platelet Syndrome	↑	↑
MYH9-related Disorders	N	↑
Scott Syndrome	N	N
MDS	N or ↑	N or ↑
Liver Disease	↑ [possibly as a result of ↓Hb]	↑ [possibly as a result of ↓Hb]

Uraemia

↑ [possibly as a result
of ↓Hb]

↑ [possibly as a result
of ↓Hb]

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

CEPI: 78-199 giây

CADP: 55-137 giây

VI. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

3. PFA-100 có giá trị tiên đoán âm cao cho rối loạn cầm máu ban đầu.
4. Kết quả PFA-100 bất thường sẽ đưa đến những phân tích sâu hơn ở LTA và xét nghiệm nucleotide tiểu cầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Favalaro, E.J., Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost*, 2008. 34(8): p. 709-33.
2. Reny, J.L., et al., Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*, 2008. 6(3): p. 444-50.
3. Karger, R., et al., Diagnostic performance of the platelet function analyzer (PFA-100) for the detection of disorders of primary haemostasis in patients with a bleeding history-a systematic review and meta-analysis. *Platelets*, 2007. 18(4): p. 249-60.
4. Favalaro, E.J., Laboratory monitoring of therapy in von Willebrand disease: efficacy of the PFA-100 and von Willebrand factor:collagen-binding activity as coupled strategies. *Semin Thromb Hemost*, 2006. 32(6): p. 566-76.
5. Franchini, M., The platelet function analyzer (PFA-100): an update on its clinical use. *Clin Lab*, 2005. 51(7-8): p. 367-72.
6. Franchini, M., The platelet-function analyzer (PFA-100) for evaluating primary hemostasis. *Hematology*, 2005. 10(3): p. 177-81.
7. Harrison, P., The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol*, 2005. 130(1): p. 3-10.
8. Favalaro, E.J., Clinical application of the PFA-100. *Curr Opin Hematol*, 2002. 9(5): p. 407-15.
9. Jilma, B., Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired

platelet dysfunction. *J Lab Clin Med*, 2001. 138(3): p. 152-63.

10. Favaloro, E.J., Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia*, 2001. 7(2): p. 170-9.

11. Rand, M.L., M.D. Carcao, and V.S. Blanchette, Use of the PFA-100 in the assessment of primary, platelet-related hemostasis in a pediatric setting. *Semin Thromb Hemost*, 1998. 24(6): p. 523-9.12.

Bài 3. FLOW CYTOMETRY

1. Flow cytometry hữu ích trong việc chẩn đoán khi chỉ có một lượng nhỏ mẫu máu có sẵn như trong trường hợp trẻ sơ sinh.
2. Tiểu cầu ở trạng thái chưa hoạt hóa ở trẻ sơ sinh có sự bộc lộ GpIIb/IIIa ít hơn hẳn so với người lớn. Nhưng GpIa/IIa và GpIb thì bình thường.
3. Flow cytometry có thể dùng để sàng lọc hội chứng Scott bằng cách phân tích Annexin V gắn với màng phospholipid tiểu cầu.
4. Sự hoạt hóa tiểu cầu có thể được phân tích bởi CD62b (P Selectin) – một thành phần của màng hạt α hoặc CD63 – một phức hợp của protein hạt đặc với màng lysosome. Việc gắn Mepacrine được thực hiện bởi hạt đặc, là marker cho hoạt hóa tiểu cầu.
5. Các microparticle tiểu cầu tăng rõ trong hoạt động cầm máu và có thể dùng để phân tích bởi Flow.
6. Một kỹ thuật ELISA chẩn đoán bệnh Glanzmann's Thrombasthenia đã được báo cáo [Lobo et al Ann Hematol 2012;91:917-921]. Xét nghiệm này sử dụng kháng thể anti-CD36 để bắt giữ tiểu cầu và sau đó xử lý với proteindisintegrin-alkaline phosphatase đặc hiệu cho GpIIb/IIIa. Kỹ thuật này đơn giản, nhanh và không cần flow cytometer.
7. Những người bị Glanzmann's Thrombasthenia sẽ được chia làm 3 type phụ thuộc vào mức biểu hiện GpIIb/IIIa. (Type 1: <5% biểu hiện GpIIb/IIIa; Type 2: 5-20%; Type 3: số lượng bình thường nhưng rối loạn chức năng receptor)

I. GIỚI THIỆU

Tiểu cầu được gắn nhãn bằng các kháng thể chống lại trực tiếp các glycoprotein màng sau đó phân tích bởi flow cytometry là kỹ thuật nhanh, nhạy cho các LABO đông máu chuyên sâu.

Test có thể thực hiện được với máu toàn phần, PRP, hoặc tiểu cầu rửa. Cần một thể tích mẫu nhỏ, phù hợp với đối tượng sơ sinh.

Flow cytometry được sử dụng trong nhiều bối cảnh:

- Theo dõi liệu pháp sử dụng đối vận của GpIIb/IIIa.
- Chẩn đoán những khiếm khuyết glycoprotein bề mặt tiểu cầu di truyền
- Chẩn đoán bệnh lý kho chứa

- Chẩn đoán HIT
- Chẩn đoán hội chứng Scott
- Và còn nhiều nữa....

Máu toàn phần được sử dụng trong flow giúp vượt qua nhiều vấn đề cố hữu trong phân tích PRP

- Sinh lý hơn
- Hoạt hóa tiểu cầu là tối thiểu vì thao tác trên mẫu là tối thiểu
- Nhiều receptor tiểu cầu được phân tích một cách tự động
- Những kháng thể mới có thể dễ dàng tham gia vào phương pháp đã có
- Thể tích mẫu nhỏ
- Có thể dùng ở bệnh nhân giảm tiểu cầu đáng kể.

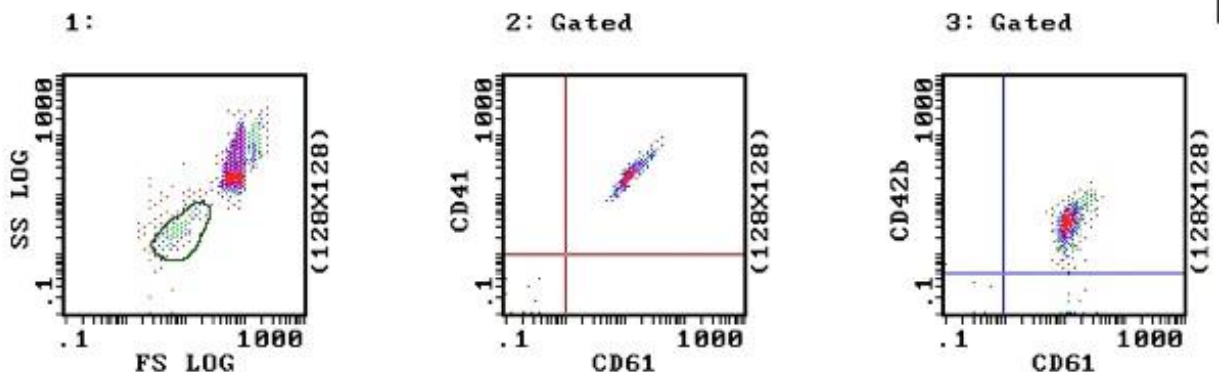
II. NGUYÊN LÝ: Xem video

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

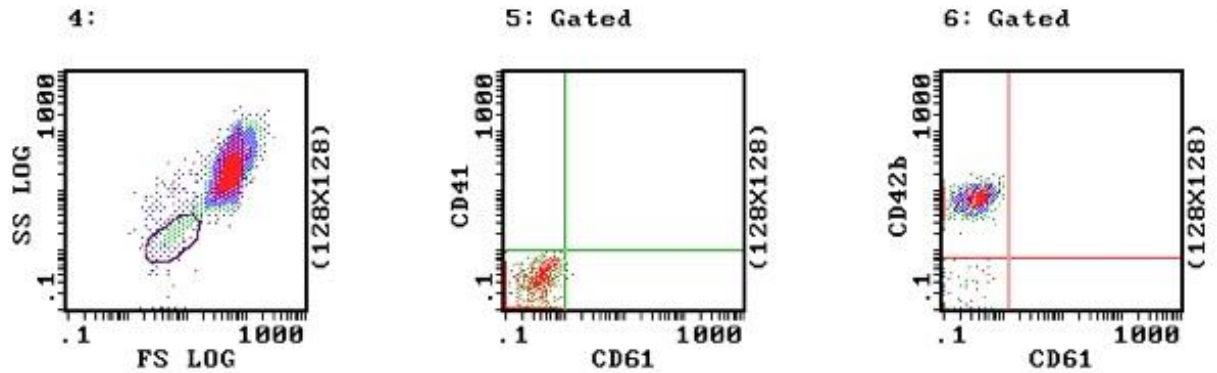
Hình ảnh sau cho thấy vai trò của flow cytometry trong phân tích bệnh Glanzmann's Thrombasthenia và Bernard Soulier Syndrome. Trong cả 2 trường hợp, chúng ta sử dụng 3 kháng thể CD41, CD61 và CD42b kháng lại trực tiếp các glycoprotein màng

Kháng thể	Độ đặc hiệu
CD41	CD41 nhận ra glycoprotein GpIIb (chuỗi integrin alpha IIb), là thành phần liên kết không cộng hóa trị với GpIIIa (chuỗi integrin beta 3) tạo phức hợp GpIIb/IIIa.
CD61	CD61 nhận ra glycoprotein GpIIIa (chuỗi integrin beta 3) của màng tiểu cầu.
CD42b	CD42b phản ứng với GpIb ở mẫu tiểu cầu và tiểu cầu. CD42b cũng ức chế khả năng gắn của VWF vào tiểu cầu với sự hiện diện của ristocetin cũng như ức chế RIPA.

1. Tiểu cầu bình thường: Hình 1, mẫu máu bình thường, tiểu cầu được chọn ra dựa vào FS và SS (Forward và Side Light Scatter) và được khoanh trong vòng màu xanh. Hình 2, tiểu cầu được nhuộm với CD41 (GpIIb) và CD61 (GpIIIa) và cho biểu hiện cả 2 glycoprotein. Hình 3, tiểu cầu được nhuộm với CD42b (GpIb) và CD61 (GpIIa) và biểu hiện cả 2 glycoprotein.

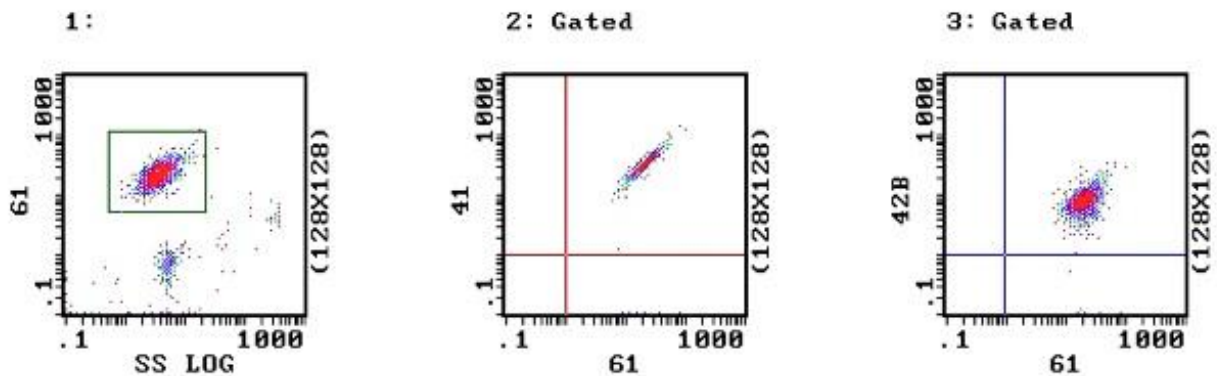


2. Glanzmann's Thrombasthenia: Hình ảnh từ bệnh nhân bị Glanzmann's Thrombasthenia. Hình 5 và 6 cho thấy không có hoạt động của cả CD41 và CD61, cho thấy thiết hụt phức hợp GpIIb/IIIa => bệnh Glanzmann's Thrombasthenia. Tuy nhiên hình 6 cho thấy hoạt động của CD42b (GpIb) là bình thường

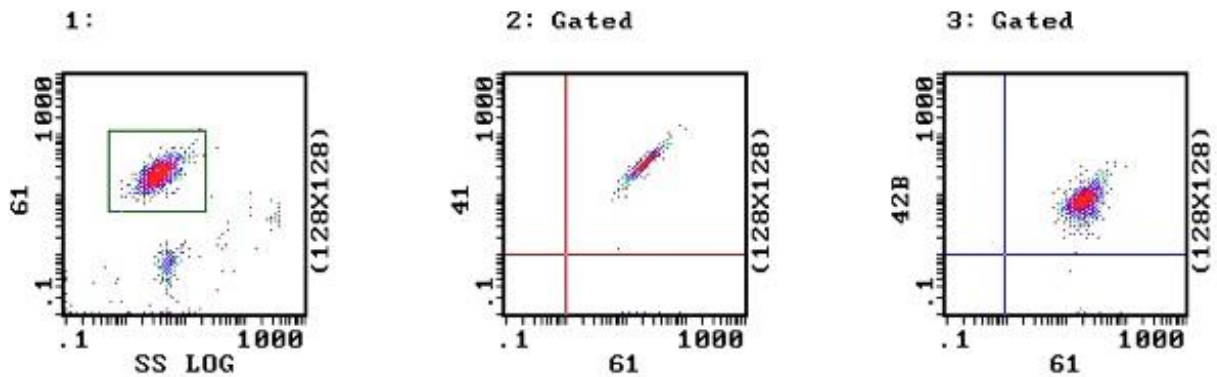


3. Hội chứng Bernard Soulier

- a. Tiêu cầu bình thường: Hình 1 tiêu cầu được chọn dựa trên SS và gắn CD61. Hình 2 và 3 – tiêu cầu (từ 1 người bình thường) cho thấy hoạt tính của cả CD41 và 61 (Hình 2), hoạt tính của cả CD61 và CD42b (hình 3) chỉ ra rằng receptor GpIIb-IIIa và GpIb là bình thường.



- b. Hình ảnh từ bệnh nhân BSS: Hình 5 cho thấy sự gắn bình thường với CD41 và CD61 chỉ ra phức hợp GpIIb-IIIa bình thường. Hình 6 cho thấy 2 pool tiêu cầu, 1 pool với CD61 và CD42 gắn bình thường (53% tổng tiêu cầu được phân tích) và một pool nhỏ hơn (47%) cho thấy gắn CD61 bình thường nhưng khiếm khuyết với CD42 => vắng GpIb. Đây là trường hợp tiêu cầu của BSS sau khi được truyền tiêu cầu và 2 pool đại diện cho 2 dân số tiêu cầu.



Điều thú vị là (dữ liệu không trình ra) sự phát huỳnh quang trung bình của pool BSS lớn hơn pool tiêu chuẩn bình thường, phản ánh sự tăng MPV và tiểu cầu lớn ở BSS.

IV. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Nền tảng của test này giúp chẩn đoán hoặc GTT hoặc BSS. Những test thêm vào có thể là giải trình tự gene để xác định đột biến nguyên nhân và nghiên cứu phá hệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. [Flow Cytometry](#)

2. Michelson, A.D., Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2006. 35(1-2): p. 67-82.

3. Linden, M.D., et al., Application of flow cytometry to platelet disorders. *Semin Thromb Hemost*, 2004. 30(5): p. 501-11.

4. Rinder, H.M., Platelet function testing by flow cytometry. *Clin Lab Sci*, 1998. 11(6): p. 365-72.

5. Michelson, A.D., Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*, 1996. 87(12): p. 4925-36.

7. Percy CL, Macartney N, Pollard B, Rayment R, Collins PW. Laboratory monitoring of Scott Syndrome. *Br J Haematol*. 2009 Oct 8.

8. Weiss HJ, Lages B. Family studies in Scott syndrome. *Blood*. 1997 Jul 1;90(1):475-6.

9. Zhou Q, Sims PJ, Wiedmer T. Expression of proteins controlling transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the B lymphocytes from a patient with Scott syndrome. *Blood*. 1998 Sep 1;92(5):1707-12.

10. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 22;1636(2-3):119-28.

11. This [LINK](#) is a useful slideshow in pdf format on flow cytometry for the analysis of platelets.

Bài 4. XÉT NGHIỆM NUCLEOTIDE TIỂU CẦU

I. GIỚI THIỆU

Có 2 “hồ chứa” nucleotide riêng biệt trong tiểu cầu. 60% chứa trong hạt đặc và không hoạt động chuyển hóa, 40% còn lại tạo thành “hồ chuyển hoá” và cung cấp năng lượng cho nhiều hoạt động khác nhau của tiểu cầu.

Có sự khác biệt về nồng độ tương đối giữa ADP và ATP trong hai hồ và sự trao đổi giữa 2 khu vực là rất chậm:

- Hồ chuyển hóa: ATP:ADP là 8:1
- Hạt đặc: ATP:ADP là 2:3

Hạt	Thành phần
Hạt đặc	ADP (ADP được tập trung trong hạt đặc) ATP/GDP/GTP Serotonin Ca^{2+}/Mg^{2+} * Hạt đặc bài tiết: Khi tiểu cầu kết dính vào mọi mạc tổn thương, điều này dẫn đến: hoạt hóa tiểu cầu thông qua nhiều cơ chế tín hiệu nội bào → tiết ra các chất chứa trong hạt alpha và hạt đặc bao gồm ADP và serotonin, cả hai chất này đều làm hoạt hóa tiểu cầu → tạo ra và bài tiết TxA2 (gắn với Tx receptor) → hoạt hóa (bằng cách thay đổi cấu dạng GpIIb/IIIa) để chuẩn bị cho sự tạo ra phức hợp “Tenase” và phức hợp prothrombinase → bộc lộ phospholipid tích điện âm, cho phép tạo ra phức hợp “Tenase” và phức hợp prothrombinase → tạo ra các microvesicle (thuật ngữ này vui lòng đọc thêm trên Wikipedia, còn gọi là microparticle) tiền đông.
Hạt alpha	Fibrinogen/fibronectin/VWF Factor V PF4 PDGF/TGFβ

Trong rối loạn kho chứa, làm giảm hoặc mất thể đặc – điều này dẫn đến sự giảm tổng số lượng ATP và ADP, làm tăng đáng kể tỉ số giữa ATP và tổng lượng ADP của tiểu cầu.

II. RỐI LOẠN KHO CHỨA (SPD – Storage Pool Disorder)

SPD	Mô tả
Suy giảm hạt đặc	Hội chứng Hermansky-Pudlak Hội chứng Chediak-Higashi Suy giảm hạt đặc vô căn * Những đặc điểm của suy giảm hạt đặc: 1. LTA: - ADP liều thấp: không có sóng thứ 2 với agonist yếu.

	<p>- Adrenaline: Vắng sóng thứ 2 với adrenaline. Tuy nhiên điều này cũng có thể xảy ra 10-15% người bình thường.</p> <p>- Collagen: chậm và kém đáp ứng với collagen.</p> <p>- Arachidonic Acid/Ristocetin: đáp ứng kém (Chú ý: LTA tương đối kém trong xác định SPD, đo nucleotide hoặc Lumiaggrometry nhạy hơn)</p> <p>2. Giảm đáng kể cả ADP và tỉ số ADP:ATP hoặc khiếm khuyết bài tiết ATP (nhớ rằng bài tiết từ hạt đặc là con đường khuếch đại cho hoạt hóa tiểu cầu và cần cho hoạt hóa bên vũng GpIIb/IIIa).</p> <p>3. Giảm số lượng hoặc vắng hạt đặc trên kính hiển vi điện tử.</p> <p>4. Xác nhận suy giảm hạt đặc cũng có thể xác định nhanh bằng việc suy giảm các hạt gắn mepacrine của tiểu cầu bằng flow cytometry.</p> <p>* Chú ý: Rối loạn bài tiết và dẫn truyền tín hiệu có thể cho ra kết quả LTA tương tự SPD, nhưng hạt tiểu cầu hiện diện bình thường trong các bệnh lý này, vấn đề nằm ở chỗ bài tiết bất thường mà thôi. Bài tiết hạt là quá trình cần thiết để tạo ra sóng ngưng tập thứ 2 và vì vậy nếu suy giảm hạt hoặc bài tiết không đầy đủ thì ảnh hưởng trên LTA sẽ tương tự.</p>
Rối loạn mắc phải	<p>Rối loạn tăng sinh tủy</p> <p>DIC</p> <p>Phẫu thuật bắt cầu tim phổi (CPB)</p> <p>Xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)</p> <p>Hội chứng tán huyết tăng ure huyết (HUS)</p>

III. ĐO NUCLEOTIDE TIỂU CẦU

Kỹ thuật	
Lumiaggrometry	<p>Lumiaggrometry là một biến thể của LTA đo sự bài tiết ATP từ hạt đặc. Nó dựa trên khả năng phát quang của ATP khi phản ứng với luciferin và luciferase.</p> <p>Để đo ngưng tập, máy lumiaggrometer sử dụng một đèn LED phát ra ánh sáng hồng ngoại, và những thay đổi trong ánh sáng truyền qua được xác định bởi một phototransistor. Để đo khả năng phát quang từ việc bài tiết ATP, người ta dùng một ống photomultiplier đặt thẳng góc với nguồn sáng của đèn LED.</p> <p>Luciferin + ATP → Luciferyl Adenylate + Inorganic phosphate [PPi]</p> <p>Luciferyl Adenylate + O₂ → Oxyluciferin + AMP + LIGHT</p> <p>Đo khả năng bài tiết tiểu cầu sử dụng phản ứng luciferin-luciferase có thể sử dụng aggregometry máu toàn phần.</p>
Kính hiển vi điện tử	Hạt đặc có thể quan sát dễ dàng dưới kính hiển vi điện tử.
HPLC	HPLC là một trong những cách có thể đo thành phần ADP và ATP trong hạt tiểu cầu.
Bài tiết hạt tiểu cầu.	Cũng có thể đo bằng xét nghiệm bài tiết Serotonin ¹⁴ C

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Nucleotide	Reference Range
Total platelet nucleotide content	5.5 - 9.6 nmol/10 ⁸ platelets
ATP content of platelets	3.5 - 5.9 nmol/10 ⁸ platelets
ADP content of platelets	1.9 - 3.8 nmol/10 ⁸ platelets
Ratio	1.3 - 2.0 [>2 = abnormal]

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hardisty, R.M., Disorders of platelet secretion. Baillieres Clin Haematol, 1989. 2(3): p. 673-94.
2. Lages, B. and H.J. Weiss, Heterogeneous defects of platelet secretion and responses to weak agonists in patients with bleeding disorders. Br J Haematol, 1988. 68(1): p. 53-62.
3. Wall, J.E., et al., A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. Br J Haematol, 1995. 89(2): p. 380-5.

Bài 5. XÉT NGHIỆM HOẠT TÍNH TIỀN ĐÔNG CỦA TIỂU CẦU

Platelet Procoagulant Activity [PCA] Assays

1. Xét nghiệm này dành cho một số loại rối loạn hiếm.

I. HỘI CHỨNG SCOTT VÀ HOẠT TÍNH TIỀN ĐÔNG TIỂU CẦU

Hoạt tính tiền đông của tiểu cầu trước đây được thiết kế là yếu tố 3 tiểu cầu (Platelet Factor-3 (PF3) hoặc Platelet Factor-3 availability (PF3a)). Hội chứng Scott được gọi tên sau khi bệnh nhân đầu tiên được mô tả rối loạn này (Ann Scott) năm 1973.

Có một rối loạn hiếm về hoạt tính tiền đông của tiểu cầu (tới hiện tại chỉ có 3 case được báo cáo), mà nguyên nhân, ít nhất trong một số trường hợp, là đột biến trong gene ABC transporter A1 [ABCA1] hoặc gene điều hòa hoạt động trans-, kiểm soát biểu hiện gene.

Bệnh nhân hội chứng Scott chịu rối loạn chảy máu từ vừa đến nặng. Tuy nhiên, có một số rối loạn hoạt tính tiền đông tiểu cầu khác là Quebec Platelet Disorder (Platelet Factor V Quebec), Platelet Factor V-New York, một số bệnh nhân với Storage Pool Disorder [SPD], Glanzmann's Thrombasthenia và Bernard Soulier Syndrome. Việc tìm kiếm Glanzmann's Thrombasthenia và Bernard Soulier Syndrome gợi ý bất thường glycoprotein màng tiểu cầu cũng có thể tương tác với PCA tiểu cầu và xu hướng chảy máu không phải do thiếu hụt glycoprotein tuyệt đối.

Ít nhất một số bệnh nhân với hội chứng Scott cho thấy khiếm khuyết gắn kết FVa vào inophore (thể mang ion) trên tiểu cầu hoạt hóa. Sự thay đổi trong màng phospholipid xảy ra trong quá trình hoạt hóa tiểu cầu là điều kiện tối cần thiết để tạo thành phức hợp "tenase" và "prothrombinase" và bộc lộ sự khiếm khuyết gắn FVa bằng Flow cytometry.

II. PHƯƠNG PHÁP

Nhiều test hữu ích cho sàng lọc bất thường hoạt tính tiền đông của tiểu cầu.

1. Chỉ số tiêu thụ Prothrombin (Prthrombin Consumption Index – PCI)

Điều này dựa vào sự phát hiện thời gian Prothrombin của huyết thanh dài hơn so với huyết tương, do prothrombin bị tiêu thụ trong quá trình chuyển thành thrombin.

$$PCI = (\text{Clotting time huyết thanh} / \text{CT huyết tương}) \times 100\%$$

Nếu loại trừ giảm tiểu cầu và phospholipid, thì bất thường PCI có thể do khiếm khuyết PCA.

2. Xét nghiệm PF3a

Xét nghiệm PF3a dựa trên nguyên lý ủ PRP với kaolin làm hoạt hóa hoạt tính tiền đông của tiểu cầu => rút ngắn đáng kể so với cả thời gian phục hồi calci và thời gian RVV.

Xét nghiệm PF3a rất hữu ích cho sàng lọc bất thường PCA tiểu cầu nhưng không chẩn đoán được một rối loạn đặc hiệu nào.

3. Khả năng gắn Annexin V

Annexin V là một protein với ái lực cao và đặc hiệu cho aminophospholipid tại nồng độ calcium sinh lý và có thể dùng như một marker cho hoạt hóa tiểu cầu và phát huy hoạt tính tiền đông. Sử dụng annexin V trong flow cytometry cung cấp một phương pháp nhanh để đánh giá hoạt tính tiền đông trong tiểu cầu và mất phospholipid không đối xứng ở màng tế bào.

III. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Nếu PCI hoặc PF3a bất thường, thì sàng lọc đột biến gene ABC transporter A1 [ABCA1] nên được thực hiện, nhưng cũng nên quan tâm đến các nguyên nhân khác gây bất thường PCA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brooks, M.B., et al., Exclusion of ABCA-1 as a candidate gene for canine Scott syndrome. *J Thromb Haemost*, 2008. 6(9): p. 1608-10.
2. Zwaal, R.F., P. Comfurius, and E.M. Bevers, Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1636(2-3): p. 119-28.
3. Zhou, Q., P.J. Sims, and T. Wiedmer, Expression of proteins controlling transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the B lymphocytes from a patient with Scott syndrome. *Blood*, 1998. 92(5): p. 1707-12.
4. Weiss, H.J. and B. Lages, Platelet prothrombinase activity and intracellular calcium responses in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb-IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity--a comparison with Scott syndrome. *Blood*, 1997. 89(5): p. 1599-611.
5. Weiss, H.J. and B. Lages, Family studies in Scott syndrome. *Blood*, 1997. 90(1): p. 475-6.
6. Toti, F., et al., Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood*, 1996. 87(4): p. 1409-15.
7. Weiss, H.J., Scott syndrome: a disorder of platelet coagulant activity. *Semin Hematol*, 1994. 31(4): p. 312-9.
8. 1. Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost* 2011;9:1883-91.

PHẦN 3. BỘ XÉT NGHIỆM YẾU TỐ

Bài 1. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ DỰA VÀO PT MỘT GIAI ĐOẠN

(1-Stage-Based Factor Assays)

1. Độ pha loãng của huyết tương chứng và của huyết tương mẫu thử (trộn huyết tương bệnh nhân cần xác định yếu tố với huyết tương đặc hiệu thiếu yếu tố đó) có thể không giống nhau, cần nhận ra điều này khi biểu diễn trên biểu đồ. Ví dụ nếu độ pha loãng huyết tương chứng là {1/64, 1/128, 1/256} trong khi đó huyết tương mẫu thử là {1/4; 1/8; 1/16} bạn phải điều chỉnh lại kết quả cuối do khác biệt về độ pha loãng. Nếu chọn mức pha loãng 1/64 của huyết tương chứng là 100% và được dùng để suy ra yếu tố đông máu trong mẫu thử thì giá trị sau đó phải được chia cho 4 do khác nhau 4 lần độ pha loãng.
2. Nên nhớ nếu nồng độ của yếu tố đông máu trong huyết tương chứng cho bởi IU/dL thì huyết tương của mẫu thử nên được báo cáo với đơn vị IU/dL, dùng cùng đơn vị, không chuyển đổi. Đơn vị IU có nghĩa là huyết tương đó đã được chuẩn hóa theo chuẩn quốc tế, đơn vị % nghĩa là nó chưa được chuẩn hóa.
3. Nên nhớ, bạn không thể pha loãng một thứ không có! Vì vậy nếu tất cả các mức pha loãng đều cho một thời gian kéo dài như nhau thì đồng nghĩa mức yếu tố <math>< 1\text{IU/dL}</math> (hoặc <math>< 1\%</math>)
4. Nếu bạn biểu diễn nhiều mức pha loãng của huyết tương chứng nhưng chỉ 1 mức của huyết tương mẫu thử - bạn có thể luôn luôn tạo ra được một đường song song! Một số máy tự động làm điều này với mặc định rằng đường chứng và đường mẫu thử là song song. Tuy nhiên, 2 đường này có thể không song song (ví dụ bệnh nhân có chức ức chế). Vì vậy, bạn nên tránh chỉ sử dụng 1 điểm để xác định yếu tố đông máu.
5. Một số LABO ưa thích tính toán mức yếu tố đông máu cho mỗi độ pha loãng riêng biệt và sau suy ra bằng cách lấy trung bình giữa chúng, tuy nhiên điều này ít có lợi nếu 2 đường này song song.
6. Để chính xác, đường thẳng phải đạt độ dốc đầy đủ. Độ dốc tối thiểu không nên kéo dài dưới 50% thời gian đông của mỗi độ pha loãng 10 lần trong mẫu thử. Vì vậy,

nếu độ pha loãng 1/10 cho ra thời gian là 40 giây thì độ pha loãng 1/100 nên cho thời gian đông tối thiểu 60 giây ($40 [+50\% \text{ của } 40]=60$)

7. Nếu bạn quyết định điều tra một xét nghiệm yếu tố đông máu của con đường chung (như II, V, X) vì cả PT và APTT đều kéo dài, đừng quên rằng có thể là trường hợp suy giảm nhiều yếu tố như ở bệnh nhân uống kháng vitamin K hoặc trường hợp suy giảm FV+VIII.
8. Nhớ rằng ở thang Log, nếu bạn ấn định độ pha loãng 1/10 là 100% thì 1/100 phải là 10% và 1/1000 phải là 1%.
9. Mức các yếu tố II, VII, IX, X thấp lúc sinh vì nó phụ thuộc vitamin K. Chúng đạt được mức như người lớn lúc 6 tháng tuổi.

I. GIỚI THIỆU

Để xác định mức các yếu tố V, VII, X và II, một phương pháp dựa vào thời gian PT được sử dụng.

II. NGUYÊN LÝ

Xét nghiệm các yếu tố đông máu dựa trên việc đo mức độ hiệu chỉnh PT khi huyết tương của bệnh nhân được cho thêm vào huyết tương thiếu yếu tố đặc hiệu cần đo.

III. PHƯƠNG PHÁP

Bạn cần một bút chì sắc, một thước kẻ trong, và có thể là một cục tẩy ☺ và một vài tấm biểu đồ Log-Log.

Pha loãng các mức huyết tương chứng và huyết tương bệnh nhân với dung dịch đệm (ví dụ: 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80...)

Độ pha loãng	1/10	1/20	1/30	1/40	1/80	1/100	1/1000
% hoạt tính	100%	50%	33%	25%	12.5%	10%	1%

Kiểm tra nồng độ của huyết tương tham chiếu chuẩn và đơn vị được dùng:

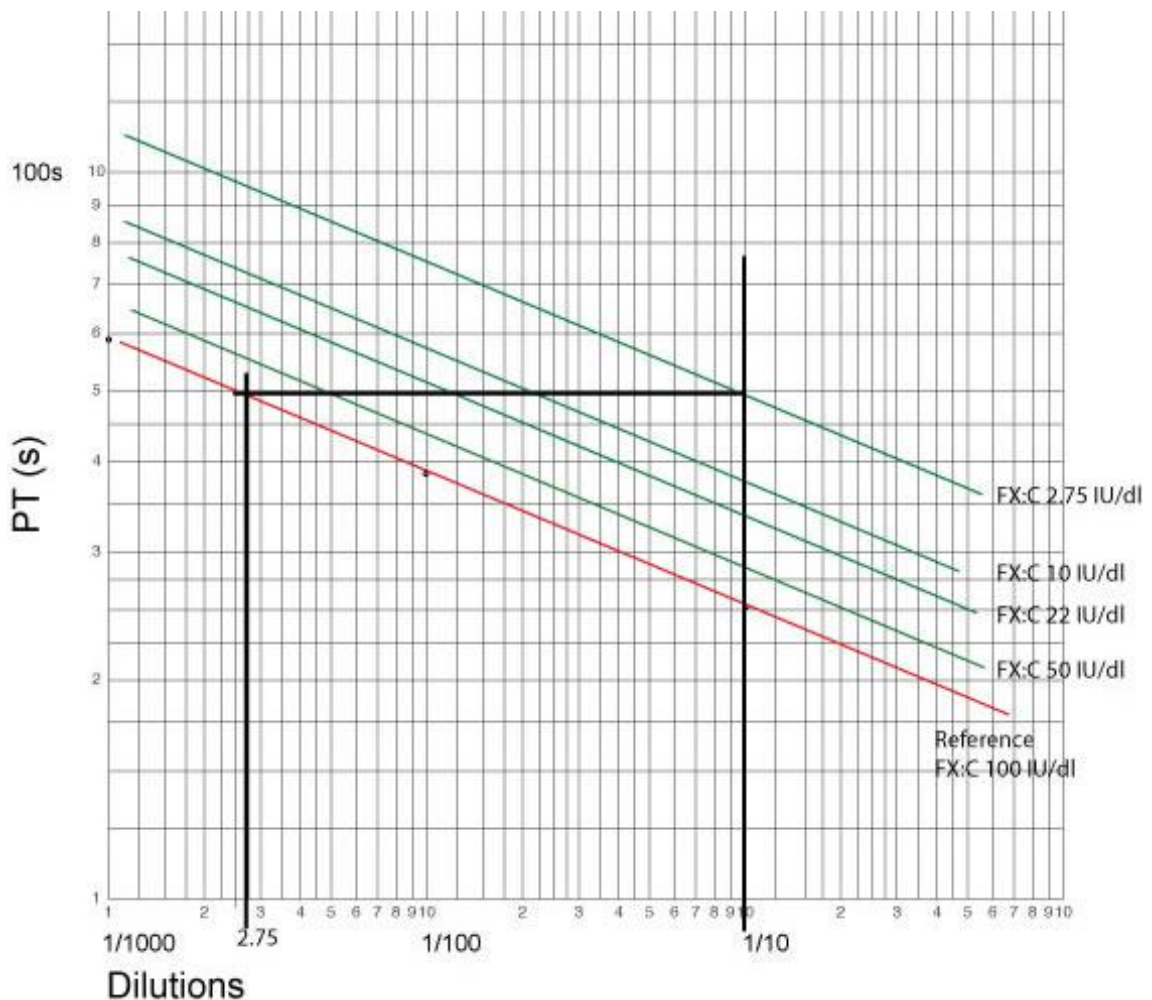
1. Huyết tương tham chiếu chuẩn có phải 100UI/dl? Nếu không, bạn phải điều chỉnh để đạt được con số này với bất kỳ yếu tố nào bạn cần suy ra từ mẫu tham chiếu này.
2. Đơn vị của huyết tương tham chiếu là IU/dl hay IU/ml hay %? Đảm bảo là bạn đã dùng cùng đơn vị và không đổi đơn vị IU hoặc %. Đơn vị IU có nghĩa là huyết tương đó đã được chuẩn hóa theo chuẩn quốc tế, đơn vị % nghĩa là nó chưa được chuẩn hóa.
3. Vẽ kết quả - thường dùng biểu đồ Log-Log (thang đo logarithm ở cả trục X và trục Y). Mức pha loãng luôn luôn biểu diễn trên trục X và thời gian cục máu đông thể

hiện trên trục Y. Độ pha loãng bắt đầu từ bên phải với độ pha loãng nhỏ nhất. Thời gian cục đông bắt đầu từ đáy trục Y, và khi thời gian cục đông tăng lên, bạn sẽ di chuyển theo trục Y.

4. NHỚ: Các trục là thang LOG (đối với xét nghiệm yếu tố dựa vào PT) và bạn cần đảm bảo rằng bạn định hướng vị trí thang đo chính xác.
5. Độ pha loãng nhỏ nhất của huyết tương chuẩn được ấn định giá trị 100% (100IU/dl). Tuy nhiên bạn có thể ấn định bất kỳ độ pha loãng nào của huyết tương chuẩn là 100% miễn là tất cả các độ pha loãng khác lấy giá trị này để tính toán, ví dụ nếu 1/10 được ấn định là 100IU/dl (hoặc 100%) thì 1/20 sẽ có giá trị 50IU/dl (50%), 1/40 sẽ là 25IU/dl (25%) và tiếp tục như vậy. Nếu 1/20 được ấn định là 100IU/dl (100%) thì 1/40 sẽ là 50IU/dl (50%) và tiếp tục.

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Xem một ví dụ cụ thể ở video minh họa.



V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Mỗi LABO phải xây dựng một khoảng tham chiếu riêng, nhìn chung đối với xét nghiệm yếu tố dựa vào PT một giai đoạn, khoảng tham chiếu nằm giữa 50-150% [50-150 IU/dL hoặc 0.5-1.50 IU/mL]

VI. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

1. Nếu bạn tìm thấy kết quả FV giảm (tương tự nếu FVIII giảm), bạn nên đề nghị xét nghiệm FVIII (hoặc FV) để loại trừ rối loạn di truyền NST thường hiếm gặp.
2. Nếu bạn thấy FVII thấp, phải đảm bảo rằng nguồn yếu tố mô trong test PT được lấy có nguồn gốc từ người, vì một số đột biến gene F7 như FVII Padua có thể làm tăng sự biến thiên FVII phụ thuộc nguồn cung cấp TF trong test PT. Dù sao thì cũng nên sử dụng TF người tái tổ hợp, sẽ cho kết quả tương tự như trong in vivo.
3. Nếu bạn tìm thấy mức thấp các yếu tố đông máu phụ thuộc vitamin K – xem xét khả năng bệnh nhân đang uống warfarin hay suy giảm vitamin K thật sự? hay có thể là những đột biến gene liên quan đến mã hóa các protein liên quan đến chu kỳ vitamin K.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Girolami A, Sartori MT, Steffan A, Fadin MA. Recombinant thromboplastin is slightly more sensitive to factor VII Padua than standard thromboplastins of human origin. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993 Jun;4(3):497-8.
2. Girolami A, Toffanin F, Gazzetta R. Factor VII survival studies in factor VII Padua abnormality. *Acta Haematol*. 1980;63(6):333-5.
3. Girolami A, Cattarozzi G, Dal Bo Zanon R, Toffanin F. Factor VII Padua 2: another factor VII abnormality with defective ox brain thromboplastin activation and a complex hereditary pattern. *Blood*. 1979 Jul;54(1):46-53.

Bài 2. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ DỰA VÀO APTT MỘT GIAI ĐOẠN (1-Stage APTT-Based Factor Assays)

1. Phương pháp này là chủ đề của tất cả các biến đổi tiền phân tích (pre-analytical variables) mà có thể tác động lên APTT bao gồm những biến đổi trong phương pháp (methodology) - như nguồn cung cấp phospholipid hoặc huyết tương khiếm khuyết yếu tố, và quá trình thực hiện.
2. Sự chuẩn bị đường cong tham chiếu và đánh giá những giá trị của bệnh nhân cũng làm tăng nguy cơ biến thiên kết quả. Vì một kết quả có thể biến thiên giữa các LABO. Tình huống này có thể cải thiện tốt hơn với tự động hóa và chuẩn hóa quốc tế cũng như sự chuẩn bị huyết tương có sẵn thương mại hóa, tuy nhiên vẫn giữ trong suy nghĩ khi so sánh kết quả giữa các LABO khác nhau.
3. Xét nghiệm dựa trên APTT có một mức độ sai lệch cố hữu do tương tác với mật độ quang từ lipid hoặc heprin trong mẫu và độ nhạy của nó với tiền hoạt hóa FVIII. Những phương pháp thay thế cho xét nghiệm yếu tố đã có và được dùng dưới những hoàn cảnh nhất định, chúng bao gồm phương pháp so màu và xét nghiệm đông máu 2 giai đoạn, được dùng bởi các công ty dược để xác định hiệu lực nồng độ yếu tố đông máu.
4. Vấn đề đơn vị, đã đề cập ở bài xét nghiệm dựa vào PT một giai đoạn.
5. Mức các yếu tố II, VII, IX, X thấp lúc sinh vì nó phụ thuộc vitamin K. Chúng đạt được mức như người lớn lúc 6 tháng tuổi.

I. GIỚI THIỆU

Xét nghiệm yếu tố dựa vào APTT một giai đoạn được sử dụng rộng rãi để đo các yếu tố VIII, IX, XI và XII. Nó cũng có thể dùng để đo các yếu tố X, V, II mặc dù các yếu tố này chủ yếu dựa vào PT.

II. NGUYÊN LÝ

APTT đánh giá sự tương tác của một lượng lớn các yếu tố đông máu. Để nó có hiệu lực, tất cả các yếu tố đông máu phải bình thường hoặc gần bình thường (phụ thuộc vào phương pháp đo APTT không nhạy với suy giảm nhẹ các yếu tố). Ngược lại, khi yếu tố đông máu thấp, APTT trở nên kéo dài. Có 2 nguyên lý cơ bản được sử dụng ở đây:

1. APTT có một quan hệ về mặt toán học rõ ràng với nồng độ các yếu tố đông máu
2. Nếu có sự thay đổi APTT trong mẫu thử thiếu 1 yếu tố nhất định so với huyết tương chứng thì giá trị của APTT có thể dùng để tính ra nồng độ yếu tố đó.

Vì vậy, khi chúng ta xác định được quan hệ trong ý 1, thì sự biến đổi trong ý 2, từ APTT ta sẽ suy ra được mức yếu tố đó. Nó phổ biến được dùng để đo các yếu tố VIII, IX, XI.

Yếu tố XII cũng như Pre-kallikrein cũng có thể được xác định bằng phương pháp này mặc dù không có yếu tố nào gây ra xu hướng dễ chảy máu, nhưng nó làm kéo dài APTT.

III. PHƯƠNG PHÁP

Để xét nghiệm một yếu tố dựa vào APTT cần:

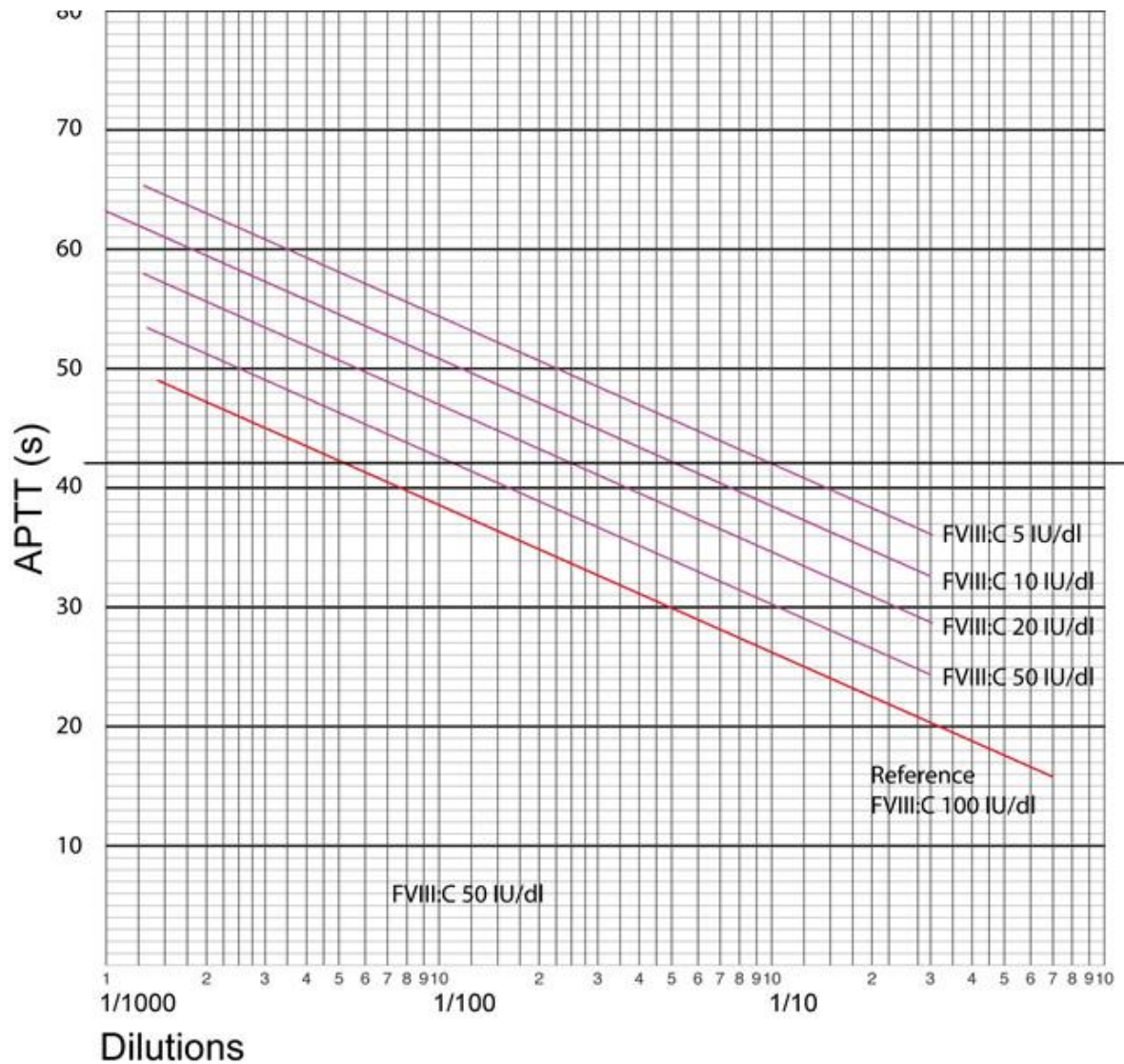
Thuốc thử	Giải thích
Bộ thuốc thử APTT	Xem phân xét nghiệm APTT
Huyết tương tham chiếu chuẩn	Huyết tương này được dùng để thành lập một điểm mốc, từ đó các yếu tố đông máu trong các huyết tương khác được xác định bằng cách đối chiếu thời gian cục máu đông. Nó được ấn định có 100% tất cả yếu tố đông máu và có thể được tạo ra bằng cách trộn huyết tương của nhiều người tình nguyện khỏe mạnh (khoảng 40 người). Nhiều LABO hiện nay mua các chuẩn tham chiếu thương mại hóa, trong đó mức các yếu tố đông máu đã được chuẩn hóa theo chuẩn quốc tế và mức các yếu tố đó được báo cáo bằng IU/dl hoặc IU/ml chứ không còn là %.
Huyết tương khuyết yếu tố (Huyết tương nền)	Một huyết tương mất hoàn toàn 1 yếu tố trong con đường tạo APTT (phổ biến là VII, IX, XI). Huyết tương như vậy thường thương mại hóa sẵn nhưng cũng có thể chuẩn bị từ những người cho (như những bệnh nhân Haemophilia A thể nặng đã biết). Nếu huyết tương này được chuẩn bị từ người cho, thì mức yếu tố phải <1 IU/dl và vắng mặt chất ức chế.
Huyết tương bệnh nhân	Huyết tương nghèo tiểu cầu (PPP)

Những máy phân tích hiện đại thực hiện tất cả những tính toán một cách chính xác, nhưng vì mục đích minh họa nguyên lý, chúng ta sẽ dùng giấy vẽ biểu đồ. Một ví dụ xác định yếu tố VIII:

1. Xác định mối quan hệ toán học giữa APTT và nồng độ các yếu tố đông máu là tương đối rõ ràng. Chuẩn bị hàng loạt độ pha loãng của huyết tương tham chiếu với dung dịch đệm: 1/10, 1/20, 1/40... và tiến hành đo APTT.
2. Thời gian APTT ở mỗi độ pha loãng sau đó được biểu diễn trên đồ thị Log-Lin và đường thẳng tốt nhất được vẽ đi qua chúng. Đường này cho phép chúng ta xác định mức pha loãng của huyết tương bình thường cần để tạo ra một thời gian APTT nhất định. Vì mối quan hệ giữa độ pha loãng và APTT là hàm mũ, nếu những điểm này được vẽ trên biểu đồ Log-Lin thì một đường thẳng sẽ được tạo ra. ($y = ax^k \Rightarrow \log y = k \log x + \log a \leftrightarrow Y = kX + b$)

Độ pha loãng	1/10	1/20	1/30	1/40	1/80	1/100	1/1000
% hoạt tính	100%	50%	33%	25%	12.5%	10%	1%

3. Huyết tương cần kiểm tra được làm tương tự như huyết tương tham chiếu với hàng loạt độ pha loãng được trộn với một thể tích bằng nhau của huyết tương nền. Vì huyết tương nền không chứa FVIII nhưng cung cấp số lượng bình thường của tất cả yếu tố khác, một sự khác biệt có ý nghĩa duy nhất giữa huyết tương test (trộn huyết tương bệnh nhân + huyết tương nền) và huyết tương chứng là mức yếu tố VIII trong huyết tương test.
 4. Bây giờ, chúng ta đo APTT của huyết tương test ở mỗi độ pha loãng và biểu diễn kết quả trên biểu đồ Log-Lin (độ pha loãng trên trục X, thời gian trên trục Y)
 5. Đường thẳng nối các điểm kết quả nên song song với đường chuẩn của huyết tương tham chiếu, trừ khi mức yếu tố như nhau thì nó sẽ chồng lên nhau. Nếu chúng không song song, có nhiều vấn đề có thể xảy ra:
 - a. Bạn vẽ các điểm không đúng – kiểm tra lại
 - b. Hiện diện chất ức chế. Thường khi hiện diện chất ức chế, yếu tố đông máu đo được sẽ tăng lên khi pha loãng vì chất ức chế bị pha loãng.
 - c. Nhớ rằng bạn không thể pha loãng một thứ không có gì! – nếu tất cả các thời gian cục đồng đều kéo rất dài và không thay đổi theo độ pha loãng thì mức yếu tố đó có lẽ <1 IU/dl (%)
 6. Một đường thẳng đúng được vẽ từ độ pha loãng đại diện là 100 IU/dl – trong trường hợp này ta chọn mức 1/10. Khi đường này giao với đường tham chiếu, tại điểm đó, ta vẽ một đường nằm ngang, cho đến khi nó cắt đường của huyết tương test, tại điểm giao đó, ta hạ đường thẳng góc xuống cắt trục X. Trong trường hợp này nó giao trục X tại vị trí 5IU/dl. Điều này đại diện cho mức yếu tố trong huyết thanh chưa biết. Nếu tại mức pha loãng 1/10 không phải là 100IU/dl thì một sự hiệu chỉnh có thể được thực hiện tại bước này. Trong trường hợp huyết tương test có giá trị 5 IU/d, nếu huyết tương chứng là 104 IU/dl thì mức yếu tố hiệu chỉnh là $5 \times 104 / 100 = 5,2$ IU/dl.
 7. Nhớ rằng nếu huyết tương tham chiếu là IU/dl thì huyết tương test khi trả kết quả cũng là IU/dl và tương tự với %. Không được đổi đơn vị!
- Biểu đồ sau cho thấy kết quả xét nghiệm FVIII với các mức FVIII khác nhau. Đường huyết tương tham chiếu màu đỏ và các huyết tương test màu tím.



IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Nhìn chung mức FVIII và FIX tương quan với nguy cơ chảy máu.

Phân độ nặng	Mức yếu tố
Hemophilia A hoặc B nặng	<1 IU/dl (%)
Hemophilia A hoặc B trung bình	>1 nhưng <5 IU/dl (%)
Hemophilia A hoặc B nhẹ	5-30 IU/dl (%)

Trong suy giảm FXI, nguy cơ chảy máu biến thiên giữa các cá thể, nhưng hằng định đối với một người.

Thất bại trong việc vẽ đường thẳng hoặc trong việc vẽ song song các điểm từ huyết tương test gợi ý sự hiện diện chất ức chế.

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Nhiều yếu tố bao gồm FVIII, FIX, X khoảng tham chiếu nằm giữa 50-150% [50-150 IU/dL hoặc 0.5-1.50 IU/mL]. FXI có khoảng hẹp hơn 0,65-1,25IU/ml.

Khoảng tham chiếu các yếu tố nhìn chung không thay đổi khi trên 6 tháng tuổi, ở trẻ sơ sinh, có sự thấp sinh lý do gan chưa trưởng thành.

Thêm vào đó, FVIII là một protein pha cấp và vì vậy nó sẽ tăng trong đáp ứng với stress bao gồm cả mang thai và phẫu thuật.

VI. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Bảng sau cho một tóm tắt các gợi ý:

Yếu tố giảm	
FVIII	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nếu suy giảm FVIII là mới phát hiện và không dự đoán trước thì mức von Willebrand và FV cần được kiểm tra. Điều này không cần thiết nếu FVIII suy giảm trong bối cảnh đã biết (như người đã biết Haemophilia A) 2. Có một số hiếm trường hợp bệnh nhân suy giảm FVIII không tương hợp giữa mức FVIII đo bằng phương pháp 1 giai đoạn với phương pháp 2 giai đoạn hoặc so màu. Mức yếu tố cao hơn ở phương pháp 1 giai đoạn, nhưng kiểu hình chảy máu phù hợp với xét nghiệm FVIII bằng phương pháp 2 giai đoạn hoặc so màu hơn. 3. Suy giảm FVIII mắc phải: một người khỏe mạnh có thể sinh tự kháng thể chống lại FVIII dẫn đến Haemophilia A mắc phải. Những tự kháng thể như vậy cũng có thể thấy ở những bệnh nhân với rối loạn miễn dịch như viêm khớp dạng thấp. 4. Bạn cũng thấy FVIII giảm trong bệnh von Willebrand mắc phải 5. FVIII là một protein pha cấp và có thể cao ở những người chịu stress vì bất kỳ lý do gì, bao gồm cả mang thai. 6. Nồng độ FVIII là thành phần quyết định chính của APTT và mức thấp sẽ gây kéo dài, ngược lại mức cao sẽ rút ngắn APTT. 7. Ở phụ nữ có FVIII hoặc FIX thấp mà không có tiền căn gia đình, karyotype nên được kiểm tra (như xem xét hội chứng Turner)
FIX	<p>FIX thấp trong haemophilia B</p> <p>Chất ức chế FIX mắc phải (tự kháng thể) hiếm gặp</p>
FX	<p>Nếu suy giảm FX nghi ngờ nhưng xét nghiệm dựa vào APTT không cho ra kết quả như mong đợi thì một kỹ thuật khác cần được sử dụng (dựa vào PT, so màu, miễn dịch) vì những đột biến gây nên suy giảm chỉ có thể xác định bởi những kỹ thuật nhất định.</p> <p>Chất ức chế FX hiếm gặp nhưng mức thấp FX có thể gặp ở một số bệnh nhân amyloidosis.</p>
FXI	<p>Suy giảm FXI là hiếm nhưng cao hơn đáng kể ở người gốc Do thái.</p> <p>Chủng tộc này có đột biến gene FII chiếm số lượng nhiều.</p>

Suy giảm bất kỳ yếu tố nào	Xem xét: 1. Sàng lọc gia đình 2. Phân tích đột biến
----------------------------	---

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. BCSH: Neonatal Reference Ranges <http://www.bcsguidelines.com/pdf/Neonatal020703.pdf>
2. [Factor XI \[FII\] mutation database](#)
3. [Factor VIII \[FVIII\] mutation database](#)
4. [Factor IX \[F9\] mutation database](#)

Bài 3. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ BẰNG HAI GIAI ĐOẠN VÀ TẠO MÀU (2-Stage & Chromogenic Factor Assays)

1. Kết quả xét nghiệm FVIII bởi phương pháp 2 giai đoạn và tạo màu là tương đương nhau. Đối với hầu hết bệnh nhân, kết quả xét nghiệm FVIII từ cả 3 phương pháp (1 giai đoạn, 2 giai đoạn, tạo màu) là có thể so sánh. Tuy nhiên có một số tình huống mà có sự khác biệt trong kết quả được thực hiện bởi phương pháp 1 giai đoạn so với 2 phương pháp còn lại.
2. Sự khác biệt lớn (lên đến thấp hơn 40% với xét nghiệm 1 giai đoạn) giữa phương pháp 1 giai đoạn so với 2 phương pháp còn lại đã được báo cáo ở huyết tương bệnh nhân sau truyền FVIII tái tổ hợp. Điều này có thể vượt qua bằng cách sử dụng một chuẩn tham chiếu FVIII tái tổ hợp thay vì chuẩn huyết tương cho xét nghiệm 1 giai đoạn trong trường hợp này.
3. Một số đột biến trong gene F8 tạo ra kết quả chênh lệch, đặc biệt là cản trở tương tác với domain A1 và A2. Có 3 type: a/ Mức FVIII cao hơn 2 lần ở PP 1 giai đoạn so với PP còn lại; b/ Mức FVIII cho ra bình thường ở PP 1 giai đoạn; c/ Mức FVIII cao hơn 2 lần ở PP 2 giai đoạn/tạo màu so với 1 giai đoạn. Và kiểu hình chảy máu thường tương ứng với phương pháp 2 giai đoạn/tạo màu.
4. Độ thay đổi màu trong phương pháp tạo màu có thể đo rất chính xác và tỷ lệ trực tiếp với lượng Xa. Vì vậy nó phù hợp trong trường hợp xác định mức yếu tố rất thấp hoặc rất cao.
5. Phương pháp này nhìn chung sử dụng một mức pha loãng cao hơn, làm cho nó không nhạy với các LA, heparin, lepirudin, hoặc những chất ức chế; trong khi đó, tất cả những yếu tố này tương tác lớn trong xét nghiệm 1 giai đoạn.
6. Phương pháp tạo màu hiện nay được xem là phương pháp quyết định nồng độ FVIII có hiệu lực, được khuyến cáo bởi European Pharmacopoeia và ISTH Subcommittee

I. GIỚI THIỆU

Phương pháp 2 giai đoạn hiếm thực hiện ngày nay nhưng vẫn là một xét nghiệm quan trọng. Xét nghiệm này đã được thay thế trong nhiều trường hợp bằng phương pháp tạo màu. Nếu chúng ta xem xét định mức FVIII, xét nghiệm 1 giai đoạn thực hiện tương đối đơn giản và chính xác. Nhưng hạn chế của nó bao gồm độ nhạy với các yếu tố nhiễu tiên hoạt hóa yếu tố VIII hoặc kháng thể kháng phospholipid cũng như kết quả nhầm lẫn khi có

FVIII tái tổ hợp. Thêm vào đó một số đột biến gene F8 dẫn đến khác biệt kết quả giữa phương pháp 1 giai đoạn so với phương pháp 2 giai đoạn/ tạo màu.

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Phương pháp xét nghiệm FVIII 2 giai đoạn

Phương pháp này tương tự như phương pháp tạo màu, nó liên quan đến một bước ủ để tạo ra FXa và giai đoạn 2 xác định số lượng FXa được tạo ra.

Cần chuẩn bị:

Thành phần	Giải thích
Huyết tương hoạt hóa	Chúng cung cấp FIX, X, XIa để khởi động con đường đông máu trong mẫu huyết tương bệnh nhân. Nó có bán sẵn ở thị trường hoặc được chuẩn bị bằng cách ủ máu toàn phần với kính, ly tâm và sau đó loại bỏ huyết thanh.
FV	Có bán sẵn, thường có nguồn gốc từ bò. FV là một cofactor cần để khởi động phản ứng đông máu
Huyết tương bệnh nhân đã hấp phụ (adsorbed)	Hấp phụ với Al(OH) ₃ loại bỏ FII, VII, IX, X. Điều này ngăn cản sự tạo thành phức hợp mức prothrombinase vượt mức kiểm soát
Huyết tương bình thường	Cung cấp prothrombin và fibrinogen để cục máu đông có thể được tạo thành.
CaCl ₂ và Phospholipid	Phản ứng phụ thuộc calcium cho hoạt tính các yếu tố và bề mặt phospholipid để tương tác giữa các yếu tố.

Huyết tương hấp phụ của bệnh nhân được trộn với huyết tương hoạt hóa, FV, CaCl₂ và Phospholipid để khởi động đông máu và tạo ra FXa. Sau một thời gian ủ cố định, một phần của hỗn hợp tạo thành được cho vào một phần huyết tương bình thường và thời gian cục đông được ghi lại. Thời gian cục đông được biểu diễn trên biểu đồ Log-Log và từ đó mức FVIII được suy ra.

Huyết tương bệnh nhân được hấp phụ để loại bỏ prothrombin và ngăn sự tạo thành cục đông khi dòng thác đông máu khởi động. Cục đông bắt đầu khi thêm FIXa, FX và FV được cung cấp một lượng dư. Mức FVIII là yếu tố giới hạn sự tạo thành Xa. Đây là giai đoạn 1 của xét nghiệm. Ở giai đoạn 2, một mẫu của hỗn hợp ở giai đoạn 1 được cho vào huyết tương bình thường và thời gian cục đông được ghi lại. Vì thời gian cục đông tạo thành sẽ phụ thuộc vào mức FXa trong mẫu ở giai đoạn 1 và mức FXa lại tỷ lệ với nồng độ FVIII trong huyết tương bệnh nhân, vì vậy mức FVIII có thể suy ra từ thời gian tạo ra trong giai đoạn 2.

2. Phương pháp xét nghiệm FVIII bằng tạo màu

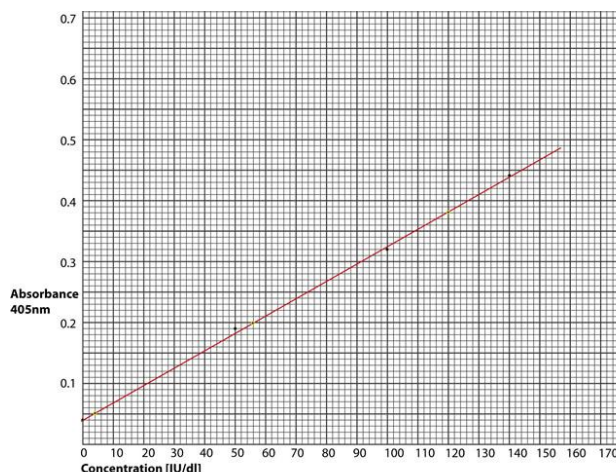
Tương tự phương pháp 2 giai đoạn trên, với giai đoạn 1 tạo FXa và giai đoạn 2 xác định lượng FXa tạo ra. Trong phương pháp này, lượng FXa được đo bởi khả năng của nó tương tác với cơ chất tạo màu đặc hiệu cao và vì vậy cường độ màu tạo được tỷ lệ trực tiếp với lượng FXa, suy ra tỷ lệ trực tiếp với FVIII, mức FVIII có thể được tính từ độ hấp thụ bước sóng đặc hiệu của mẫu.

Chuẩn bị cần:

Thành phần	Giải thích
Thuốc thử hỗn hợp (“cocktail”) để tạo FXa	Chứa FIXa, FX lượng dư, thrombin, nguồn calcium và phospholipid
Cơ chất tạo màu	Một cơ chất được cắt bởi FXa để tạo ra sự thay đổi màu sắc. Nó cũng có thể chứa thêm chất ức chế thrombin, để đảm bảo dùng tạo FXa khi cơ chất được thêm vào.
Huyết tương bệnh nhân	Huyết tương nghèo tiểu cầu

Huyết tương bệnh nhân được ủ với thuốc thử “cocktail” ở 37 độ C. Thrombin trong hỗn hợp thuốc thử sẽ hoạt hóa FVIII thành FVIIIa và trong sự có mặt của Calcium, Phospholipid, chúng hoạt động như là đồng yếu tố (co-factor) của FIXa để chuyển FX thành FXa. FVIII làm giới hạn tỷ lệ ở bước này. Cơ chất tạo màu được thêm vào. Sau ủ 1 giây, độ hấp thụ của bước sóng đặc hiệu được đo và so với đường cong tham chiếu mức FVIII.

Đường cong tham chiếu được vẽ bởi độ hấp thụ bước sóng 405nm so với nồng độ trên một đường thẳng trong đồ thị.



III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Xem phần bình luận về sự khác biệt của xét nghiệm FVIII 1 và 2 giai đoạn

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Mức tham chiếu FVIII nằm giữa 50-150% [50-150 IU/dL hoặc 0.5-1.50 IU/mL]. Khoảng tham chiếu ở trẻ sơ sinh rất tương tự người lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Keeling, D.M., Sukhu, K., Kemball-Cook, G., Waseem, N., Bagnall, R. & Lloyd, J.V. (1999) Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954-->Leu substitution in the factor VIII A3 domain. *Br J Haematol*, 105, 1123-1126.
2. Kirkwood, T.B. & Barrowcliffe, T.W. (1978) Discrepancy between one-stage and two-stage assay of factor VIII:C. *Br J Haematol*, 40, 333-338.
3. Rodgers, S.E., Duncan, E.M., Barbulescu, D.M., Quinn, D.M. & Lloyd, J.V. (2007) In vitro kinetics of factor VIII activity in patients with mild haemophilia A and a discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII assay results. *Br J Haematol*, 136, 138-145.

Bài 4. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ X MỘT GIAI ĐOẠN BẢNG NỌC ĐỘC RẮN RUSSELL VIPER (RẮN HỔ BƯỚM)

(1-Stage Russell Viper Venom [RVV] Factor X Assay)



1. Xét nghiệm RVV cho FX hiếm khi được thực hiện ngày nay.
2. Mức các FII, VII, IX, X thấp lúc sinh vì phụ thuộc vitamin K. Chúng đạt mức như người lớn lúc 6 tháng tuổi.

I. GIỚI THIỆU

RVV (Russell's Viper Venom) hoạt hóa trực tiếp FX và trong sự hiện diện của FV, Prothrombin, Calcium, Phospholipid dẫn đến sự tạo thành cục máu đông. RVV được phân lập từ rắn hổ bướm, tên khoa học là *Daboia russelii*.

Xét nghiệm RVV là một trong 5 xét nghiệm để đo FX (4 loại khác là: dựa vào PT, dựa vào APTT, tạo màu, miễn dịch) mặc dù xét nghiệm dựa vào PT và APTT được thực hiện phổ biến nhất.

II. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý RVV xét nghiệm FX tương tự như xét nghiệm yếu tố dựa vào PT một giai đoạn. Một loạt độ pha loãng của huyết tương tham chiếu và huyết tương test được thực hiện và cho tạo cục đông bằng RVV. Thời gian cục đông được ghi lại, ghi trên biểu đồ Log-Log và so sánh đường chuẩn với đường test.

III. PHƯƠNG PHÁP

Thành phần	Giải thích
Huyết tương tham chiếu hoặc huyết tương test	Pha loãng 1/10, 1/20, 1/40, 1/100.
RVV + Chất thay thế tiểu cầu	Có bán sẵn.
Calcium Chloride 0,025M	
Huyết tương nền thiếu FX	Có bán sẵn

Một mẫu huyết tương nền thiếu FX được trộn với một mẫu huyết tương tham chiếu hoặc huyết tương test pha loãng, ủ ở 37 độ C trong 30 giây và sau đó RVV+chất thay thế tiểu cầu được cho vào. 30 giây sau, cục đông được khởi động bằng cách thêm Calcium Chloride 0,025M và thời gian cục đông được ghi lại. Kết quả được biểu diễn trên giấy Log-Log và từ đó suy ra theo phương pháp dựa vào PT một giai đoạn.

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

FX thấp có thể gặp trong các tình huống sau

Nguyên nhân làm FX thấp
Liên kết với suy giảm các yếu tố khác như giảm vitamin K/ dùng thuốc kháng vitamin K
Suy giảm FX di truyền
Bệnh gan
Amyloidosis do sự hấp thụ FX vào các các sợi tinh bột (amyloid)
Chất ức chế yếu tố máu phải (hiếm)
Bệnh nhân mất đoạn nhánh dài NST 13 có thể suy giảm kết hợp FX và FVII vì gene của 2 protein này nằm gần nhau trên cánh dài NST số 13.

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Khoảng tham chiếu dựa trên xét nghiệm FX dựa vào PT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. de Grouchy J, Dautzenberg MD, Turleau C, Beguin S, Chavin-Colin F. Regional mapping of clotting factors VII and X to 13q34. Expression of factor VII through chromosome 8. Hum Genet. 1984;66(2-3):230-3.
2. Vossen CY, Hasstedt SJ, Demers C, Rosendaal FR, Bovill EG. Linkage analysis for three coagulation factors clustering on chromosome 13q34: factor VII, factor X and protein Z. J Thromb Haemost. 2007 Jun;5(6):1325-7.
3. Girolami A, Scapin M, Scarparo P, Vettore S. Different genotypes are responsible for the normal Russell viper venom assays seen in some cases of congenital factor X deficiency. Am J Hematol. 2008 Nov;83(11):884-5.

4. Peyvandi F, Mannucci PM, Lak M, Abdoullahi M, Zeinali S, Sharifian R, et al. Congenital factor X deficiency: spectrum of bleeding symptoms in 32 Iranian patients. *Br J Haematol.* 1998;102(2):626-8.
5. Uprichard J, Perry DJ. Factor X deficiency. *Blood Rev.* 2002 Jun;16(2):97-110.

Bài 5. XÉT NGHIỆM CHẤT ỨC CHẾ

(Inhibitor Assays)

1. Xét nghiệm Bethesda có thể làm tăng tỷ lệ dương giả ở nồng độ chất ức chế thấp [<1 Bu] trong khi đó hiệu chỉnh Nijmegen sẽ đưa về mức không. Những thay đổi trong pH và nồng độ protein có thể ảnh hưởng đến tính ổn định của yếu tố VIII và sự bất hoạt của nó tăng lên khi pH tăng và nồng độ protein thấp. Bằng việc đệm bằng huyết tương bình thường và sử dụng huyết tương thiếu FVIII, những biến đổi này sẽ được loại bỏ hoặc tối thiểu. Hiệu chỉnh Nijmegen trong xét nghiệm chất ức chế FVIII liên quan đến việc sử dụng huyết tương bình thường đệm với 0.1M Imidazole tại pH bằng 7.4 và sử dụng huyết tương thiếu FVIII trong hỗn hợp chứng
2. Xét nghiệm Bethesda được thiết kế để đo những chất ức chế FVIII ở bệnh nhân haemophilia A. Tuy nhiên, nó được dùng để kiểm tra và báo cáo những chất ức chế liên kết với các yếu tố đông máu khác như FXI, FIX... Nguyên lý tương tự, mặc dù trong một số trường hợp, protein phản ứng ngay lập tức với chất ức chế nên không đòi hỏi thời gian ủ (như FIX)
3. Ở những bệnh nhân mà động học chất ức chế phức tạp như phổ biến hay gặp ở bệnh nhân có chất ức chế mắc phải (như chất ức chế FVIII mắc phải) – nồng độ chất ức chế tính được có thể tăng khi độ pha loãng tăng.
4. Sàng lọc chất ức chế VWF bằng phương pháp xác định chất ức chế cổ điển (trộn huyết tương bình thường và huyết tương test, sau đó đo mức VWF) là rất khó. Xét nghiệm chất ức chế theo kiểu Bethesda chuẩn thường xuyên thất bại trong việc xác định chất ức VWF. Xét nghiệm ELISA đã được giới thiệu để tìm kiếm chất ức chế VWF, nhưng lại một lần nữa không phải luôn luôn xác định được kháng thể. Tiền sử có thể rất quan trọng trong những trường hợp này, một tiền sử không ghi nhận những rối loạn chảy máu thường xuyên mãi cho tới gần đây. Thời gian bán hủy của VWF truyền vào cũng giảm đáng kể và xác nhận điều này rất có giá trị. Đo tỉ số VWF:pp/VWF:Ag có thể rất hữu ích.

I. GIỚI THIỆU

Chất ức chế là những kháng thể mà trong hoạt động đông máu, đích nó chống lại thường là:

1. Những yếu tố đông máu đặc hiệu (như FVIII)
2. Phospholipid như LA (thật ra hầu hết LA chống lại trực tiếp phức hợp protein-phospholipid)

Một chất ức chế thường được nghi ngờ từ tiền sử hoặc xét nghiệm đông máu kéo dài không hiệu chỉnh lại được với mix test (50:50). Những chất ức chế phổ biến nhất là chống lại phospholipid – LA.

Những chất ức chế hoặc kháng đông lưu hành chống lại các yếu tố đông máu có thể hoặc phụ thuộc thời gian (như chất ức chế FVIII) hoặc phản ứng ngay lập tức (như chất ức chế FIX).

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. XÉT NGHIỆM SÀNG LỌC DỰA VÀO APTT

Sàng lọc chất ức chế dựa vào APTT và liên quan đến việc đo APTT của mẫu huyết tương trước và sau khi nó được ủ 37 độ C. 3 ống được chuẩn bị như bảng bên dưới. Các ống này được ủ ở 37 độ C trong 120 phút và sau đó đặt trong nước đá để làm ngừng phản ứng. Ống thứ 4 được chuẩn bị từ một thể tích bằng nhau của ống 1 và ống 2, APTT được thực hiện ở cả 4 ống.

	Ống 1	Ống 2	Ống 3
Bước 1	Huyết tương bình thường	Huyết tương test	Huyết tương trộn (1:1)
	Ủ 37 độ C trong 120 phút	Ủ 37 độ C trong 120 phút	Ủ 37 độ C trong 120 phút
Bước 2	Đặt mẫu vào nước đá	Đặt mẫu vào nước đá	Đặt mẫu vào nước đá
Bước 3	Chuẩn bị một phần thể tích bằng nhau của huyết tương thường + huyết tương test chưa ủ (ống 4)		
Bước 4	Đo APTT ở ống 1, 2, 3 và 4.		

Giải thích kết quả của các APTT thu được từ 4 ống như sau:

Ống	APTT			
1 [BT]	BT	BT	BT	BT
2	BT	Tăng = T	T	T
[Test=T]				
3 [T+BT ủ]	BT	BT	T	T
4 [T+BT chưa ủ]	BT	BT	T	BT
Giải thích	BT	Suy giảm yếu tố	Chất ức chế hoạt động tức thì	Chất ức chế phụ thuộc thời gian

Nên nhớ rằng, một xét nghiệm sàng lọc thì cần nhạy chứ không cần đặc hiệu. Vì vậy nó có thể xác định chất ức chế của tất cả yếu tố nhưng nó rất không đặc hiệu, tuy nhiên khi test sàng lọc dương tính, bạn có thể điều tra chi tiết hơn bằng xét nghiệm Bethesda.

2. XÉT NGHIỆM ĐỊNH LƯỢNG: XÉT NGHIỆM BETHESDA

Xét nghiệm Bethesda được dùng một cách rộng rãi để định lượng nồng độ của chất ức chế FVIII.

1 đơn vị Bethesda (Bu) được định nghĩa là số lượng một chất ức chế cần để trung hòa 50% 1 đơn vị FVIII:C trong huyết tương bình thường sau 120 phút ủ ở 37 độ C. Chất ức chế FVIII là phụ thuộc thời gian trong khi những loại khác là phản ứng tức thì (như FIX) và vì vậy không đòi hỏi một bước ủ. Tuy nhiên, những nguyên lý cơ bản là giống nhau.

Vì chất ức chế FVIII là phụ thuộc thời gian, nếu FVIII ngoại sinh được thêm vào huyết tương và hỗn hợp được ủ, FVIII sẽ bị trung hòa tăng dần. Nếu số lượng FVIII được thêm vào và thời gian ủ được chuẩn hóa thì độ mạnh hoặc nồng độ của chất ức chế có thể đo được theo đơn vị là bao nhiêu FVIII thêm vào bị phá hủy. Xét nghiệm này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cả FVIII nguồn gốc từ người lẫn từ lợn (FVIII của lợn hiện không có sẵn, sản phẩm tái tổ hợp của nó đang được phát triển).

Hiệu chỉnh Nijmegen của xét nghiệm chất ức chế FVIII liên quan đến việc đệm huyết tương bình thường với 0.1M imidazole tại pH 7.4 và sử dụng huyết tương đã loại bỏ FVIII bằng phương pháp miễn dịch, để tạo thành hỗn hợp chứng. Ở hiệu giá chất ức chế thấp (<1 Bu), xét nghiệm Bethesda cổ điển có thể cho ra dương tính giả trong khi đó hiệu chỉnh Nijmegen sẽ đưa ra mức ức chế là 0.

Xét nghiệm Bethesda:

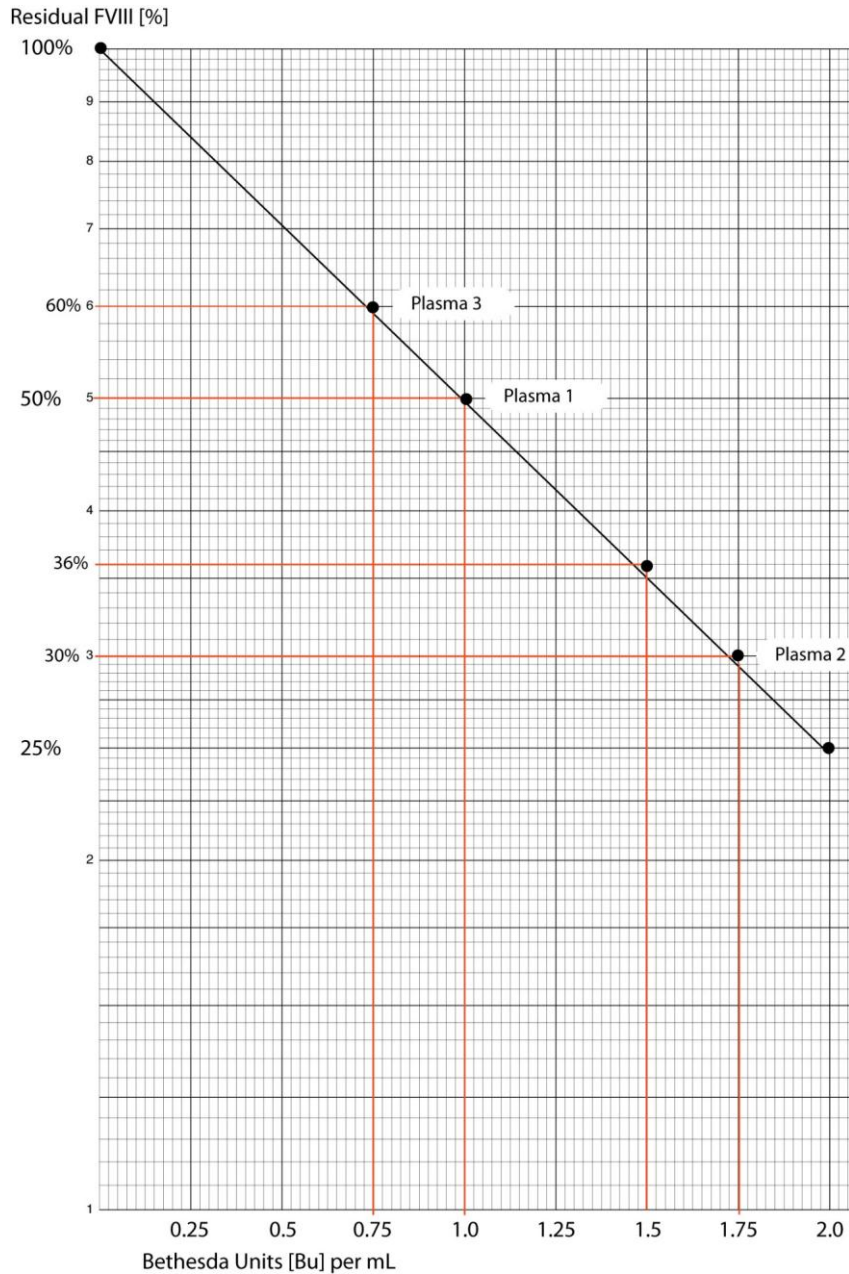
1. Đơn vị Bethesda (Bu) được định nghĩa là lượng chất ức chế trong mẫu huyết tương có thể trung hòa 50% 1 đơn vị FVIII:C trong huyết tương bình thường sau khi ủ 2h ở 37 độ C.
2. Pha loãng gấp đôi huyết tương bệnh nhân (thường từ 1/2-1/1024) trong chất đệm Imidazole được ủ với một lượng thể tích bằng nhau với “huyết tương bình thường pool” tại 37 độ C.
3. Huyết tương bình thường pool sẽ chứa xấp xỉ 100UI/dl FVIII.
4. Một mẫu chứng bao gồm 1 thể tích bằng nhau huyết tương bình thường trộn với dung dịch đệm (hoặc trong hiệu chỉnh Nijmegen sẽ là huyết tương thiếu FVIII) được thực hiện để đại diện giá trị 100%. Hỗn hợp này thật sự có giá trị nồng độ FVIII ban đầu là 50% do pha trộn nhưng điều này không quan trọng vì cùng nguồn và thể tích được thêm vào để ủ tất cả hỗn hợp.
5. Vào cuối thời kỳ ủ, nồng độ FVIII còn lại được đo bằng phương pháp dựa vào APTT một giai đoạn, với mẫu chứng được lấy chuẩn 100%.
6. Nồng độ chất ức chế được tính từ đồ thị hoạt tính FVIII còn lại so với đơn vị chất ức chế. Độ pha loãng của huyết tương test mà tại đó nồng độ FVIII tồn dư gần 50%

nhất, nhưng trong giới hạn 30-60% được chọn để tính chất ức chế. Cũng có thể tính nồng độ chất ức chế ở mỗi độ pha loãng, sau đó lấy trung bình. Bất cứ mức FVIII còn lại nào <25% hoặc >75% đều không nên dùng để tính mức chất ức chế.

7. Nếu mức hoạt tính FVIII còn lại trong khoảng 80-100% thì mẫu không chứa chất ức chế.
8. Suy ra nồng độ chất ức chế từ biểu đồ và nhân với độ pha loãng để có nồng độ cuối cùng. Một huyết tương chứng dương tính với nồng độ chất ức chế đã biết nên có sẵn.
9. Nên nhớ rằng, khi biểu diễn mức hoạt tính FVIII còn lại so với nồng độ BU trên đồ thị thì trục Y là thang đo Log và trục X là thang tuyến tính. Mức hoạt tính FVIII còn lại được vẽ trên trục Y và nồng độ BU được vẽ trên trục X.

Trong bảng và đồ thị bên dưới, 4 mẫu huyết tương với những độ pha loãng khác nhau đã được xét nghiệm và nồng độ Bu được tính toán.

Mẫu huyết tương	Độ pha loãng	Hoạt tính FVIII còn lại	Bu x Độ pha loãng	Nồng độ Bu
1	1:10	50%	1 x 10	10
2	1:20	30%	1.75 x 20	35
3	1:40	60%	0.75 x 40	30
4	1:100	36%	1.5 x 100	150



III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Xem ở trên.

IV. NHỮNG CHẤT ỨC CHẾ YẾU TỐ VIII

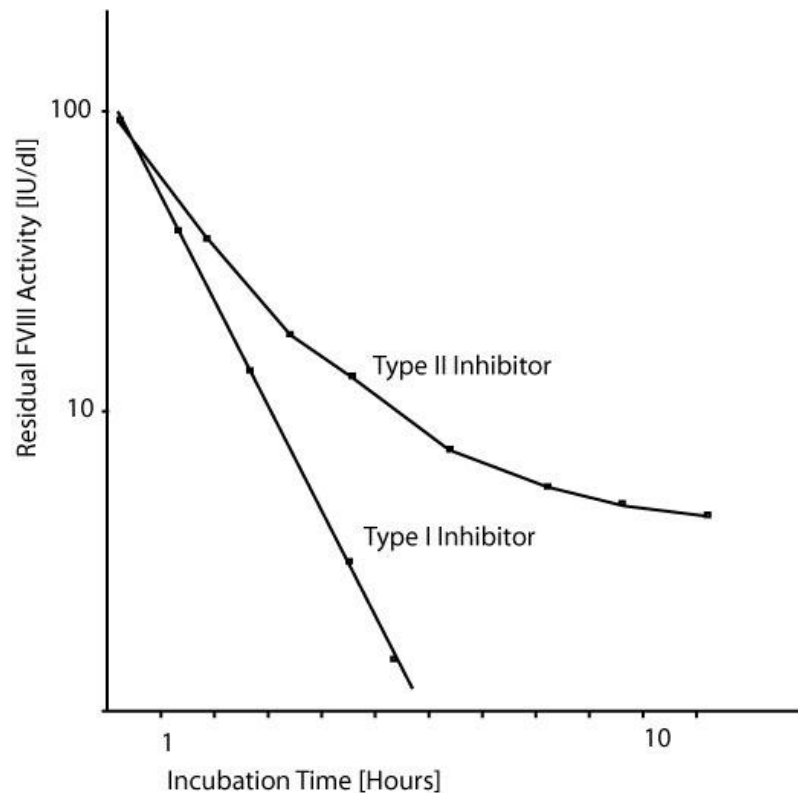
Những chất ức chế FVIII về phương diện cổ điển, được chia thành 2 type I hoặc II dựa vào động học của chất ức chế. Chất ức chế type I có động học ức chế theo dạng tuyến tính, và phụ thuộc vào cả thời gian và nồng độ (có mối quan hệ tuyến tính giữa logarithm FVIII:C còn lại và nồng độ kháng thể). Dị kháng thể hình thành từ những bệnh nhân haemophilia

thể nặng trong đáp ứng với điều trị, cho thấy động học kiểu type I điển hình và ức chế hoàn toàn hoạt tính FVIII.

Ngược lại, chất ức chế type II cho thấy mô hình động học phức tạp hơn và thường thấy trong tự kháng thể hình thành ở haemophilia A mắc phải. Chất ức chế type II không thể nào bất hoạt hoàn toàn hoạt tính FVIII dù ở nồng độ tối đa (chưa pha loãng). Điều này giải thích tại sao một số bệnh nhân với một số lượng nhỏ chất ức chế FVIII (haemophilia A mắc phải) có thể xác định được.

Type	Động học	Ức chế FVIII	Gặp trong:
Type I	Đơn giản – First Order	Hoàn toàn	Dị kháng thể xuất phát từ người haemophilia được điều trị với sản phẩm FVIII và sản sinh kháng thể chống lại protein ngoại lai.
Type II	Phức tạp – Second Order	Không hoàn toàn	Tự kháng thể - gặp trong haemophilia A mắc phải

Đồ thị sau tóm tắt sự khác biệt giữa chất ức chế type I và type II:



Trong những trường hợp haemophilia biến chứng xuất hiện chất ức chế, hầu hết xuất hiện ở người thể nặng (như FVIII:C < 1 IU/dl). Tuy nhiên, trong trường hợp haemophilia A nhẹ-vừa xuất hiện chất ức chế, chất ức chế có thể gồm 2 loại:

- Mức FVIII nên giảm => có sự thay đổi kiểu hình từ haemophilia nhẹ-vừa chuyển sang nặng.
- Mức FVIII nên không giảm nhưng chất ức chế hiện diện. Những bệnh nhân như vậy duy trì kiểu hình nhẹ-vừa, nhưng khi điều trị với chế phẩm FVIII ngoại sinh thì FVIII ngoại sinh bị hủy nhanh chóng.

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Bảng sau cho một tóm tắt các gợi ý:

Yếu tố giảm	
FVIII	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nếu suy giảm FVIII là mới phát hiện và không dự đoán trước thì mức von Willebrand và FV cần được kiểm tra. Điều này không cần thiết nếu FVIII suy giảm trong bối cảnh đã biết (như người đã biết Haemophilia A) 2. Có một số hiếm trường hợp bệnh nhân suy giảm FVIII không tương hợp giữa mức FVIII đo bằng phương pháp 1 giai đoạn với phương pháp 2 giai đoạn hoặc so màu. Mức yếu tố cao hơn ở phương pháp 1 giai đoạn, nhưng kiểu hình chảy máu phù hợp với xét nghiệm FVIII bằng phương pháp 2 giai đoạn hoặc so màu hơn. 3. Suy giảm FVIII mắc phải: một người khỏe mạnh có thể sinh tự kháng thể chống lại FVIII dẫn đến Haemophilia A mắc phải. Những tự kháng thể như vậy cũng có thể thấy ở những bệnh nhân với rối loạn miễn dịch như viêm khớp dạng thấp. 4. Bạn cũng thấy FVIII giảm trong bệnh von Willebrand mắc phải 5. FVIII là một protein pha cấp và có thể cao ở những người chịu stress vì bất kỳ lý do gì, bao gồm cả mang thai. 6. Nồng độ FVIII là thành phần quyết định chính của APTT và mức thấp sẽ gây kéo dài, ngược lại mức cao sẽ rút ngắn APTT. 7. Ở phụ nữ có FVIII hoặc FIX thấp mà không có tiền căn gia đình, karyotype nên được kiểm tra (như xem xét hội chứng Turner)
FIX	<p>FIX thấp trong haemophilia B</p> <p>Chất ức chế FIX mắc phải (tự kháng thể) hiếm gặp</p>
FX	<p>Nếu suy giảm FX nghi ngờ nhưng xét nghiệm dựa vào APTT không cho ra kết quả như mong đợi thì một kỹ thuật khác cần được sử dụng (dựa vào PT, so màu, miễn dịch) vì những đột biến gây nên suy giảm chỉ có thể xác định bởi những kỹ thuật nhất định.</p> <p>Chất ức chế FX hiếm gặp nhưng mức thấp FX có thể gặp ở một số bệnh nhân amyloidosis.</p>
FXI	<p>Suy giảm FXI là hiếm nhưng cao hơn đáng kể ở người gốc Do thái.</p> <p>Chủng tộc này có đột biến gene FII chiếm số lượng nhiều.</p>

Suy giảm bất kỳ yếu tố nào	Xem xét: 1. Sàng lọc gia đình 2. Phân tích đột biến
----------------------------------	---

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Goodeve, A.C., Williams, I., Bray, G.L. & Peake, I.R. (2000) Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate). Recombinate PUP Study Group. *Thromb Haemost*, 83, 844-848.
2. Giles AR, Verbruggen B, Rivard GE, Teitel J, Walker I. A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII:C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. Association of Hemophilia Centre Directors of Canada. Factor VIII/IX Subcommittee of Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 1998 Apr;79(4):872-5.
3. Reber G, Arousseau MH, Dreyfus M, Delahousse B, Caron C, Trzeciack MC, et al. Inter-laboratory variability of the measurement of low titer factor VIII:C inhibitor in haemophiliacs: improvement by the Nijmegen modification of the Bethesda assay and the use of common lyophilized plasmas. *Haemophilia*. 1999 Jul;5(4):292-3.
4. Verbruggen B, Giles A, Samis J, Verbeek K, Mensink E, Novakova I. The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost*. 2001 Dec;86(6):1435-9.
5. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost*. 1995 Feb;73(2):247-51
6. Keeling D, Beavis J, Sukhu K. A simple inhibitor screen is more sensitive than a Bethesda assay in monitoring for the development of inhibitors in haemophilia A and B. *Br J Haematol*. 2005 Mar;128(6):885.

7. Verbruggen B, Dardikh M, Polenewen R, C VAND, Meijer P. The factor VIII inhibitor assays can be standardized: results of a workshop. *J Thromb Haemost* 2011;9:2003-8.

8. Collins PW. Management of acquired haemophilia A. *J Thromb Haemost* 2011;9 Suppl 1:226-35.

Bài 6. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ VON WILLEBRAND

PHẦN 1: GIỚI THIỆU

1. Trẻ sơ sinh có mức VWF tăng lúc sinh và đạt mức bình thường lúc 6 tháng tuổi
2. VWF tăng theo độ tuổi với tỷ lệ khoảng 10IU/dl mỗi thập kỷ.
3. VWF thay đổi theo nhóm máu – nhóm máu O có mức thấp hơn các nhóm khác.
Điều này quan trọng trong chẩn đoán VWD khi mức VWF nằm ở giới hạn dưới và bệnh nhân có nhóm máu O.
4. Tiền sử chảy máu là cơ bản để chẩn đoán VWD – sử dụng thang điểm chảy máu quy ước được khuyến cáo.
5. Nhớ rằng Ristocetin gây kết dính hơn là gây ngưng tập tiểu cầu. Sự ngưng tập phụ thuộc vào việc gắn fibrinogen vào phức hợp GpIIb/IIIa.
6. VWD type 1C (Type 1 Vicenza) là một dưới nhóm của VWD do đột biến gây rút ngắn thời gian bán hủy của phân tử VWF.
7. VWD type 2A nay được chia làm 2 nhóm nhỏ: 2A1 do bất thường tổng hợp VWF và 2A2 do tăng ly giải protein bởi ADAMTS13.

I. GIỚI THIỆU

VWF là một glycoprotein kích thước lên tới 20×10^6 Da. Nó được tổng hợp bởi:

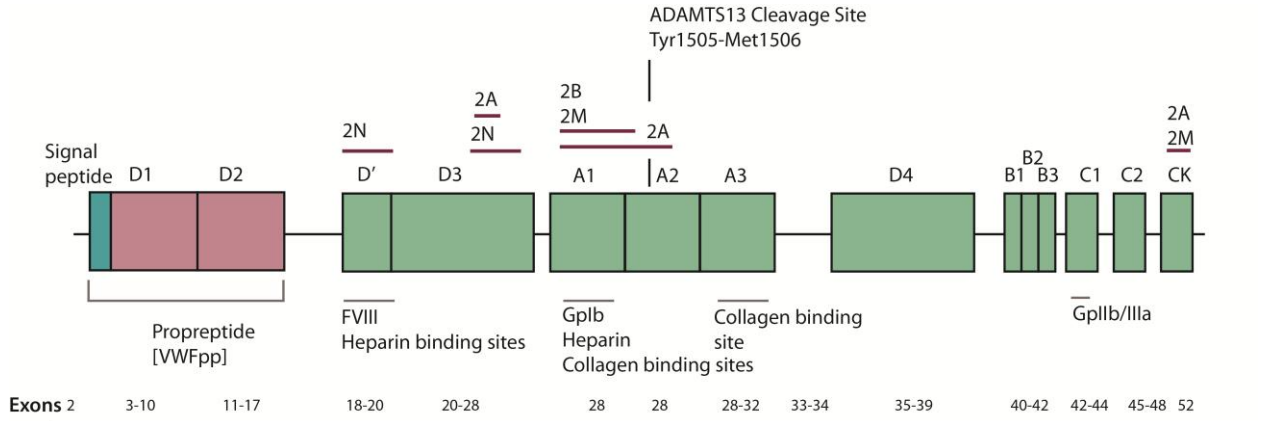
1. Tế bào nội mạc mạch máu, nơi nó được lưu giữ trong thể Weibel-Palade trước khi được bài xuất
2. Mẫu tiểu cầu của tủy xương và nó cũng hiện diện ở tiểu cầu.

VWF ban đầu được tổng hợp như một chuỗi multimer rất lớn, sau đó được thoái giáng bởi ADAMTS13. Một sự suy giảm ADAMTS13 dẫn đến tích tụ multimer trọng lượng phân tử cao và gây ra đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh lý xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP). Xét nghiệm yếu tố ADAMTS13 cũng được viết ở bài riêng.

VWF có 2 vai trò cơ bản:

1. Là một chất mang của FVIII, đảm bảo nó không bị thoái giáng trong huyết tương
 2. Là một protein kết dính liên quan đến sự tương tác giữa tiểu cầu và thành mạch
- Gene mã hóa VWF dài 172kb, gồm 52 exon, ở NST số 12 (12p13.3), mã hóa một protein có 2813 amino acid(aa) bao gồm 3 phần: một peptide tín hiệu (signal peptide) 22 aa, một prepropeptide 741 aa (từ 23-763), một protein trưởng thành 2050 aa (từ 764-2800). Protein trưởng thành chia ra một loạt các domain chứa những vùng chức năng khác nhau. VWF trưởng thành trong huyết tương có thời gian bán hủy khoảng 12 giờ. (9-15 giờ)

Có một giả gene (pseudogene) của một phần yếu tố von Willebrand chưa được xử lý nằm ở NST 22.



II. TÓM TẮT NHỮNG KÝ HIỆU LIÊN QUAN ĐẾN YẾU TỐ VON WILLBRAND

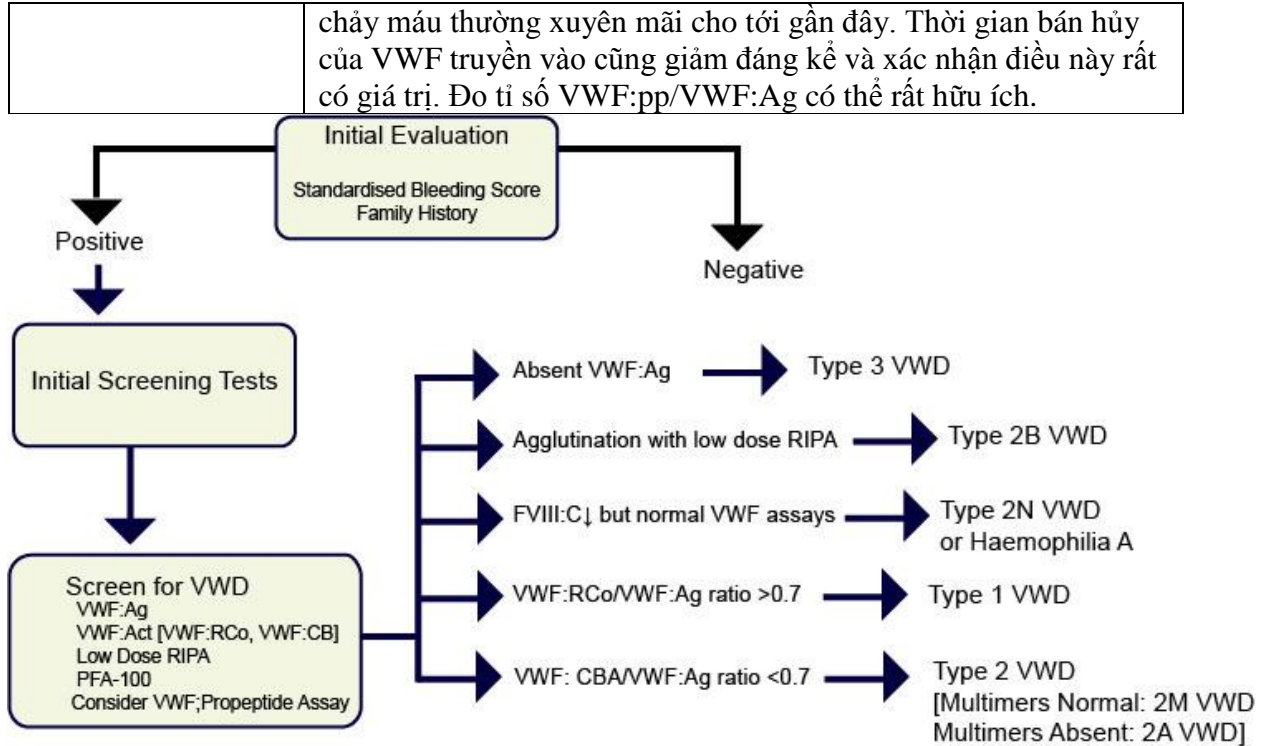
Tên gọi	Sơ lược
Von Willebrand Disease [VWD]	Rối loạn do bất thường số lượng hoặc chức năng của VWF
Von Willebrand Factor [VWF]	Đã giới thiệu ở trên
von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity [VWF:RCo]	Xét nghiệm chức năng VWF dựa vào mức độ huy động kết dính tiểu cầu sau khi cho thêm ristocetin
von Willebrand Collagen Binding Activity [VWF:CB]	Xét nghiệm chức năng VWF dựa vào định lượng khả năng gắn của VWF lên đĩa ELISA phủ collagen
von Willebrand Factor Antigen [VWF:Ag]	Xét nghiệm miễn dịch giúp định lượng số lượng hơn là hoạt tính của VWF
von Willebrand Factor Propeptide [VWFpp]	Prepropeptide của VWF
FVIII	Yếu tố đông máu đóng vai trò là cofactor cho việc tạo thành phức hợp Xnase (“Tenase”)
FVIII:C	Xét nghiệm chức năng hoạt tính FVIII
FVIII:Ag	Xét nghiệm miễn dịch FVIII
Ristocetin-Induced Platelet Aggregation [RIPA]	Xét nghiệm đo khả năng VWF gắn với tiểu cầu
VWF gene	Gene mã hóa VWF
F8 gene	Gene mã hóa FVIII

III. CHẨN ĐOÁN BỆNH VON WILLEBRAND

VWD được phân thành 3 type từ 1 đến 3.

Đánh giá	Diễn giải
----------	-----------

Triệu chứng chảy máu	Khó đánh giá vì những vấn đề chảy máu nhẹ diễn ra phổ biến ở người khỏe mạnh. Sử dụng thang điểm chảy máu chuẩn hóa tỏ ra hữu ích (xem phần tài liệu tham khảo)	
Tiền sử gia đình	Xác nhận sự hiện diện của bất cứ tiền sử gia đình nào nghi ngờ có rối loạn chảy máu	
Test ban đầu	<ul style="list-style-type: none"> - Công thức máu - PT - APTT - Fibrinogene - [PFA-100] 	
Tỉ số VWF:RCo/VWF:Ag	Tỉ số này giúp chẩn đoán các type 2A, 2B, 2M và giúp phân biệt với type 1. Nếu <0.7 hướng đến sự có mặt của rối loạn chức năng VWF.	
Tỉ số VWF:CB/VWF:Ag	Tương tự như tỷ số ở trên. <ul style="list-style-type: none"> - Type 2A: tỉ này thường thấp - Type 2B: tỉ này thường thấp, nhưng có thể bình thường - Type 2M: VWF:Ag có thể giảm hoặc bình thường, nhưng tỷ này <0.7 	
Tỉ số VWFpp/VWF:Ag	Điều này hữu ích trong nghiên cứu Type 1 và giúp chia type 1 thành VWF có thời gian bán hủy bình thường và VWF có thời gian bán hủy ngắn (1C, Vicenza)	
Test LABO đặc hiệu	Nghiên cứu gắn kết FVIII	Có giá trị trong chẩn đoán type 2N, nhưng test này không phổ biến. Xét nghiệm gene VWF có giá trị tương đương
	Phân tích multimer	Là xét nghiệm định tính, phân tích các multimer VWF có kích thước khác nhau.
	RIPA liều thấp	Có giá trị trong chẩn đoán type 2B
Các test LABO ban đầu có thể trong VWD	VWF:Ag	Xét nghiệm miễn dịch, cung cấp tổng số lượng VWF, không phản ánh chức năng
	VWF:Act	Xét nghiệm chức năng, bằng dùng kháng thể đơn dòng gắn vào vị trí gắn thụ thể GpIb của VWF
	FVIII:C	Đo hoạt tính đông máu của yếu tố VIII bằng phương pháp 1 giai đoạn
Xét nghiệm chất ức chế VWF.	Sàng lọc chất ức chế VWF bằng phương pháp xác định chất ức chế cổ điển (trộn huyết tương bình thường và huyết tương test, sau đó đo mức VWF) là rất khó. Xét nghiệm chất ức chế theo kiểu Bethesda chuẩn thường xuyên thất bại trong việc xác định chất ức chế VWF. Xét nghiệm ELISA đã được giới thiệu để tìm kiếm chất ức chế VWF, nhưng lại một lần nữa không phải luôn luôn xác định được kháng thể. Tiền sử có thể rất quan trọng trong những trường hợp này, một tiền sử không ghi nhận những rối loạn	



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. VWD

2. Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FG, Keeling D, et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*. 2004 May;10(3):199-217.

3. Keeney S, Bowen D, Cumming A, Enayat S, Goodeve A, Hill M. The molecular analysis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Haemophilia Genetics Laboratory Network. *Haemophilia*. 2008 Sep;14(5):1099-111.

4. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Battlè J, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost*. 2006 Apr;4(4):766-73.

5. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Batlle J, Baudo F, Cappelletti A, et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost.* 2005 Dec;3(12):2619-26.
6. Rodeghiero F, Tosetto A, Castaman G. How to estimate bleeding risk in mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2007 Jul;5 Suppl 1:157-66.
7. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score. *Blood Rev.* 2007 Mar;21(2):89-97.
8. Rodeghiero F, Kadir RA, Tosetto A, James PD. Relevance of quantitative assessment of bleeding in haemorrhagic disorders. *Haemophilia.* 2008 Jul;14 Suppl 3:68-75.
9. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Bleeding scores in inherited bleeding disorders: clinical or research tools? *Haemophilia.* 2008 May;14(3):415-22.
10. Bowman M, Riddel J, Rand ML, Tosetto A, Silva M, James PD. Evaluation of the diagnostic utility for von Willebrand disease of a pediatric bleeding questionnaire. *J Thromb Haemost.* 2009 Aug;7(8):1418-21.
11. Schneppenheim R, Budde U. von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein. *J Thromb Haemost* 2011;9 Suppl 1:209-15.
12. Favaloro EJ. Diagnosis and classification of von Willebrand disease: a review of the differential utility of various functional von Willebrand factor assays. *Blood coagulation & fibrinolysis* 2011;22:553-64.
13. Favaloro EJ. Rethinking the diagnosis of von Willebrand disease. *Thromb Res* 2011;127 Suppl 2:S17-21.

Bài 6. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ VON WILLEBRAND

PHẦN 2: XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH

1. Kết quả VWF:Ag nên được biểu diễn bằng IU/dl hoặc IU/ml nếu xét nghiệm đã được chuẩn hóa theo tiêu chuẩn quốc tế.

I. GIỚI THIỆU

VWF:Ag là xét nghiệm miễn dịch đo nồng độ VWF trong huyết tương. Chúng không cho biết hoạt tính của VWF. Một số phương pháp dùng để đo VWF:Ag bao gồm ELISA và hấp phụ miễn dịch latex [LIA]. Nhiều LABO hiện nay sử dụng phương pháp LIA.

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. **Miễn dịch Latex:** Phương pháp này dùng các vi ống latex phủ kháng thể chống VWF người. Trong sự hiện diện của VWF, các vi ống này sẽ ngưng kết và tỉ lệ với nồng độ VWF:Ag trong mẫu.

2. **Xét nghiệm ELISA**

Bánh kẹp ELISA đo VWF:Ag bằng cách sử dụng kháng thể cố định ở trên đĩa bằng cách vi ống, đặc hiệu cho VWF người. Huyết tương bệnh nhân, chất kiểm soát và hàng loạt mẫu tham chiếu pha loãng được thêm vào, và VWF trong mẫu sẽ gắn kết với kháng thể. Đĩa sau đó được rửa để loại bỏ các VWF chưa gắn. Một kháng thể thứ 2 có gắn Horseradish Peroxidase (HRP). Một bước rửa thứ 2 được thực hiện và cơ chất cho HRP được thêm vào (Tetramethylbenzidine – TMB) theo sau bởi hydrogen peroxidase để tạo màu. Phổ hấp thụ tại 450nm được đo và từ đường cong tham chiếu, nồng độ VWF:Ag được suy ra. Việc sử dụng mẫu chứng với nồng độ VWF đã biết để đảm bảo rằng xét nghiệm là chính xác.

Một số kháng thể đơn dòng (gắn vào domain gắn GpIb của VWF) có thể phân biệt giữa type 2A và 2B.

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Diễn giải xét nghiệm VWF:Ag phải được làm trong bối cảnh với các xét nghiệm khác (FVIII:C và hoạt tính VWF), nhóm máu và tiền sử chảy máu. Hơn nữa, VWF là một protein pha cấp và sẽ tăng trong các trường hợp viêm, mang thai, phẫu thuật...

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Giá trị tham chiếu của VWF:Ag là 50-150 IU/dl.

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Ở bệnh nhân nghi ngờ VWD, cần cố gắng sử dụng các xét nghiệm để phân type của bệnh, vì nó ảnh hưởng đến quyết định điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Christophe, O., Rouault, C., Obert, B., Pietu, G., Meyer, D. & Girma, J.P. (1995) A monoclonal antibody (B724) to von Willebrand factor recognizing an epitope within the

A1 disulphide loop (Cys509-Cys695) discriminates between type 2A and type 2B von Willebrand disease. *Br J Haematol*, 90, 195-203.

2. Laffan, M., Brown, S.A., Collins, P.W., Cumming, A.M., Hill, F.G., Keeling, D., Peake, I.R. & Pasi, K.J. (2004) The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*, 10, 199-217.

3. Gadisseur, A., Berneman, Z., Schroyens, W. & Michiels, J.J. (2009) Laboratory diagnosis of von Willebrand disease type 1/2E (2A subtype IIE), type 1 Vicenza and mild type 1 caused by mutations in the D3, D4, B1-B3 and C1-C2 domains of the von Willebrand factor gene. Role of von Willebrand factor multimers and the von Willebrand factor propeptide/antigen ratio. *Acta Haematol*, 121, 128-138.

4. Favaloro, E.J., Bonar, R. & Marsden, K. (2008) Lower limit of assay sensitivity: an under-recognised and significant problem in von Willebrand disease identification and classification. *Clin Lab Sci*, 21, 178-183.

5. Gombos, T., Mako, V., Cervenak, L., Papassotiriou, J., Kunde, J., Harsfalvi, J., Forhecz, Z., Pozsonyi, Z., Borgulya, G., Janoskuti, L. & Prohaszka, Z. (2009) Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure.

6. *Thromb Haemost*, 102, 573-580. Davies, J.A., Collins, P.W., Hathaway, L.S. & Bowen, D.J. (2009) C1584: effect on von Willebrand factor proteolysis and von Willebrand factor antigen levels. *Acta Haematol*, 121, 98-101.

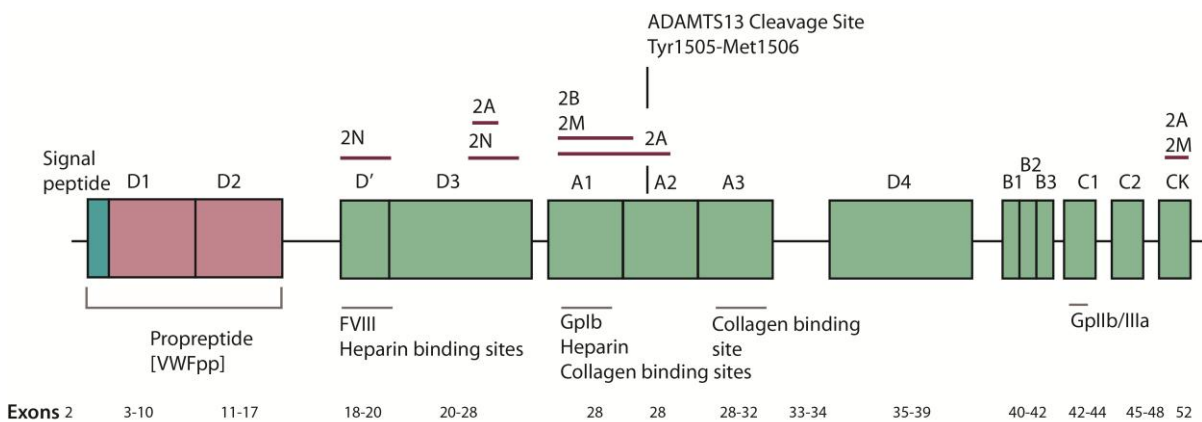
Bài 6. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ VON WILLEBRAND

PHẦN 3: XÉT NGHIỆM HOẠT TÍNH VWF ĐẶC HIỆU EPITOPE (VWF:Act)

1. Xét nghiệm đặc hiệu epitope là xét nghiệm bán chức năng (semi-functional)
2. Xét nghiệm này sẽ cho ra kết quả bình thường ở bệnh nhân type 2N
3. Xét nghiệm ELISA sử dụng kháng thể chống trực tiếp epitope gắn GpIb của VWF bị chỉ trích vì chức năng của các multimer VWF kích thước lớn không được đo trực tiếp.

I. GIỚI THIỆU

Test này sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho vị trí gắn GpIb của tiểu cầu định vị trên domain A1 của phân tử von Willebrand và độc lập với ristocetin.



II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Xét nghiệm ELISA: Trong xét nghiệm này, các giếng kích thước micro đã được phủ kháng thể đơn dòng chống trực tiếp phần gắn GpIb của VWF. Mẫu huyết tương (tham chiếu, test và chuẩn) được pha loãng và cho vào các giếng. Đã được ủ để kháng thể cố định kháng nguyên. Những VWF đã gắn này, được nhận diện bởi một kháng thể anti-human có gắn HRP. Kháng thể anti-human này được định lượng bằng phản ứng so màu bằng cách thêm cơ chất của HRP là OPD (1,2 ortho-phenylendiamine dihydrochloride) và đo độ phổ hấp thụ tại 492nm. Phổ hấp thụ tỷ lệ với nồng độ VWF. Đường cong chuẩn được xây dựng bằng cách vẽ nhiều điểm trên đồ thị bậc nhất của VWF:Act và OD, từ đó nồng độ trong mẫu được suy ra. Test này độc lập với ristocetin.
2. Phương pháp ngưng kết latex tự động: Nó sử dụng những phần tử latex được phủ kháng thể đơn dòng chống lại domain gắn GpIb. Hoạt tính của VWF được xác định bằng cách đo độ đục được tạo ra do sự ngưng kết của phần tử latex như là hậu quả của việc tương tác với receptor GpIb của VWF. Test này độc lập, có thể tự động hóa hoàn toàn và được chạy trên một số máy phân tích.

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

1. Sử dụng ELISA, đối với bệnh nhân type 1 hoặc 2A thì kết quả tương tự test hoạt tính VWF:RCo. Trong type 1, thì ELISA tương tự như đo mức kháng nguyên VWF:Ag. VWF:Act thấp hơn đáng kể so với VWF:Ag trong type 2A và 2B giúp phân biệt các dưới nhóm. Type 2M thì VWF:Act ở mức biên hoặc thấp. Type 3 thì VWF:Act rất thấp hoặc không xác định được.
2. Ngưng kết latex tương tự như ELISA

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Khoảng tham chiếu của xét nghiệm VWF:Act thường từ 50-150 IU/dl. Nhớ rằng VWF là một protein pha cấp vì vậy nó tăng lên trong thời gian stress, mang thai....

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

VWF:Act thường là một phần trong xét nghiệm chẩn đoán hoặc loại trừ bệnh lý VWD. Nó cũng được dùng để theo dõi điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chand S, McGraw A, Hutton R, Tuddenham EGD, Goodall AH. A Two-Site Monoclonal Antibody-Based Immunoassay for von Willebrand Factor-Demonstration that vWF Function Resides in a Conformational Epitope. *Thrombosis and Haemostasis*. 1986;55(3):318-24.
2. Murdock PJ, Woodhams BJ, Matthews KB, Pasi KJ, Goodall AH. von Willebrand factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost*. 1997;78(4):1272-7.

Bài 6. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ VON WILLEBRAND

PHẦN 4: XÉT NGHIỆM KHẢ NĂNG GẮN FVIII

1. VWD Type 2N giống haemophilia A hoặc người mang gene. Ở type 2N, FVIII giảm do giảm khả năng gắn của VWF với FVIII.
2. Trong hầu hết type 2N, đột biến tìm thấy ở exon 18-20 của gene VWF, mã hóa vị trí gắn FVIII, mặc dù đột biến ở các vùng khác gần đây cũng được báo cáo.
3. 2 đột biến cùng xuất hiện mới đủ khả năng tạo ra kiểu hình ở bệnh nhân VWD type 2N. Rối loạn này gặp ở người đồng hợp tử hoặc dị hợp kép. Với những người đồng hợp tử, bố mẹ của họ thường là người mang gene.
4. Nhớ rằng trong type 2N, FVIII giảm là do khả năng gắn của VWF với FVIII bất thường, còn các chức năng khác vẫn bình thường, nên xét nghiệm miễn dịch cũng như chức năng của nó đều bình thường.

I. GIỚI THIỆU

VWD type 2N là bệnh lý di truyền lặn do đột biến vị trí gắn kết của VWF với FVIII, dẫn đến giảm khả năng gắn và vận chuyển FVIII trong huyết tương. Hậu quả là thời gian bán hủy của FVIII giảm đáng kể vì nó không còn được bảo vệ trước sự thoái giáng bởi các protease trong huyết tương. Bệnh nhân VWD type 2N thỉnh thoảng bị chẩn đoán nhầm với Haemophilia A.

Chẩn đoán type 2N cần có:

- Phân tích phả hệ (bệnh di truyền lặn)
- Đo đồng thời hoạt tính FVIII và VWF (FVIII giảm nhưng hoạt tính VWF bình thường)
- Nghiên cứu khả năng gắn FVIII
- Phân tích gene

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

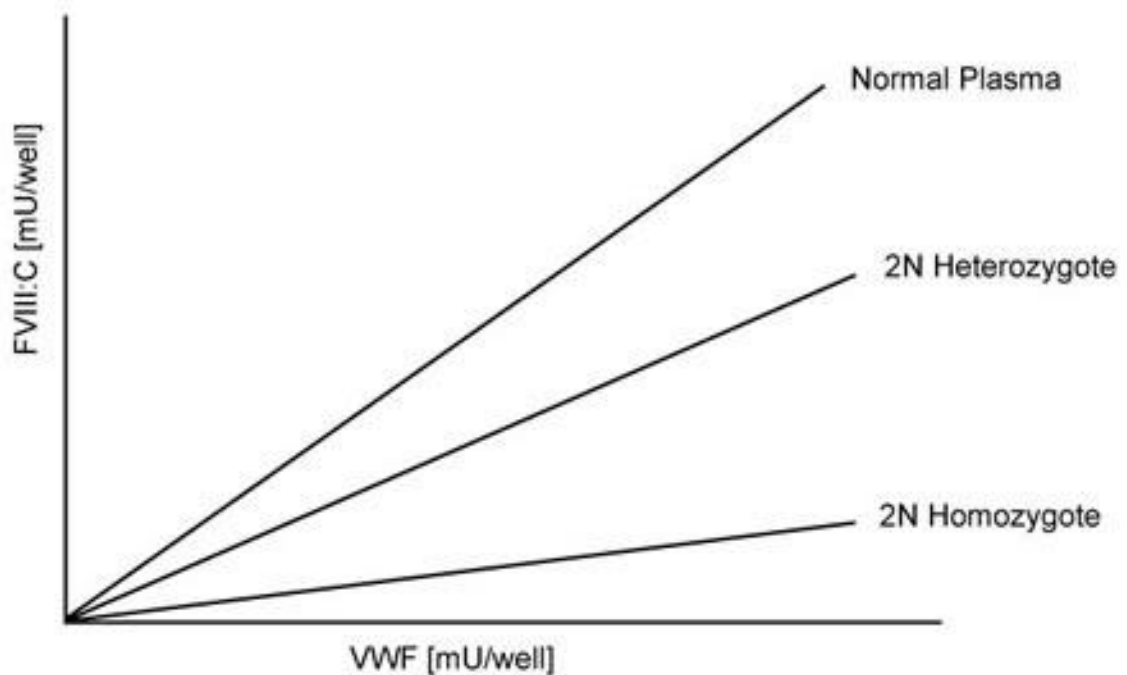
Có một số phương pháp hiện có để đo khả năng gắn FVIII với VWF. Phương pháp ELISA thường được sử dụng:

3. Một đĩa có 96 ô chuẩn được phủ bởi kháng thể kháng VWF người.
4. Đĩa được ủ với mẫu huyết tương (cho phép kháng thể kháng VWF gắn kết phức hợp VWF-FVIII cố định lên đĩa)
5. Đĩa được rửa, sau đó ủ với calcium chloride để loại bỏ FVIII đã gắn với VWF nội sinh trước đó (điều này để đảm bảo chỉ có VWF gắn trên đĩa)
6. Nồng độ chuẩn FVIII tái tổ hợp được thêm vào để gắn với VWF đã cố định ở tất cả mẫu.

7. Sau khi rửa lại, tiếp tục cho vào đĩa hoặc anti-VWF thô gắn peroxidase hoặc antihuman FVIII gắn peroxidase. Sau bước rửa cuối cùng, cơ chất tetramethylbenzidine dihydrochloride được thêm vào và sự tạo màu được ghi nhận như xét nghiệm VWF:Ag chuẩn.
8. Đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng hàng loạt huyết tương bình thường pool (thường >60 người)
9. Tại mỗi độ pha loãng, giá trị của yếu tố VIII tái tổ hợp được biểu diễn cùng với VWF được cố định. Giá trị VWF:FVIII được biểu diễn bằng phần trăm so với huyết tương bình thường.

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Những người với VWF bình thường sẽ cho thấy khả năng gắn FVIII bình thường ở bước 4, trong khi đó bệnh nhân type 2N sẽ cho thấy có rào cản trong việc gắn kết



IV. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Hầu hết bệnh nhân type 2N bị chẩn đoán nhầm với haemophilia A thể nhẹ. Bất kỳ bệnh nhân haemophilia A thể nhẹ nào cũng cần sàng lọc bệnh VWD type 2N. Một tình huống suy giảm kết hợp FV và FVIII cũng nên được xem xét ở bệnh nhân haemophilia A thể nhẹ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gaucher C, Jorieux S, Mercier B, Oufkir D, Mazurier C. The "Normandy" variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood*. 1991;77(9):1937-41.

2. Tuley EA, Gaucher C, Jorieux S, Worrall NK, Sadler JE, Mazurier C. Expression of von Willebrand factor "Normandy": an autosomal mutation that mimics hemophilia A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6377-81.
3. Caron C, Mazurier C, Goudemand J. Large experience with a factor VIII binding assay of plasma von Willebrand factor using commercial reagents. *Br J Haematol*. 2002 Jun;117(3):716-8.
4. Miller CH, Kelley L, Green D. Diagnosis of von Willebrand disease type 2N: a simplified method for measurement of factor VIII binding to von Willebrand factor. *Am J Hematol*. 1998 Aug;58(4):311-8.

Bài 6. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ VON WILLEBRAND

PHẦN 5: XÉT NGHIỆM HOẠT TÍNH COFACTOR CỦA RISTOCETIN (VWF:RCo)

1. Ristocetin là một kháng sinh, nhưng gây giảm tiểu cầu nên bị rút khỏi thị trường. Nó gây giảm tiểu cầu do kết dính tiểu cầu với nhau, nhưng chỉ xảy ra khi có sự hiện diện của ristocetin. Ristocetin làm tăng sự gắn VWF vào phức hợp GpIb bằng cách thay đổi lực tĩnh điện giữa GpIb và VWF. Trong vi tuần hoàn, lực cắt cao (high shear) dẫn đến việc gắn VWF với tiểu cầu hơn là nhờ phân tử như ristocetin.
2. Kết quả của VWF:RCo nên được biểu diễn bằng đơn vị IU/dl dựa vào tiêu chuẩn của WHO
3. Botrocetin là nọc độc được phân lập từ loài rắn *Bothrops jararaca*, sẽ làm thay đổi cấu dạng của VWF và tăng ái lực với GpIb. Xét nghiệm Botrocetin trong VWF cũng tương tự như ristocetin, tuy nhiên có một số bệnh nhân cho thấy hoạt tính 100% với botrocetin nhưng là 0% với ristocetin. Vì vậy chẩn đoán một số thể của VWD không thể loại trừ chỉ dựa vào xét nghiệm cofactor của botrocetin bình thường.
4. Kết dính tiểu cầu nhờ ristocetin (RIPA – Ristocetin induced platelet agglutination) được thực hiện trên huyết tương giàu tiểu cầu của bệnh nhân với nồng độ thấp ristocetin (khoảng 0.5µg/ml). Nồng độ thấp ristocetin này không thể gây ra việc gắn VWF và kết dính tiểu cầu trong mẫu từ người bình thường, nhưng sẽ xảy ra với bệnh nhân type 2B hoặc những đột biến trong receptor VWF của tiểu cầu (VWD type tiểu cầu hay bệnh giả Von Willebrand). Vì vậy, nó được dùng để sàng lọc type 2B.
5. VWF:CB ít có sự biến thiên giữa các xét nghiệm cũng như giữa các LABO nên tốt hơn trong việc phân biệt những VWF có/rối loạn chức năng hơn là VWF:RCo.
6. VWF:RCo là xét nghiệm định lượng, cho phép xác định số lượng VWF bất thường, vì sự tương tác giữa VWF và receptor GpIb trên màng tiểu cầu trong sự có mặt của ristocetin phụ thuộc vào VWF multimer. Tuy nhiên xét nghiệm này không thật sự là xét nghiệm “chức năng”, mà đúng hơn là xét nghiệm khả năng gắn của VWF với GpIb khi có mặt ristocetin (Lý do là tiểu cầu không phải của bệnh nhân)

7. Một số đa hình trong gene VWF cho thấy ảnh hưởng lên xét nghiệm VWF:RCo và điều này giải thích sự khác biệt của các chủng tộc trong đáp ứng với liệu quan sát ở xét nghiệm VWF:RCo.

I. GIỚI THIỆU

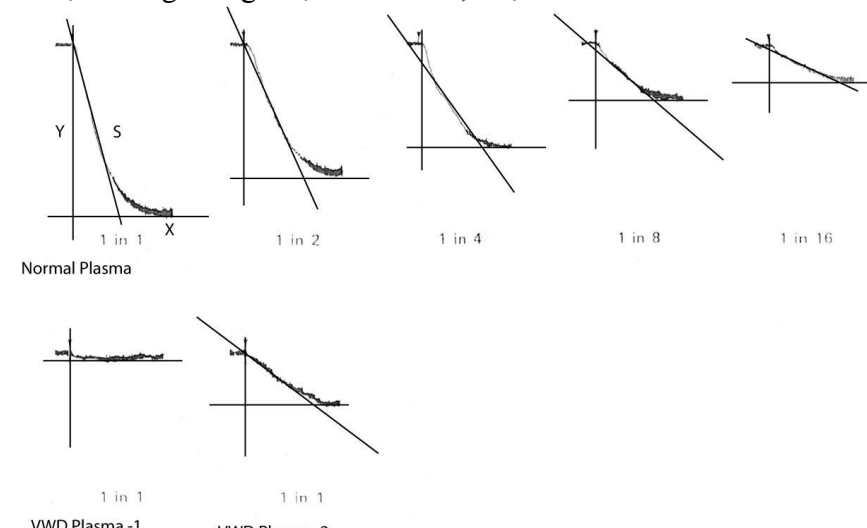
VWF:RCo đo khả năng của huyết tương bệnh nhân tạo ra sự kết dính tiểu cầu khi có mặt kháng sinh ristocetin. Tỷ lệ kết dính tiểu cầu nhờ ristocetin tương quan với nồng độ cũng như hoạt tính chức năng của VWF huyết tương. Ristocetin được cho là gắn với VWF tại Glu1239-Pro-Gly Gly1242.

RIPA là test tương tự như VWF:RCo nhưng ở đây ristocetin được cho trực tiếp vào huyết tương giàu tiểu cầu của bệnh nhân và không cần pha loãng mẫu huyết tương.

Có một số phương pháp để đo VWF:RCo. Trước đây, tiểu cầu rửa được sử dụng, nhưng nay người ta dùng tiểu cầu formaldehyde hoặc tiểu cầu đông lạnh.

II. PHƯƠNG PHÁP

10. Phương pháp kết dính tiểu cầu: Phương pháp này tương tự xét nghiệm yếu tố

Bước	
1	Tiểu cầu rửa hoặc cố định được trộn với huyết tương bệnh nhân pha loãng (nghèo tiểu cầu)
2	Huyết tương bệnh nhân thường được pha loãng gấp đôi
3	Kết dính được cho phép diễn ra và độ dốc (hệ số góc) đường cong được ghi lại. Một đường cong chuẩn được thành lập bằng cách sử dụng phương pháp tương tự nhưng thay huyết tương bệnh nhân bằng một loạt độ pha loãng của huyết tương bình thường.
4	<p>Độ dốc của đường cong được biểu diễn trên đồ thị log-log tại mỗi độ pha loãng và một đường thẳng được kẻ. Từ đó, hoạt tính cofactor của ristocetin được suy ra</p>  <p>The figure displays seven log-log plots. The top row shows 'Normal Plasma' with five plots at dilutions 1 in 1, 1 in 2, 1 in 4, 1 in 8, and 1 in 16. Each plot shows a straight line with a negative slope, indicating a consistent relationship between ristocetin concentration and platelet aggregation. The bottom row shows 'VWD Plasma' with two plots at dilutions 1 in 1 and 1 in 1. These plots show a non-linear relationship, with the slope decreasing as the ristocetin concentration increases, indicating a deficiency in the cofactor activity.</p>

	Nhớ rằng độ dốc (hệ số góc) được xác định bằng cách vẽ tiếp tuyến của đường cong, nó cắt trục hoành và trục tung, lấy khoảng cách trên trục tung chia cho trục hoành.
5	<p>Nếu chúng ta tính độ dốc ($S=Slope$) của mỗi độ pha loãng huyết tương bình thường và biểu diễn trên đồ thị log-log thì sẽ được một đường thẳng. Dựa trên đường này, mức hoạt tính VWF:RCo được suy ra</p> <p>Dilutions [%] 1/16 (6.25%) 1/8 (12.5%) 1/4 (25%) 1/2 (50%)</p>
6	<p>Trong mẫu huyết tương 1, gần như không có sự kết dính tiểu cầu nên VWF:RCo <1%</p> <p>Trong mẫu huyết tương 2, $S=0,65$ ta suy ra VWF:RCo khoảng 8.5%.</p> <p>Cuối cùng, do ta sử dụng cùng độ pha loãng với huyết tương chứng, nên không cần phải hiệu chỉnh theo độ pha loãng.</p>
	Có thể thay aggregometer bằng đọc đĩa ELISA hoặc microtitre nhưng nguyên lý vẫn vậy.

11. Xét nghiệm ELISA đánh giá khả năng gắn trực tiếp của VWF với GpIb tiểu cầu: trong xét nghiệm này, GpIb có thể từ 1 trong 2 nguồn:
- Mảnh GpIb tái tổ hợp: dùng đĩa ELISA phủ kháng thể kháng GpIb, cho GpIb tái tổ hợp vào, sau cho VWF (huyết tương chứng hoặc bệnh nhân) vào, và phát hiện VWF bằng kỹ thuật so màu tương như các xét nghiệm ELISA đã đề cập (dùng kháng thể anti-VWF gắn HRP, cho cơ chất tạo màu OPD, rồi so màu)
 - Mảnh protein có thuật ngữ là “glycocalicin”, bao gồm phần ngoại bào của chuỗi α trong cấu trúc GpIb của tiểu cầu, nó có thể được tách khỏi tiểu cầu bằng việc sử dụng một số protease, điều thú vị là glycocalicin cũng tìm thấy trong huyết tương bình thường và có thể ly tâm để sử dụng trong xét nghiệm. Nguyên lý xét nghiệm tương tự như ở trên.
12. Flow cytometry: trong phương pháp này, một hỗn hợp tiểu cầu cố định formalin được gắn nhãn fluochrome màu đỏ và xanh, ủ với huyết tương test trong sự hiện diện ristocetin. Một phân tử VWF multimer có nhiều vị trí gắn GpIb tiểu cầu. Khi cả 2 tín hiệu tiểu cầu “đỏ” và “xanh” được gắn vào 1 phân tử VWF thì hiện tượng vi ngưng tập xảy ra. Mức độ vi ngưng tập, phản ánh qua hiện tượng “dương kép”, tương ứng với hoạt tính VWF:RCo. Sẽ không có hiện tượng dương kép nếu trọng lượng phân tử VWF multimer quá thấp để gắn ít nhất 2 tiểu cầu.
13. Xét nghiệm VWF:RCo dựa trên latex: dùng hạt latex phủ kháng thể đơn dòng để gắn chuỗi GpIb α , sau đó cho ngưng kết với VWF trong sự hiện diện của ristocetin. Tiến hành đo độ đục.

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Xét nghiệm VWF:RCo có sự biến thiên lớn trong mỗi LABO cũng như giữa các LABO, và nó không thật sự đo chức năng sinh lý của VWF. Mặc dù với những hạn chế đó, nó vẫn là test để đo hoạt tính VWF phổ biến nhất hiện nay.

Ở người bình thường, kết quả VWF:Ag và VWF:RCo là giống nhau.

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Khoảng tham chiếu của xét nghiệm VWF:RCo thường từ 50-150 IU/dl. Nhớ rằng VWF là một protein pha cấp vì vậy nó tăng lên trong thời gian stress, mang thai....

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

VWF:RCo thường là một phần trong xét nghiệm chẩn đoán hoặc loại trừ bệnh lý VWD. Nó cũng được dùng để theo dõi điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen D, 4 CA, Hendricksen JI, Pruthi RK, Nichols WL, Heit JA, et al. A highly-sensitive plasma von Willebrand factor ristocetin cofactor (VWF:RCo) activity assay by flow cytometry. J Thromb Haemost. 2008 Feb;6(2):323-30.

2. De Vleeschauwer A, Devreese K. Comparison of a new automated von Willebrand factor activity assay with an aggregation von Willebrand ristocetin cofactor activity assay for the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006 Jul;17(5):353-8.
3. Dowling SV, Ekert H. A comparison of two methods for measurement of von Willebrand's factor (ristocetin cofactor). *Thromb Haemost*. 1976 Aug 31;36(1):284-5.
4. Ewenstein BM. Use of ristocetin cofactor activity in the management of von Willebrand disease. *Haemophilia*. 2001 Jan;7 Suppl 1:10-5.
5. Federici AB, Canciani MT, Forza I, Cozzi G. Ristocetin cofactor and collagen binding activities normalized to antigen levels for a rapid diagnosis of type 2 von Willebrand disease--single center comparison of four different assays. *Thromb Haemost*. 2000 Dec;84(6):1127-8.
6. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, Morateck PA, Wren JS, Scott JP, et al. Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost*. 2009 Nov;7(11):1832-9.
7. Lattuada A, Preda L, Sacchi E, Gallo L, Federici AB, Rossi E. A rapid assay for ristocetin cofactor activity using an automated coagulometer (ACL 9000). *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004 Sep;15(6):505-11.
8. Lippi G, Franchini M, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC. Correlation between von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor ristocetin cofactor activity and factor VIII activity in plasma. *J Thromb Thrombolysis*. 2008 Oct;26(2):150-3.
9. Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, Zucker MB, Grant RA, McPherson J. Letter: A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh*. 1975 Sep 30;34(1):306-8.

10. Redaelli R, Corno AR, Borroni L, Mostarda G, Nichelatti M, Morra E, et al. von Willebrand factor ristocetin cofactor (VWF:RCo) assay: implementation on an automated coagulometer (ACL). *J Thromb Haemost.* 2005 Dec;3(12):2684-8.
11. Strandberg K, Lethagen S, Andersson K, Carlson M, Hillarp A. Evaluation of a rapid automated assay for analysis of von Willebrand ristocetin cofactor activity. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006 Jan;12(1):61-7.
12. Truss NJ, Beavis J, MacCallum PK, Harrison P, Warner TD. Rapid and accurate method for the von Willebrand factor ristocetin cofactor assay using 96-well microtiter plates. *J Thromb Haemost.* 2009 Jul;7(7):1226-8.
13. Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vandecasteele G, Vauterin S, Deckmyn H. A Reliable von Willebrand factor: ristocetin cofactor enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate between type 1 and type 2 von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost.* 2002 Apr;28(2):161-6.
14. Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vauterin S, Schlamadinger A, Mazurier C, Deckmyn H. A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 2000 Jan;83(1):107-13.
15. Veyradier A, Fressinaud E, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D. von Willebrand factor ristocetin cofactor activity correlates with platelet function in a high shear stress system. *Thromb Haemost.* 2000 Oct;84(4):727-8.
16. Federici AB, Canciani MT, Forza I, Mannucci PM, Marchese P, Ware J, et al. A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Ibalph α for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. *Haematologica.* 2004 Jan;89(1):77-85.
17. Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Schlamadinger A, Vauterin S, Hoylaerts MF, Arnout J, et al. Plasma glycocalicin as a source of GPIbalph α in the von Willebrand factor ristocetin cofactor ELISA. *Thromb Haemost.* 2005 Jan;93(1):165-71.

18. Chen D, Daigh CA, Hendricksen JI, Pruthi RK, Nichols WL, Heit JA, et al. A highly-sensitive plasma von Willebrand factor ristocetin cofactor (VWF:RCo) activity assay by flow cytometry. *J Thromb Haemost.* 2008 Feb;6(2):323-30.

19. Lindahl TL, Fagerberg IH, Larsson A. A new flow cytometric method for measurement of von Willebrand factor activity. *Scand J Clin Lab Invest.* 2003;63(3):217-23.

20. Bowyer AE, Shepherd F, Kitchen S, Makris M. A rapid, automated VWF ristocetin cofactor activity assay improves reliability in the diagnosis of Von Willebrand disease. *Thromb Res* 2011;127:341-4.

Bài 6. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ VON WILLEBRAND

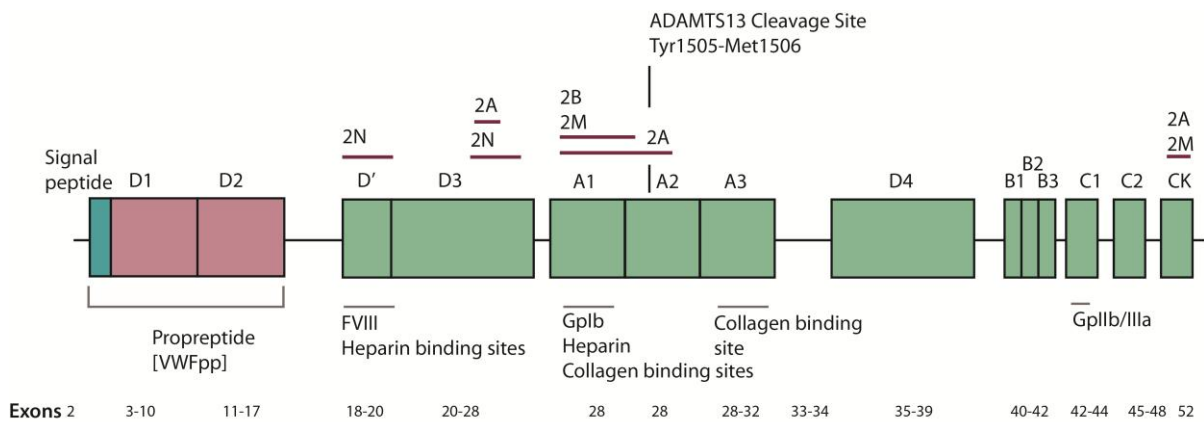
PHẦN 6: XÉT NGHIỆM PRE-PROPEPTIDE (VWFpp)

1. Trong lịch sử, VWFpp được biết như là VWF:AgII
2. Trong type 1, đột biến làm giảm khả năng cắt của ADAMTS13, dẫn đến hiện diện các multimer kích thước siêu lớn => tăng đào thải, làm giảm VWF.
3. Đo VWFpp có giá trị trong việc phân biệt liệu VWF giảm là do giảm tổng hợp hay tăng đào thải. Trong giảm tổng hợp thì tỉ số giữa VWFpp và VWF:Ag bằng 1, trong khi tăng thải thì tỉ số này tăng lên.
4. Các chế phẩm VWF cô đặc không có bất cứ VWFpp nào.
5. Type 1 Vicenza và những biến thể tương tự với thời gian bán hủy VWF ngắn, được xếp vào nhóm 1C.

I. GIỚI THIỆU

VWF được tổng hợp là protein gồm 2813 amino acid với 22 amino acid làm peptide tín hiệu, 741 amino acid làm pre-propeptide và một protein trưởng thành 2050 amino acid (pro-VWF). Chúng trải qua quá trình dimer hóa trong lưới nội bào tương thông qua cầu nối disulphide ở đầu C tận. Những dimer này sau đó được chuyển đến bộ máy Golgi, tại đây nó được tạo các liên kết chéo qua thành viên cysteine ở đầu N tận, tạo thành hàng loạt những multimer, làm tăng trọng lượng phân tử. Cũng tại bộ máy Golgi, phần pre-propeptide được tách ra khỏi mảnh protein trưởng thành.

VWFpp có nồng độ trong huyết tương khoảng 1µg/ml và thời gian bán hủy 2-3 giờ, trong khi đó mảnh VWF trưởng thành có nồng độ 10 µg/ml và thời gian bán hủy 8-12 giờ.



Một cơ chế mới trong Type 1 VWD liên quan đến việc tăng đào thải VWD khỏi huyết tương. Những bệnh nhân này cho thấy triệu chứng chảy máu cổ điển của type 1, xét nghiệm giảm VWF:Ag, VWF:RCo, FVIII và di truyền mô hình kiểu trội. Multimer cho

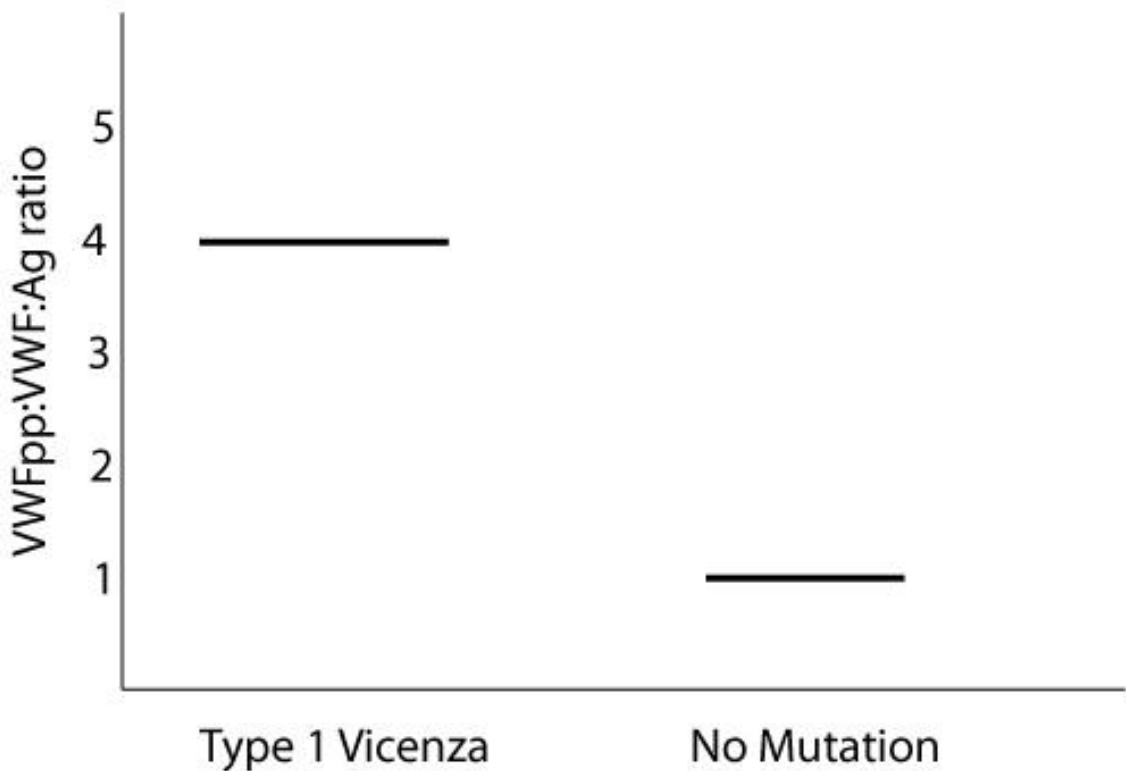
thấy sự hiện diện của những siêu phân tử. Sử dụng DDAVP cho thấy tăng đáng kể cả mức VWF và FVIII nhưng chúng nhanh chóng bị đào thải khỏi huyết tương, ngược với type 1 cổ điển, tốc độ đào thải chậm hơn nhiều.

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

Sử dụng ELISA với kháng thể và kháng kháng thể đặc hiệu của VWFpp

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Ở những bệnh nhân type 1 do tăng đào thải, tỉ số VWFpp/VWF:Ag có xu hướng tăng (khoảng bằng 4). Điều này gợi ý VWFpp có thời gian bán hủy bình thường nhưng của VWF trưởng thành thì giảm, nó bị đào thải nhanh chóng do đột biến bên trong protein VWF trưởng thành.



Type 1C có chức năng VWF-tiểu cầu bình thường, mức VWF huyết tương 6-10IU/dl và sự hiện diện của những multimer kích thước siêu lớn.

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

VWFpp có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm máu O và các nhóm còn lại. Giá trị tham khảo từ 55-219IU/dl, tỉ số VWFpp/VWF:Ag có kỳ vọng bằng 1.

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Những cá nhân bất thường tỷ số VWFpp/VWF:Ag hướng đến bệnh VWD type 1 do tăng đào thải. Sử dụng DDAVP cũng giúp ích chẩn đoán.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, et al. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3344-51.
2. Nossent AY, VANM, NH VANT, Rosendaal FR, Bertina RM, JA VANM, et al. von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2006 Dec;4(12):2556-62.
3. Sztukowska M, Gallinaro L, Cattini MG, Pontara E, Sartorello F, Daidone V, et al. Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter Von Willebrand factor survival in patients with type 1 and type 1c von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2008 Sep;143(1):107-14.
4. Gadisseur A, Berneman Z, Schroyens W, Michiels JJ. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease type 1/2E (2A subtype IIE), type 1c von Willebrand disease and mild type 1 caused by mutations in the D3, D4, B1-B3 and C1-C2 domains of the von Willebrand factor gene. Role of von Willebrand factor multimers and the von Willebrand factor propeptide/antigen ratio. *Acta Haematol*. 2009;121(2-3):128-38.

Bài 6. XÉT NGHIỆM YẾU TỐ VON WILLEBRAND

PHẦN 7: XÉT NGHIỆM KHẢ NĂNG GẮN FVIII

1. VWD Type 2N giống haemophilia A hoặc người mang gene. Ở type 2N, FVIII giảm do giảm khả năng gắn của VWF với FVIII.
2. Trong hầu hết type 2N, đột biến tìm thấy ở exon 18-20 của gene VWF, mã hóa vị trí gắn FVIII, mặc dù đột biến ở các vùng khác gần đây cũng được báo cáo.
3. 2 đột biến cùng xuất hiện mới đủ khả năng tạo ra kiểu hình ở bệnh nhân VWD type 2N. Rối loạn này gặp ở người đồng hợp tử hoặc dị hợp kép. Với những người đồng hợp tử, bố mẹ của họ thường là người mang gene.
4. Nhớ rằng trong type 2N, FVIII giảm là do khả năng gắn của VWF với FVIII bất thường, còn các chức năng khác vẫn bình thường, nên xét nghiệm miễn dịch cũng như chức năng của nó đều bình thường.

I. GIỚI THIỆU

VWD type 2N là bệnh lý di truyền lặn do đột biến vị trí gắn kết của VWF với FVIII, dẫn đến giảm khả năng gắn và vận chuyển FVIII trong huyết tương. Hậu quả là thời gian bán hủy của FVIII giảm đáng kể vì nó không còn được bảo vệ trước sự thoái giáng bởi các protease trong huyết tương. Bệnh nhân VWD type 2N thỉnh thoảng bị chẩn đoán nhầm với Haemophilia A.

Chẩn đoán type 2N cần có:

- Phân tích phả hệ (bệnh di truyền lặn)
- Đo đồng thời hoạt tính FVIII và VWF (FVIII giảm nhưng hoạt tính VWF bình thường)
- Nghiên cứu khả năng gắn FVIII
- Phân tích gene

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

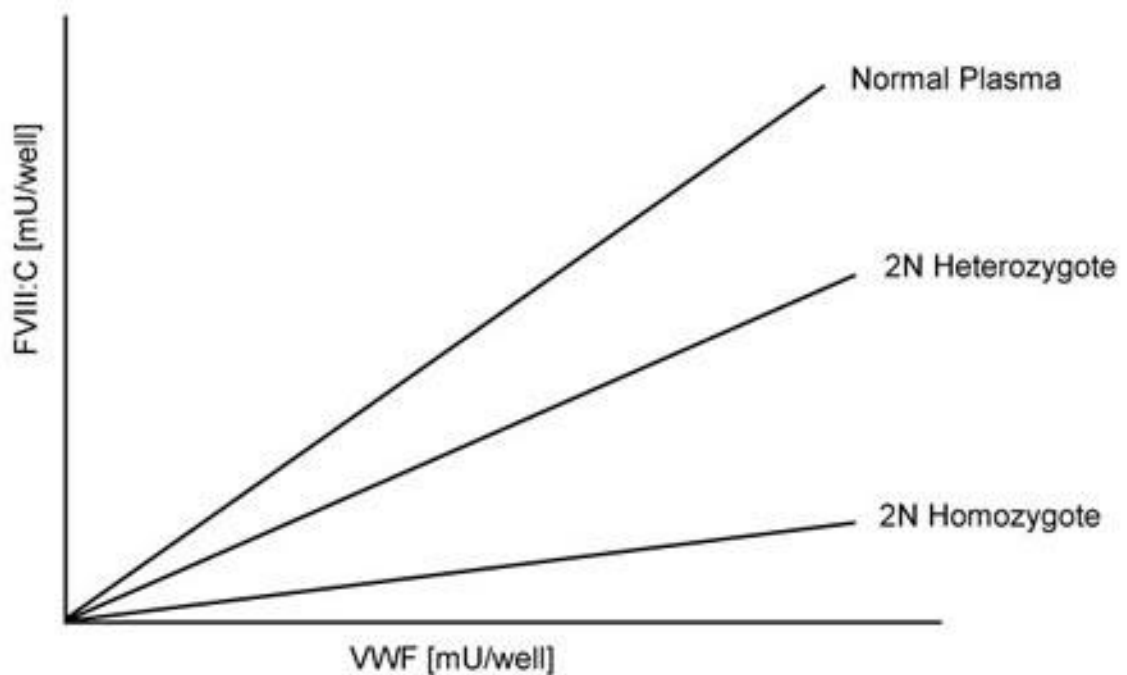
Có một số phương pháp hiện có để đo khả năng gắn FVIII với VWF. Phương pháp ELISA thường được sử dụng:

14. Một đĩa có 96 ô chuẩn được phủ bởi kháng thể kháng VWF người.
15. Đĩa được ủ với mẫu huyết tương (cho phép kháng thể kháng VWF gắn kết phức hợp VWF-FVIII cố định lên đĩa)
16. Đĩa được rửa, sau đó ủ với calcium chloride để loại bỏ FVIII đã gắn với VWF nội sinh trước đó (điều này để đảm bảo chỉ có VWF gắn trên đĩa)
17. Nồng độ chuẩn FVIII tái tổ hợp được thêm vào để gắn với VWF đã cố định ở tất cả mẫu.

18. Sau khi rửa lại, tiếp tục cho vào đĩa hoặc anti-VWF thử gắn peroxidase hoặc antihuman FVIII gắn peroxidase. Sau bước rửa cuối cùng, cơ chất tetramethylbenzidine dihydrochloride được thêm vào và sự tạo màu được ghi nhận như xét nghiệm VWF:Ag chuẩn.
19. Đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng hàng loạt huyết tương bình thường pool (thường >60 người)
20. Tại mỗi độ pha loãng, giá trị của yếu tố VIII tái tổ hợp được biểu diễn cùng với VWF được cố định. Giá trị VWF:FVIII được biểu diễn bằng phần trăm so với huyết tương bình thường.

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Những người với VWF bình thường sẽ cho thấy khả năng gắn FVIII bình thường ở bước 4, trong khi đó bệnh nhân type 2N sẽ cho thấy có rào cản trong việc gắn kết



IV. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Hầu hết bệnh nhân type 2N bị chẩn đoán nhầm với haemophilia A thể nhẹ. Bất kỳ bệnh nhân haemophilia A thể nhẹ nào cũng cần sàng lọc bệnh VWD type 2N. Một tình huống suy giảm kết hợp FV và FVIII cũng nên được xem xét ở bệnh nhân haemophilia A thể nhẹ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gaucher C, Jorieux S, Mercier B, Oufkir D, Mazurier C. The "Normandy" variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood*. 1991;77(9):1937-41.

2. Tuley EA, Gaucher C, Jorieux S, Worrall NK, Sadler JE, Mazurier C. Expression of von Willebrand factor "Normandy": an autosomal mutation that mimics hemophilia A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6377-81.

3. Caron C, Mazurier C, Goudemand J. Large experience with a factor VIII binding assay of plasma von Willebrand factor using commercial reagents. *Br J Haematol*. 2002 Jun;117(3):716-8.

4. Miller CH, Kelley L, Green D. Diagnosis of von Willebrand disease type 2N: a simplified method for measurement of factor VIII binding to von Willebrand factor. *Am J Hematol*. 1998 Aug;58(4):311-8.

PHẦN 3.
BỘ XÉT NGHIỆM TĂNG ĐÔNG

Bài 1. XÉT NGHIỆM ANTITHROMBIN

1. Có 4 loại antithrombin được mô tả [I-IV], việc thiết kế AT từ I đến IV xuất phát từ những nghiên cứu ban đầu thực hiện những năm 1950 bởi Seeger, Johnson và Fell. ATI liên quan đến việc chú ý vào sự thu hút thrombin tới fibrin sau khi thrombin chuyển fibrinogen thành fibrin. ATII liên quan đến hoạt tính cofactor trong huyết tương, cùng với heparin tác động lên mối tương tác thrombin và fibrinogen. ATIII liên quan đến một chất trong huyết tương làm bất hoạt thrombin. ATIV liên quan đến một antithrombin được hoạt hóa trong và một thời gian ngắn sau khi đông máu. Chỉ có ATIII và có lẽ ATI là có ý nghĩa y học. ATIII được thương mại dưới tên gọi AT.
2. Một thời gian ủ ngắn trong xét nghiệm cofactor heparin làm mẫu nhạy với những biến đổi trong việc gắn heparin trong khi đó một thời gian ủ dài hơn làm xét nghiệm trở nên kém nhạy.
3. Xét nghiệm Antithrombin tiến triển (Progressive AT Assay) tương tự xét nghiệm tạo màu nhưng test này không chứa bất kỳ heparin nào. Test đòi hỏi thời gian ủ nhiều phút và vì vậy, sự ức chế cơ chất có thể xảy ra không chỉ do antithrombin mà còn do những protease khác hiện diện trong huyết tương. Việc sử dụng heparin trong xét nghiệm này làm tăng hoạt tính của antithrombin lên hàng nghìn lần và làm test này chỉ nhạy với antithrombin.
4. Bovine FXa được dùng như là cơ chất để nỗ lực cải thiện sự phân biệt giữa bất thường và bình thường trong trường hợp mức hoạt tính antithrombin gần hoặc ở giới hạn trên bình thường.
5. Đột biến type I, đột biến tác động lên vị trí hoạt hóa (RS) và đột biến đa hướng (PL) liên kết với nguy cơ cao huyết khối tĩnh mạch hơn là đột biến ảnh hưởng lên vị trí gắn của heparin (HBS)
6. Cho đến ngày nay, đột biến mất hoàn toàn antithrombin chưa được báo cáo, và có lẽ dạng này không thể sống được. Đột biến đồng hợp tử đã được báo cáo nhưng chỉ liên kết với khiếm khuyết vị trí gắn heparin và có xu hướng tăng đông nhẹ.
7. Mức antithrombin giảm nhanh trong sepsis và cũng ở bệnh nhân điều trị asparaginase.

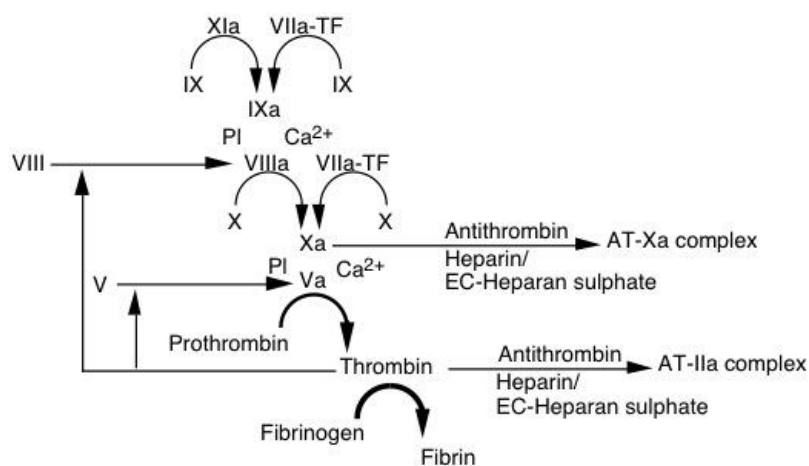
I. GIỚI THIỆU

Antithrombin (AT) là một chất chống đông tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong hemostasis thông qua việc ức chế các serine protease gồm thrombin (IIa), FXa và một phần các yếu tố IXa, XIa.

Khiếm khuyết di truyền antithrombin liên kết với tăng nguy cơ huyết khối thuyên tắc tĩnh mạch (VTE) và có thể gặp ở 1-2% bệnh nhân VTE so với 0.02-0.2% ở dân số chung. Khiếm khuyết antithrombin di truyền có thể gặp ở dân số chung với tỷ lệ trong khoảng 0.2/1000 đến 0.5/1000

Antithrombin được tổng hợp chủ yếu ở gan, lưu hành trong huyết tương dạng chuỗi đơn 432 amino acid với trọng lượng 58200 Dalton. Mức bình thường trong huyết tương là 150 µg/ml và thời gian bán hủy là khoảng 3 ngày.

Gene mã hóa AT là [SERPINC1] nằm trên NST số 1 và nhiều loại đột biến đã được xác định ở người suy giảm antithrombin và huyết khối tĩnh mạch.



AT có thể được xác định bằng cả phương pháp miễn dịch (định lượng) và chức năng (định tính), và dựa trên cơ sở những xét nghiệm này, suy giảm AT được phân loại:

Type	Giải thích
Type I	Biến đổi số lượng – Suy giảm type I liên kết với sự suy giảm đồng thời cả xét nghiệm miễn dịch và chức năng, xấp xỉ 50% người bình thường.
Type II	Biến đổi chất lượng – Suy giảm type II liên kết với suy giảm xét nghiệm chức năng hơn là xét nghiệm miễn dịch.
Type II HBS (Heparin Binding Site):	Đột biến tác động lên vị trí gắn heparin của thrombin
Type II RS (Reactive Site):	Đột biến vị trí hoạt hóa của AT
Type II PL (Pleiotropic):	Đột biến tác động lên cả vị trí gắn heparin và vị trí hoạt hóa của phân tử.

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

Xét nghiệm chức năng AT dựa trên nguyên lý ức chế FIIa và FXa khi có mặt heparin. Hoạt tính chống FIIa và FXa của AT có thể được đo bằng phương pháp cục máu đông hoặc phương pháp tạo màu. Phương pháp tạo màu được sử dụng phổ biến hơn vì sự tiện lợi của nó.

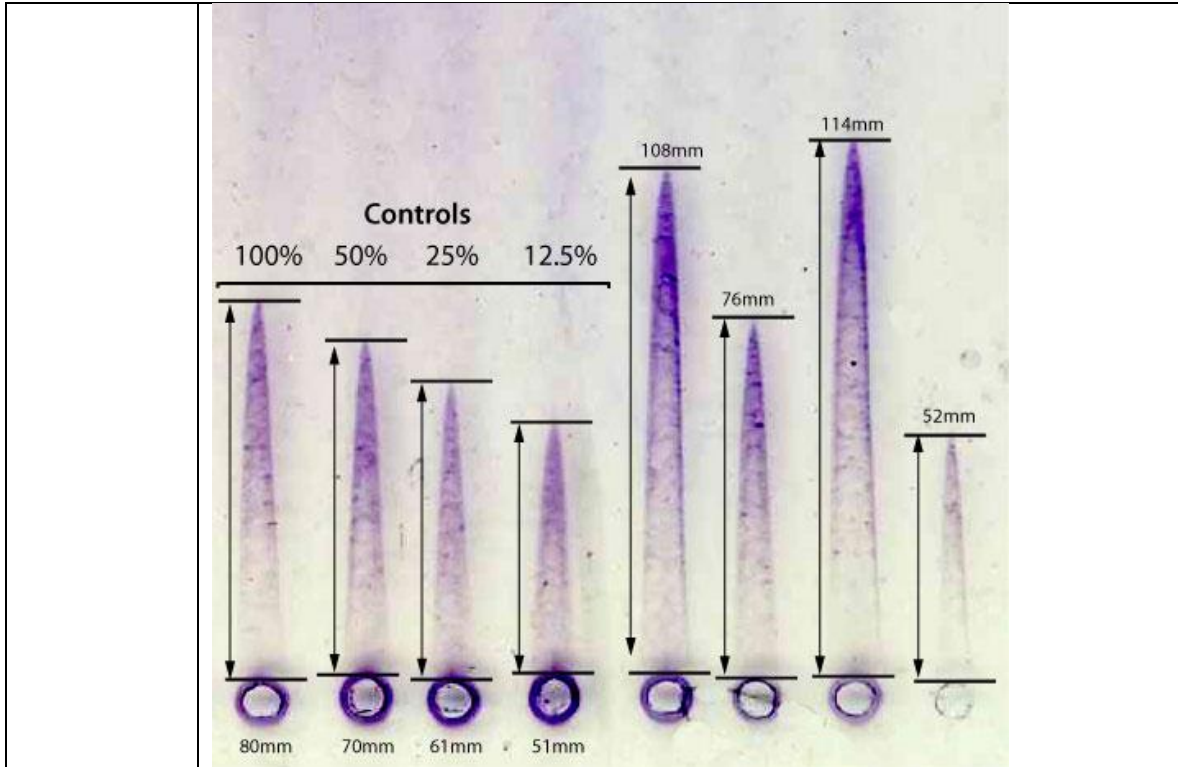
4. Phương pháp tạo màu (Chromogenic)

3 xét nghiệm AT dựa vào sự ức chế FIIa bò, FXa người, FIIa người đều đã có và sử dụng cùng một nguyên lý giống nhau. Huyết tương được ủ với một lượng dư cơ chất trong sự hiện diện của heparin. Heparin gắn và gây ra sự thay đổi cấu dạng của AT, làm tăng hoạt tính của AT một cách đáng kể. Một cơ chất tạo màu đặc hiệu với protease (như FIIa) được cho vào và lượng dư của protease gây ra việc cắt cơ chất làm thay đổi màu. Phổ hấp thụ được đo tại 405nm tỷ lệ nghịch với nồng độ hoạt tính AT trong huyết tương.

Cơ chất	Nguyên lý
Human IIa	Huyết tương pha loãng với nước muối trong sự có mặt của heparin, ủ 90 giây với lượng dư human IIa tạo thành phức hợp AT-Thrombin-Heparin. Lượng human IIa dư sẽ cắt và giải phóng p-nitroanaline (pNa) từ cơ chất tạo màu. Phổ hấp thụ được đo tại 405nm tỷ lệ nghịch với nồng độ hoạt tính AT trong huyết tương.
Bovine IIa	Huyết tương được pha loãng và ủ 30 giây với dung dịch đệm chứa bovine IIa dư và heparin sulfate. Hoạt tính bovine IIa dư được đo bằng cơ chất tạo màu nhạy với IIa. Phổ hấp thụ được đo tại 405nm tỷ lệ nghịch với nồng độ hoạt tính AT trong huyết tương.
Bovine FXa	Huyết tương được pha loãng và ủ 90 giây với lượng dư bovine Xa trong sự có mặt của heparin sulfate. FXa dư được đo bởi tỷ lệ thủy phân cơ chất tạo màu S-2765. pNa giải phóng ra được đo tại 405nm và tỷ lệ nghịch với mức hoạt tính AT trong mẫu.

5. Xét nghiệm miễn dịch

Test	Nguyên lý
Xét nghiệm ELISA	AT:Ag chủ yếu được đo bằng ELISA. Các giếng được phủ với kháng thể anti-AT đa dòng. Pha loãng huyết tương bệnh nhân, huyết tương chứng và hỗn hợp huyết tương bình thường để xây dựng đường chuẩn; cho vào đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng. Sau một số chu kỳ rửa, cho kháng thể anti-AT gắn horse radish peroxidase vào. Cơ chất của horse radish peroxidase được thêm vào và phổ hấp thụ được đo tại 490nm. Dựa vào đường cong tham chiếu để suy ra mức AT.
Điện di miễn dịch Laurell	Trong lịch sử, AT (và nhiều protein khác) được đo bằng điện di miễn dịch [EIA], còn được gọi là “những viên đá của Laurell”. Hiện không còn dùng, bạn đọc quan tâm có thể đọc thêm ở phần tài liệu tham khảo.



III. PHÂN TÍCH

Có một sự khác biệt rõ ràng về khả năng của các xét nghiệm AT trong việc xác định tất cả các biến thể của AT. Bovine FVIIa là xét nghiệm nhạy nhất và với thời gian ủ ngắn, xét nghiệm này có thể xác định được tất cả những biến đổi trong AT kể cả thay đổi vị trí gắn heparin. Ngược lại, human FIIa và bovine FXa có thể không xác định được một số lớn các biến đổi quan trọng trong lâm sàng. Sự khác nhau về độ nhạy của 3 xét nghiệm phản ánh khiếm khuyết phân tử bên dưới, sự hiện diện của các chất ức chế serine protease hoặc những biến đổi về thời gian ủ trong xét nghiệm.

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Trẻ sơ sinh có mức AT thấp lúc sinh (30-50% mức người lớn) nhưng chúng có thể tăng lên gần 60% (tương ứng mức người lớn) 1 tháng sau sinh.

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Những người có AT thấp, rất quan trọng xác định liệu do type I hay type II và liệu nó ảnh hưởng lên vị trí gắn heparine (HBS), vị trí hoạt hóa (RS) hay cả 2 (PL). Điều này có thể thực hiện bằng việc giải trình tự gene [SERPINC1]

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tait, R.C., Walker, I.D., Perry, D.J., Islam, S.I.A.M., Daly, M.E., McCall, F., Conkie, J.A. & Carrell, R.W. (1994) Prevalence of antithrombin III deficiency in the healthy

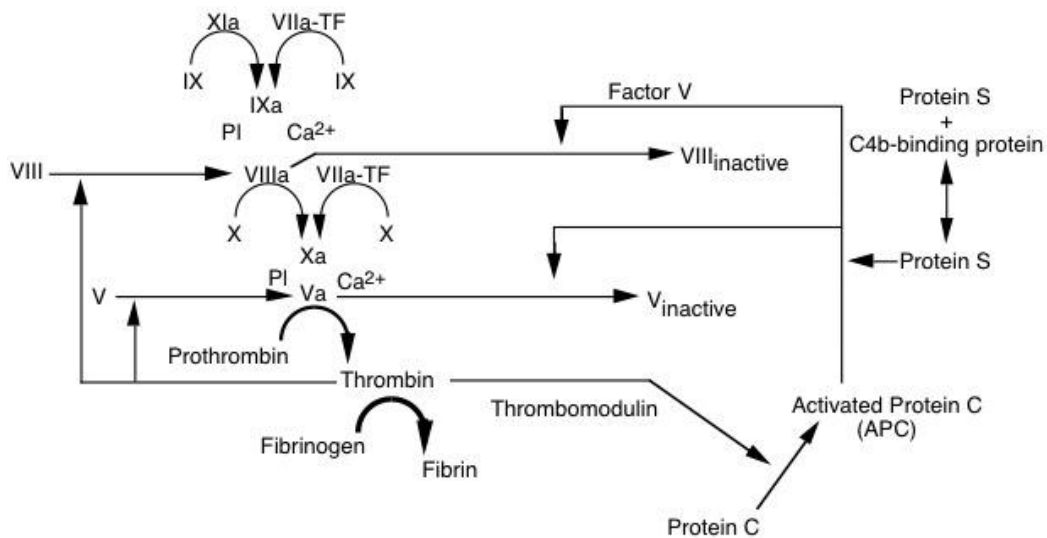
- population. *British Journal Of Haematology*, 87, 106-112.
2. Perry, D.J. (1994) Antithrombin and its Inherited Deficiencies. *Blood Reviews*, 8, 37-55.
 3. Olds, R.J., Lane, D.A. & Thein, S.L. (1994) The Molecular Genetics of Antithrombin Deficiency. *Br J Haem*, 87, 221-226.
 4. Chowdhury, V., Lane, D.A., Mille, B., Auberger, K., Gandenberger, B.S., Pabinger, I., Olds, R.J. & Thein, S.L. (1994) Homozygous antithrombin deficiency: report of two new cases (99 Leu to Phe) associated with arterial and venous thrombosis. [Review]. *Thrombosis & Haemostasis*, 72, 198-202.
 5. Bruce, D., Perry, D.J., Borg, J.Y., Carrell, R.W. & Wardell, M.R. (1994) Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (187 Asn-->Asp). *Journal Of Clinical Investigation*, 94, 2265-2274.
 6. Mourey, L., Samama, J.-P., Delarue, M., Petitou, M., Choay, J. & Moras, D. (1993) Crystal Structure of Cleaved Bovine Antithrombin III at 3.2Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 232, 223-241.
 7. Lane, D.A., Olds, R.J., Conard, J., Boisclair, M., Bock, S.C., Hultin, M., Abildgaard, A., Ireland, H., Thompson, E., Sas, G., Horellou, M.H., Tamponi, G. & Thein, S.-L. (1993) Pleiotropic Effects of Antithrombin Strand 1C Substitution Mutations. *Journal Of Clinical Investigation*, 90, 2422-2433.
 8. Lane, D.A., Olds, R.J., Boisclair, V., Chowdhury, V., Thein, S.L., Cooper, D.N., Blajchman, M., Perry, D.J., Emmerich, J. & Aiach, M. (1993) Antithrombin III Mutation Database: First Update. *Thrombosis And Haemostasis*, 70, 361-369.
 9. Laurell, C.B. (1965) Antigen-Antibody crossed electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 10, 358-361.
 10. Laurell, C.B. (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analytical Biochemistry*, 15, 45-52.
 11. Laurell, C.B. (1972) Electroimmunoassay. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 125, 21-37.
 12. <http://en.wikipedia.org/wiki/Antithrombin>

Bài 2. XÉT NGHIỆM PROTEIN C (PC)

1. Protein C có thời gian bán hủy khoảng 6 giờ.
2. Mặc dù warfarin và những antagonist vitamin K (VKA) khác gây ra một sự suy giảm chức năng trong protein C những yếu tố đông máu phụ thuộc vitamin K khác, dạng carboxylated và acarboxylated từng phần của các yếu tố đông máu có thời gian bán hủy trong huyết tương ngắn hơn một nửa và vì vậy mức miễn dịch suy giảm.
3. Sơ đồ gene protein C nằm ở 2q13-14 và mã hóa protein 429 amino acid.
4. Protein C tăng theo tuổi và thấp lúc sinh (cũng như tất cả các yếu tố đông máu phụ thuộc vitamin K), một số nghiên cứu chỉ ra rằng mức PC không đạt được giá trị như người lớn mãi cho đến 17 tuổi.
5. Kháng nguyên PC cũng có thể đo bằng phương pháp Laurell Electroimmunoassay (“Những viên đá”) nhưng hiếm khi được thực hiện ngày nay.
6. Xét nghiệm tạo màu PC đặc hiệu cho những đột biến tác động lên hoạt tính xúc tác của nó. Những trường hợp xét nghiệm hoạt tính tạo màu bình thường nhưng xét nghiệm chức năng dựa trên cục máu đông giảm, đã được báo cáo.
7. PC giảm thâm trọng trong nhiễm trùng huyết do não mô cầu.

I. GIỚI THIỆU

PC là một serine protease phụ thuộc vitamin K trọng lượng 62kDa và là thành phần cốt lõi của hệ thống chống đông tự nhiên.



Nó lưu hành trong tuần hoàn dưới dạng protein chuỗi đơn và được chuyển thành dạng hoạt động bởi thrombin (đôi khi được gọi là APC – Activated Protein C), khi đó, nó cùng với cofactor của mình – Protein S, bất hoạt FVa và FVIIIa. Sự hoạt hóa PC thành APC xảy ra tương đối chậm khi chỉ có sự hiện diện của thrombin đơn độc, nhưng tốc độ sẽ tăng lên đáng kể khi thrombin được gắn vào protein xuyên màng Thrombomodulin [Tm]. Thrombin gắn với Tm không có hoạt tính tiền đông nhưng hoạt tính chống đông lại nổi bật nhờ con đường PC-PS.

Bên cạnh hoạt tính chống đông, APC cho thấy cả hoạt tính chống viêm và chống apoptosis. APC cũng gắn với PAI-1 và vì vậy ngăn cản t-PA, từ đó tăng hoạt tính tiêu sợi huyết.

APC bị ức chế bởi PCI – Protein C Inhibitor (trước đây còn được gọi là PAI-3) – một thành viên của gia đình SERPIN (Khái niệm SERINE và SEPIN, bạn đọc tham khảo thêm)

Suy giảm PC là một rối loạn di truyền trội NST thường, làm tăng nguy cơ VTE với mức độ phụ thuộc vào đồng hợp hay dị hợp.

Suy giảm PC đồng hợp tử là hiếm gặp, hiện diện ở trẻ sơ sinh với chấm xuất huyết ác tính (một dạng của DIC đặc trưng bởi hoại tử và xuất huyết da lan rộng), dẫn đến tử vong nhanh chóng nếu không điều trị thay thế PC kịp thời. Những người đột biến thể dị hợp, Warfarin tạo ra hiện tượng tự vì nó làm giảm PC trước (vốn dĩ PC có thời gian bán hủy ngắn) sau đó mới giảm các yếu tố đông máu phụ thuộc vitamin K. Vì vậy, mặc dù vai trò của warfarin như một chất chống đông, nó tạo ra tình trạng tăng đông đặc trưng bởi sự tạo thành huyết khối trong các mạch máu nhỏ ở da, gây hoạt ứ da lan rộng. Đây là một hiện tượng hiếm.

Đề kháng PC hoạt hóa (Activated PC Resistance – APCR) là sự mất khả năng cắt FVa và FVIIIa của PC. Điều này có thể là di truyền hoặc mắc phải nhưng thường do sự bất thường trong đích tác động của APC hơn là bản thân PC. Ví dụ phổ biến của APCR là do đột biến V Leiden.

II. NGUYÊN LÝ

PC có thể được đo bởi:

1. ELISA: Lưu ý xét nghiệm này chỉ cho biết số lượng, không phải chức năng.
2. Xét nghiệm dựa vào thời gian cục máu đông theo APTT: thời gian tạo thành cục máu đông sau khi cho chất hoạt hóa PC vào, từ đó suy ra lượng PC.
3. Phương pháp tạo màu: sử dụng chất hoạt hóa PC là ProtacTM, chiết xuất từ nọc độc của *Akistrodon contortrix*.
4. Test dựa vào sự tạo thành thrombin cũng được sử dụng

III. PHƯƠNG PHÁP

1. ELISA: Sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng chống lại PC.
2. Xét nghiệm PC dựa vào cục máu đông: Có thể dựa vào PT hoặc APTT, mặc dù APTT được dùng phổ biến. Như xét nghiệm APTT, ở đây cho thêm chất hoạt hóa PC, thời gian APPT phụ thuộc vào số lượng FVa, FVIIIa => phụ thuộc vào APC => Phụ thuộc vào PC. Nếu mức PC thấp thì APTT sẽ ngắn lại.

3. Phương pháp tạo màu: đo lượng chất APC thông qua cơ chất tạo màu.

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Không có một xét nghiệm PC là độ nhạy và đặc hiệu 100% cho các bất thường.

1. ELISA: Đo mức miễn dịch của PC với độ nhạy cao nhưng không phản ánh chức năng. Phức hợp PC với chất ức chế của nó có thể được nhận ra bởi ELISA mà không thể với các xét nghiệm khác.
2. Phương pháp tạo màu: xác định mức thấp PC với độ nhạy cao và xác định hầu hết bất thường chức năng nhưng không phải tất cả - ví dụ khiếm khuyết gắn vào màng phospholipid do đột biến ở domain Gla, vì xét nghiệm này không phụ thuộc vào phospholipid. Tương tự, xét nghiệm này cũng không phụ thuộc vào PS.
3. Xét nghiệm chức năng PC dựa vào APTT có thể nhầm lẫn với mức PC thấp, sự hiện diện đột biến V Leiden và một số nguyên nhân khác của APCR, tăng mức FVIII, tăng lipid máu. Kết quả bình thường giả khi có kháng đông lupus và bệnh nhân dùng DTI, sử dụng xét nghiệm APTT theo dõi.

Những điều sau nên được quan tâm khi diễn giải kết quả

Nguyên nhân làm PC “có vẻ” thấp (Làm rút ngắn APTT)	Nguyên nhân làm PC thấp thật sự
Đột biến FV Leiden Tăng FVIII huyết tương Những nguyên nhân APCR khác Tăng lipid máu.	Di truyền: - Suy giảm PC dị hợp (gặp ở 0.2% dân số và 3% bệnh nhân VTE) - Suy giảm PC đồng hợp (hiếm)
	Mắc phải: (phổ biến hơn nhiều) - Phản ứng pha cấp - DIC - Bệnh gan - Vitamin K antagonists - Hồng cầu hình liềm

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Trẻ sơ sinh có mức PC thấp lúc sinh khoảng 40IU/dl tăng lên theo tuổi và đạt mức 60IU/dl sau dậy thì. Khoảng tham chiếu ở người lớn là 65-135 IU/dl.

VI. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Test dựa vào APTT có thể bị ảnh hưởng bởi LA, bệnh nhân nên được sàng lọc điều này.

PC thường là một phần trong bộ đánh giá tăng đông. Những test khác gồm PS, gene cho FV Leiden, G2010A cho đột biến prothrombin, mức homocysteine.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gempeler-Messina, P.M., Volz, K., Buhler, B. & Muller, C. (2001) Protein C activators from snake venoms and their diagnostic use. *Haemostasis*, 31, 266-272.

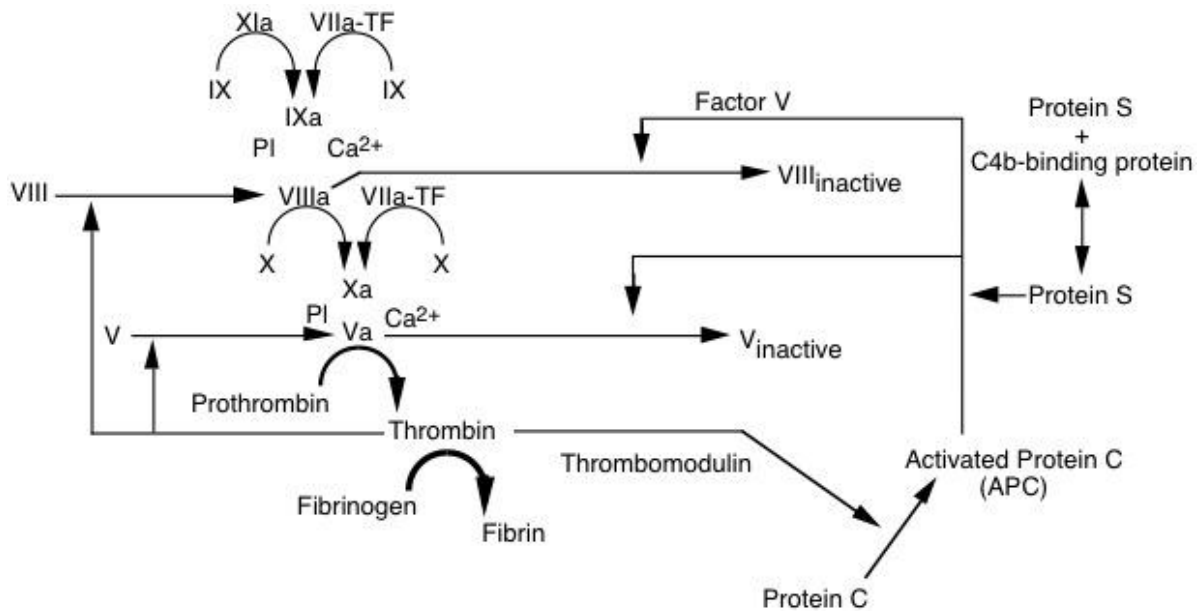
2. Nishioka, J., Ning, M., Hayashi, T. & Suzuki, K. (1998) Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles. *J Biol Chem*, 273, 11281-11287.
3. Elisen, M.G., van Kooij, R.J., Nolte, M.A., Marquart, J.A., Lock, T.M., Bouma, B.N. & Meijers, J.C. (1998) Protein C inhibitor may modulate human sperm-oocyte interactions. *Biol Reprod*, 58, 670-677.
4. Wright, J.G., Malia, R., Cooper, P., Thomas, P., Preston, F.E. & Serjeant, G.R. (1997) Protein C and protein S in homozygous sickle cell disease: does hepatic dysfunction contribute to low levels? *Br J Haematol*, 98, 627-631.
5. Hezard, N., Bouaziz-Borgi, L., Remy, M.G., Florent, B. & Nguyen, P. (2007) Protein C deficiency screening using a thrombin-generation assay. *Thromb Haemost*, 97, 165-166.
6. Smith, O.P., White, B., Vaughan, D., Rafferty, M., Claffey, L., Lyons, B. & Casey, W. (1997) Use of protein-C concentrate, heparin, and haemodiafiltration in meningococcus-induced purpura fulminans. *Lancet*, 350, 1590-1593.

Bài 3. XÉT NGHIỆM PROTEIN S (PS)

1. Protein S tăng theo tuổi và thấp lúc sinh (cũng như tất cả các yếu tố đông máu phụ thuộc vitamin K).
2. Một tỷ lệ lớn trường hợp chẩn đoán suy giảm PS type II sau đó đã phát hiện là đột biến FV Leiden (dương tính giả)
3. Suy giảm PS di truyền là một bệnh di truyền trội NST thường, kiểu gene dị hợp gặp ở 2% bệnh nhân VTE.
4. Suy giảm PS hiếm khi xảy ra ở người khỏe mạnh.
5. Bệnh nhân huyết khối tái diễn hoặc tiền sử gia đình có huyết khối, tỷ lệ suy giảm PS tăng 3-6%.
6. Suy giảm PS phổ biến ở người Nhật hơn người Caucasians

I. GIỚI THIỆU

PS là một glycoprotein phụ thuộc vitamin K và là thành phần cốt yếu của con đường chống đông tự nhiên PS-PC.



PS hoạt động với vai trò là cofactor của APC trong việc bất hoạt FV_a và FVIII_a. PS cũng bộc lộ hoạt tính chống đông độc lập với PC thông qua việc gắn trực tiếp với FV_a, FXa, FVIII. Bên cạnh đó, nó còn có vai trò tăng cường hoạt động thực bào các tế bào apoptotic.

PS có 2 dạng tồn tại: tự do và kết hợp. Dạng kết hợp chiếm 65%, tạo phức hợp với C4b-binding Protein (C4bBP) và là dạng bất hoạt. Chỉ dạng tự do có hoạt tính. Tỷ lệ giữa dạng tự do và kết hợp được điều hòa bởi C4bBP. PS được tổng hợp bởi gan, tế bào nội mạc và mẫu tiểu cầu, có thời gian bán hủy 42 giờ.

Suy giảm PS là một rối loạn di truyền trội NST thường, làm tăng nguy cơ VTE với mức độ phụ thuộc vào đồng hợp hay dị hợp.

Suy giảm PS đồng hợp tử là hiếm gặp, hiện diện ở trẻ sơ sinh với chấm xuất huyết ác tính (một dạng của DIC đặc trưng bởi hoại tử và xuất huyết da lan rộng), dẫn đến tử vong nhanh chóng nếu không điều trị thay thế PS kịp thời (thường dùng FFP nếu không có PS cô đặc sẵn, mặc dù phức hợp prothrombin cô đặc – PCC, chứa thêm II, VII, IX, X, PS, PC).

Có 3 type suy giảm PS di truyền

Type	PS tự do	PS kết hợp	PS toàn phần	PS chức năng
I	G (Giảm)	G	G	BT
II	BT	BT	BT	G
III	G	T (Tăng)	BT	BT

Tuy nhiên, có lẽ type I và type III chỉ là những kiểu hình khác nhau của cùng một đột biến gene, cho nên việc phân loại type I hay III có thể không đúng ở một số bệnh nhân. PS tăng theo tuổi cũng là một phần trong những biến đổi kiểu hình.

Nhiều trường hợp type II khi đánh giá lại đã xác định là đột biến FV Leiden.

II. NGUYÊN LÝ

PC có thể được đo bởi:

5. Kháng nguyên PS toàn phần: ELISA được sử dụng phổ biến, không phụ thuộc C4bBP
6. Xét nghiệm PS chức năng: Đo PS dạng tự do
7. Xét nghiệm PS tự do: đầu tiên phải dùng polyethylene glycol (PEG) để tạo kết tủa với phức hợp C4bBP-PS, sau đó ly tâm để loại bỏ khỏi huyết tương. PS tự do còn lại được xác định. Một cách khác là sử dụng kháng thể đơn dòng chống trực tiếp epitope trên PS mà không bị ảnh hưởng bởi C4bBP.

Xét nghiệm miễn dịch có thể đo cả dạng PS tự do và kết hợp. Có mối tương quan tốt giữa kháng nguyên PS tự do và hoạt tính chức năng của PS, nên nhiều LABO chọn chỉ đo kháng nguyên PS. Tuy nhiên một số trường hợp hiếm, xét nghiệm mức PS bình thường nhưng chức năng hoạt tính bất thường (type 2).

III. PHƯƠNG PHÁP

1. Xét nghiệm miễn dịch

ELISA	Các giếng được phủ kháng thể anti-human PS. Sau rửa, cho vào anti-PS gắn HRP. Cơ
-------	--

	chất của HRP được thêm vào và phổ ánh sáng được ghi nhận. (Đã bàn nhiều nên ở đây không ghi).
Xét nghiệm ngưng kết dựa trên latex	Phân tử latex được gắn C4bBP và ủ với huyết tương bệnh nhân. PS tự do sẽ gắn kết vào latex, sau đó kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp PS sẽ cho vào để các latex ngưng kết lại với nhau. Mức độ ngưng kết tỷ lệ với lượng PS tự do.

2. Xét nghiệm chức năng

Dựa vào APTT	PPP được ủ với huyết tương thiếu PS tại 37 độ C, phospholipid, chất hoạt hóa tiếp xúc, chất hoạt hóa PC lượng dư. Sau ủ (1-4 phút), calcium được thêm vào để khởi động đông máu. Đo APTT để từ đó suy ra mức PS dựa vào đường cong tham chiếu.
Dựa vào PT	Tương tự, nhưng theo cách đo PT.

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

- Suy giảm PS type I đồng hợp tử dễ dàng chẩn đoán lúc sinh khi mức PS gần như không hiện diện. Tuy nhiên, khoảng tham chiếu với trẻ sơ sinh rất rộng, nên đối với thể dị hợp hoặc type II, III thì cần lặp lại test lúc 6 tháng để chẩn đoán.
- Suy giảm type II rất hiếm nhưng xét nghiệm chức năng suy giảm có thể nghi ngờ cao khi các test khác bình thường.
- Xét nghiệm chức năng PS giảm có thể nhầm lẫn với APCR như đột biến FV Leiden hoặc tăng FVIII.
- DTI và các chất chống đông khác cũng tương tác tới kết quả.
- Mức PS thấp ở phụ nữ mang thai và một số phụ nữ dùng thuốc tránh thai đường uống
- Mức PS giảm ở bệnh nhân suy giảm vitamin K hoặc dùng các VKA
- Mức PS giảm ở bệnh nhân bệnh gan, nhưng lưu ý còn có các vị trí tổng hợp ngoài gan.
- Giảm PS đã được báo cáo có quan hệ với nhiễm HIV
- Chấm xuất huyết ác tính đe dọa tính mạng do suy giảm PS di truyền đã được báo cáo có mối liên hệ với bệnh thủy đậu (varicella)
- PS thấp trong bệnh hồng cầu hình liềm do sự hấp thụ PS vào các tế bào hồng cầu hình liềm này. Điều thú vị là PS không giảm thêm nữa trong cơn hồng cầu liềm (sickle crisis)

11. Hoại tử da liên quan đến warfarin đã được báo cáo ở bệnh nhân giảm PS mặc dù cơ chế không rõ, vì thời gian bán hủy của PS dài hơn so với các yếu tố đông máu khác cũng như PC.

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Trẻ sơ sinh có mức PC thấp lúc sinh và đạt mức người lớn sau 6 tháng tuổi. Khoảng tham chiếu ở người lớn là nam > 73 U/dl, nữ > 63 U/dl.

VI. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Trong trường hợp suy giảm PS, những nguyên nhân mắc phải nên được loại trừ. Với chấm xuất huyết ác tính ở trẻ sơ sinh, bố mẹ của đứa bé nên được sàng lọc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. D'Angelo, S.V., Mazzola, G., Della, V.P., Testa, S., Pattarini, E. & D'Angelo, A. (1995) Variable interference of activated Protein C resistance in the measurement of Protein S activity by commercial assays. *Thromb Res*, 77, 375-378.
2. Faioni, E.M., Boyer, N.C., Franchi, F., Wolf, M., Meyer, D. & Mannucci, P.M. (1994) Another Protein S functional assay is sensitive to resistance to activated Protein C [letter]. *Thromb Haemost*, 72.
3. Francis, R.B., Jr. (1988) Protein S deficiency in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med*, 111, 571-576.
4. Kemkes, M.B. (1992) Acquired Protein S deficiency. *Clin Investig*, 70, 529-534.
5. Murdock, P.J., Brooks, S., Mellars, G., Cheung, G., Jacob, D., Owens, D.L., Parmar, M. & Riddell, A. (1997) A simple monoclonal antibody based ELISA for free Protein S. Comparison with PEG precipitation. *Clin Lab Haematol*, 19, 111-114.
6. Odegaard, O.R., Lindahl, A.K., Try, K., Kvalheim, G. & Sorbo, J.H. (1992) Recurrent venous thrombosis during warfarin treatment related to acquired Protein S deficiency. *Thrombosis Research*, 66, 729-734.
7. Simioni, P., Gavasso, S., Luni, S., Invidiato, S. & Girolami, A. (1995) A Protein S functional assay yields unsatisfactory results in patients with activated Protein C resistance [letter]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 6, 286-287.
- 8 Tam, D.A. (1997) Protein C and Protein S activity in sickle cell disease and stroke. *J Child Neurol*, 12, 19-21.
9. Simmonds, R.E., Zoller, B., Ireland, H., Thompson, E., de Frutos, P.G., Dahlback, B. & Lane, D.A. (1997) Genetic and phenotypic analysis of a large (122-member) Protein S-

deficient kindred provides an explanation for the familial coexistence of type I and type III plasma phenotypes. *Blood*, 89, 4364-4370.

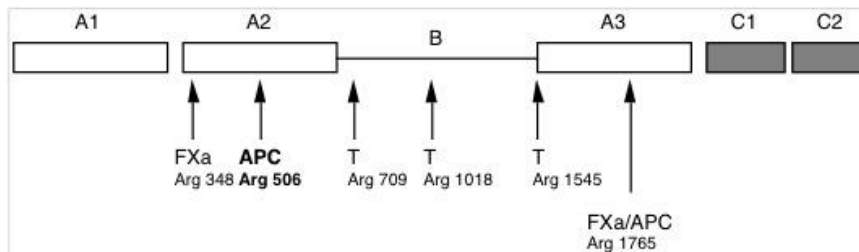
10. Faioni, E.M., Franchi, F., Asti, D., Sacchi, E., Bernardi, F. & Mannucci, P.M. (1993) Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families: interference in a protein S functional assay. *Thromb Haemost*, 70, 1067-1071.

Bài 4. XÉT NGHIỆM ĐỀ KHÁNG PROTEIN C HOẠT HÓA (APCr Assays)

- Mặc dù hầu hết các trường hợp APCr là do đột biến yếu tố V Leiden, xét nghiệm dựa vào APTT cổ điển vẫn hữu ích trong việc xác định những yếu tố nguy cơ độc lập cho VTE bao gồm mang thai, dùng thuốc OCP, hiện diện LA. APCr hiện diện độc lập với đột biến V Leiden là yếu tố nguy cơ cho VTE.
- Có ý kiến cho rằng đột biến gene F8 ảnh hưởng lên vị trí cắt của APC sẽ dẫn đến APCr. Tuy nhiên mối quan hệ này chưa được báo cáo, gợi ý rằng đột biến này có lẽ hiếm xảy ra. Dữ liệu nghiên cứu in vitro tạo gene F8 đột biến vị trí cắt của APC cho thấy không làm giảm thời gian cục đông trong các xét nghiệm APCr.

I. GIỚI THIỆU

APCr lần đầu được báo cáo năm 1995 và xấp xỉ 95% trường hợp do đột biến yếu tố V Leiden [FVL] – một đột biến sai nghĩa G1691A tại Arginine 506 dẫn đến sự thay thế bởi một Glutamine [R506Q] và hủy bỏ 1 vị trí cắt của APC đối với FVa. Điều này được minh họa ở sơ đồ bên dưới (T – Vị trí cắt của thrombin; APC – Activated Protein C)



II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

Có nhiều phương pháp đã phát triển để sàng lọc APCr

APTT	<p>Test nguyên thủy cho sàng lọc APCr, bằng cách đo APTT của huyết tương bệnh nhân trong 2 tình huống: có và không việc cho thêm APC ngoại sinh. Trong mẫu huyết tương không có APCr, việc thêm APC sẽ làm bất hoạt FVa và FVIIIa dẫn đến làm kéo dài APTT. Ngược lại, ở mẫu có APCr thì sự kéo dài APTT không đáng kể.</p> <p>Một tỷ số được suy ra: $[APTT+APC]/[APTT-APC]$</p> <p>Một giả định của test này là đòi hỏi APTT bệnh nhân phải bình thường và vì vậy không thể sử dụng trong trường hợp kéo dài APTT như đang dùng VKA hoặc có LA...</p>
------	--

	Những người không có FVL thường có tỷ số >2, nhưng người có dị hợp FVL thường có tỷ số <2, tuy nhiên có một khoảng chồng lấp giữa người bình thường và người dị hợp.
APTT hiệu chỉnh bằng cách pha loãng với huyết tương thiếu FV	Phương pháp này là hiệu chỉnh từ phương pháp gốc ở trên, nhưng pha loãng 1 phần huyết tương bệnh nhân với 4 phần huyết tương thiếu FV, trước khi cho APC và calcium vào. Việc pha loãng này sẽ làm giảm tác động của các yếu tố khác ảnh hưởng lên APTT như mức FVIII cao, như thế test sẽ đặc hiệu hơn cho đột biến FV. Tuy nhiên, nếu có LA, thì APTT sẽ kéo dài và dẫn tới tỷ lệ dương tính giả cao khi dùng nó để sàng lọc FVL. Rất quan trọng cần nhớ là test này thiết kế chỉ đặc hiệu cho FV, trong khi đó test gốc thì đo APCr từ bất cứ nguyên nhân nào. Trong một số trường hợp có bổ sung thêm polybrene để làm cho nó không nhạy với UFH và LMWH.
Pefakit APC-R FVL Screen	Nó cũng dựa vào thời gian tạo cục máu đông và khác với những test APCr khác, nó sử dụng chất hoạt hóa FV đặc hiệu phân lập từ nọc độc rắn RVV Test này cũng sử dụng huyết tương pha loãng 1:4 với huyết tương thiếu yếu tố V, và cũng dùng 2 mẫu, có hoặc không có thêm APC. Đông máu được khởi động bằng việc thêm chất hoạt hóa prothrombin phụ thuộc FV phân lập từ loại nọc độc rắn khác (<i>Notechis scutatus scutatus</i>) trong sự vắng mặt calcium. Thời gian tạo cục máu đông được ghi lại và tỉ số được tính: Clotting Time(CT) + APC/Clotting Time – APC Nếu FVa bị loại bỏ trong bước ủ thì tốc độ hoạt hóa prothrombin từ Noscargin phụ thuộc FV sẽ chậm, và vì vậy CT sẽ kéo dài. Thuốc thử trong test này cũng được bổ sung thêm polybrene để làm nó không nhạy với UFH và LMWH
Tạo màu	Dựa vào khả năng APC làm hạn chế sự tạo thành FXa thông qua bất hoạt FVIIIa. Tỷ số giữa hoạt tính FXa trong mẫu có APC với mẫu không có, phản ánh đáp ứng của hệ thống đông máu với APC
Xét nghiệm RVV	Dựa vào dRVVT. dRVVT kéo dài khi huyết tương được ủ với chất hoạt hóa PC được phân lập từ nọc độc rắn <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> . Kết quả được biểu thị ở dạng tỷ số giữa DRVVT có và không có nọc độc.

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Việc diễn giải kết quả phụ thuộc rất nhiều vào độ đặc hiệu của test. Những yếu tố ảnh hưởng lên test như chống đông, LA, tăng FVIII...

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Rất phụ thuộc vào độ đặc hiệu của test. Xem ở phần bình luận

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Những người với tỷ số APC thấp thường đưa đến sàng lọc gene F5 cho đột biến FVL. Tuy nhiên, một điều cần nhớ là mặc dù hầu hết các trường hợp APCr là do đột biến yếu tố V Leiden, xét nghiệm dựa vào APTT cổ điển vẫn hữu ích trong việc xác định những yếu tố nguy cơ độc lập cho VTE bao gồm mang thai, dùng thuốc OCP, hiện diện LA. APCr hiện diện độc lập với đột biến V Leiden là yếu tố nguy cơ cho VTE.

Một số đột biến gene F5 liên kết với APCr nhưng không phải là FVL cũng đã được báo cáo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis*. 1994;24(2):139-51.
2. Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major basis of venous thrombosis, is caused by deficient anticoagulant cofactor function of factor V. *Haematologica*. 1995.
3. Dahlback B. Thrombophilia: the discovery of activated protein C resistance. *Adv Genet*. 1995;33(135):135-75.
4. Dahlback B. Factor V and protein S as cofactors to activated protein C. *Haematologica*. 1997;82(1):91-5.
5. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterised by a poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1993;90:1004-8.
7. Jorquera JI, Montoro JM, Fernandez MA, Aznar JA, Aznar J. Modified test for activated protein C resistance. *Lancet*. 1994;344(8930):1162-3.

Bài 5. HOMOCYSTEINE (Hcy)

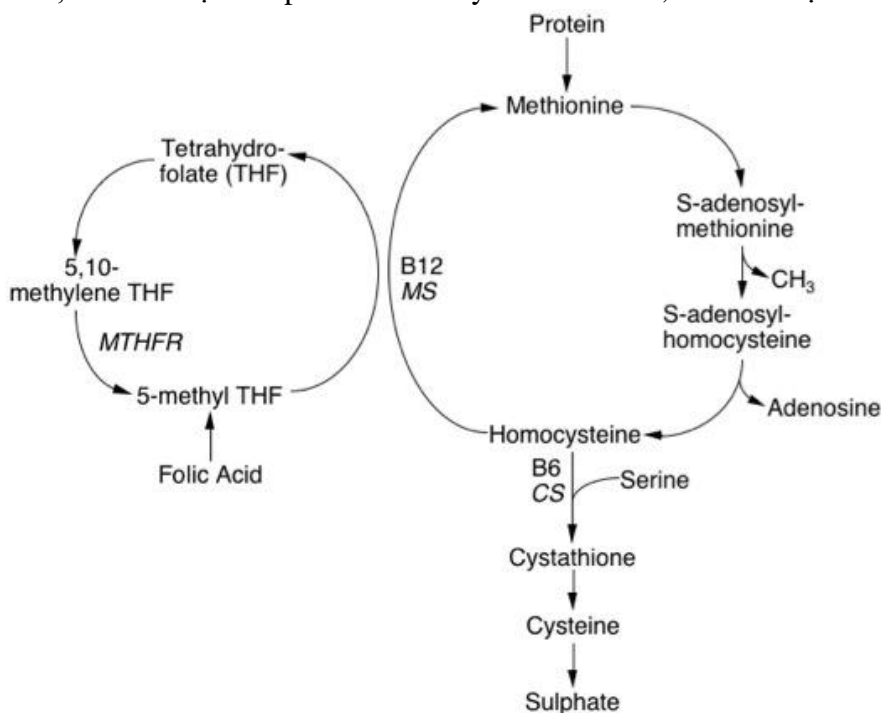
1. Thu thập mẫu máu là bước tối quan trọng trong việc đo Homocysteine huyết tương. Một bữa ăn nhẹ có lẽ ít tác động lên mức homocystein, nhưng một bữa ăn giàu protein sẽ dẫn đến tăng homocystein đến 15-20% và đạt cực đại 6-8h sau ăn.
2. Homocysteine được tạo ra từ hồng cầu, bạch cầu và tiếp tục được tạo ra sau khi lấy máu. Mức Hcy tăng với tốc độ 10-15%/giờ. Nếu việc xử lý mẫu không làm ngay được, thì đặt mẫu trong nước đá sẽ làm giảm ảnh hưởng của hiện tượng này.
3. Sau khi ly tâm tách huyết tương, Hcy có thể ổn định trong nhiều năm khi đông ở -20 độ C.
4. Trong máu toàn phần và trong huyết tương, luôn có sự tái phân phối các dạng Hcy và trong vòng 1 giờ sau thu thập tại nhiệt độ phòng sau khi rã đông, phần lớn Hcy ở dạng kết hợp với protein.
5. Để ước tính chính xác lượng Hcy tự do, cần khử hiện tượng protein hóa ngay lập tức trước khi xử lý mẫu.
6. Một chế độ ăn hạn chế và quá trình xử lý mẫu cẩn thận sẽ không ảnh hưởng đến chẩn đoán Hcy niệu cổ điển, nhưng nó sẽ trở nên quan trọng khi đánh giá nguy cơ mạch máu.
7. Một sự tăng Hcy 4-5 μ mol/l sẽ làm tăng 40-50% bệnh mạch máu.
8. Có sự giảm đáng kể Hcy trong đột biến C677T MTHFR như là một yếu tố nguy cơ của VTE. BCSH Guidline không khuyến cáo sàng lọc điều này ở bệnh nhân VTE.

I. GIỚI THIỆU

Hcy là một amino acid chứa nhóm sulfur xuất phát từ Methionine, một amino acid thiết yếu tìm thấy phổ biến trong các protein có nguồn gốc động vật, Hcy có nguồn duy nhất ở người. Hcy được chuyển hóa hoặc bởi remethylation hoặc transsulphuration.

- Con đường Remethylation: trong con đường này, Hcy cần một nhóm methyl được lấy từ hoặc do sự chuyển đổi 5-methyltetrahydrofolate thành tetrahydrofolate hoặc từ betaine thành N,N-dimethylglycine. Phản ứng trước phụ thuộc B12, xảy ra ở tất cả các mô và đòi hỏi enzyme *methionine synthase* (MS). Phản ứng sau chiếm phần phụ, độc lập B12 xảy ra chủ yếu ở gan và cần enzyme khác *betaine homocysteine methyltransferase*. Hcy nếu không được methylated thì sẽ được chuyển hóa theo con đường thứ 2 còn gọi là transsulphuration.
- Con đường transsulphuration: trong con đường này, Hcy sẽ ngưng tụ với serine tạo thành cystathione, một phản ứng không thể đảo ngược được xúc tác bởi enzyme

cystathionine- β -synthase (C β S) và nó đòi hỏi pyridoxal-5'-phosphate (vitamin B6) như một cofactor. Cystathionine được chuyển hóa tiếp thành cysteine và α -ketobutyrate bởi *gamma-cystathionase*. Methionine được chuyển thành homocysteine thông qua S-adenosylmethionine (SAM), SAM hoạt động như một người cho methyl trong một số lớn các phản ứng sinh học như quá trình tổng hợp purine và pyrimidine. S-adenosylhomocysteine (SAH) là kết quả của sự khử methyl từ SAM, sau đó được thủy phân thành Hcy và adenosine, bắt đầu một chu trình mới.



Hcy tồn tại trong huyết tương ở nhiều dạng

Dạng	
Tự do	Phân tử thiol (sulphydryl) tự do. Hcy tự do nhanh chóng bị oxy hóa tại pH sinh lý và chỉ hiện diện lượng nhỏ trong huyết tương.
Hcy	Hcy có thể liên hợp với các phân tử Hcy khác bằng cầu nối disulphide để tạo thành dạng homocystein.
Kết hợp với protein khác	Phần lớn Hcy ở dạng kết hợp với các protein khác qua cầu nối disulphide với các phân tử cysteine. Tổng lượng dự do và kết hợp tạo ra lượng hcy toàn phần (tHcy).

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Test Cyanide-nitroprussic acid: ít khi được thực hiện ngày nay. Trước đây người ta dùng phản ứng homocysteine disulphide hiện diện trong nước tiểu với dung dịch cyanide-nitroprussic acid tạo thành ferric thiocyanate – một phức hợp cơ-kim có màu hồng tím.

2. Một số phương pháp đo Hcy xin phép không viết chi tiết. Bạn đọc quan tâm có thể đọc thêm.

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Homocysteine niệu thường là kết quả của bệnh lý di truyền lặn do thiếu hụt enzyme CBS hoặc MS liên quan đến con đường transsulphuration và remethylation. tHcy huyết tương ở những bệnh nhân này thường $>50\mu\text{mol/L}$, vào khoảng $200-400\mu\text{mol/L}$ liên kết với tăng methionine huyết tương. Những người bị ảnh hưởng thường có bất thường chậm phát triển tâm thần, dị dạng xương và nguy cơ cao bệnh lý mạch máu. Một số bệnh nhân với homocysteine niệu điển hình do thiếu hụt CBS sẽ đáp ứng điều trị với bổ sung pyridoxine, làm giảm mức Hcy cũng như giảm nguy cơ bệnh lý mạch máu. Đột biến dị hợp CBS xảy ra ở 0.5-1.5% dân số chung và có thể liên kết với tăng nhẹ Hcy.

Có một số yếu tố ảnh hưởng lên kết quả của Hcy, tham khảo thêm ở bảng:

Di truyền	CBS deficiency MS deficiency MTHFR deficiency TL-MTHFR (C677T)
Sinh lý	Age: Homocysteine levels increase with age Sex: Pre- and postmenopausal women have lower tHcy levels than men Pregnancy: Levels fall Diet: tHcy levels directly related to methionine intake and inversely related to folate, B12, B6 and rarely choline, intake. Alcohol
Bệnh lý	Vitamin deficiencies Renal disease: tHcy correlates with increasing creatinine and decreasing GFR Renal/cardiac transplantation: tHcy levels increased Severe psoriasis: Levels increased Leukaemia: Levels increased
Thuốc	Oral contraceptives/Hormone Replacement Therapy: levels reduced Steroids: Levels increased Ciclosporin: Levels increased Anti-folate drugs: Levels increased Smoking: Levels increased

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Giá trị bình thường <16 $\mu\text{mol/L}$

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Ở một người tăng Hcy, điều quan trọng nhất phải loại trừ suy giảm folate hoặc B12. Những nguyên nhân khác nên được xem xét đã tổng kết ở bảng trên. Nhớ rằng, việc đo Hcy huyết tương là khó và chịu nhiều ảnh hưởng của các yếu tố tiền phân tích. Một kết quả bất thường nên được làm lại để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. McCully, K.S. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*, 56, 111-128.
2. McCully, K.S. & Wilson, R.B. (1975) Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*, 22, 215-227.
- Refsum, H., Ueland, P.M., Nygard, O. & Vollset, S.E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*, 49, 31-62.
3. Jacques, P.F., Selhub, J., Bostom, A.G., Wilson, P.W. & Rosenberg, I.H. (1999) The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med*, 340, 1449-1454.
4. Baric, I. (2009) Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis*, 32, 459-471.
5. Khandanpour, N., Loke, Y.K., Meyer, F.J., Jennings, B. & Armon, M.P. (2009) Homocysteine and peripheral arterial disease: systematic review and meta-analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 38, 316-322.
6. Marti-Carvajal, A.J., Sola, I., Lathyrus, D. & Salanti, G. (2009) Homocysteine lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006612.

Bài 6. NHỮNG KHÁNG THỂ KHÁNG PHOSPHOLIPID (APLs)

PHẦN 1: GIỚI THIỆU

1. Rất quan trọng phải nhớ rằng APLs có thể hiện diện một cách yên lặng sau khi ốm, đặc biệt là nhiễm trùng và không nên kết luận cho đến khi một test thứ 2 được thực hiện. APLs yên lặng hiếm khi liên kết với huyết khối.
2. APS có thể xảy ra trong bối cảnh một bệnh lý khác (APS thứ phát), chủ yếu là rối loạn tự miễn, SLE và xơ cứng bì (scleroderma).
3. Những người có cả LA và hiệu giá kháng thể anticardiolipin vừa/cao cho thấy nguy cơ huyết khối cao hơn những người chỉ có 1 test dương tính.
4. Việc xác định LA ở bệnh nhân dùng VKA là khó. Khuyến cáo ngưng VKA 1-2 tuần và khi INR <1.5 trước khi sàng lọc LA. Nếu INR 1.5-3 thì mix 1:1 với huyết tương bình thường có thể được chuẩn bị trước khi sàng lọc LA. Tuy nhiên việc diễn giải kết quả có thể vẫn khó và một LA yếu có thể có ý nghĩa lâm sàng nhưng bị bỏ qua do pha loãng. Một số test khác như thời gian cục đông Textarin/Ecarin có thể thực hiện mặc dù không được khuyến cáo hiện tại bởi ISTH SSC cho LA.
5. Ảnh hưởng của LMWH lên sàng lọc LA là thay đổi. Một số kit thương mại cho sàng lọc LA có chứa sẵn thuốc thử trung hòa heparin như polybrene.

I. GIỚI THIỆU

APL phá vỡ quá trình đông máu và quan trọng vì 2 lý do:

1. Chúng có thể kéo dài những xét nghiệm đông máu phụ thuộc phospholipid như APTT, cho ra một ấn tượng về một rối loạn chảy máu tiềm tàng NHƯNG
2. In vivo chúng có thể thúc đẩy huyết khối (Hội chứng kháng phospholipid - APS), và cũng có thể sự hiện diện của chúng hoàn toàn không có triệu chứng.

Rất quan trọng xác định APL vì chúng có thể giải thích những đợt huyết khối và xảy thai tái diễn trong 3 tháng đầu. Thêm vào đó, nếu không được nhận ra, APL có thể kéo dài test đông máu và tiếp đó là xét nghiệm yếu tố dẫn đến diễn dịch nhầm lẫn là suy giảm yếu tố đông máu. May mắn là trong trường hợp sau, một số đầu mối dựa vào đồ thị không song song trong xét nghiệm yếu tố có thể phát hiện ra.

Chẩn đoán APS đòi hỏi sự kết hợp của ít nhất một test LABO đặc hiệu và một hoặc nhiều hơn các triệu chứng lâm sàng:

Tiêu chuẩn lâm sàng

Huyết khối mạch máu	Một hoặc nhiều đợt huyết khối động mạch, tĩnh mạch, hoặc mạch máu nhỏ ở bất cứ mô hay cơ quan nào. Huyết khối phải được xác định bằng những tiêu chuẩn có giá trị (hình ảnh hoặc mô học rõ ràng)
Thai lưu	a. Một hoặc nhiều những đợt thai lưu không giải thích được, bình thường về mặt hình thái tại thời điểm ≤ 10 tuần. b. Một hoặc nhiều những lần sinh non bình thường về mặt hình thái trước tuần 34 vì: - Sản giật hoặc tiền sản giật nặng hoặc - Nhận ra những đặc điểm bánh nhau không đầy đủ. c. 3 hoặc nhiều hơn những đợt xảy thai tự động trước tuần 10 đã loại trừ các bất thường giải phẫu/ hormone/ NST.
Tiêu chuẩn LABO	
Ít nhất 2 test dương tính cho APL cách nhau 12 tuần	
Trực tiếp	* ELISA - Nguyên lý: + 3 đặc điểm cho việc xác định APL chính xác là: ✓ Chống trực tiếp hoặc cardiolipin (aCL) hoặc $\beta 2$ -glycoprotein-I (anti- $\beta 2$ GPI) ✓ IgG và/ hoặc IgM ✓ Hiện diện với chuẩn độ trung bình hoặc cao (i.e. >40 GPLU hoặc MPLU đối với aCL hoặc $>$ the 99th percentile đối với hoặc aCL hoặc anti- $\beta 2$ GPI. + Cardiolipin được tìm thấy gần như độc quyền ở lớp trong màng ty thể, nơi nó thực hiện vai trò quan trọng trong việc điều hòa những enzyme liên quan đến chuyển hóa năng lượng của ty thể. Thuật ngữ “cardiolipin” xuất phát từ sự việc là lần đầu nó được phân lập từ trái tim của con bò những năm đầu 1940 và tạo thành nền tảng cho xét nghiệm Wasserman cho giang mai. + $\beta 2$ -glycoprotein I (còn được biết là Apolipoprotein H) là một protein đa chức năng: gắn vào cardiolipid và làm thay đổi cấu hình, tương tác với quá trình ngưng tập tiểu cầu bằng việc ức chế bài tiết serotonin và tương tác với nhiều bước khác trong con đường đông máu. Những kháng thể gắn $\beta 2$ GPI có mối liên quan chặt chẽ với những biến chứng huyết khối trong APS.
Gián tiếp	Thông qua ảnh hưởng lên xét nghiệm đông máu phụ thuộc phospholipid. - Nguyên lý APL có thể ảnh hưởng lên phospholipid được sử dụng ở một số LABO trong các xét nghiệm đông máu (như APTT) và làm kéo dài thời gian cục đông. Ảnh hưởng này có thể vượt qua bằng cách cho thêm lượng dư phospholipid trung hòa APL và thời gian in vitro sẽ ngắn lại.

	<p>Việc chứng minh sự hiện diện APL bởi những test đông máu đòi hỏi:</p> <ol style="list-style-type: none"> Kéo dài những test đông máu phụ thuộc phospholipid VÀ Rút ngắn lại khi cho dư phospholipid hoặc loại bỏ ảnh hưởng của APL bằng cách nào đó HOẶC So sánh với test xác định độc lập với phospholipid. <p>- Những test được dùng cho mục đích này là:</p> <ol style="list-style-type: none"> Dilute Russell Viper venom test (DRVVT) Silica clotting time (SCT) Kaolin clotting time (KCT) The Textarin/Ecarin time Taipan venom time (TVT) Factor V ratio <p>Không có một test nào ở trên có thể xác định được tất cả LA. Vì vậy ít nhất 2 test khác nhau nên được sử dụng</p>
--	---

Sơ đồ dưới đây cho thấy trình tự điều tra một trường hợp nghi ngờ LA

Collection of blood samples

[Pre-analytical variables are critical in LA Screening

-> Fresh sample

Avoid testing if on anticoagulants

Double centrifugation

Avoid Freeze-thawing plasma samples as this can lyse platelets releasing PI and may neutralise a LA]



Screening Tests

[Two tests should be used but with different principles

dRVVT

APTT using PI-sensitive reagents[Low PL concentration/Silica as an activator]



Mixing Tests

[Normal plasma 1:1]



Confirmatory Tests

[Increase the dose of PI used in the screening test

Bilayer or hexagonal-phase PI should be used to increase the concentration of PL]



Report Results

[Results should be reported as the ratio of patient-to-normal plasma.]

Khi sàng lọc LA, 2 test dựa vào những nguyên lý khác nhau nên được sử dụng. Khuyến cáo hiện tại của ISTH SSC khuyến cáo sử dụng Silica Clotting Time [SCT] và dilute Russell Viper Venom Time [dRVVT].

II. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Để hoàn thành xét nghiệm APL, mẫu máu bệnh nhân cần được thử 2 lần cách nhau 12 tuần. Công thức máu cũng cần được kiểm tra vì APL có thể gây nên ITP. APL cũng có thể gây nên suy giảm prothrombin mắc phải và ở bệnh nhân APL với tiền sử chảy máu, việc đo mức FII rất có giá trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pengo, V., Tripodi, A., Reber, G., Rand, J.H., Ortel, T.L., Galli, M. & De Groot, P.G. (2009) Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*, 7, 1737-1740.
2. Urbanus, R.T., Derksen, R.H. & de Groot, P.G. (2008) Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev*, 22, 93-105.
3. Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H., PG, D.E.G., Koike, T., Meroni, P.L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P.G. & Krilis, S.A. (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*, 4, 295-306.
4. Greaves, M., Cohen, H., MacHin, S.J. & Mackie, I. (2000) Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*, 109, 704-715.
5. Brandt, J.T., Triplett, D.A., Alving, B. & Scharrer, I. (1995) Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost*, 74, 1185-1190.
6. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44:750-9.
7. BCSH [Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome \[2012\]](#).

Bài 6. NHỮNG KHÁNG THỂ KHÁNG PHOSPHOLIPID

Phần 2. THỜI GIAN NỌC ĐỘC RUSSELL'S VIPER PHA LOÃNG

Dilute Russell's Viper Venom Time [DRVVT]

1. Việc chuẩn bị PPP cho DRVVT cũng như tất cả các test LA là quan trọng. Mẫu huyết tương phải được quay gấp đôi để loại bỏ tất cả tiểu cầu vì nó có thể trở thành một nguồn cung cấp PL khác trong test. Tương tự mẫu không nên đông lại vì tiểu cầu sau đó sẽ bị dung giải và phóng thích PL trong quá trình rã đông.
2. Kháng thể chống FV hoặc suy giảm FV sẽ làm kéo dài DRVVT nhưng việc kéo dài sẽ không được điều chỉnh khi thêm phospholipid ở bước hiệu chỉnh.
3. Heparin sẽ kéo dài DRVVT nhưng nó cũng sẽ kéo dài Thrombin Time (TT), trong khi APL rất hiếm khi gây kéo dài TT. Nếu TT kéo dài, thực hiện RT sẽ xác nhận sự hiện diện của heparin.
4. DRVVT không tin tưởng được khi bệnh nhân uống warfarin. Một số LABO thực hiện mix 1:1 với huyết tương bình thường để làm giảm tối thiểu ảnh hưởng.
5. Test hiệu chỉnh (confirm theo cách gọi của LABO chúng ta) trước đây người ta dùng tiểu cầu ly giải. Tuy nhiên, hầu hết LABO hiện nay sử dụng phospholipid tinh khiết vì điều này sẽ chuẩn hơn.
6. Đọc thêm bài nọc độc rắn trong đông máu (Snake Venoms in Haemostasis)

I. GIỚI THIỆU

RVV được phân lập từ rắn *Daboia russelii* chứa một chất hoạt hóa FX khi có mặt PL, prothrombin, calcium chuyển fibrinogen thành fibrin. Những người có LA gắn với PL sẽ ức chế hoạt động của RVV và làm kéo dài CT (Clotting time).

Vì RVV hoạt hóa trực tiếp FX vì vậy test không bị ảnh hưởng bởi suy giảm yếu tố FXII, XI, IX hoặc VIII. DRVVT thường được kết hợp với động tác trung hòa tiểu cầu để chứng minh sự đặc hiệu với PL của kháng thể.

II. PHƯƠNG PHÁP

Huyết tương bình thường được trộn với PL pha loãng tại 37 độ C. RVV pha loãng và sau đó calcium chloride được thêm vào, CT được ghi lại. Test sau đó được lặp lại với huyết tương bệnh nhân và tỷ số giữa bệnh nhân/chứng được tính toán.

Thuốc thử	Giải thích
-----------	------------

PPP	Một nguồn của các yếu tố đông máu, đặc biệt là thrombin và fibrinogen.
RVV pha loãng	Nó được pha loãng để CT của huyết tương chứng vào khoảng 30-35 giây vì đây là độ nhạy tối ưu cho APL.
PL	Cung cấp bề mặt cho sự tạo thành thrombin.
Calcium	Khởi động đông máu

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Nếu DRVVT không kéo dài thì test hiệu chỉnh không được chỉ định.

DRVVT	Phân tích
DRVVT	Khoảng tham chiếu: 29-42 giây
Tỉ số DRVVTtest/chứng	Khoảng tham chiếu: 0.9-1.05
Tỷ số >1.05	Có thể LA Loại trừ suy giảm các yếu tố II, V, X, Fibrinogen hoặc chất ức chế khác không phải LA
DRVVT kéo dài hiệu chỉnh được với huyết tương bình thường.	Suy giảm yếu tố đông máu (Một LA yếu có thể bị che giấu ở mix 1:1 với huyết tương bình thường, một số LABO khuyến cáo mix 1:4 (1 test, 4 NPP) để thử lại)
DRVVT kéo dài hiệu chỉnh lại với PL	LA

Tính phần trăm hiệu chỉnh

- Phần trăm hiệu chỉnh được tính bằng cách sử dụng công thức sau

$$\text{Percent correction} = \frac{\text{Test DRVVT}}{\text{Test DRVVT} + \text{PL}}$$

- Phần trăm hiệu chỉnh của tỉ số được tính bằng công thức bên dưới. Kết quả cuối cùng được nhân 100 để thành đơn vị %. Cách tính này hiện đã được khuyến cáo bởi Hội hội chuẩn hóa Huyết học của Anh quốc (British Committee for Standardisation in Haematology [BCSH.]

$$\frac{[\text{Test DRVVT}/\text{Control DRVVT}] - [\text{Test DRVVT} + \text{PL}/\text{Control DRVVT} + \text{PL}]}{\text{Test DRVVT} / \text{Control DRVVT}}$$

Xem ví dụ sau

Mẫu	CT của DRVVT (giây)	Tỷ số
Huyết tương bệnh nhân	69.2	1.82
NPP	37.9	
Huyết tương bệnh nhân + PL	39.5	1.21

NPP + PL	32.5	
----------	------	--

Từ dữ liệu trên: $[1.82 - 1.21/1.82] \times 100 = 33.5\%$ hiệu chỉnh. Như vậy bệnh nhân này kết luận có LA.

3. Khi nào thì dương tính? Nhiều LABO chọn mức hiệu chỉnh $>10\%$ là test dương tính.

IV. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Khi một người với LA dương tính, test nên được lặp lại lúc 12 tuần. Nhớ rằng không có test nào có thể phát hiện tất cả LA, vì vậy nếu vẫn nghi ngờ một bệnh nhân có LA thì một test khác nên được thực hiện như SCT. Cuối cùng, nguyên nhân của LA nên được sàng lọc như ANA, thuốc, virus...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Shapiro SS. The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Annu Rev Med.* 1996;47(533):533-53.
2. Triplett DA. Antiphospholipid antibodies, lupus anticoagulants and thromboembolic disease. *Haematologica.* 1995.
3. Kampe CE. Clinical syndromes associated with lupus anticoagulants. [Review]. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis.* 1994;20(1):16-26.
4. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Mannucci PM. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment. Performance of dilute Russell viper venom test and silica clotting time in comparison with Staclot LA. *Thromb Haemost.* 2002 Oct;88(4):583-6.
5. Triplett DA. Use of the dilute Russell viper venom time (dRVVT): its importance and pitfalls. *J Autoimmun.* 2000 Sep;15(2):173-8.
6. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood.* 1986 Oct;68(4):869-74.
7. [BCSH Guidelines](#) on the Investigation and Management of antiphospholipid Syndrome.

Bài 6. NHỮNG KHÁNG THỂ KHÁNG PHOSPHOLIPID

Phần 3. KAOLIN CLOTTING TIME [KCT]

Thuật ngữ “KCT” đôi khi được dùng để viết tắt cho Kaolin Cephalin Time – một tên gọi khác của APTT. Điều này có thể dẫn đến nhầm lẫn vì Kaolin Clotting Time là một test khác, không cho PL (Cephalin) vào và được dùng để sàng lọc LA.

I. GIỚI THIỆU

KCT được xem như test nhạy nhất trong việc xác định chống đông lưu hành. KCT xác định tất cả các loại chất ức chế, bao gồm cả những chất ức chế chống trực tiếp FVIII, nhưng nó cũng nhạy với sự có mặt của UFH.

II. NGUYÊN LÝ

KCT được thiết kế như APTT nhưng không cho thêm bất kỳ PL nào. Test dựa vào những mảnh màng tế bào và lipid huyết tương để cung cấp bề mặt PL cho phản ứng đông máu.

III. PHƯƠNG PHÁP

Pha loãng huyết tương bệnh nhân: huyết tương bình thường theo tỷ lệ như trong bảng. Kaolin và sau đó calcium được thêm vào. Thời gian KCT được đo lại. Kaolin làm vẩn đục dung dịch nên khó xác định điểm cuối nếu đo bằng quang học, thường đòi hỏi phải làm tay. Tuy nhiên, gần đây người ta đã tạo ra các kaolin ít gây đục, có thể đo tự động được.

Normal Plasma	Patient Plasma
100%	0%
90%	10%
80%	20%
50%	50%
20%	80%
10%	90%

Không có bước cho PL vào để làm test khẳng định đối với KCT. Thay vào đó, để loại trừ suy giảm yếu tố gây kéo dài KCT, một lượng lớn huyết tương bình thường được cho vào, nếu rút ngắn thì sẽ là thiếu hụt, nếu không sẽ chứng tỏ sự hiện diện kháng đông.

Test tại độ pha loãng 80:20 được dùng như một test sàng lọc. Tỷ số ≥ 1.2 được xem như dương tính với LA mặc dù khoảng tham chiếu nên được xây dựng theo mỗi LABO.

$$\frac{\text{KCT (80\% Normal : 20\% Test)}}{\text{KCT (100\% Normal)}}$$

Chỉ số Rosner: giá trị bình thường là <0.15

[KCT 50: 50 Mix Control Plasma + Test Plasma] - [KCT Control Plasma]
KCT Test Plasma

Phần trăm của Chang:

- a. Ban đầu Chang và cs cũng sử dụng mix 50:50, kết quả dương tính khi >70%, giá trị biên là 58-70%

$$\frac{[\text{KCT Test Plasma}] - [\text{KCT 50: 50 Mix Control Plasma} + \text{Test Plasma}]}{[\text{KCT Test Plasma} - \text{KCT Normal Plasma}]}$$

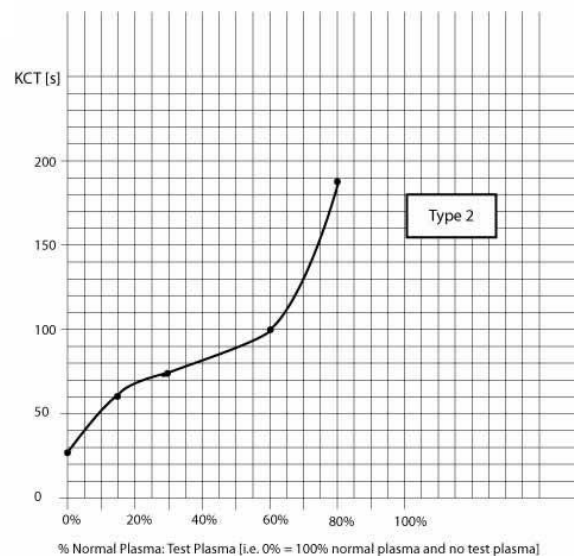
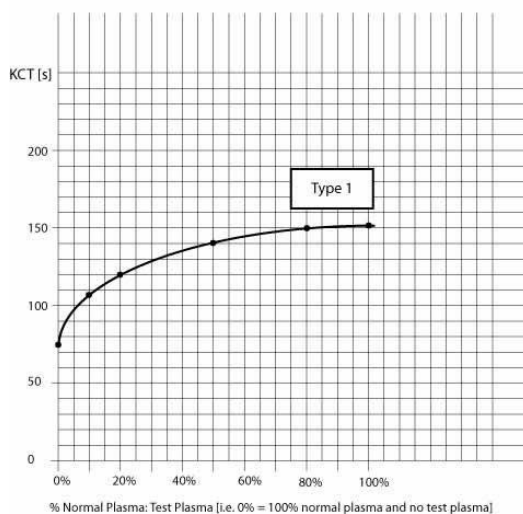
- b. Sau đó Chang và cs thấy mix 4:1 cho kết quả nhạy hơn; dương tính khi >50%.

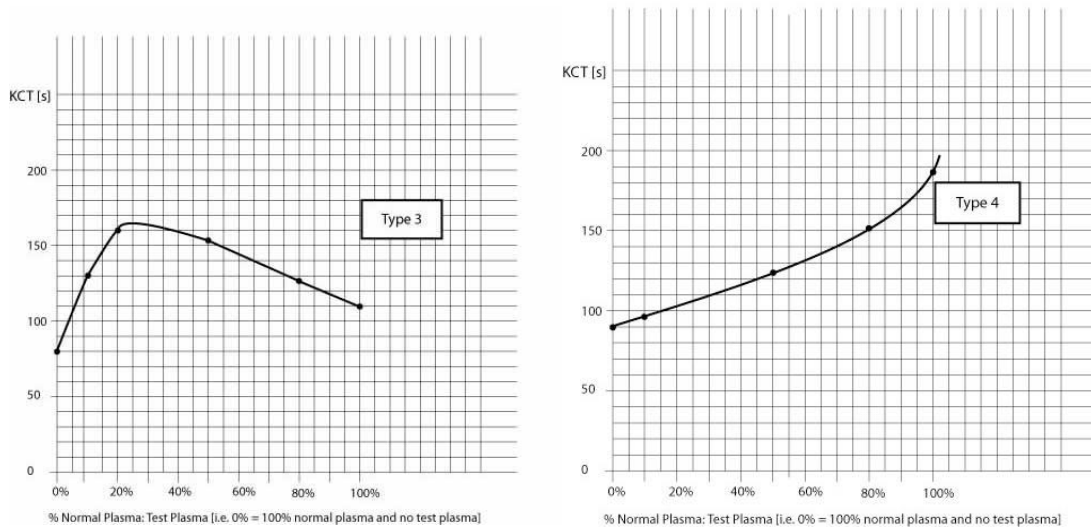
$$\frac{[\text{KCT Test Plasma}] - [\text{KCT 4: 1 Mix Test Plasma} + \text{Control Plasma}]}{[\text{KCT Test Plasma} - \text{KCT Normal Plasma}]}$$

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

KCT sử dụng một lượng nhỏ phospholipid trong huyết tương bệnh nhân và vì vậy rất nhạy với sự nhiễu của tiểu cầu trong mẫu (điều này làm giảm đáng kể độ nhạy của test, đặc biệt sau khi đông và rã đông sẽ làm vỡ màng tiểu cầu và phóng thích ra một lượng lớn bề mặt cho đông máu). Một KCT <60 giây cho phép xác định sự nhiễu của tiểu cầu từ huyết tương chứng, kết quả không chính xác.

KCT của test được so với chứng. Nếu tỷ số test/chứng ≥ 1.2 hướng đến một chất ức chế (1.1-1.2 được xem là ranh giới). Suy giảm yếu tố phân biệt với APL bằng cách cho lượng lớn huyết tương bình thường vào sẽ hiệu chỉnh được KCT. Nếu CT ở những độ pha loãng khác nhau được biểu diễn trên giấy Log-Lin, hàng loạt đường cong được tạo ra như hình dưới





Tóm tắt các đường cong KCT

Đường cong	Diễn giải
Type 1	Hiện diện LA. KCT tại độ pha loãng 0% nên >60 giây, nếu không thì huyết tương bình thường chứa nồng độ PL quá cao làm mất độ nhạy. Nhớ rằng KCT chỉ sử dụng nguồn PL trong huyết tương test.
Type 2	LA + Suy giảm yếu tố
Type 3	LA hiện diện nhưng không có $\beta 2$ -GPI
Type 4	Không có LA hiện diện

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Khi một người với LA dương tính, test nên được lặp lại lúc 12 tuần. Nhớ rằng không có test nào có thể phát hiện tất cả LA, vì vậy nếu vẫn nghi ngờ một bệnh nhân có LA thì một test khác nên được thực hiện như SCT. Cuối cùng, nguyên nhân của LA nên được sàng lọc như ANA, thuốc, virus...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. Br J Haematol. 1978 Sep;40(1):143-51.
2. Exner T. Comparison of two simple tests for the lupus anticoagulant. Am J Clin Pathol. 1985 Feb;83(2):215-8.

3. Exner T, Triplett DA, Taberner DA, Howard MA, Harris EN. Comparison of test methods for the lupus anticoagulant: international survey on lupus anticoagulants-I (ISLA-1). *Thromb Haemost.* 1990 Nov 30;64(3):478-84.
4. Exner T. Some recent developments with lupus anticoagulants. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994 Apr;5(2):281-9.
5. Exner T, Hohnen-Behrens C, Newman P, Dargan W. Effect of instruments on lupus anticoagulant testing. *Thromb Haemost.* 2000 Feb;83(2):345-8.
6. Chang, S.H., Tillema, V. & Scherr, D. (2002) A "percent correction" formula for evaluation of mixing studies. *Am J Clin Pathol*, 117, 62-73.

Bài 6. NHỮNG KHÁNG THỂ KHÁNG PHOSPHOLIPID

Phần 4. SILICA CLOTING TIME [SCT]

I. GIỚI THIỆU

SCT chính là APTT nhưng silica được dùng thay cho kaolin.

II. NGUYÊN LÝ

Silica dạng keo trộn với PPP, calcium để khởi động đông máu. SCT chứa một lượng ít PL, nên nó rất nhạy với sàng lọc LA. Test khẳng định được thực hiện tương tự bằng cách cho lượng dư PL vào.

Heparin sẽ tương tác với test nhưng một số kit thương mại có chứa sẵn chất trung hòa heparin như polybrene

Thuốc thử	Giải thích
PPP	Một nguồn của các yếu tố đông máu, đặc biệt là thrombin và fibrinogen.
Silica dạng keo	Chất hoạt hóa đường nội sinh
PL	Cung cấp bề mặt cho sự tạo thành thrombin. Liều thấp được dùng để sàng lọc, liều cao để khẳng định.
Calcium	Khởi động đông máu

III. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Tính phần trăm hiệu chỉnh

4. Phần trăm hiệu chỉnh được tính theo cách nguyên thủy

$$\% \text{ Correction} = \frac{\text{SCT [Low PL Concentration]} - \text{SCT [High PL Concentration]}}{\text{SCT [Low PL Concentration]}} \times 100$$

5. Hiện nay, cách tính có thay đổi

- a. Tỷ số SCT cho test sàng lọc:
Patient Screen SCT [s]/Mean of SCT Screen Reference Range [s]
- b. Tỷ số SCT cho test khẳng định
Patient Confirm SCT [s]/Mean of SCT Confirm Reference Range [s]
- c. Chỉ số bình thường hóa được tính: Tỷ số test sàng lọc/Tỷ số test khẳng định
 - i. Tỷ số này >1.16 (1.24 ở một số máy) hướng đến hiện diện LA; ngược lại, hướng đến suy giảm yếu tố.

Xem ví dụ sau

Mẫu	CT của DRVVT (giây)	Tỷ số
Huyết tương bệnh nhân	210.3	3.22
NPP	65.2	
Huyết tương bệnh nhân + PL	62.2	1.04
NPP + PL	32.5	

Từ dữ liệu trên: $[3.22 - 1.04/3.22] \times 100 = 67.7\%$ hiệu chỉnh. Như vậy bệnh nhân này kết luận có LA.

Test này kém nhạy với heparin do có polybrene, nó cũng kém nhạy với kháng đông đường uống và cho ra một kết quả bình thường ở người bệnh gan có rối loạn đông máu. Test này không hiệu quả trong việc phân biệt LA và kháng thể kháng FVIII.

IV. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Khi một người với LA dương tính, test nên được lặp lại lúc 12 tuần. Nhớ rằng không có test nào có thể phát hiện tất cả LA, vì vậy nếu vẫn nghi ngờ một bệnh nhân có LA thì một test khác nên được thực hiện như SCT. Cuối cùng, nguyên nhân của LA nên được sàng lọc như ANA, thuốc, virus...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Luddington, R., et al. (1999) Lupus anticoagulant testing with optical end point automation. *Thromb Res*, 96, 197-203.
2. Chantarangkul, V., et al. (1992) Silica clotting time (SCT) as a screening and confirmatory test for detection of the lupus anticoagulants. *Thromb Res*, 67, 355-365

Bài 6. NHỮNG KHÁNG THỂ KHÁNG PHOSPHOLIPID

Phần 5. TỶ SỐ YẾU TỐ V

(Factor V Ratio)

1. Tỷ số FV PT:FV APTT ở người có LA, tương quan tốt với DRVVT.
2. Độ mạnh của test nằm ở chỗ khả năng của sàng lọc LA ở bệnh nhân dùng warfarin.

I. GIỚI THIỆU

LA có liên quan đến APCr thông qua ảnh hưởng hoạt động FV.

II. NGUYÊN LÝ

Tỷ số FV dựa vào một phát hiện là PT thường bình thường hoặc chỉ kéo dài nhẹ ở những người có LA trong khi APTT kéo dài hơn. Test này suy ra một tỷ số hoạt tính FV sử dụng xét nghiệm dựa vào PT với dựa vào APTT.

III. PHƯƠNG PHÁP

Hoạt tính FV được đo bằng phương pháp PT một giai đoạn và APTT một giai đoạn, từ đó tỷ số được suy ra.

IV. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

Tỷ số này rất chặt ở người bình thường với giá trị trung bình 1.09 ± 0.1 . Tỷ số này cao hơn đáng kể ở người có LA 4.82 ± 3.34 . Một người có LA và dùng warfarin có tỷ số tương tự 4.82 ± 3.34 .

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Khi một người với LA dương tính, test nên được lặp lại lúc 12 tuần. Nhớ rằng không có test nào có thể phát hiện tất cả LA, vì vậy nếu vẫn nghi ngờ một bệnh nhân có LA thì một test khác nên được thực hiện như SCT. Cuối cùng, nguyên nhân của LA nên được sàng lọc như ANA, thuốc, virus...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amagai, H., Kanda, T., Shizuka, R., Fukumura, Y. & Kobayashi, I. (1999) Ratio of factor V activities in PT and APTT assays as a new diagnostic marker of lupus anticoagulant. Clin Lab Haematol, 21, 45-49

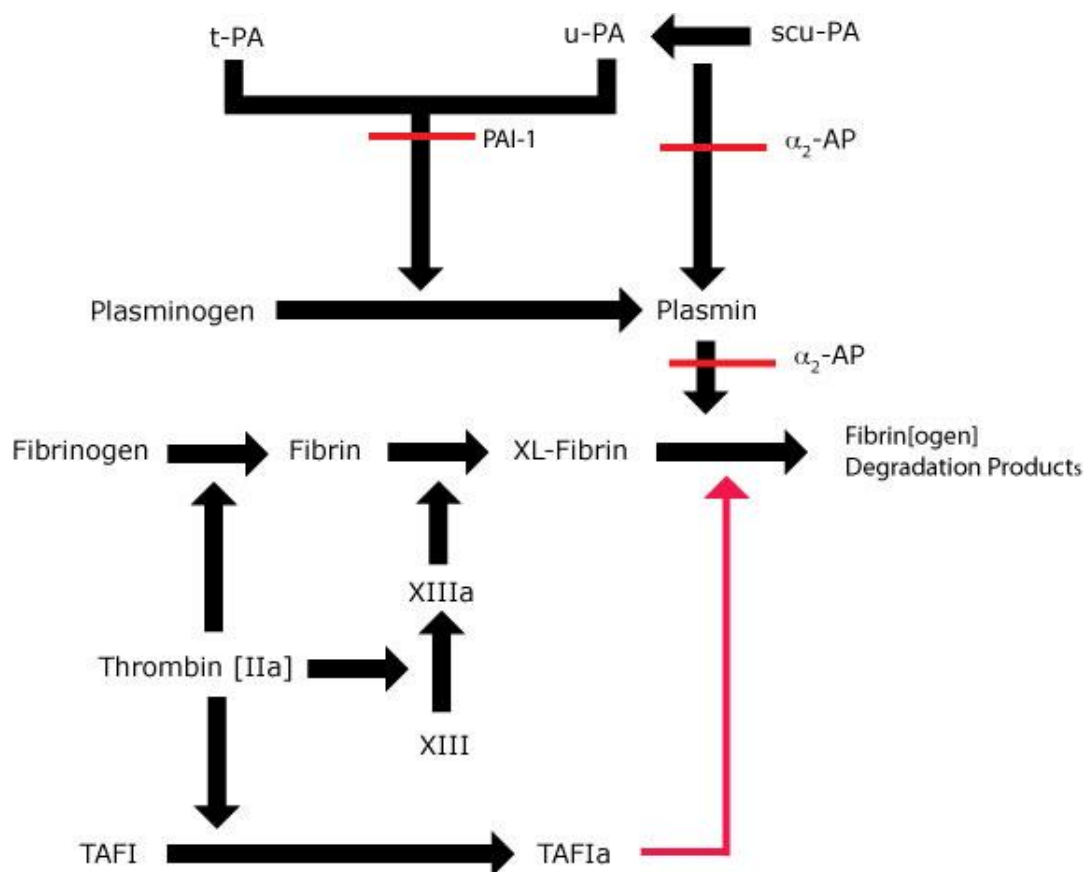
PHẦN 4.

BỘ XÉT NGHIỆM TIÊU SỢI HUYẾT

Bài 1. GIỚI THIỆU

I. GIỚI THIỆU

Tiêu sợi huyết là quá trình fibrin bị loại bỏ khỏi thành mạch tổn thương. Nó cũng đóng vai trò quan trọng trong tái cấu trúc mô và sửa chữa vết thương.



Các ký hiệu: t-PA - tissue plasminogen activator; u-PA - urinary plasminogen activator; XL-Fibrin - cross-linked fibrin; TAFI - Thrombin Activatable Fibrinolytic Inhibitor.

Các thành phần của hệ thống tiêu sợi huyết

Protein	Chức năng	Nửa đời	Gene
Plasminogen [PLG] – tiền thân của plasmin (có hoạt tính serine protease cắt fibrin, đồng thời cũng tương tác với các phân tử khác như fibrinogene, FV, FVIII).	PLG chứa 1 vị trí hoạt hóa serine protease cùng với 5 phân tử “kringle” (gọi như vậy vì nó giống với một loại bánh của người Scandinavian , 4 trong số chúng có vị trí gần lysine giúp PLG tương tác với cơ chất (những chất hoạt hóa và những chất ức chế). Cắt tại vị trí liên kết Arg561-Val562 bởi t-PA hoặc u-PA chuyển protein từ dạng zymogen bất hoạt thành serine protease hoạt động	50 giờ	6q27

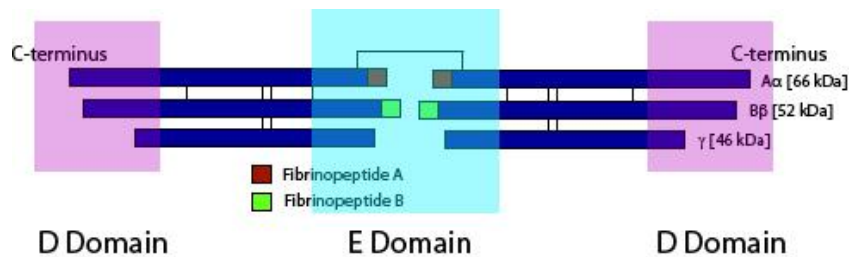
t-PA	Một serine protease được bài tiết chủ yếu từ tế bào nội mạc mạch máu. t-PA là chất hoạt hóa chủ yếu của PLG. t-PA có thời gian bán hủy ngắn chỉ 2-3 phút do sự có mặt của chất ức chế của nó là PAI-1. Ái lực của t-PA với PLG tăng một cách đáng kể khi có sự hiện diện của cục máu đông. Việc cắt t-PA từ một chuỗi đơn thành 2 chuỗi cũng làm tăng hoạt tính của nó.	2-3 phút	8p11.1
u-PA	u-PA được phân lập lần đầu từ nước tiểu nên lấy nó làm tên gọi. u-PA là một chất hoạt hóa của PLG thành plasmin và chủ yếu liên quan đến quá trình tái cấu trúc, sửa chữa vết thương ở ngoài lòng mạch.	2-3 phút	10q22
PAI-1	Chất ức chế chính của t-PA và u-PA. Bài tiết chủ yếu bởi tế bào nội mạc mạch máu. Thành viên của siêu gia đình protein SERPIN. Phức hợp t-PA:PAI-1 được loại bỏ ở gan. t-PA gắn vào cục máu đông sẽ được bảo vệ tương đối khỏi sự bất hoạt của PAI-1.	4-5 phút	7q22
α_2 -antiplasmin [α_2 -Plasmin Inhibitor]	Chất ức chế chính của plasmin. Thành viên của siêu gia đình protein SERPIN. Những liên kết chéo trong cục đông fibrin nhờ FXIIIa giúp cục đông đề kháng với tiêu sợi huyết.	72 giờ	17p13
Fibrinogen	Được chuyển thành fibrin bởi thrombin và được liên kết chéo tạo thành polymer không hòa tan bởi FXIIIa.	90 giờ	4q32
TAFI	TAFI loại bỏ lysine ở đầu C-tận khỏi plasmin và vì vậy loại bỏ vị trí gắn của cả PLG và t-PA.	10 phút	13q14.

Bài 2. D-DIMER (DD)

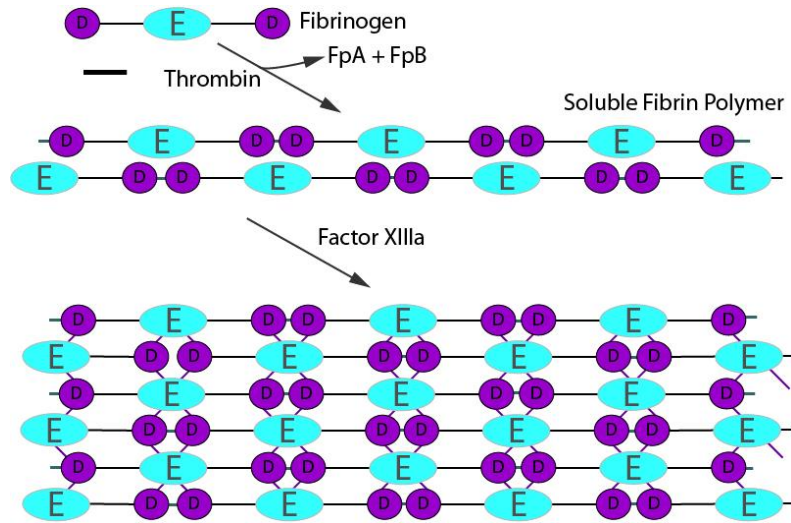
1. Không có một phương pháp chuẩn nào hiện có để xác định D-Dimer
2. Đơn vị DD được báo cáo bao gồm: Fibrinogen Equivalent Units/mL [FEU/mL] (Đơn vị đương lượng Fibrinogen) và $\mu\text{g/mL}$.
3. Đơn vị đương lượng fibrinogen biểu thị nồng độ các sản phẩm thoái giáng của fibrin tương ứng với một lượng fibrinogen nhất định có thể tạo ra chúng. 2 μg FEU/mL tương đương về hoạt tính miễn dịch với 1 $\mu\text{g/mL}$ DD tinh khiết
4. Xét nghiệm DD dương tính giả khi có sự hiện diện của yếu tố thấp

I. GIỚI THIỆU

Fibrinogen chứa 3 cặp polypeptide: $2A\alpha$, $2B\beta$, 2γ . Chúng gắn với nhau bởi 29 cầu nối disulphide theo cách thức vùng N tận của 6 chuỗi polypeptide gặp nhau tạo thành domain E ở trung tâm. Vùng C tận của mỗi 3 chuỗi tạo thành domain D và chúng xoắn lại theo kiểu α -helix với domain E, tạo thành cấu trúc fibrinogen điển hình.



Sự hoạt hóa của fibrinogen bởi thrombin cắt 2 chuỗi peptide ngắn hơn từ vùng N tận của chuỗi $A\alpha$ và $B\beta$, những peptide này còn được gọi là Fibrinopeptide A [FpA - 16 amino acid] và Fibrinopeptide B [FpB - 14 amino acid] tương ứng. Việc loại bỏ đoạn mã đầu N tận của chuỗi $A\alpha$ và $B\beta$ sẽ tạo ra đoạn mã đầu N tận mới trong vùng domain E, gọi là “knobs”. Những knobs này tương tác với domain D để tạo thành fibrin dạng polymer. Dưới tác động của FXIIIa, liên kết chéo giữa các sợi fibrin polymer (giữa amino acid glutamine và lysine) để tạo thành mạng lưới liên kết chéo.

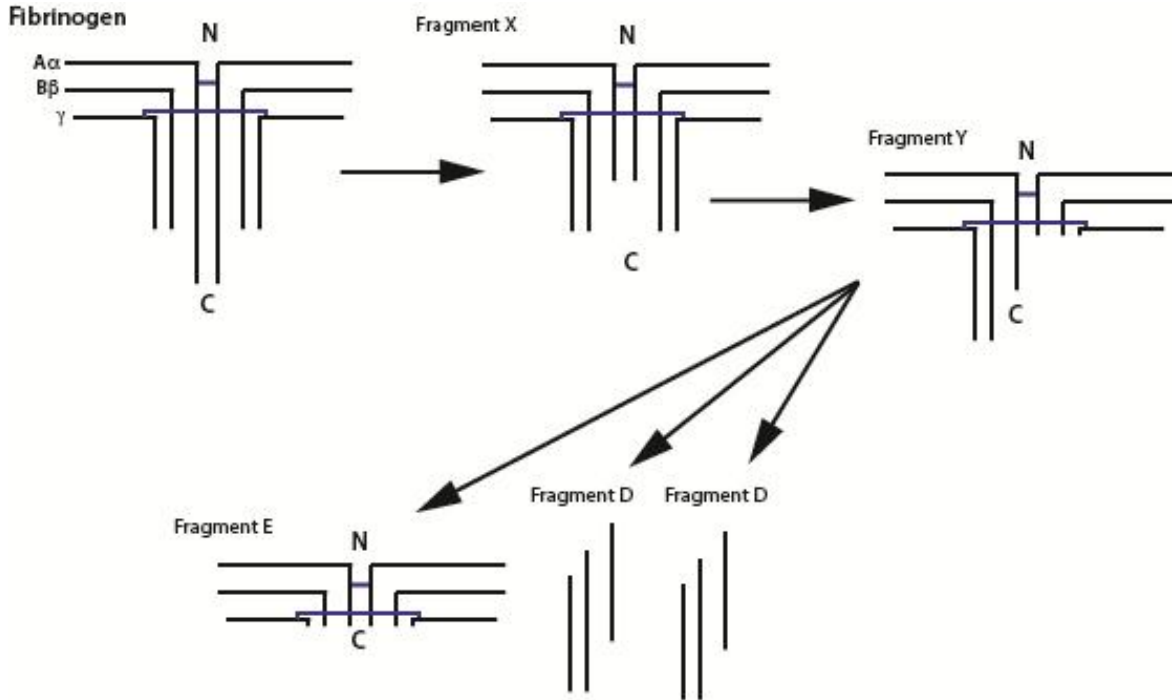


Sự hoạt hóa FXIII bởi thrombin được gia tăng khi có sự hiện diện của các sợi fibrin chưa liên kết chéo nhưng lại bị ức chế bởi các sợi fibrin đã liên kết chéo đầy đủ. Sự tự điều hòa này làm hạn chế tác động của FXIIIa lên những vị trí fibrin đã tạo thành cục đông.

II. D DIMER

DD được tạo ra khi thoái giáng fibrin đã liên kết chéo, vì vậy sẽ không được tạo ra khi fibrin chưa liên kết chéo hoặc thoái giáng fibrinogen – điểm khác biệt căn bản với Fibrin(ogen) Degradation Products (FDPs)

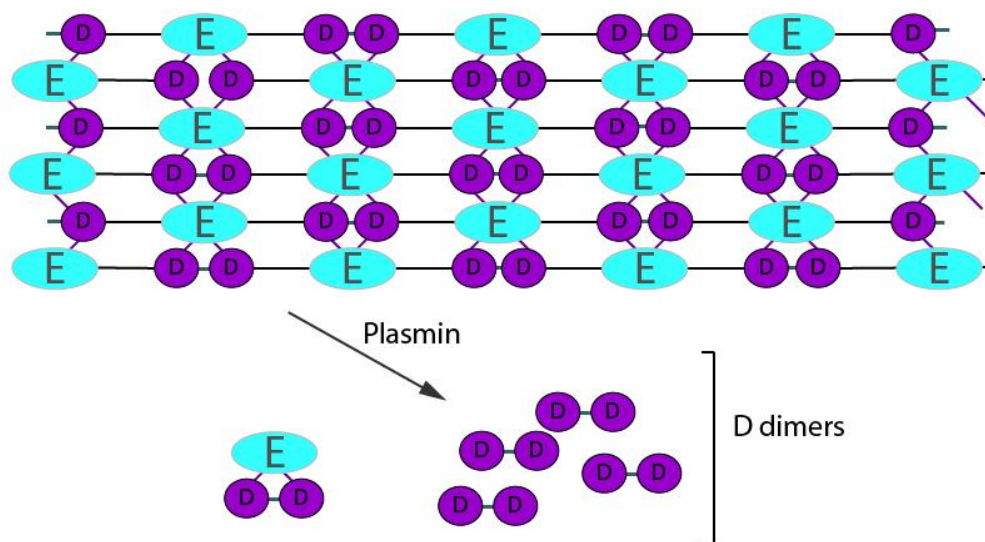
1. Sự thoái giáng của Fibrinogen và Fibrin chưa liên kết chéo



Fibrinogen bị thoái hóa bởi plasmin tạo ra một loạt các mảnh như hình vẽ. Thoái hóa một phần chuỗi γ tạo ra mảnh X, thoái hóa xa hơn tạo ra mảnh Y. Thoái hóa mảnh Y sẽ tạo ra mảnh E và 2 mảnh D.

2. Thoái hóa fibrin đã liên kết chéo

Thoái hóa fibrin đã liên kết chéo bởi plasmin tạo ra nhiều mảnh, trong đó có DD. Điều này xác định sự thoái hóa này là từ các fibrin đã liên kết chéo. Plasmin cắt sợi fibrin đã liên kết chéo một cách ngẫu nhiên tạo ra một loạt các mảnh hòa tan (vì vậy gọi là “X-oligomers”) với những trọng lượng khác nhau và bao gồm DD. Ở mỗi bước thoái giáng, liên kết chéo γ vẫn được giữ lại, vì thế DD tạo thành. Mặc dù sơ đồ trình bày DD đứng riêng lẻ, nhưng trong thực tế chúng tồn tại dưới dạng nhiều DD trong oligomer như EDD. Quá trình này là một quá trình động và nhiều mảnh hơn sẽ được tạo ra khi quá trình này tiếp diễn. DD tạo thành một neoepitope và nó được xác định bởi một kháng thể đặc hiệu được sử dụng trong các hệ thống khác nhau.



III. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hiện tại có hơn 30 xét nghiệm khác nhau để đo DD nhưng tất cả đều sử dụng kháng thể chống trực tiếp neo-epitope được tạo ra bởi sự hình thành DD.

Rất quan trọng phải nhớ là xét nghiệm DD được dùng như một phần trong phác đồ tiếp cận bệnh nhân nghi ngờ VTE, nên nó phải được dùng trong bối cảnh lâm sàng phù hợp.

IV. PHÂN TÍCH

1. DD tăng trong DIC
2. DD được sử dụng một cách rộng rãi để loại trừ DVT vì nó có giá trị tiên đoán âm cao. Tuy nhiên DD một mình nó không nên được dùng để loại trừ chẩn đoán DVT ở bệnh nhân có xác suất tiên nghiệm cao.

3. DD tăng trong nhiều tình huống lâm sàng và vì vậy nó có giá trị tiên đoán dương thấp cho VTE. Chúng có thể tăng trong:
- a. Mang thai
 - b. Bệnh ác tính
 - c. Nhiễm trùng
 - d. DIC
 - e. Con hồng cầu hình liềm gây nghẽn mạch
 - f. Phẫu thuật
 - g. Phỏng
 - h. Bệnh gan
 - i. Rắn cắn
 - j. Rung nhĩ
 - k. Suy thận
 - l. Suy tim
 - m. VTED (Bệnh thuyên tắc huyết khối tĩnh mạch)
 - n. Bóc tách động mạch chủ
4. DD có thể giảm ở bệnh nhân DVT điều trị heparin.

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Rất quan trọng phải nhớ rằng khoảng tham chiếu thay đổi giữa các test được sử dụng và không có chuẩn quốc tế cho DD. Nhiều LABO (đúng hoặc sai) dùng khoảng tham chiếu của nhà sản xuất. Nhớ rằng không phải tất cả xét nghiệm DD đều phù hợp để loại trừ VTE.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hamulyak, K., van der Graaf, F., Janssen, M.C., de Moerloose, P. & Michiels, J.J. (1999) Exclusion of deep vein thrombosis with rapid ELISA D-dimer testing: from theory to daily practice. *Clin Appl Thromb Hemost*, 5, 216-219.
2. van der Graaf, F., van den Borne, H., van der Kolk, M., de Wild, P.J., Janssen, G.W. & van Uum, S.H. (2000) Exclusion of deep venous thrombosis with D-dimer testing-- comparison of 13 D-dimer methods in 99 outpatients suspected of deep venous thrombosis using venography as reference standard. *Thromb Haemost*, 83, 191-198.
3. Keeling, D.M., Mackie, I.J., Moody, A. & Watson, H.G. (2004) The diagnosis of deep vein thrombosis in symptomatic outpatients and the potential for clinical assessment and D-dimer assays to reduce the need for diagnostic imaging. *Br J Haematol*, 124, 15-25.

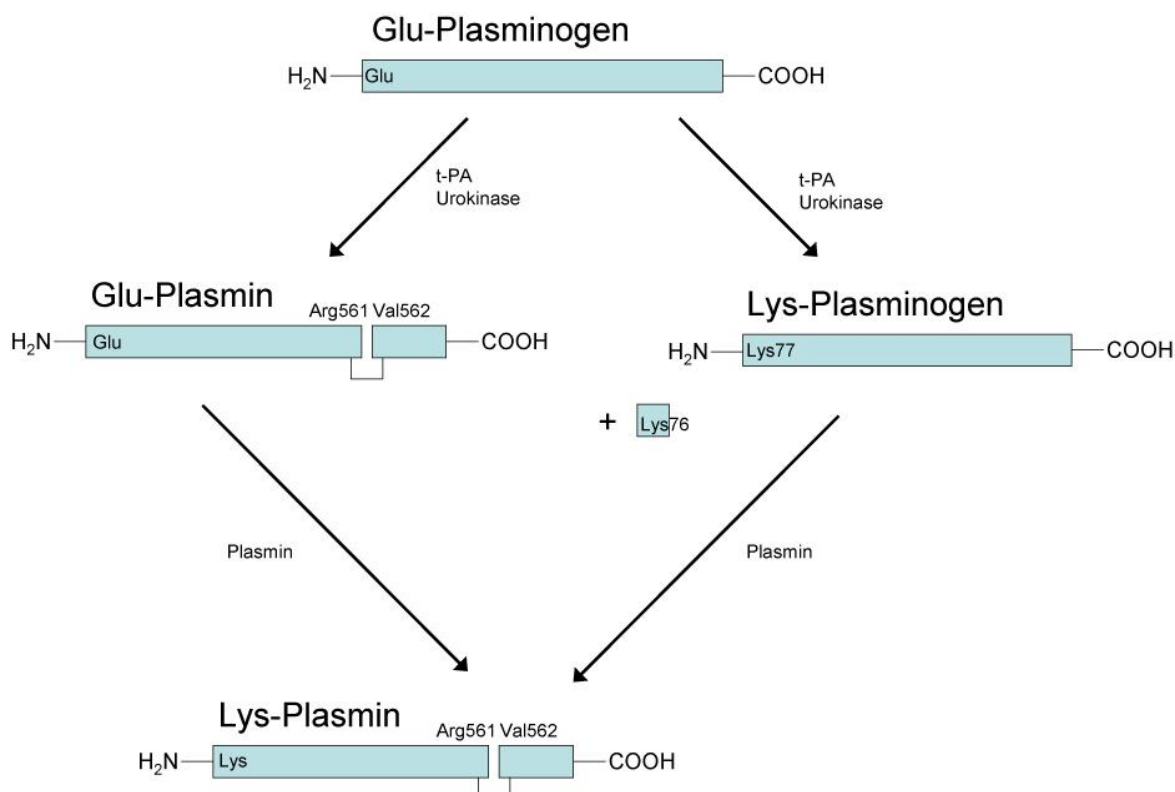
Bài 3. XÉT NGHIỆM PLASMINOGEN (PLG)

1. Khiếm khuyết đồng hợp tử làm thiếu hụt hoàn toàn PLG đã được báo cáo nhưng cực kỳ hiếm.
2. PLG cũng gắn với Histidine Rich Glycoprotein [HRG].
3. Lipoprotein A [Lp(a)] có tính tương đồng cao với PLG và có thể cạnh tranh với PLG trong việc gắn với fibrinogen và t-PA. Vì vậy nếu Lp(a) cao có thể làm giảm tiêu sợi huyết và tăng nguy cơ huyết khối.

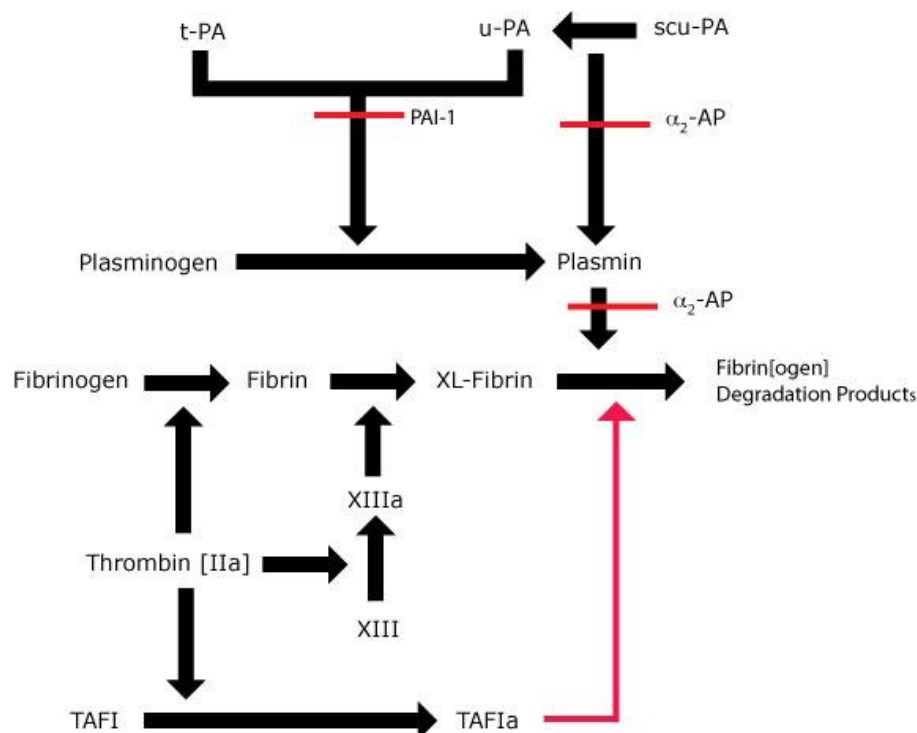
I. GIỚI THIỆU

PLG được tổng hợp ở gan và lưu hành ở hai dạng: Glu-Plasminogen và Lys-Plasminogen. Ở dạng nguyên thủy, PLG chứa một glutamic acid tại đầu N tận và được gọi là Glu-Plasminogen. Sự hoạt hóa Glu-Plg (thông qua t-PA và u-PA) xảy ra nhờ việc cắt tại Arg561 và Val562 tạo thành 2 chuỗi hoạt động – Glu-Plasmin. Chuỗi nặng có vị trí gắn lysine trong khi chuỗi nhẹ có hoạt tính serine protease. Tuy nhiên, vị trí gắn lysine của chuỗi nặng bị che khuất nên phân tử này không hoạt động chức năng.

Việc chuyển đổi tự động Glu-plasmin thành Lys-plasmin xảy ra thông qua việc cắt chuỗi nặng tại Lys76-Lys77 tạo nên một sự thay đổi cấu hình trong cấu trúc của nó và bộc lộ vị trí gắn lysine, cho phép nó gắn vào cục fibrin. Điều thú vị là cả Lys và Glu-plasmin đều có thể cắt liên kết Lys76-Lys77 trong dạng Glu-plasminogen thành dạng Lys-plasminogen. Glu-plasminogen có thời gian bán hủy 50 giờ trong khi đó Lys-plasminogen chỉ có 20 giờ.



Plasmin – một serine protease, thành phần cốt lõi của con đường tiêu sợi huyết. Sự chuyển đổi PLG thành plasmin nhờ tPA sẽ không hiệu quả nếu vắng mặt fibrin, nhưng khi có sự hiện diện fibrin, sự chuyển đổi này tăng lên một cách rõ rệt. PLG cũng có thể được chuyển thành plasmin nhờ urokinase, FXIa, FXIIa. Plasmin phân cắt fibrin thành nhiều sản phẩm hòa tan khác nhau (FDP). FDP ức chế cạnh tranh với thrombin và vì vậy giảm chuyển fibrinogen thành fibrin. Plasmin chịu trách nhiệm cho cả phá hủy cục đông và gián tiếp giảm tạo thành cục đông.



TAFI	Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor
XL-Fibrin	Cross-Linked Fibrin
α_2 -AP	Alpha 2 antiplasmin [Plasmin inhibitor]
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
u-PA	Urinary Plasminogen Activator [Urokinase]
scu-PA	Single Chain Urinary Plasminogen Activator

Bên cạnh vai trò tiêu sợi huyết, plasmin cũng cắt fibronectin, thrombospondin, laminin, von Willebrand, một số collagenase và một số thành phần của hệ thống bổ thể. Nó có vai trò trong rụng trứng và làm lành vết thương. Vì những lý do đó, hoạt tính của plasma phải được điều hòa một cách cẩn thận. Plasmin bị bất hoạt bởi alpha 2 antiplasmin và cũng có thể được chuyển thành angiotatin, một chất ức chế tăng sinh mạch bởi con đường thay thế.

Suy giảm PLG là bệnh lý di truyền lặn NST thường. Một số nhỏ trường hợp báo cáo một mối quan hệ không rõ ràng, và mâu thuẫn giữa huyết khối và suy giảm PLG.

Có 2 kiểu suy giảm PLG di truyền:

Type	Xét nghiệm PLG	Tỷ lệ	Liên hệ lâm sàng
I	Giảm	1:1.6 triệu	Liên kết với bệnh màng giả đặc biệt là viêm kết mạc dạng gỗ (ligneous conjunctivitis), khiếm khuyết làm lành vết thương và có thể suy giảm khả năng sinh sản ở nữ.
II	Suy giảm hoạt tính chức năng nhưng hoạt tính miễn dịch bình thường	Lên đến 3%	Không có màng giả nhưng khiếm khuyết làm lành vết thương và có thể suy giảm khả năng sinh sản ở nữ.

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Xét nghiệm miễn dịch: ELISA
2. Xét nghiệm chức năng: hoạt tính PLG có thể được đo bởi sự hoạt hóa nó thành plasmin (bởi streptokinase hoặc urokinase) sau đó đo hoạt tính chức năng của plasmin, sử dụng nhiều cơ chất.

III. KHOẢNG THAM CHIẾU

Hoạt tính tham chiếu của Plasminogen: 0.75-1.60 U/ml

Kháng nguyên PLG: 150-250 ng/L

Khoảng tham chiếu có thể biến thiên ở các chủng tộc, cao hơn ở người nam gốc Phi.

Mức PLG giảm lúc mới sinh.

IV. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP?

Sàng lọc các thành viên trong gia đình để tham vấn di truyền.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tait, R.C., Walker, I.D., Conkie, J.A., Islam, S., McCall, F., Mitchell, R. & Davidson, J.F. (1992) Plasminogen levels in healthy volunteers - Influence of age, sex, smoking and oral contraceptives. *Thrombosis and Haemostasis* 68, 506-510.
2. Zollner, T.M., Veraart, J.C., Wolter, M., Hesse, S., Villemur, B., Wenke, A., Werner, R.J., Boehncke, W.H., Jost, S.S., Scharer, I. & Kaufmann, R. (1997) Leg ulcers in Klinefelter's syndrome--further evidence for an involvement of plasminogen activator inhibitor-1. *Br J Dermatol*, 136, 341-344.

3. Schott, D., Dempfle, C.E., Beck, P., Liermann, A., Mohr-Pennert, A., Goldner, M., Mehlem, P., Azuma, H., Schuster, V., Mingers, A.M., Schwarz, H.P. & Kramer, M.D. (1998) Therapy with a purified plasminogen concentrate in an infant with ligneous conjunctivitis and homozygous plasminogen deficiency. [N Engl J Med, 339, 1679-1686.](#)

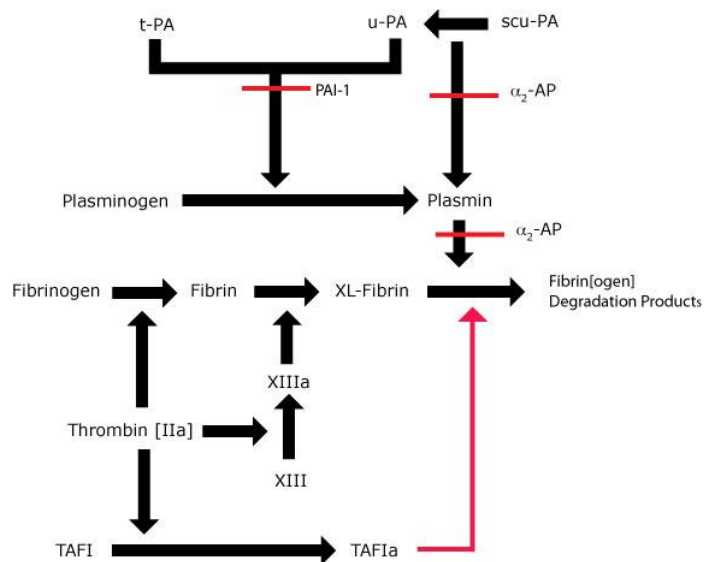
Bài 4. XÉT NGHIỆM PAI-1

(Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 [PAI-1] Assays)

1. PAI-2 là một chất ức chế của t-PA xuất hiện ở phụ nữ mang thai, được tổng hợp từ bánh nhau. Nó tồn tại ở 2 dạng: 1 dạng glycosylated ngoại bào 60 kDa và 1 dạng nội bào 43 kDa. PAI-2 cũng được tìm thấy ở monocyte/macrophage.
2. PAI-3 là tên gọi cũ của chất ức chế Protein C (Protein C Inhibitor [PCI.]
3. PAI-1 là một protein pha cấp và vì vậy nó sẽ tăng cao ở bệnh nhân hậu phẫu cũng như trong đáp ứng pha cấp.
4. Hoạt tính tiêu sợi huyết bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố và để đạt được kết quả chính xác đòi hỏi phải chuẩn hóa tối đa mẫu máu. Cụ thể phải lấy mẫu khi nghỉ ngơi, lúc đói vào buổi sáng, không hút thuốc hay uống rượu trong những giờ trước đó. Mẫu phải được chứa trong ống ổn định để tránh phức hợp t-PA và PAI-1 tạo thành trong in vitro. Tiêu sợi huyết có thể suy giảm trong mẫu nước đá.
5. Mức PAI-1 có thể tăng ở một số bệnh nhân hội chứng Klinefelter.

I. GIỚI THIỆU

PAI-1 là một chất ức chế serine protease, được bài tiết phần lớn bởi tế bào nội mạc và tế bào mỡ và là chất ức chế chính của t-PA và u-PA. Trong quá trình mang thai, PAI-2 được bài tiết bởi bánh nhau với chức năng giống như PAI-1. PAI-1 cũng đóng vai trò quan trọng trong tái cấu trúc chất cơ bản ngoại bào bao gồm tăng sinh mạch thông qua việc điều hòa plasminogen. Nó có liên quan đến tiên lượng trong một số loại ung thư, có lẽ do vai trò của nó. Mức PAI-1 cũng là một yếu tố nguy cơ của bệnh lý tim mạch và nguy cơ huyết khối sau phẫu thuật. Tuy nhiên, hiện nay PAI-1 không có một sự tương quan lâm sàng tương ứng vì nó không tạo thành nền tảng để đưa ra một quyết định điều trị hay thông tin tiên lượng hữu ích trong thực hành thường quy.



TAFI	Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor
XL-Fibrin	Cross-Linked Fibrin
α 2-AP	Alpha 2 antiplasmin [Plasmin inhibitor]
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
u-PA	Urinary Plasminogen Activator [Urokinase]
scu-PA	Single Chain Urinary Plasminogen Activator

Hoạt tính của t-PA bị ức chế bởi PAI-1 và hầu hết t-PA lưu hành đều kết hợp với chất này trong trạng thái bất hoạt.

Sự tăng mức t-PA đã xác định như một yếu tố nguy cơ của bệnh tim mạch và đột quy, dù độ mạnh của mối quan hệ này bị thay đổi bởi mức PAI-1.

Hoạt tính của t-PA tăng lên đáng kể khi bị Plasmin cắt tại Arg275-Ile276 để tạo thành phân tử 2 chuỗi.

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

Việc xác định mức t-PA ở LABO là phức tạp bởi sự dao động của mức t-PA trong máu (phản ứng pha cấp) cũng như mức dao động của PAI-1 (phản ứng pha cấp, biến thiên trong ngày), sẽ gắn và bất hoạt t-PA.

Phương pháp ELISA đối với t-PA có lợi điểm là không bị ảnh hưởng bởi sự tương tác t-PA với chất ức chế của nó.

Phương pháp tạo màu (xác định gián tiếp thông qua phản ứng tạo plasmin) hoặc sinh-miễn dịch.

III. PHƯƠNG PHÁP

1. ELISA: Lợi điểm là không bị ảnh hưởng của việc tạo thành phức hợp t-PA-PAI-1
2. Xét nghiệm chức năng: Đo lượng hoạt tính t-PA hoặc u-PA còn dư trong mẫu sau khi cho một lượng dư t-PA hoặc u-PA đã biết vào mẫu huyết tương bệnh nhân. Phương pháp phổ biến nhất là sử dụng cơ chất tạo màu để đo hoạt tính t-PA tồn dư.
 - a. Ngưng kết Latex: hạt latex phủ kháng thể anti-PAI-1
 - b. Sinh-Miễn dịch (Bioimmunoassay (BIA)): Các giếng được phủ t-PA. PAI-1 hiện diện trong mẫu huyết tương sẽ bị cố định bởi t-PA. Sau rửa, một enzyme gắn kháng thể anti-PAI-1 được cho vào để ủ. Rửa lại, và cơ chất tạo màu của enzyme được cho vào. Đo sự thay đổi ánh sáng.
 - c. Phương pháp tạo màu: Đây là quá trình gồm 2 giai đoạn. Trong giai đoạn đầu, một lượng dư đã biết của t-PA được ủ với huyết tương bệnh nhân. Điều này cho phép phức hợp t-PA-PAI-1 tạo thành. Trong giai đoạn 2, một chất kích thích t-PA như poly-D-lysine được cho vào và mẫu được ủ với cơ chất

của plasmin tạo màu. Sự biến đổi màu sắc tỷ lệ với lượng hoạt tính t-PA trong mẫu, từ đó tỷ lệ với hoạt tính PAI-1.

IV. PHÂN TÍCH

ELISA: Cho biết tổng lượng kháng nguyên PAI-1.

Xét nghiệm chức năng:

1. BIA: Xét nghiệm này đo hoạt tính PAI-1 trong mẫu nhưng ít bị tương tác với những thành phần khác như phương pháp tạo plasmin so màu truyền thống. Đây là phương pháp xét nghiệm chức năng phổ biến nhất hiện nay.
2. Xét nghiệm so màu thông qua tạo plasmin: sự hiện diện của những chất làm ly giải PLG sẽ tương tác với test như đã nói ở bài trước.

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Kháng nguyên PAI-1: 5-40 ng/L

Hoạt tính t-PA: <15 U/ml

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Meltzer, M.E., Lisman, T., de Groot, P.G., Meijers, J.C., le Cessie, S., Doggen, C.J. & Rosendaal, F.R. (2010) Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood*, 116, 113-121.
2. Follo, M. & Ginsburg, D. (1989) Structure and expression of the human gene encoding plasminogen activator inhibitor, PAI-1. Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, Ann Arbor 48109-0650. *Gene*, 84, 447-453.
3. Simpson, A.J., Booth, N.A., Moore, N.R. & Bennett, B. (1991) Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *J Clin Pathol*, 44, 139-143.
4. Ibbotson, S.H., Layton, A.M., Davies, J.A. & Goodfield, M.J. (1994) Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) levels in patients with chronic venous leg ulceration. *British Journal of Dermatology*, 131, 738-739.
5. Veraart, J.C., Hamulyak, K., Neumann, H.A. & Engelen, J. (1994) Increased plasma activity of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in two patients with Klinefelter's syndrome complicated by leg ulcers [see comments]. *Br J Dermatol*, 130, 641-644.
6. Wiman, N. (1995) Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1): Its role in thrombotic disease. *Thrombosis & Haemostasis*, 74, 71-76.
7. Bern, M.M. & McCarthy, N. (2010) Failure to Lyse Venous Thrombi Because of

Elevated Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) and 4G Polymorphism of Its Promotor Genome (The PAI-1/4G Syndrome). *Clin Appl Thromb Hemost*, 16, 574-578.

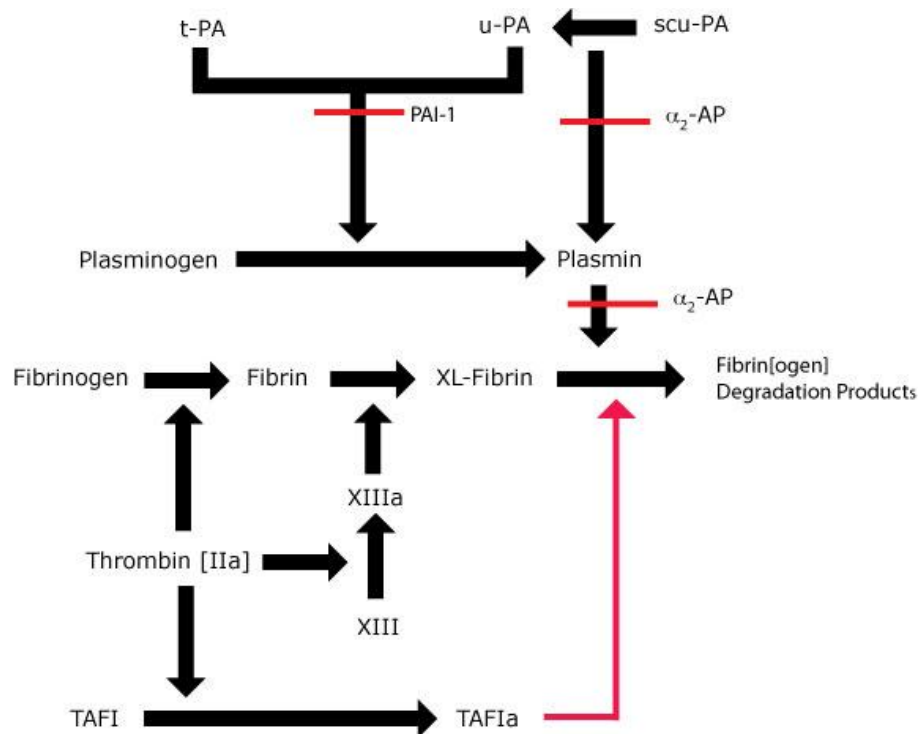
Bài 5. XÉT NGHIỆM HOẠT TÍNH TISSUE-TYPE PLAMINOGEN

Tissue-type Plasminogen Activity [T-PA] Assays

1. Sự tương tác của t-PA và chất ức chế của nó trong huyết tương vẫn tiếp tục sau khi mẫu máu được thu thập, tuy nhiên điều này có thể loại bỏ hoặc tối thiểu bằng cách giảm pH < 6.
2. T-PA có mối tương quan nghịch với BMI

I. GIỚI THIỆU

t-PA (tissue plasminogen activator) là một serine protease và là chất hoạt hóa chính của PLG thành plasmin (chất còn lại là u-PA), vì vậy nó là thành phần cốt yếu của hệ thống tiêu sợi huyết. Nó được tìm thấy hầu hết ở tế bào nội mạc, nơi nó hoạt động để giới hạn sự lan rộng của cục máu đông. t-PA được tiết liên tục vào máu và thải nhanh bởi gan. Thời gian bán hủy của t-PA chỉ khoảng 5 phút. Sự hoạt hóa plasminogen thành plasmin rất chậm/không đáng kể nếu không có fibrin, nhưng sẽ tăng lên rõ rệt khi có fibrin, vì các sợi fibrin bộc lộ vị trí gắn của cả PLG và t-PA, mang chúng lại gần nhau và định vị ở vị trí tạo cục máu đông.



TAFI	Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor
XL-Fibrin	Cross-Linked Fibrin

α 2-AP	Alpha 2 antiplasmin [Plasmin inhibitor]
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
u-PA	Urinary Plasminogen Activator [Urokinase]
scu-PA	Single Chain Urinary Plasminogen Activator

Hoạt tính của t-PA bị ức chế bởi PAI-1 và hầu hết t-PA lưu hành đều kết hợp với chất này trong trạng thái bất hoạt.

Sự tăng mức t-PA đã xác định như một yếu tố nguy cơ của bệnh tim mạch và đột quỵ, dù độ mạnh của mối quan hệ này bị thay đổi bởi mức PAI-1.

Hoạt tính của t-PA tăng lên đáng kể khi bị Plasmin cắt tại Arg275-Ile276 để tạo thành phân tử 2 chuỗi.

II. NGUYÊN LÝ

Việc xác định mức t-PA ở LABO là phức tạp bởi sự dao động của mức t-PA trong máu (phản ứng pha cấp) cũng như mức dao động của PAI-1 (phản ứng pha cấp, biến thiên trong ngày), sẽ gắn và bất hoạt t-PA.

Phương pháp ELISA đối với t-PA có lợi điểm là không bị ảnh hưởng bởi sự tương tác t-PA với chất ức chế của nó.

Phương pháp tạo màu (xác định gián tiếp thông qua phản ứng tạo plasmin) hoặc sinh-miễn dịch.

III. PHƯƠNG PHÁP

- Xét nghiệm miễn dịch: kit thương mại đã có sẵn cho việc đo kháng nguyên t-PA.
- Xét nghiệm chức năng: hoạt tính tiêu sợi huyết bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố và để đạt được kết quả chính xác đòi hỏi phải chuẩn hóa tối đa mẫu máu. Cụ thể phải lấy mẫu khi nghỉ ngơi, lúc đói vào buổi sáng, không hút thuốc hay uống rượu trong những giờ trước đó. Mẫu phải được chứa trong ống ổn định để tránh phức hợp t-PA và PAI-1 tạo thành trong in vitro.
- Sinh-Miễn dịch (Bioimmunoassay (BIA)) t-PA tạo phức hợp cố định với kháng thể đơn dòng anti-t-PA tại pH=6. Sau khi rửa, cho human plasminogen và cơ chất plasmin tạo màu vào, ủ ở 37 độ C. Số lượng màu sắc thay đổi được đo bằng photometrically và tỷ lệ với lượng t-PA hiện diện. Việc làm toan hóa huyết tương sẽ giúp ngăn cản sự tương tác với PAI-1 hiện diện.
- Phương pháp tạo màu: tương tự như BIA, nhưng không dùng kháng thể đơn dòng của anti-t-PA mà sử dụng chất kích thích giống fibrin để khuếch đại plasminogen thành plasmin bởi t-PA.

IV. PHÂN TÍCH

ELISA: Cho biết tổng lượng t-PA, mặc dù một mức heparin rất cao có thể ảnh hưởng đến xét nghiệm

Xét nghiệm chức năng: Sự hiện diện của những tác nhân khác làm ly giải PLG sẽ tương tác với test. Heparin gắn với t-PA và tăng hoạt tính của nó. Những yếu tố này phải được xem xét khi diễn giải kết quả. Xét nghiệm bất thường luôn luôn cần được làm lại, không nên chẩn đoán chỉ dựa vào bất thường của 1 lần xét nghiệm.

Mức hoạt tính t-PA giảm trong quá trình mang thai nhưng sẽ tăng nhanh sau sinh. Steroid sẽ làm tăng hoạt tính t-PA. Tương tự hoạt tính t-PA sẽ tăng ở bệnh nhân xơ gan.

Mức t-PA quá cao	Giảm hoạt tính t-PA	Giảm kháng nguyên t-PA	Tăng hoạt tính t-PA
Streptokinase, rt-PA và những tác nhân tương tự khác Heparin	Rượu (làm tăng PAI-1) Hút thuốc (làm tăng PAI-1)	Một số loại thức ăn	Rượu (phản ứng rebound sau 12 giờ) DDAVP Vận động Nọc độc côn trùng Stress sinh lý hoặc xã hội Thuốc tránh thai Thuyên tắc tĩnh mạch Mang thai Steroid Xơ gan

V. KHOẢNG THAM CHIẾU

Kháng nguyên t-PA: 1-20 ng/L

Mức hoạt tính t-PA: 0.2-2 IU/ml

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alessi, M.C., Juhan, V.I., Declerck, P.J. & Collen, D. (1991) Molecular forms of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue-type plasminogen activator (t-PA) in human plasma. *Thrombosis Research*, 62, 275-285.

2. Petaja, J., Rasi, V., Vahtera, E. & Myllyla, G. (1991) Familial clustering of defective release of t-PA. *British Journal Of Haematology*, 79, 291-295.

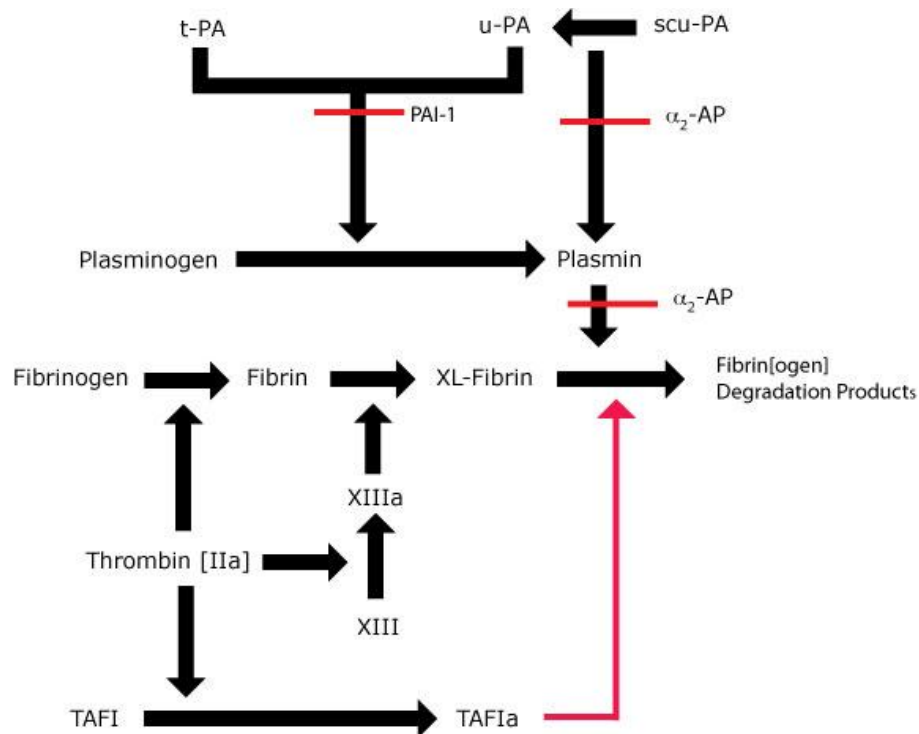
Bài 6. XÉT NGHIỆM TAFI

(Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor)

1. Gene mã hóa TAFI nằm ở 13q14.11 và chứa 11 exon dài 48kb.
2. Có ít nhất 2 đồng phân TAFI riêng biệt trong huyết tương nhưng sự khác biệt về mặt chức năng của chúng chưa được báo cáo.

I. GIỚI THIỆU

TAFI là một enzyme lưu hành trong huyết tương và liên quan đến việc điều hòa tiêu sợi huyết. TAFI được hoạt hóa thành TAFIa, nó sẽ ức chế tiêu sợi huyết thông qua việc loại bỏ thành phần lysine khỏi fibrin trong cục đông lúc nó bị bộc lộ trong quá trình thoái giáng bởi plasmin. Như thế, việc gắn t-PA vào sợi fibrin sẽ bị hạn chế, dẫn đến ngăn cản chuyển plasminogen thành plasmin (nhớ rằng plasminogen gắn với lysine trong fibrin để chuyển thành plasmin) và vì vậy, cục đông fibrin sẽ được bảo vệ khỏi tiêu sợi huyết.



TAFI	Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor
XL-Fibrin	Cross-Linked Fibrin
α_2 -AP	Alpha 2 antiplasmin [Plasmin inhibitor]
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
u-PA	Urinary Plasminogen Activator [Urokinase]

scu-PA	Single Chain Urinary Plasminogen Activator
--------	--

TAFI được hoạt hóa sẽ điều hòa ngược quá trình tiêu sợi huyết bằng việc loại bỏ lysine ở đầu C tận của fibrin. Hậu quả, việc gắn plasminogen và t-PA vào fibrin bị ức chế.

TAFI được tổng hợp ở gan là một propeptide 423 amino acid. Sự hoạt hóa TAFI tạo thành dạng hoạt tính xảy ra bởi việc cắt protein tại Arg92 tạo ra một peptide hoạt hóa 19kDa. TAFIa có thời gian bán hủy nhiều giờ.

Tiêu sợi huyết được khởi động sau khi cục đông fibrin tạo thành. Bình thường, sự hoạt hóa plasminogen thành plasmin rất chậm/không đáng kể nếu không có fibrin, nhưng sẽ tăng lên rõ rệt khi có fibrin, vì các sợi fibrin bộc lộ vị trí gắn của cả PLG và t-PA, mang chúng lại gần nhau và định vị ở vị trí tạo cục máu đông. Hơn nữa, plasmin gắn với fibrin trong cục đông sẽ được bảo vệ khỏi sự bất hoạt của α_2 -antiplasmin. Plasmin cắt fibrin và tạo ra một lysine mới đầu C tận và thúc đẩy sự tạo thành plasmin xa hơn.

TAFI ức chế tiêu sợi huyết bằng cách loại bỏ lysine đầu C tận khỏi fibrin và vì vậy ngăn cản sự gắn PLG và t-PA vào cục đông fibrin. Hơn nữa, TAFIa cũng ức chế sự chuyển Glu-Plg thành Glu-plasmin và sự chuyển Glu-Plg thành Lys-Plg. Sự hoạt hóa TAFI thành TAFIa tương đối không hiệu quả nếu vắng mặt Thrombomodulin (Tm) – Tm tăng tốc độ hoạt hóa lên 1000 lần. Nồng độ thrombin cao cũng cần để chuyển TAFI thành TAFIa, ngược lại nồng độ thrombin thấp lại cần để phục hồi fibrinogen thành fibrin. Vì những lý do đó, sự hoạt hóa TAFI diễn ra trong suốt con đường đông máu nội sinh thông qua FXI. Sự suy giảm hoặc bất thường chức năng TAFI có thể góp phần quan trọng trong việc tạo nên kiểu hình chảy máu gặp ở bệnh nhân suy giảm FXI và cũng góp phần tạo nên chảy máu nặng ở bệnh nhân suy giảm FVIII, FIX. Điều thú vị là ở mô hình chuột loại bỏ (“knockout”) TAFI cho thấy quá trình phát triển phôi bình thường, sinh sản bình thường và không xuất hiện tăng rối loạn chảy máu hay huyết khối. Tuy nhiên, ít nhất một số chuột K/O cho thấy suy giảm làm lành vết thương gợi ý vai trò của TAFI trong sửa chữa mô.

Một SNP trong gene TAFI dẫn đến sự thay thế Threonine bằng Isoleucine tại vị trí 325 và sự thay thế này làm tăng thời gian bán hủy gấp đôi (từ 8 đến 15 phút ở 37 độ C) và kết quả làm tăng hoạt tính phân cắt fibrin. Tuy nhiên, SNP này cũng liên kết với giảm hoạt tính miễn dịch TAFI, có thể do liên kết với các SNP khác trong gene TAFI mà ảnh hưởng đến biểu hiện gene.

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

7. ELISA: các giếng phủ kháng thể chống TAFI. Sau đó kháng thể thứ hai là kháng thể anti-human TAFI gắn enzyme HRP. Cách thức đã trình bày ở nhiều bài trước.
8. Xét nghiệm chức năng:
 - a. Sự làm chậm tiêu cục đông bởi TAFIa: xét nghiệm này dựa vào khả năng làm chậm ly giải cục đông huyết tương gây ra bởi rt-PA. TAFI được hoạt hóa bởi thrombin và Tm. Sự hiện diện TAFI trong huyết tương dẫn đến ức chế tiêu sợi huyết, có thể đo được qua sự thay đổi OD. Trong sự thiếu hụt

hoặc bất thường chức năng TAFI sẽ khiến huyết, hoạt tính tiêu sợi huyết sẽ không bị cản trở, sự thay đổi OD sẽ nhanh hơn.

- b. Huyết tương được hoạt hóa bởi Thrombin-Thrombodin. Sau 10 phút, sự hoạt hóa dừng lại bằng cách cho thêm PPACK (một chất ức chế protease) và TAFIa được đo bởi cơ chất đặc hiệu Hippuryl-Arg.

III. PHÂN TÍCH

3. Chảy máu: Sự suy giảm hoặc bất thường chức năng TAFI có thể góp phần quan trọng trong việc tạo nên kiểu hình chảy máu gặp ở bệnh nhân suy giảm FXI và cũng góp phần tạo nên chảy máu nặng ở bệnh nhân suy giảm FVIII, FIX.
4. Vai trò của TAFI trong sinh bệnh học của huyết khối vẫn chưa rõ.

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Kháng nguyên TAFI: 5.8-10.0 μ g/ml [100-172nM.]

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bajzar, L. (2000) Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 2511-2518.
2. Bouma, B.N., Marx, P.F., Mosnier, L.O. & Meijers, J.C. (2001) Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *Thromb Res*, 101, 329-354.
3. Bouma, B.N. & Mosnier, L.O. (2006) Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med*, 38, 378-388.
4. Meltzer, M.E., Lisman, T., de Groot, P.G., Meijers, J.C., le Cessie, S., Doggen, C.J. & Rosendaal, F.R. (2010) Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood*, 116, 113

Bài 7. XÉT NGHIỆM α 2-PLASMIN INHIBITOR

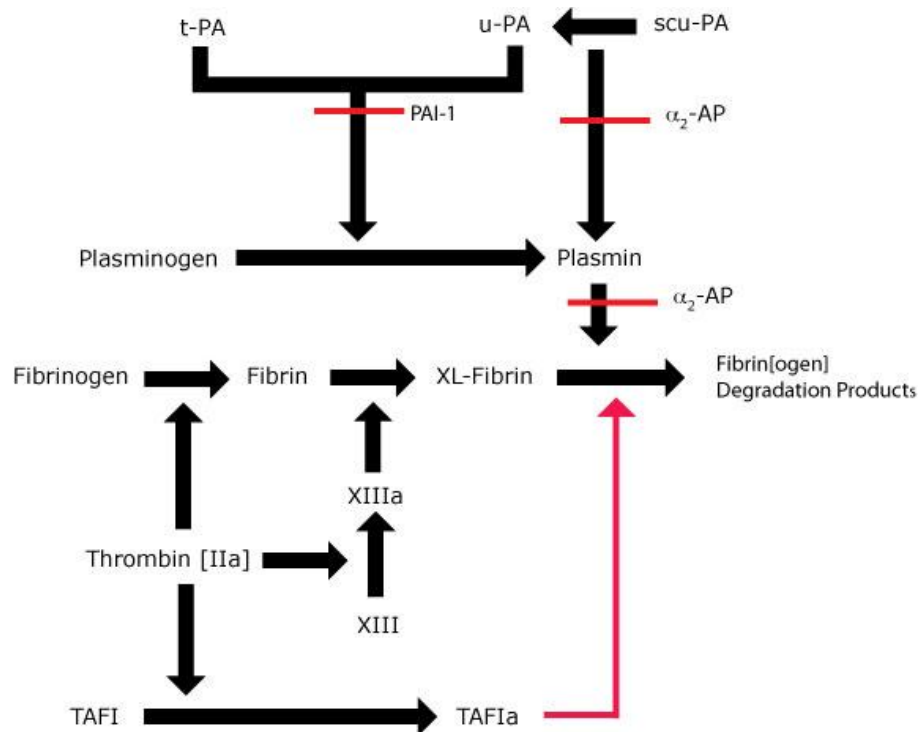
α 2-Plasmin Inhibitor [trước đây gọi là α 2-Antiplasmin]

1. Suy giảm bẩm sinh α 2-Plasmin Inhibitor là bệnh hiếm gặp, còn gọi là bệnh Miyasato. Khoảng 40 trường hợp đã được báo cáo trong y văn. Điều quan trọng trong chẩn đoán bệnh này là các xét nghiệm sàng lọc đông máu thường quy không cho thấy bất thường.

I. GIỚI THIỆU

α 2-Plasmin Inhibitor [trước đây còn gọi là α 2-Antiplasmin [α 2-AP]] cùng với TAFI và PAI-1 là những chất ức chế sinh lý của plasmin và vì vậy đóng vai trò quan trọng trong điều hòa tiêu sợi huyết. α 2-PI được tổng hợp tại gan và cũng tìm thấy trong hạt α tiểu cầu và vì vậy được bài tiết khi tiểu cầu được hoạt hóa.

Hai dạng α 2-PI lưu hành trong huyết tương dưới hai dạng: 1) một protein 464 amino acid với methionine tại đầu N tận [Met- α 2-PI] và 2) dạng ngắn hơn 452 amino acid với Asparaginase ở đầu N tận [Asn- α 2-PI]. Khoảng 30% α 2-PI trong huyết tương tìm thấy dưới dạng Met- α 2-PI và 70% ở dạng Asn- α 2-PI.



TAFI	Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor
------	---

XL-Fibrin	Cross-Linked Fibrin
α 2-AP	Alpha 2 antiplasmin [Plasmin inhibitor]
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
u-PA	Urinary Plasminogen Activator [Urokinase]
scu-PA	Single Chain Urinary Plasminogen Activator

Hoạt động tiêu sợi huyết được điều hòa bởi α 2-PI theo 3 cách:

1. Tạo thành một phức hợp với plasmin. α 2-PI ức chế plasmin tự do hiệu quả hơn nhiều plasmin gắn trong cục máu đông và điều này cho phép nó cố định plasmin tạo ra ở cục máu đông và ngăn chặn sự hoạt hóa enzyme trong tuần hoàn.
2. Bằng việc ngăn plasmin bám vào cục máu đông. α 2-PI tạo liên kết cộng hóa trị với fibrin cục máu đông bởi FXIIIa, dẫn đến tăng đề kháng với tiêu sợi huyết.
3. Bằng việc ngăn chặn gắn plasminogen vào cục máu đông. Đầu C tận của α 2-Plasmin Inhibitor có ái lực cao với vị trí gắn lysine của plasminogen, nơi fibrin cũng gắn vào. Bằng cách này, α 2-PI ngăn cản plasminogen gắn vào fibrin.

Gene cho α 2-PI [SERPINF2] nằm ở cánh ngắn NST số 17 [17pter-p12] chứa 10 exon và 9 intron. Gene mã hóa cho một protein 51kDa, được tổng hợp tại gan và lưu hành ở dạng tự do hoặc kết hợp với plasminogen. Nồng độ trong huyết tương α 2-PI là ~0.7mg/mL với T $\frac{1}{2}$ từ 2-6 ngày. α 2-PI là thành viên của gia đình SERPIN.

II. NGUYÊN LÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP

α 2-PI có thể xét nghiệm bằng phương pháp miễn dịch hoặc phương pháp chức năng.

9. ELISA: các giếng phủ kháng thể chống α 2-PI.
10. Xét nghiệm chức năng:
 - a. Huyết tương bệnh nhân chứa α 2-PI được ủ với lượng dư plasmin. Plasmin nhanh chóng bị bất hoạt bởi α 2-PI và lượng plasmin còn dư được đo bằng cách sử dụng cơ chất tạo màu bị cắt bởi plasmin và sự thay đổi màu sắc được xác định tại 405nm. Sự thay đổi trong độ hấp thụ tỷ lệ nghịch với nồng độ α 2-PI.
 - b. Plasmin được phủ ở các giếng và huyết tương bệnh nhân được thêm vào. α 2-PI có hoạt tính chức năng sẽ gắn và phản ứng với plasmin. Rửa các giếng, sau đó cho anti- α 2-Plasmin Inhibitor vào. Kháng thể được xác định bằng cách cho tiếp kháng thể thứ hai gắn horseradish peroxidase. Rửa giếng lại, và cho cơ chất tạo màu của horseradish peroxidase vào. Sự thay đổi màu sắc được ghi tại 405nm. Số lượng thay đổi màu sắc tỷ lệ với nồng độ α 2-PI hoạt động ở trong huyết tương.

III. PHÂN TÍCH

Suy giảm bẩm sinh α 2-Plasmin Inhibitor là bệnh hiếm gặp, còn gọi là bệnh Miyasato. Khoảng 40 trường hợp đã được báo cáo trong y văn. Điều quan trọng trong chẩn đoán bệnh này là các xét nghiệm sàng lọc đông máu thường quy không cho thấy bất thường.

Bệnh nhân đồng hợp tử có giá trị α 2-PI <10% và thường chảy máu. Bệnh nhân dị hợp có mức α 2-PI từ 30-60% và thường không có triệu chứng.

IV. KHOẢNG THAM CHIẾU

Khoảng tham chiếu của người bình thường là 80-140%. Những trẻ sinh đủ tháng khỏe mạnh sẽ có mức α 2-PI ở giới hạn dưới hoặc giảm nhẹ nhưng nhìn chung sẽ đạt mức của người lớn ở cuối tuần thứ nhất sau sinh.

V. ĐỀ NGHỊ XÉT NGHIỆM NÀO TIẾP

Rất hữu ích để nhớ rằng TEG/ROTEM có thể bất thường trong trường hợp nghi ngờ rối loạn α 2-PI và có thể sử dụng nó để sàng lọc rối loạn này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carpenter SL, Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. Haemophilia 2008;14:1250-4.