

Современные скрининговая коагулограмма. Диагностические возможности и проблемы.

Кузнецова О.А.,
Северо-западный государственный медицинский
университет
Санкт-Петербург

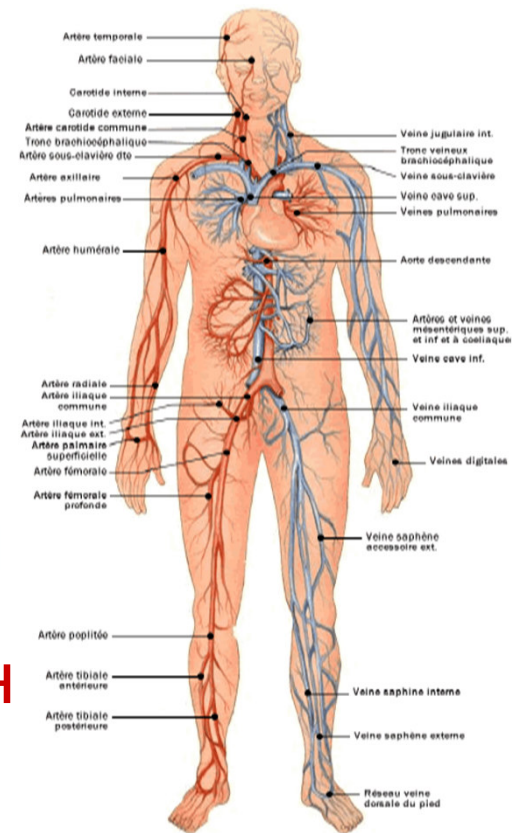
Гемостаз

➔ Функции системы гемостаза

- ❖ Предотвращение потери крови
- ❖ Остановка кровотечения
- ❖ Поддержание крови в жидком состоянии (предотвращение тромбозов)

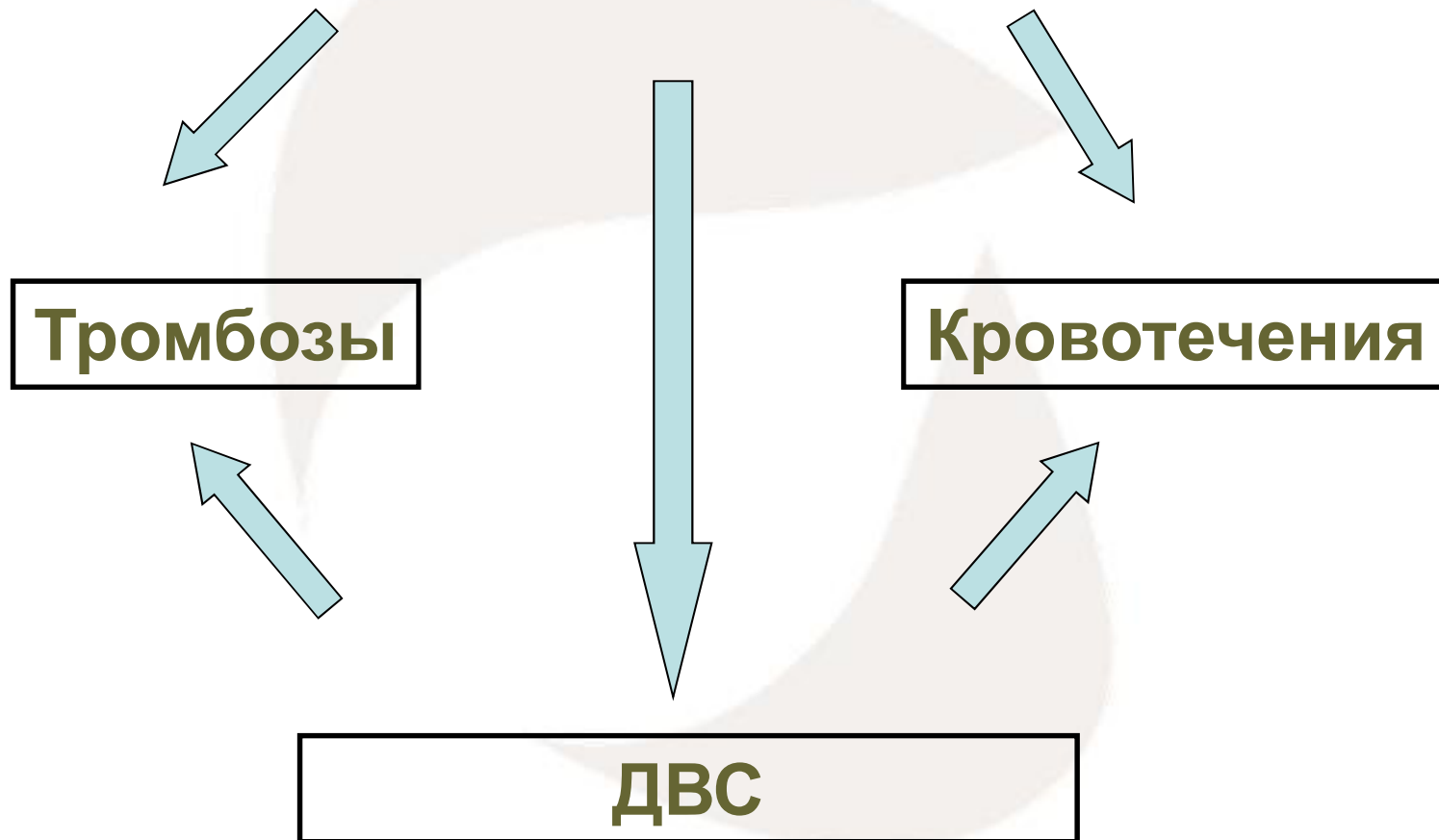
➔ От 3 до 5 л крови

- ❖ Свыше 100 000 км артерий, вен капилляров



Systeme cardiovasculaire

Нарушения системы гемостаза



Чем может лаборатория помочь врачу-клиницисту ?

- Диагностика причин
 - ✓ кровотечений
 - ✓ тромбозов
- Контроль терапии

Устаревшие тесты:

- Время лизиса эуглобулинов
- Время рекальцификации плазмы
- Каолиновое время
- Кефалиновое время
- Хагеман-зависимый фибринолиз

Нестандартизированные тесты:

- Агрегация тромбоцитов (искл. Multiplate)
- Тромбоэластография
- Тест генерации тромбина

А.Б. Добровольский, Е.В. Титаева

- Институт клинической кардиологии им. А.Л.Мясникова ФГУ РКНПК Росмедтехнологий, г. Москва
- Атеротромбоз, 2009

Основные скрининговые тесты

- Фибриноген
- Количество тромбоцитов
- *Время кровотечения – по показаниям*

Кровоточивость

- АЧТВ
- Протромбиновое время (ПВ) % по Квику
- Тромбиновое время

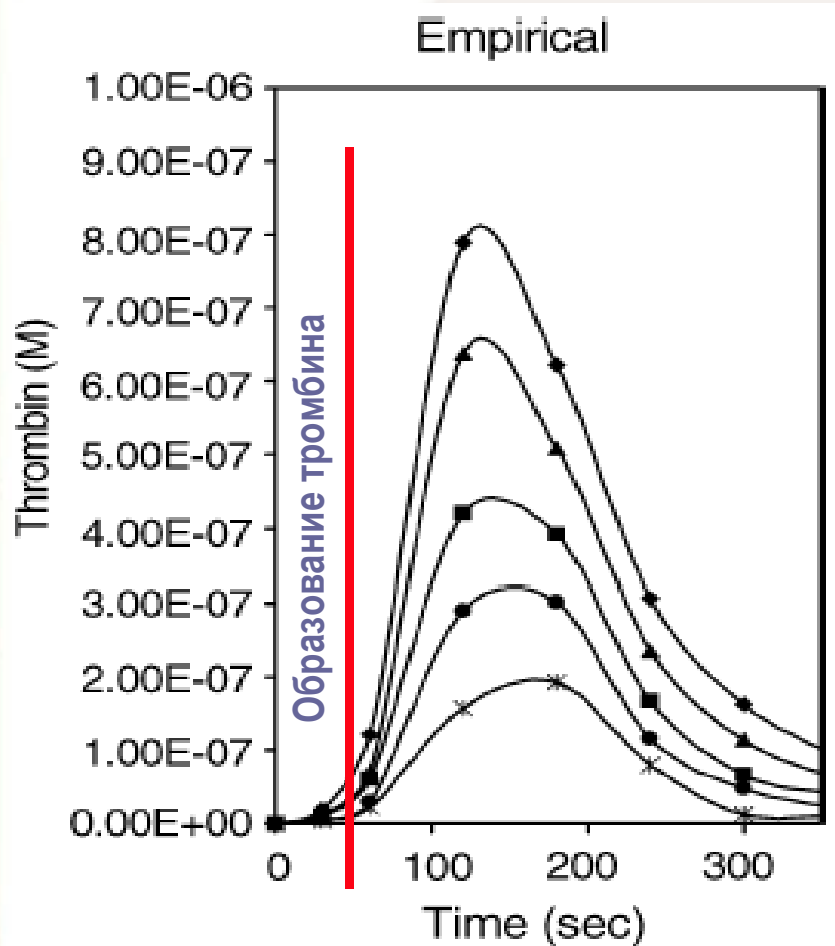
Склонность к тромбообразованию

D-димер

- *Всероссийская Ассоциация по изучению тромбозов, геморрагии и патологии сосудов имени А.А. Шмидта — Б.А. Кудряшова*
- *Научное общество «Клиническая гемостазиология»*

Оценка результата ПВ, АЧТВ, ТВ

Тест генерации тромбина



- Все тесты, основанные на определении времени образования сгустка, регистрируют только начальную фазу образования тромбина (~5% от общего тромбина)
- **Укорочение времени свертывания не имеет клинической значимости**

Mann et al., 2002

Оценка результатов ПВ

- ➔ Протромбиновое время в % по Квику
- ➔ МНО

Устаревшие способы оценки ПВ : время свертывания, ПО и %-ПИ

- свидетельствуют только о том, отличается ли плазма больного от нормальной, не дают информации о том, насколько они отличаются в действительности.
- исследовано влияние снижения концентрации факторов на время свертывания при определении с использованием четырех разных тромбопластинов. Установлено, что тромбопластин может обладать “высокой” активностью* (~11 сек.), но плохо чувствовать снижение концентрации факторов, и “низкой” активностью (-23 сек.) при высокой чувствительности к дефициту факторов. Поэтому ни время свертывания, ни ПО и %-ПИ не позволяют судить о том, насколько велика разница в содержании факторов. **Другими словами, они являются некалиброванными величинами и поэтому не должны использоваться.**
- значения этих параметров варьируют не только между лабораториями, но и в пределах одной лаборатории при переходе от одной партии тромбопластина к другой, даже если они выпущены одним и тем же производителем.

Оценка результата ПВ

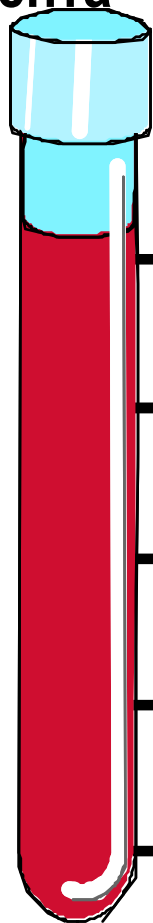
- $> 70\%$.
- Увеличение протромбинового времени $> 100\%$ не имеет клинической значимости
- Результат с $\text{МНО} > 3.0$ требует обязательного повторного исследования

Различные единицы измерения ПВ



Как различные тромбопластины влияют на протромбиновое время

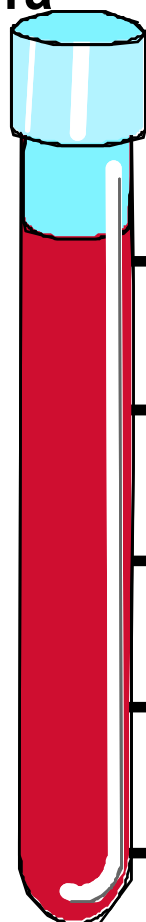
Плазма
одного
пациента



Тромбопластин реагент	ПВ пациента (секунды)	норма (секунды)	ПТИ	МИЧ	МНО
A	16	12	75 %		
B	18	12	67 %		
C	21	13	62 %		
D	24	11	46 %		
E	38	14.5	38 %		

Как различные тромбопластины влияют на протромбиновое время

Плазма
одного
пациента



Тромбопластин	ПВ пациента (секунды)	ПВ нормальной плазмы (секунды)	ПТИ	МИЧ	МНО
A	16	12	75%	3.2	2.6
B	18	12	67%	2.4	2.6
C	21	13	62%	2.0	2.6
D	24	11	46%	1.2	2.6
E	38	14.5	38%	1.0	2.6

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СИСТЕМА ВНЕШНЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

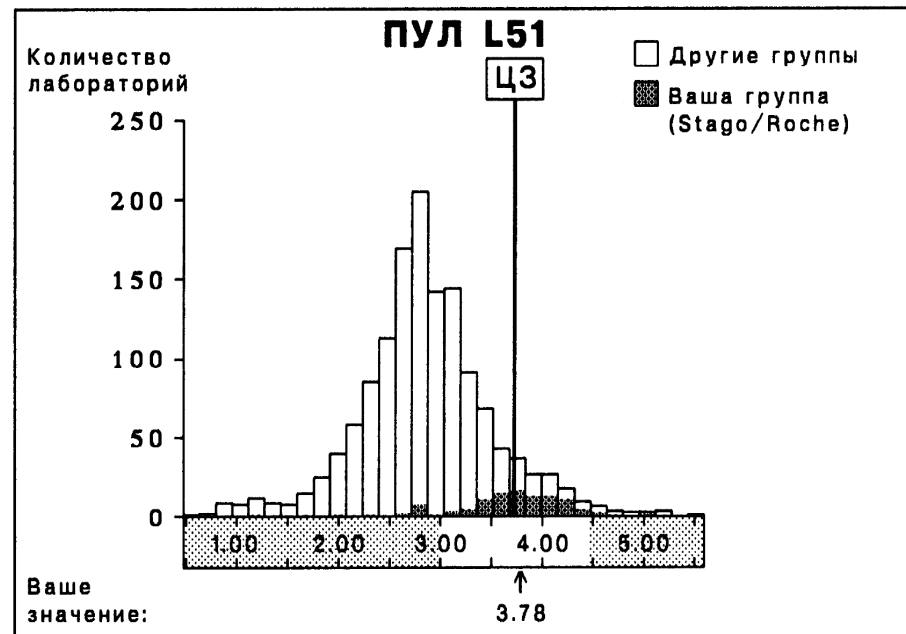
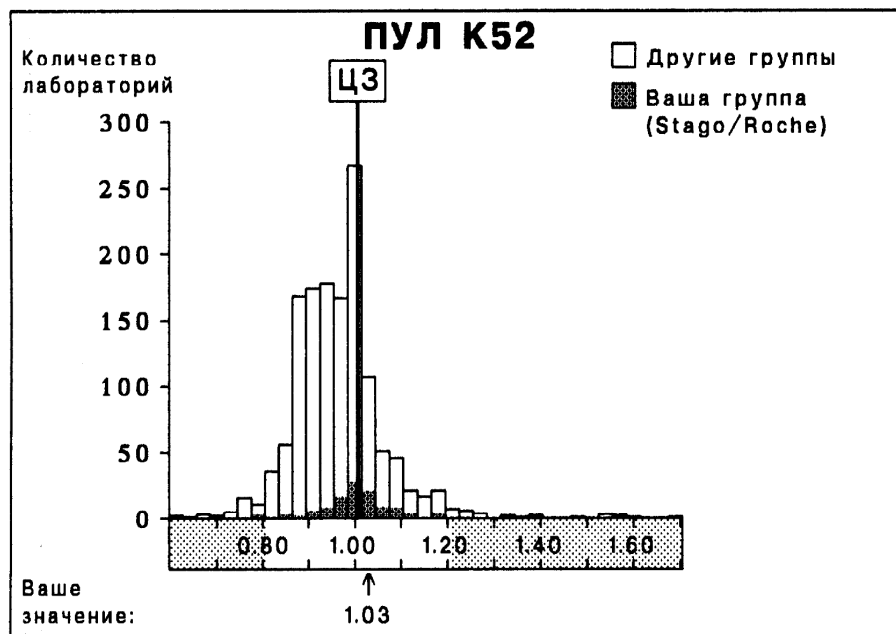
КОАГУЛОЛОГИЯ

Цикл 1-12

Номер лаборатории: 00510 Дата поступления результатов: 18.06.12 Назначенная дата: 10.07.12

Определяемый показатель: **МЕЖДУНАРОДНОЕ НОРМАЛИЗОВАННОЕ ОТНОШЕНИЕ**

ОЦЕНКА ПРАВИЛЬНОСТИ (гистограммы средних значений):



Факторы, влияющие на точность вычисления МНО

$$\text{МНО} = \left(\frac{\text{протромбиновое время больного}}{\text{протромбиновое время нормальной плазмы}} \right) \text{ МИЧ}$$

Рекомендация Комитета по стандартизации ISTH:

ПВ нормальной плазмы – среднее время свертывания плазм ≥ 20 -ти доноров (НЕ пул нормальной плазмы!!)

Реагенты АЧТВ

	Дефицит факторов	Мониторинг терапии гепарином	Волчаночный антикоагулянт
STA Cephascreen (Предоперационный скрининг, педиатрия)	+++	+	+
STA C.K. Prest (Предоперационный скрининг, педиатрия)	+++	+	+
STA PTTa (Многоцелевой скрининг)	+++	+++	+++
PTT -LA (Скрининг на волчаночный антикоагулянт)			++++

Реагент	Состав	Референсный интервал
B4218-1 Dade Actin	Фосфолипиды - Кефалин (выт. из мозга кролика), активатор - элаговая кислота Умеренная чувствительность к факторам и ВА, но низкая к гепарину	25-35 сек
B4218-2 Dade Actin		
B4218-20 Dade Actin FS	Фосфолипиды - соя, активатор - эл. кислота Высокочувствителен к факторам и гепарину и умеренно к ВА	25-33 сек
B4218-100 Dade Actin FS		
B4219-1 Dade Actin FSL	Фосфолипиды - комбиниров. соя и вытяжка из мозга кролика, активатор - эл. кислота Высокая чувствительность к ВА, хорошая к факторам и умеренная к гепарину	25-33 сек
B4219-2 Dade Actin FSL		
OQGS29 Pathrombin SL	Фосфолипиды - растит. происхождения, активатор - диоксид кремния Высокая чувствительность к ВА, гепарину и факторам	26-36 сек

IL

APTT SP (liquid)	1) синтетический фосфолипиды, кремниевый активатор, консерванты 2) 0.025 M CaCl	ACL Family 24.3 - 35.0 сек ACL Futura/Advance 25.1 - 34.7 сек ACL TOP Family 25.4 - 36.9 сек
SynthASil (liquid)	1) синтетический фосфолипиды, кремниевый активатор, консерванты 2) 0.020 M CaCl	ACL Family 25.4 - 38.4 сек ACL Futura/Advance 24.6 - 35.2 сек ACL TOP Family 25.1 - 36.5 сек

Технология Стандарт

АПТВ-тест	1. Кефалин (лиофильно высушенный фосфолипидный компонент) 2. Каолин (концентрированная суспензия 40:1 в дистиллированной воде) 3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 M) 4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 M)	на коагулометре 28 - 40 сек мануально 30 - 42 сек
АПТВ-Эл-тест	1. АПТВ-Эл-реагент (лиофильно высушенная смесь, содержащая фосфолипиды мозга кролика, эллаговую кислоту, буфер и стабилизаторы) 2. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор; 0,5 M)	на коагулометре 22 - 33 сек мануально 23 - 34 сек
АПТВ-Эл-тест, соевый, жидкий	1. АПТВ-Эл-реагент (раствор, содержащий соевые фосфолипиды, эллаговую кислоту, буфер и стабилизаторы) 2. Кальция хлорид (0,277 % раствор)	на коагулометре 30 - 42 сек мануально 32 - 44 сек

РЕНАМ

Коагуло-тест	1. Эрилид (кефалин)- смесь мозговых и соевых ФЛ 2. Каолин 0.5% суспензия 3. CaCl 0.025 M	35 - 45 сек
Коагуло-экспресс	1. Коагуло-реагент (эрилид в суспензии каолина, буфер, стабилизатор), лиофилизат 2. CaCl 0.025 M	35 - 45 сек
АЧТВ-тест	1. АЧТВ-реагент, соевые фосфолипиды+ эллаговая кислота, лиофилизат 2. CaCl 0.025 M	25 - 35 сек
АЧТВ-реагент	1. АЧТВ-реагент, соевые фосфолипиды+ эллаговая кислота, лиофилизат	25 - 35 сек

STAGO

STA-Cephascreen 4,10	Кефалин, приготовленный из тканей мозга кролика, полифенольный активатор в забуференной среде	29,2 ± 5.6 сек, т.е. норма менее 34,8 сек
STA-C.K.Prest 5	1. Кефалин, приготовленный из тканей мозга кролика 2. забуференная суспензия каолина	29.6 ± 4.8 сек, т.е норма менее 34.4 сек
STA-PTT Automate 5	Кефалин, приготовленный из тканей мозга кролика, микрокристаллический кремний в качестве активатора в забуференной среде	33,5 ± 4.6 сек, т.е. норма менее 38,1 сек



Существующие Международные Стандарты:

- 98/612, принят в 1999 для фибриногена
- 09/172, принят в 2010 для факторов II, VII, IX, X
- 03/116, принят в 2005 для фактора V
- 07/316, принят в 2009 для фактора VIII
- 04/102, принят в 2005 для фактора XI
- 93/768, принят в 1994 для АТ
- 02/342, принят в 2006 для протеина С
- 03/228, принят в 2006 для протеина S.

- Для правильной интерпретации результатов при исследовании гемостаза крайне важна комбинация:

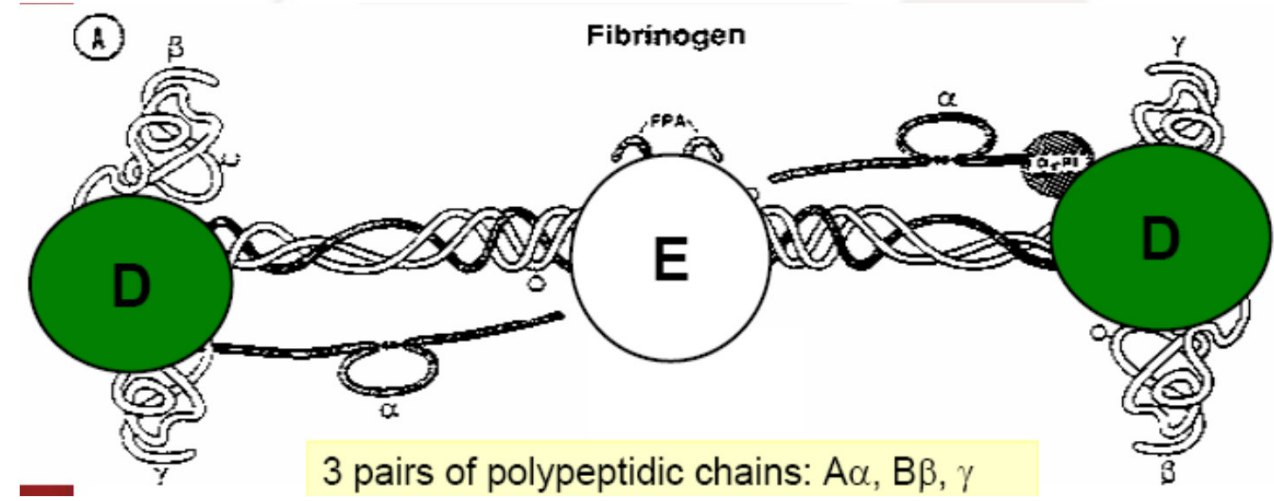
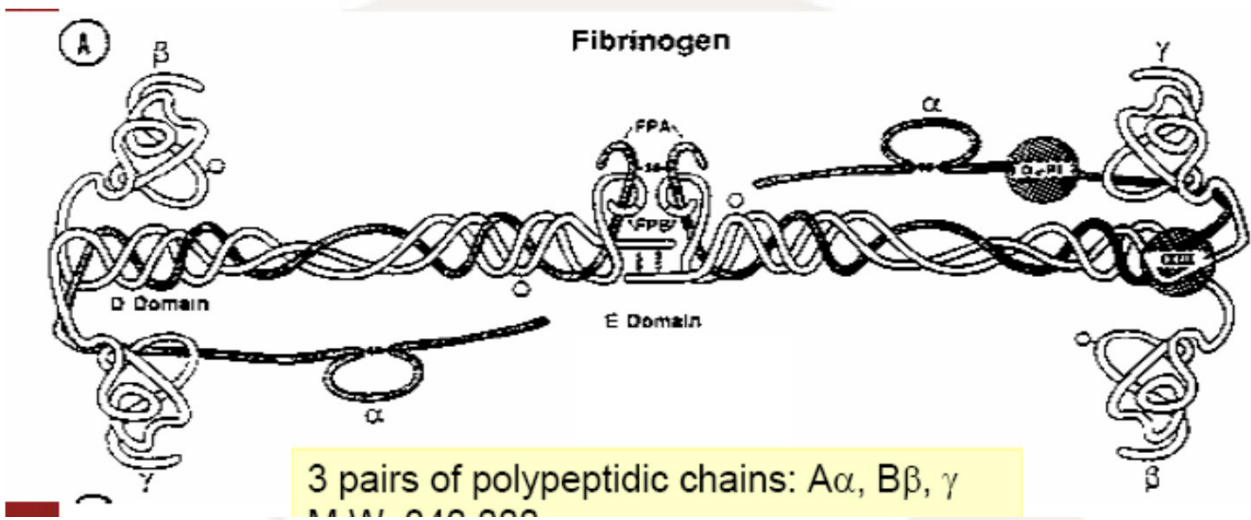
Анализатор гемостаза + реагент

- оптические,
- механические,
- оптикомеханические методы детекции (сгустка)

Маркеры активации свертывания

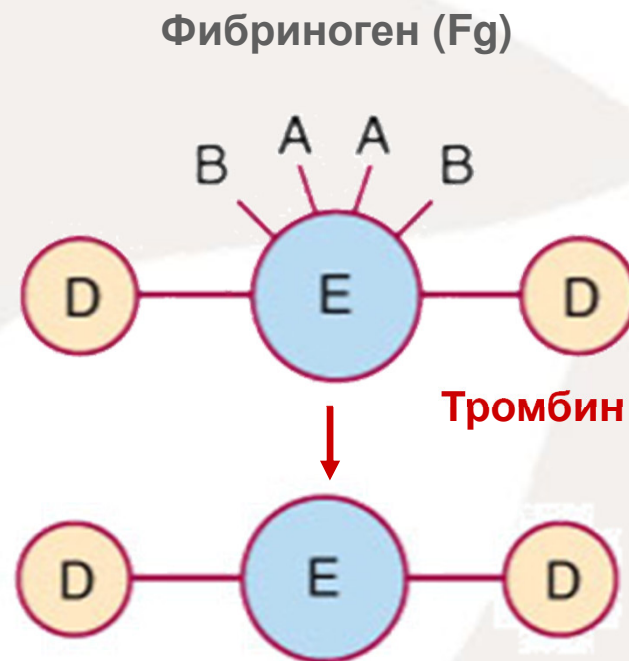
- Маркеры, связанные с продукцией фибрина
 - D-димер
 - ПДФ (продукты деградации фибрина/фибриногена)
 - Фибрин-мономер (FM)/растворимый фибрин (SF)

Фибриноген



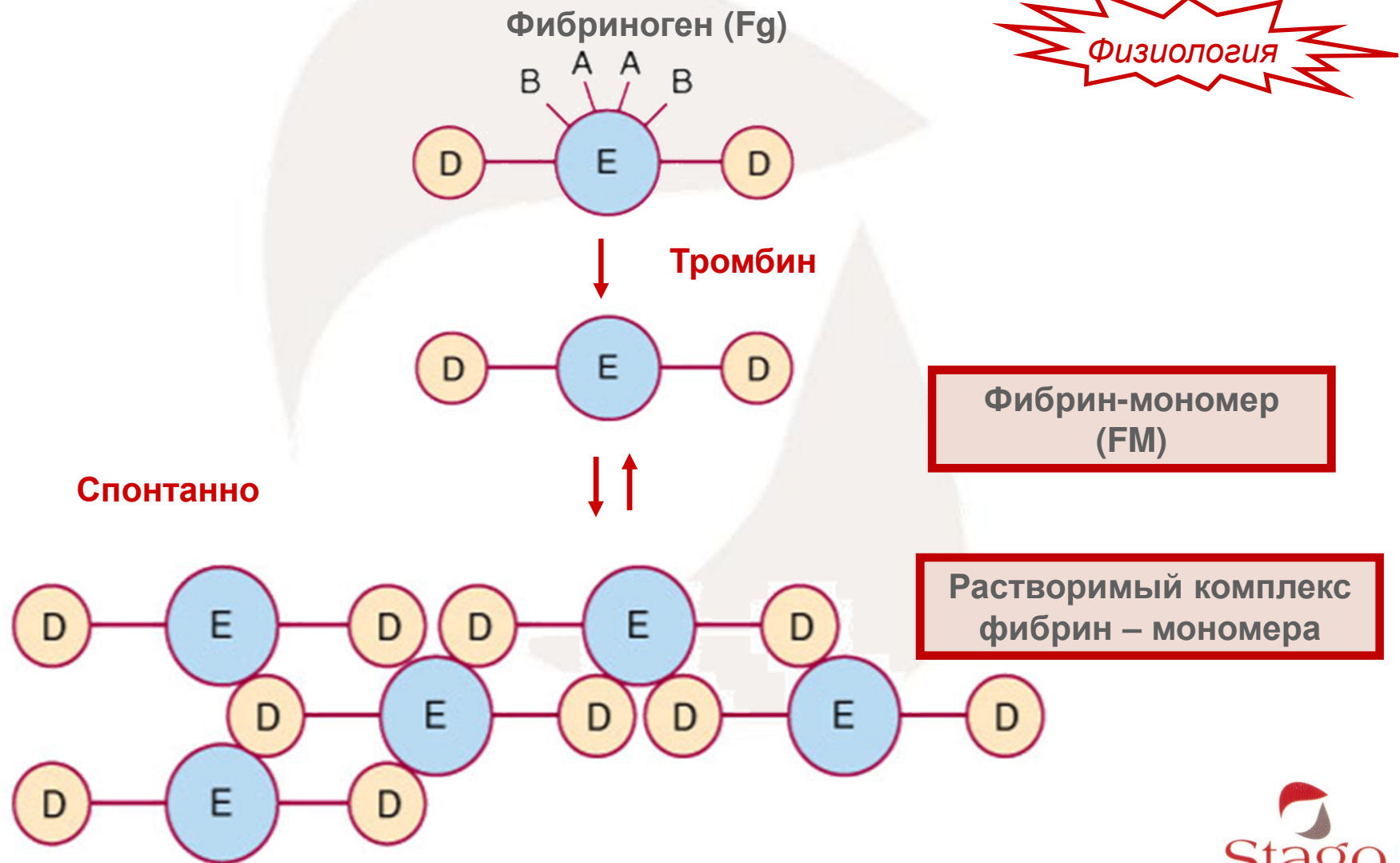
Физиологическая коагуляция

Образование и деградация фибрина



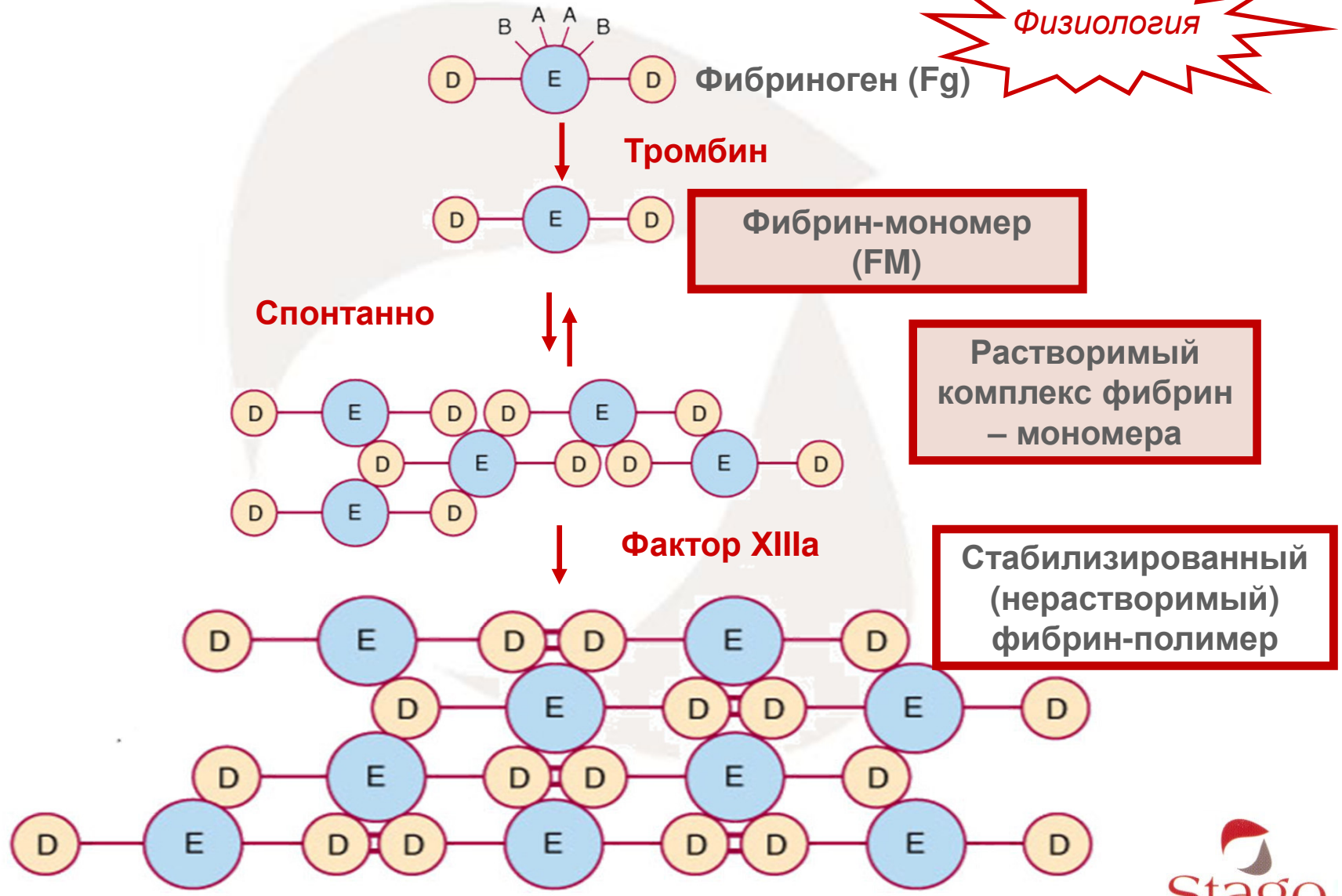
Физиологическая коагуляция

Образование и дегградация фибрина



Физиологическая коагуляция

Образование и деградация фибрина



Физиологическая коагуляция

Образование и деградация фибрина



Маркеры активации свертывания

D-димер	Фибрин-мономер
Внутри- и внесосудистый фибриногенез	Внутрисосудистый фибриногенез
ПДФ	НЕ является ПДФ
Маркер образования фибрина и его протеолиза	Маркер образования фибрина
Маркер <u>поздней</u> стадии гиперкоагуляционного статуса	Маркер <u>ранней</u> стадии гиперкоагуляционного статуса

Клинические показания для измерения уровня D-димера

1. Исключение тромбоза глубоких вен и ТЭЛА
2. Исключение синдрома ДВС
3. Прогнозирование течения заболеваний и опасности тромбоэмболических нарушений
4. Оценка эффективности антитромботической терапии
5. Определение длительности антитромботической терапии

Продукты деградации фибрина



Продукты деградации фибрина

DD

DY

YY

XD

XY

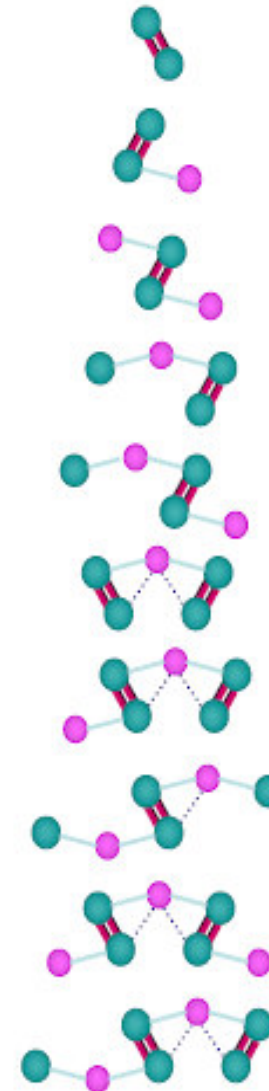
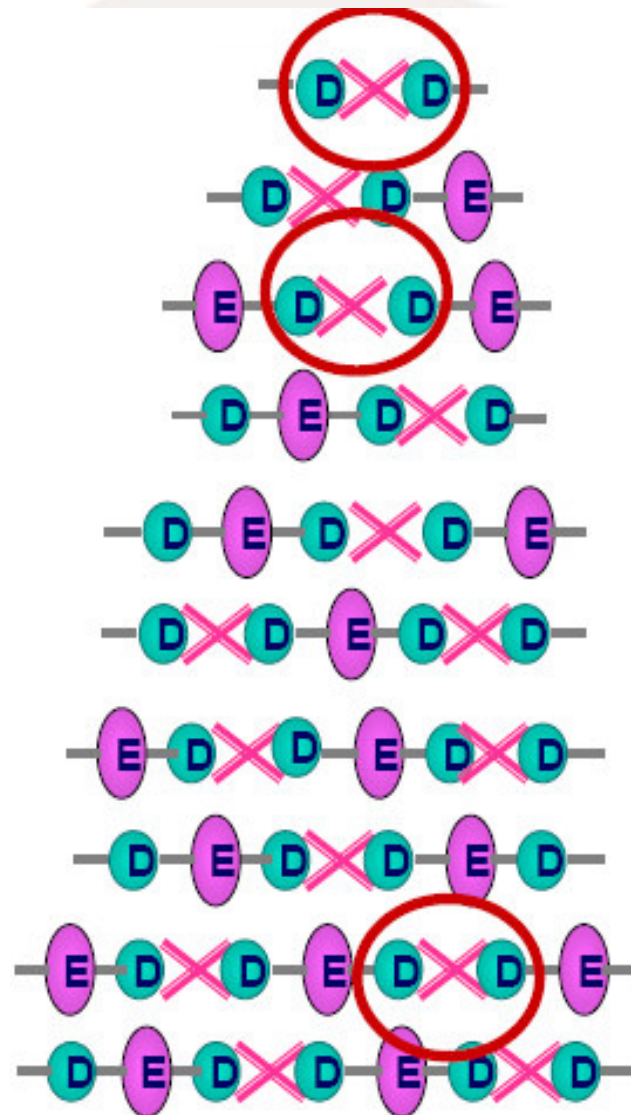
DXD

YXD

XX

YXY

XXD



D-димер – оценка результата

Высокая вариабельность анализа:

- ❖ Ситуация in vivo == in vitro
- ❖ In vitro: плазмин/расщепляет фибрин до фрагментов D=D и E
- ❖ In vivo: фрагменты до 5 млн Да (до 15 последовательностей D=D-E)
- ❖ Отсутствие международной стандартизации: используются различные моноклональные антитела
- ❖ Если в исследуемой пробе D-димер отсутствует, то результаты, полученные с реагентами разных производителей будут отрицательными
- ❖ Если в исследуемой пробе присутствует D-димер, результаты, полученные с реагентами разных производителей будут положительными, но количество определенного D-димера может быть различным

D-димер -оценка результата

Различные единицы измерения:

Fibrinogen Equivalent Unit
(FEU)

Cut off 0.5 мкг/мл = 500 нг/мл (мг/л)

D-Dimers Unit
(DDU)

Cut off 0.25 мкг/мл = 250 нг/мл (мг/л)

1 единица FEU = 2 единицы DDU

Хронология событий in vivo

- Сосудистый спазм – несколько секунд
- Образование первичного тромбоцитарного сгустка 3-5 мин
- Образование фибринового сгустка 10-30 мин
- Процесс репарации с участием фибринолитической системы: дни - недели

Кинетика изменения уровня маркеров активации свертывания после эпизода ВТЭ



1. ФМ - пре-тромботический маркер

→ Используется для **ранней** диагностики **гиперкоагуляционного статуса**

2. D-димер/ПДФ - маркеры фибринолиза

→ используются для мониторинга тромботических состояний

Кинетика гемостатического баланса

Маркеры активации свертывания	Протромботический статус	Гиперфибринолиз
Физиология	Формирование сгустка Образование фибрина Недостаточная степень фибринолиза	Деградация сгустка Отсутствие образования фибрина
Уровни маркеров активации свертывания	Высокий уровень ФМ Умеренный уровень D-димера	Высокий или умеренный ФМ Высокий уровень D-димера

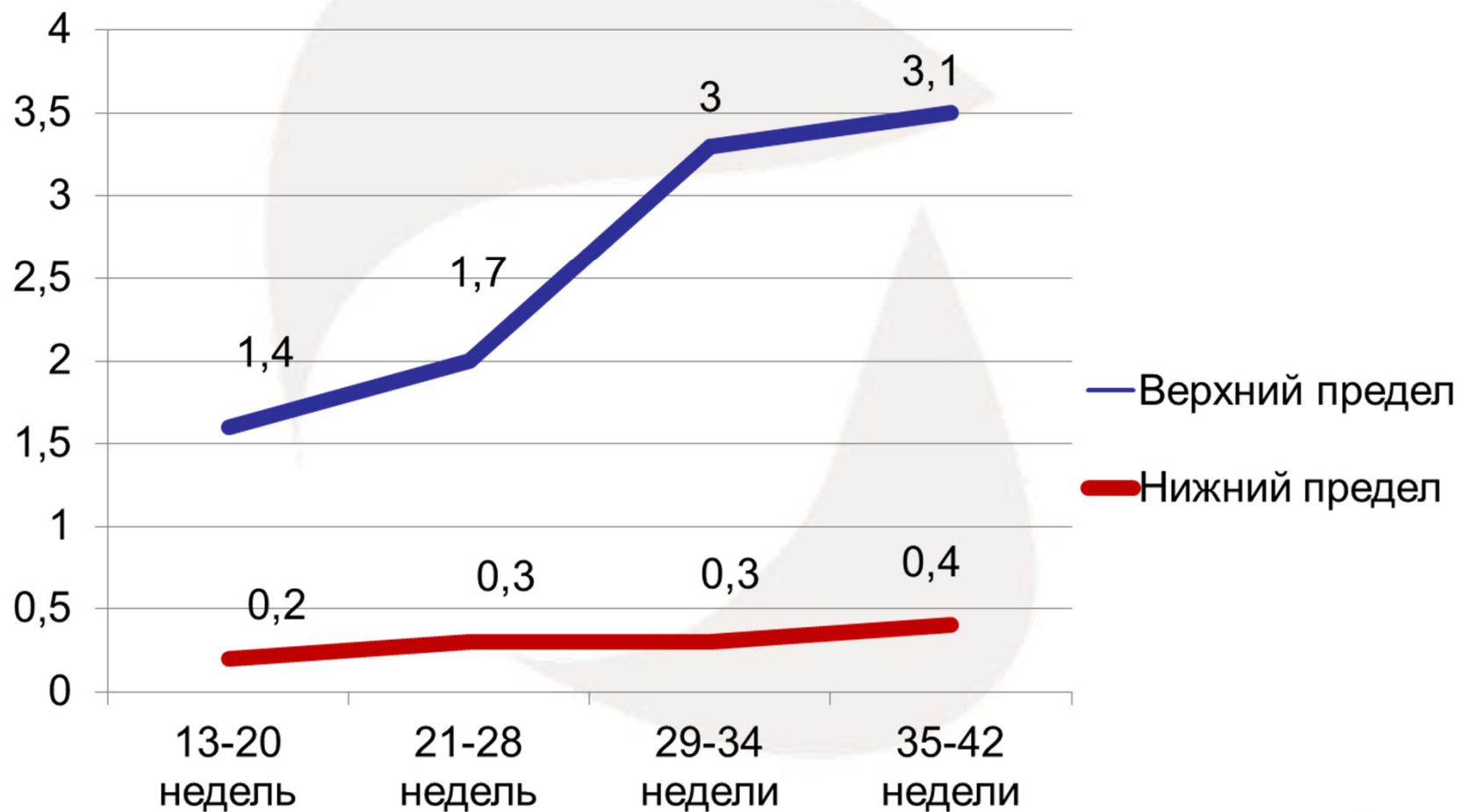
Изменение гемостатического баланса при физиологической беременности

- Привычное невынашивание беременности
- Внутриутробная гибель плода
- Отслойка плаценты
- Задержка внутриутробного развития
- . . .

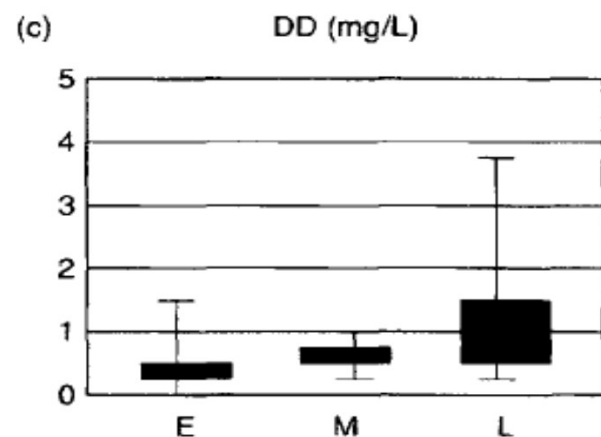
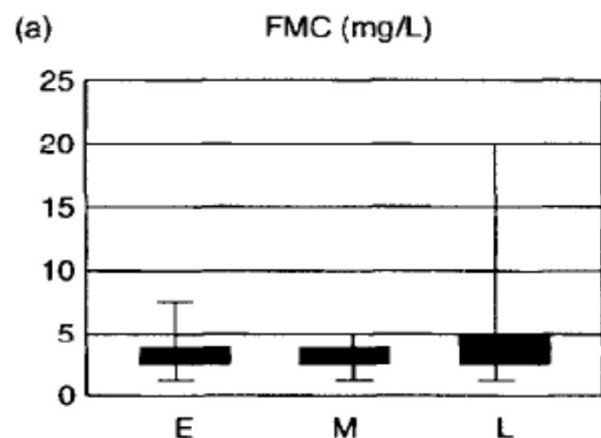
Изменение гемостатического баланса при физиологической беременности

- Беременность – фактор риска тромбоэмболических осложнений
- Изменение прокоагулянтной, антикоагулянтной и фибринолитической активности создают условия для развития ДВС

D-димер и физиологическая беременность (референсный интервал)



Фибрин-мономер - потенциальный тромботический маркер при беременности



Fibrin monomer complex in normal pregnant women: a potential thrombotic marker in pregnancy

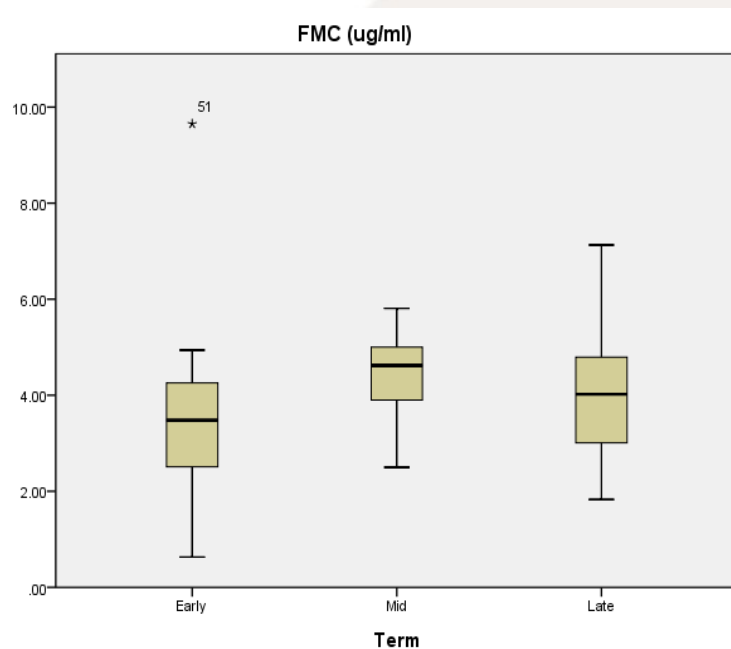
Hiroaki Onishi¹, Kimiko Kaniyu¹, Mitsutoshi Iwashita², Asashi Tanaka³ and Takashi Watanabe¹

n = 87 женщин – нормальная беременность

		FMC (mg/L)	DD (mg/L)
Early pregnancy	Median	3.35	0.43
	Percentile [†]	2.74–3.95	0.28–0.57
	Range	0.91–8.14	0.22–1.64
Mid-pregnancy	Median	3.35*	0.59**
	Percentile [†]	2.74–3.95	0.39–0.72
	Range	1.52–5.16	0.28–0.85
Late pregnancy	Median	3.95**	0.91***
	Percentile [†]	2.74–5.16	0.57–1.52
	Range	1.52–19.5	0.33–3.90

В отличие от других маркеров активации в течении беременности концентрация ФМ значительно не меняется

Фибрин-мономер во время беременности



1 триместр	ФМ (мкг/мл)
n=	50
Mean	3.3
Range (min-max)	0.54-6.1

2 триместр	ФМ (мкг/мл)
n=	28
Mean	4.4
Range (min-max)	2.9-5.9

3 триместр	ФМ (мкг/мл)
n=	38
Mean	4
Range (min-max)	1.2-6.4

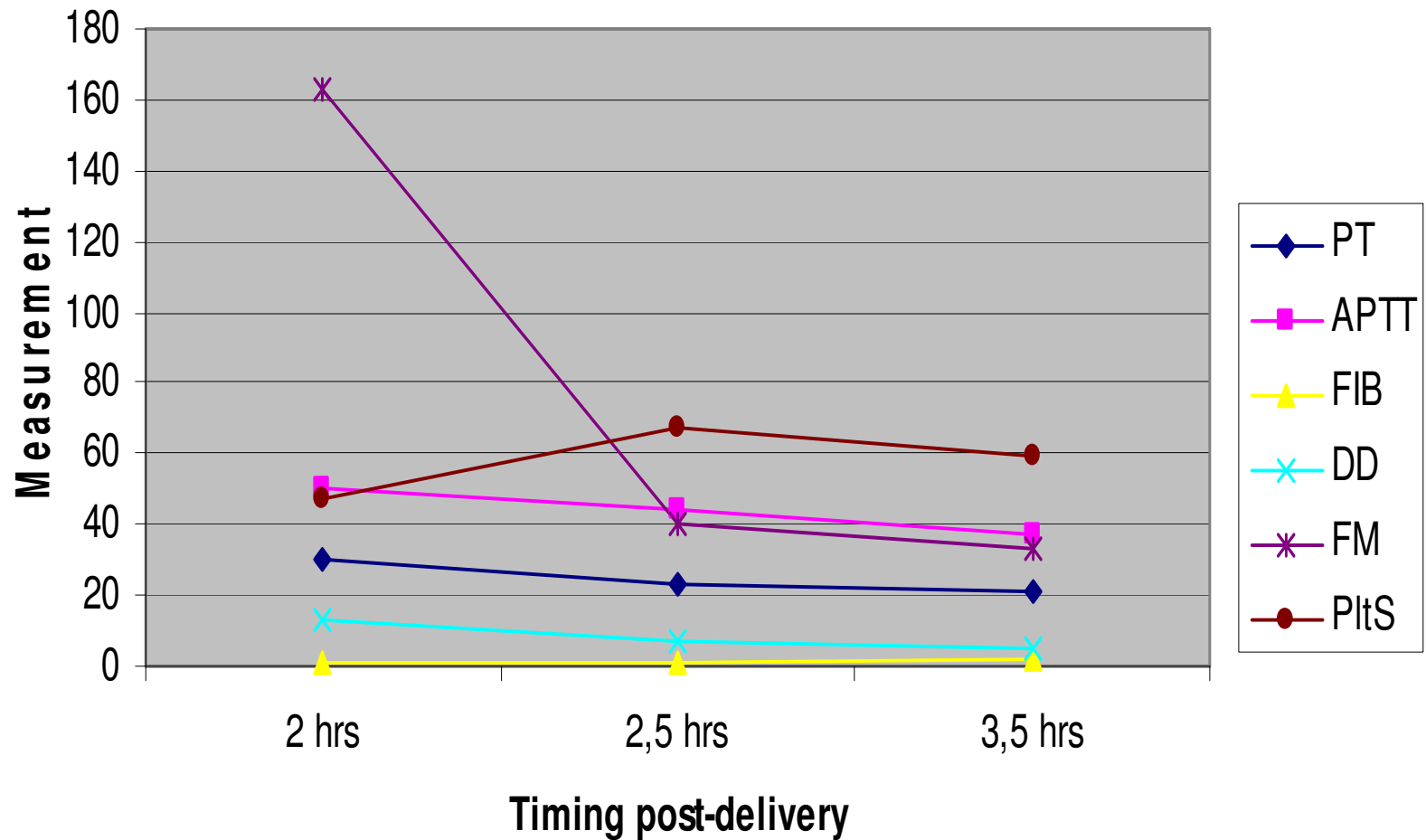
Фибрин-мономер и D-димер во время беременности

- Уровень ФМ во время беременности близок к уровню обычной популяции (< 6 мкг/мл)
- Беременность не влияет на уровень ФМ
- Уровень D-димера во время беременности постепенно растет и зависит от сроков гестации
- Определение уровня D-димера не может быть использовано для диагностики тромботических состояний у беременных

ФМ и ДВС при беременности (клинический случай)

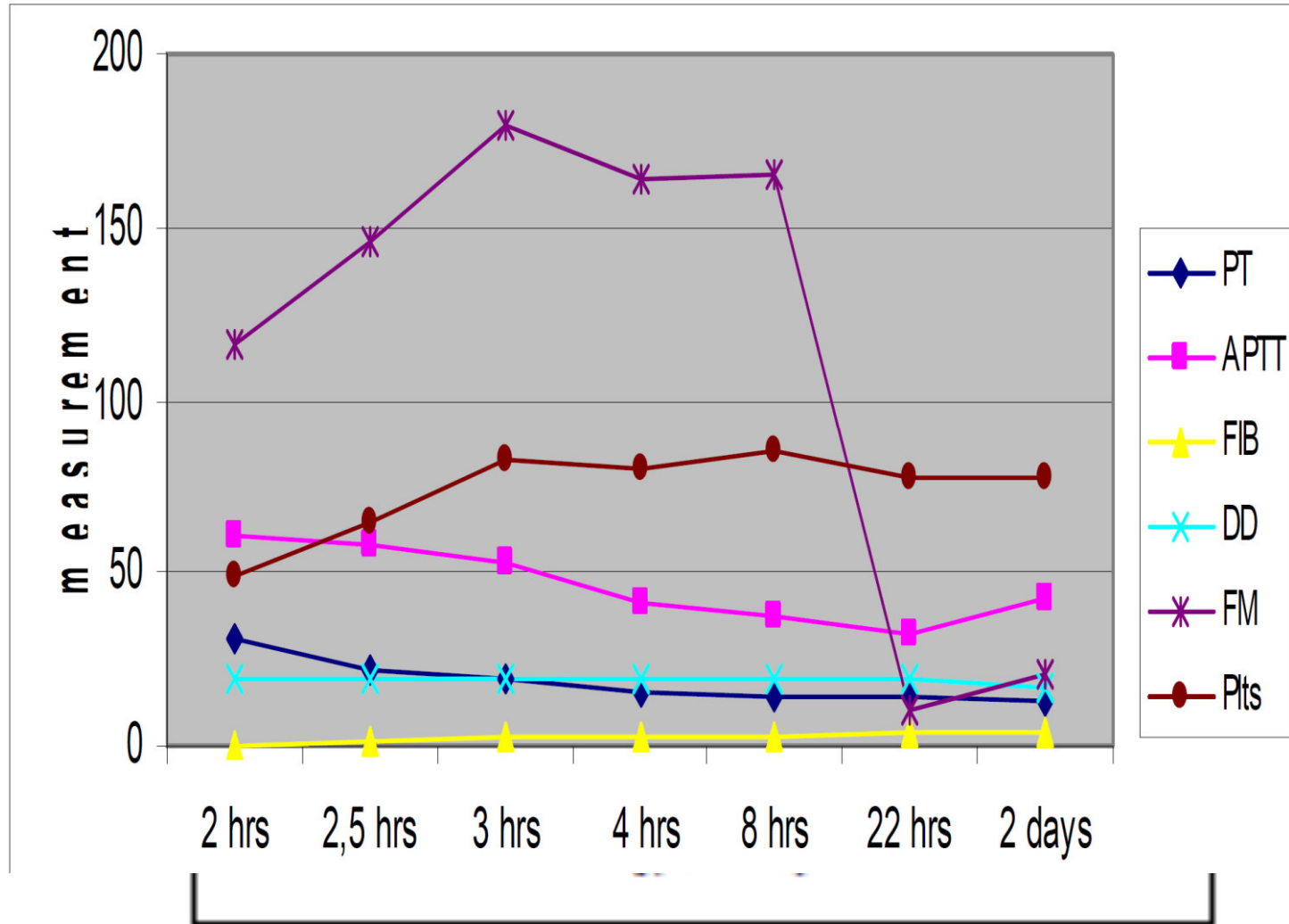
- ❖ Экстренное кесарево сечение, выполненное в связи с отслойкой плаценты, гистерэктомия
- ❖ Во время операции повреждена подвздошная артерия, как следствие – массивная кровопотеря
- ❖ Кровезамещение – 15 единиц эритроцитарной массы, 7 граммов фибриногена, 5 доз тромбоцитов
- ❖ Клинические признаки ДВС по шкале ISTH
- ❖ Контроль маркеров активации свертывания каждые 30 мин

Осложнения беременности - ДВС



TM Cohalan, S McMorrow, D Lyons, K Foley, CM Flynn

Department of Haematology, Coombe Women & Infants University Hospital, Dublin 8, Ireland



Маркеры активации свертывания

Количественный ФМ	Количественный ПДФ	Количественный D-Di
Образование фибрина	Глобальный тест	Деградация фибрина
Ранняя стадия гиперкоагуляции или продолжающееся тромбообразование	Вторичный фибринолиз или гиперфибринолиз	Вторичный фибринолиз или гиперфибринолиз
Акушерские осложнения	Диагноз и мониторинг ДВС	Исключение ВТЭ Мониторинг ДВС
Мониторинг терапии	Мониторинг терапии	Сравнение с cut-off, мониторинг терапии

Автоматические методы определения маркеров активации свертывания

STA[®] - Liatest[®] D-Dimer

STA[®] - Liatest[®] FM

STA[®] - Liatest[®] FDP

Бесприборные тесты тромбообразования

- **D- Di test:** D – димер
- **F. S. Unit :** Фибрин – мономер
- **FDP Plasma:** Продукты деградации фибрина/ фибриногена

➔ Спасибо за внимание 😊

We  **Coag**

www.hemostatica.ru