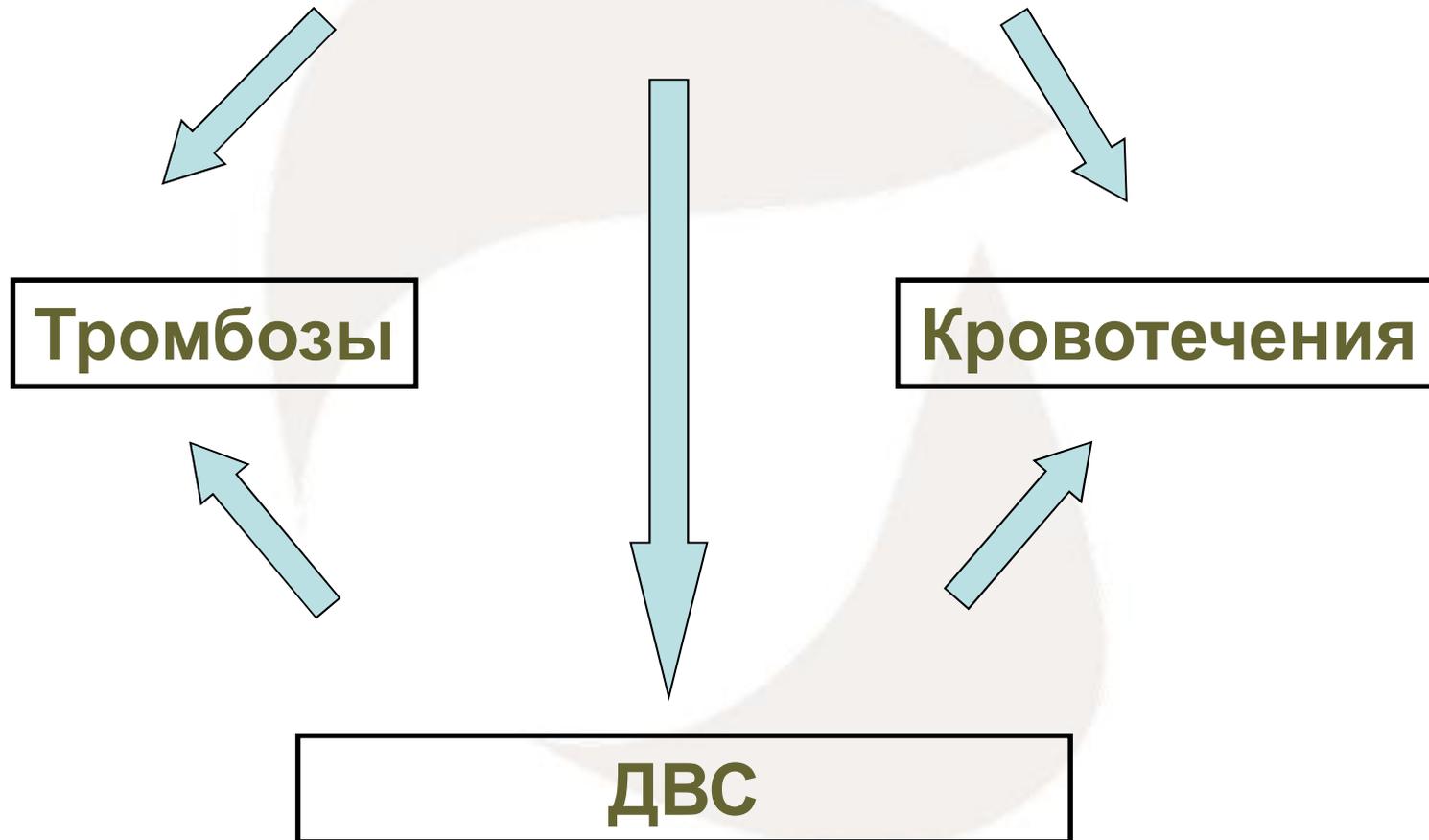


Современная скрининговая коагулограмма. Диагностические возможности и проблемы.

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

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

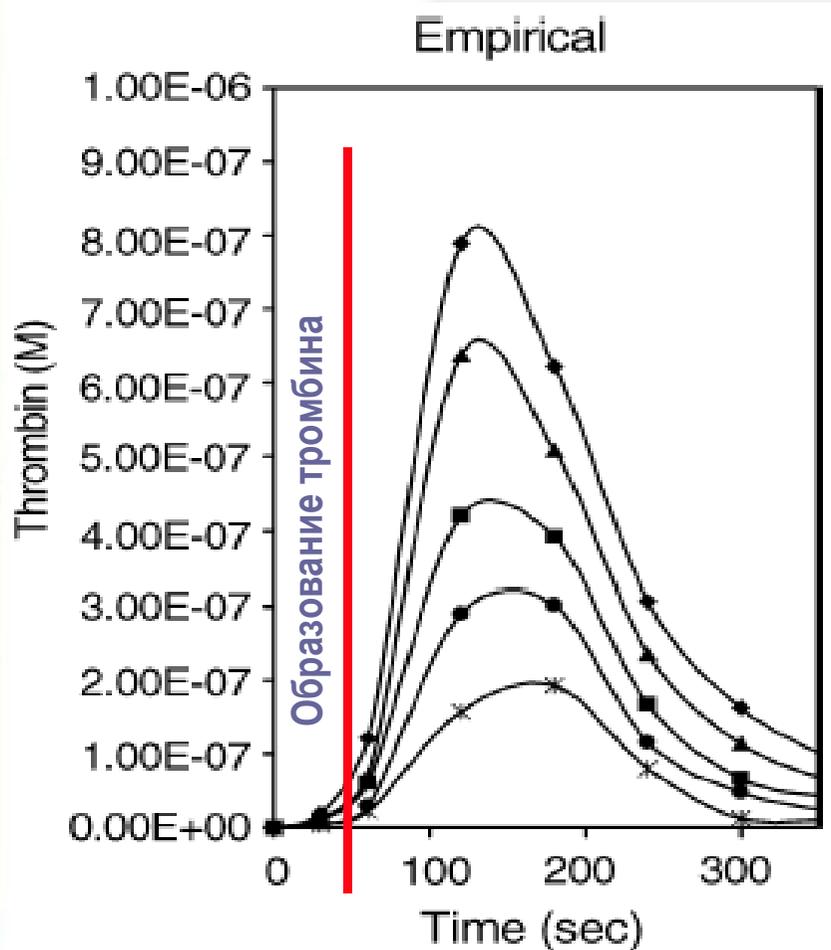
Склонность к тромбообразованию

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

Оценка результата ПВ

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

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СИСТЕМА ВНЕШНЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

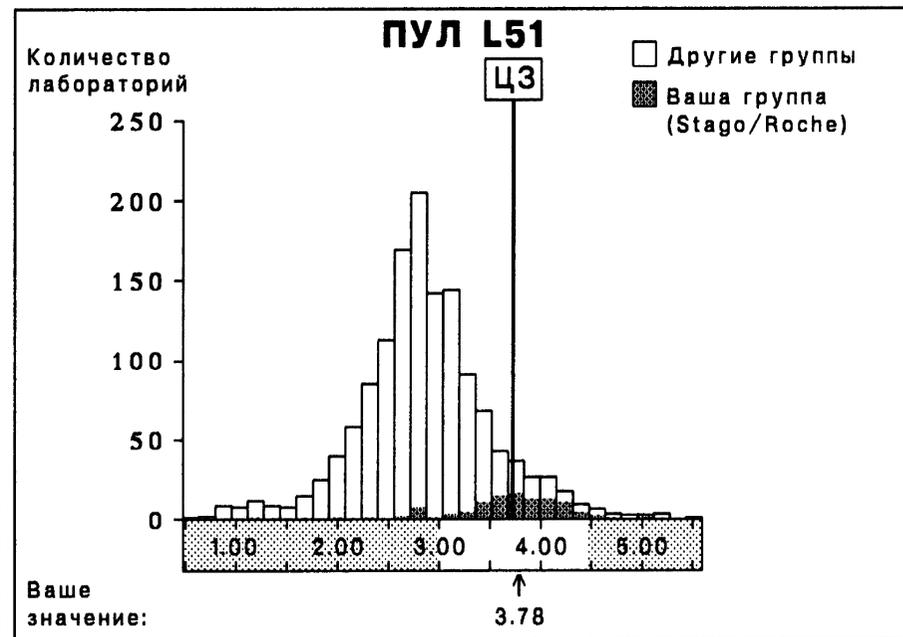
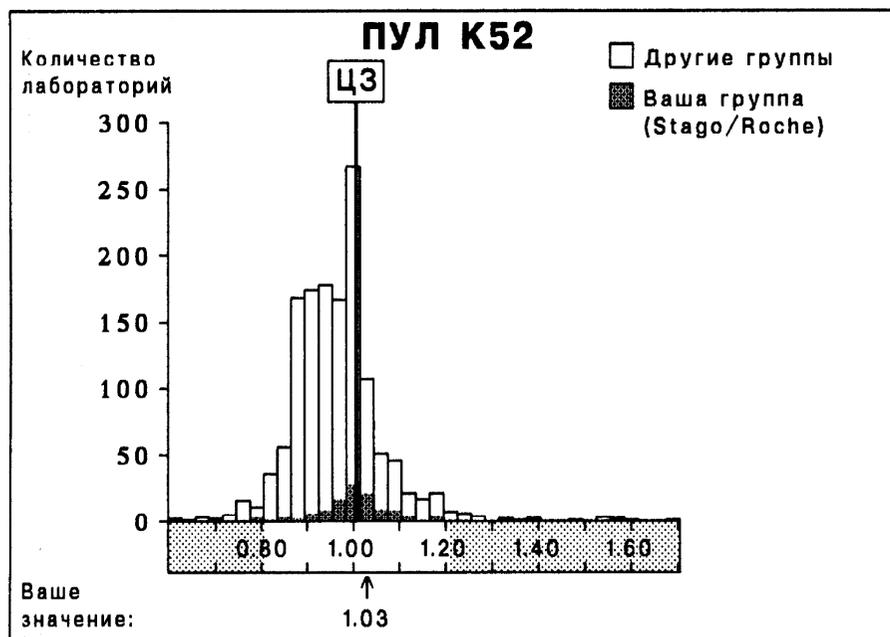
КОАГУЛОЛОГИЯ

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
Instrumentation Laboratory		
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-HCl (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:

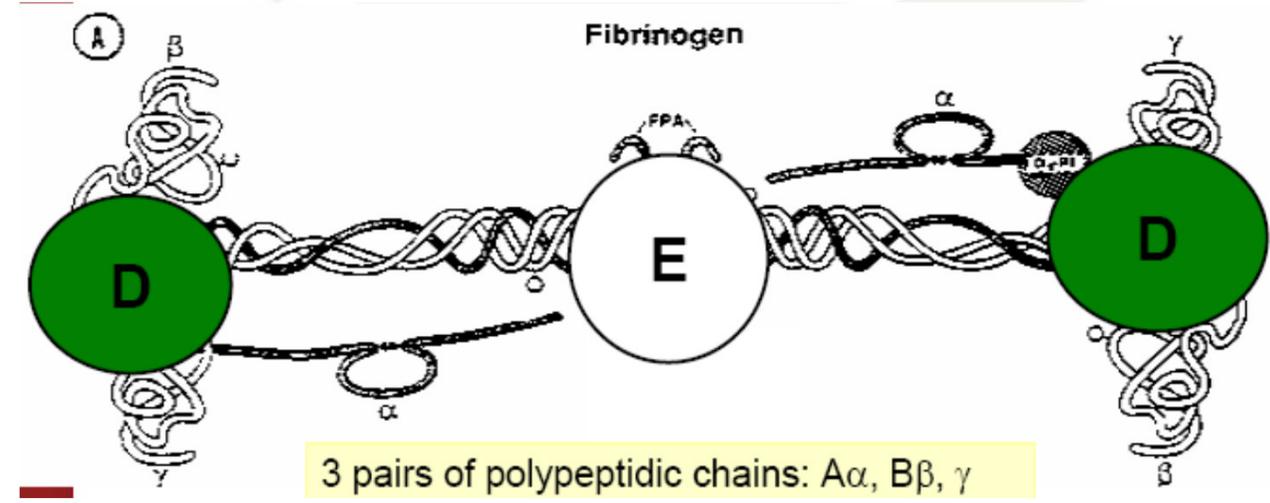
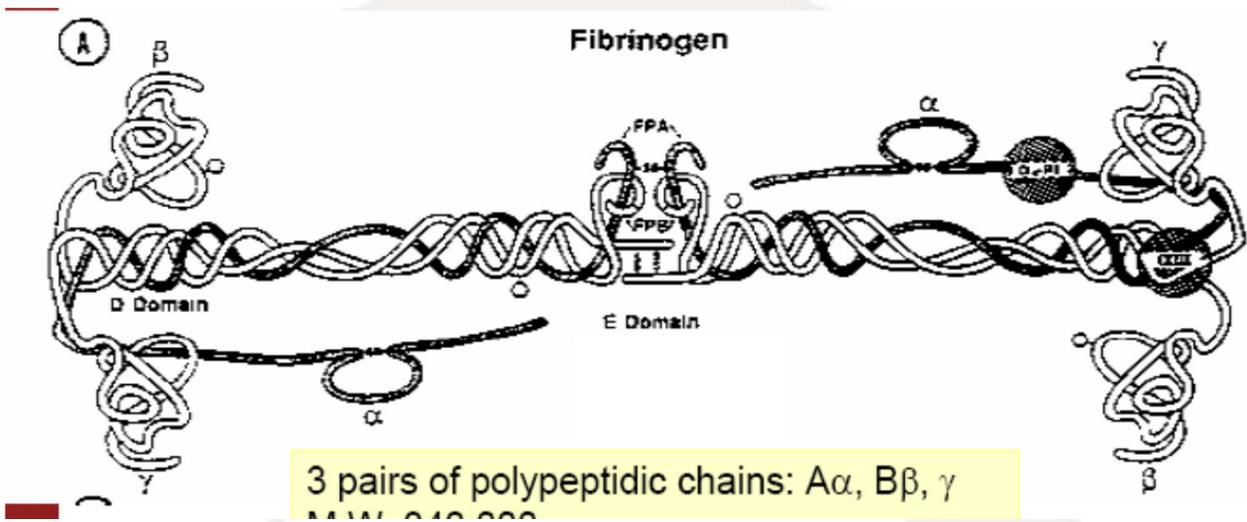
Анализатор гемостаза + реагент

- Оптические,
- Механические,
- Оптико-механические методы детекции (сгустка)

Маркеры активации свертывания

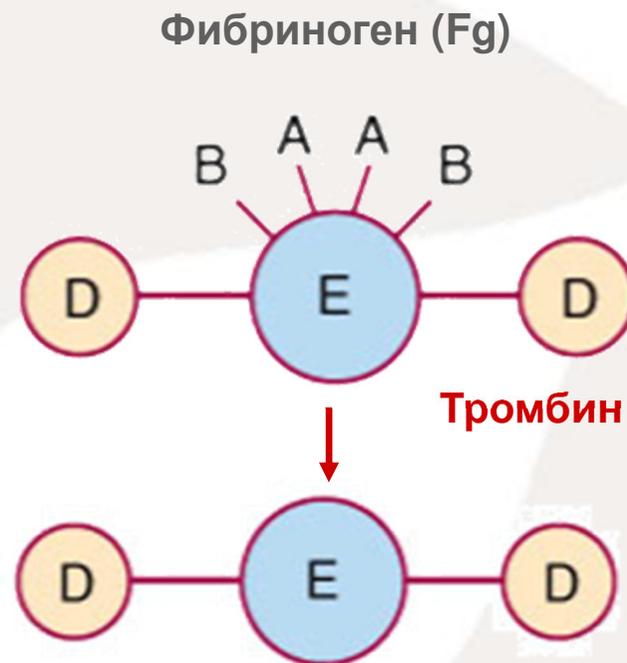
- Маркеры, связанные с продукцией фибрина
 - D-димер
 - ПДФ (продукты деградации фибрина/фибриногена)
 - Фибрин-мономер (FM)/растворимый фибрин (SF)

Фибриноген



Физиологическая коагуляция

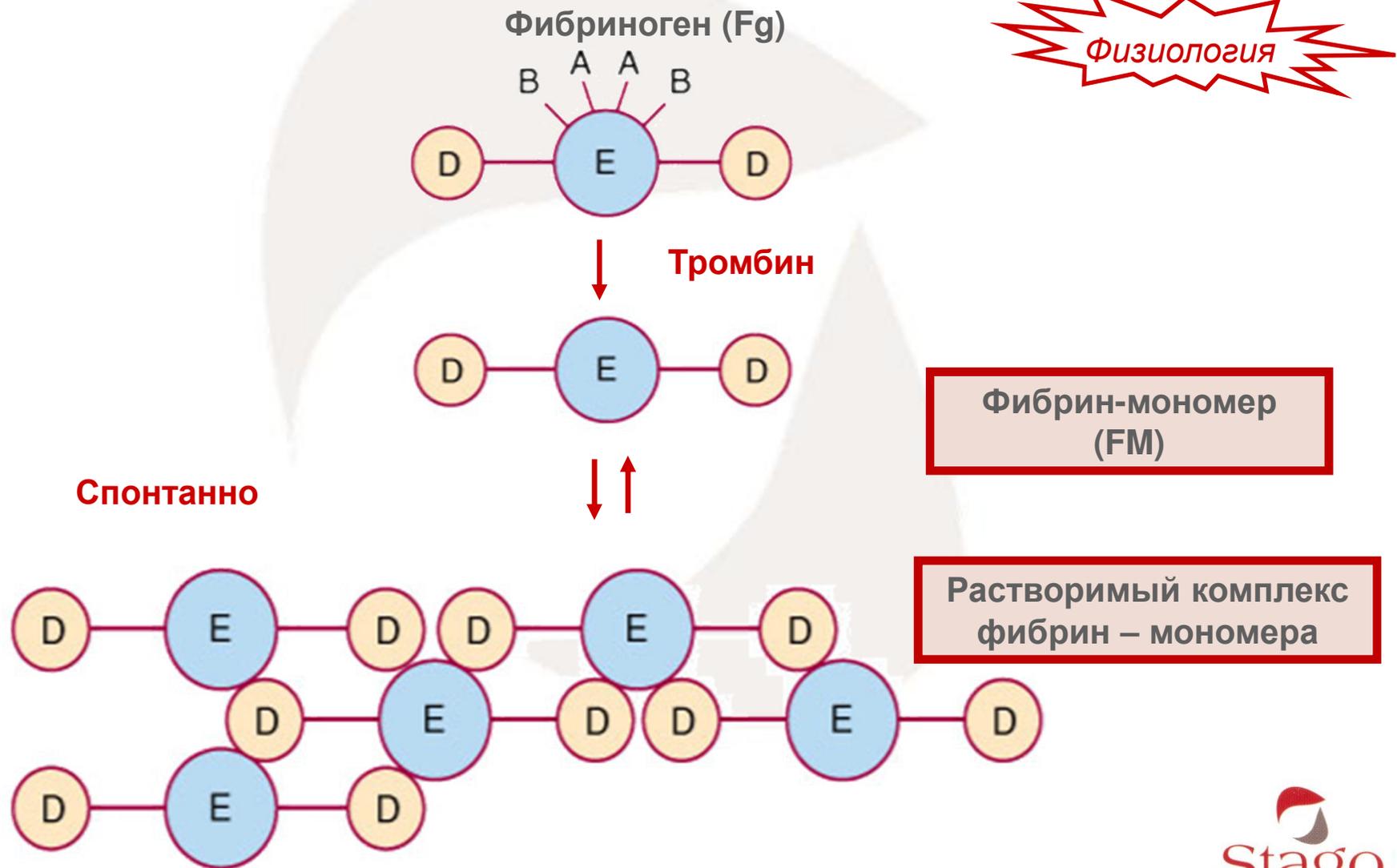
Образование и деградация фибрина



Фибрин-мономер
(FM)

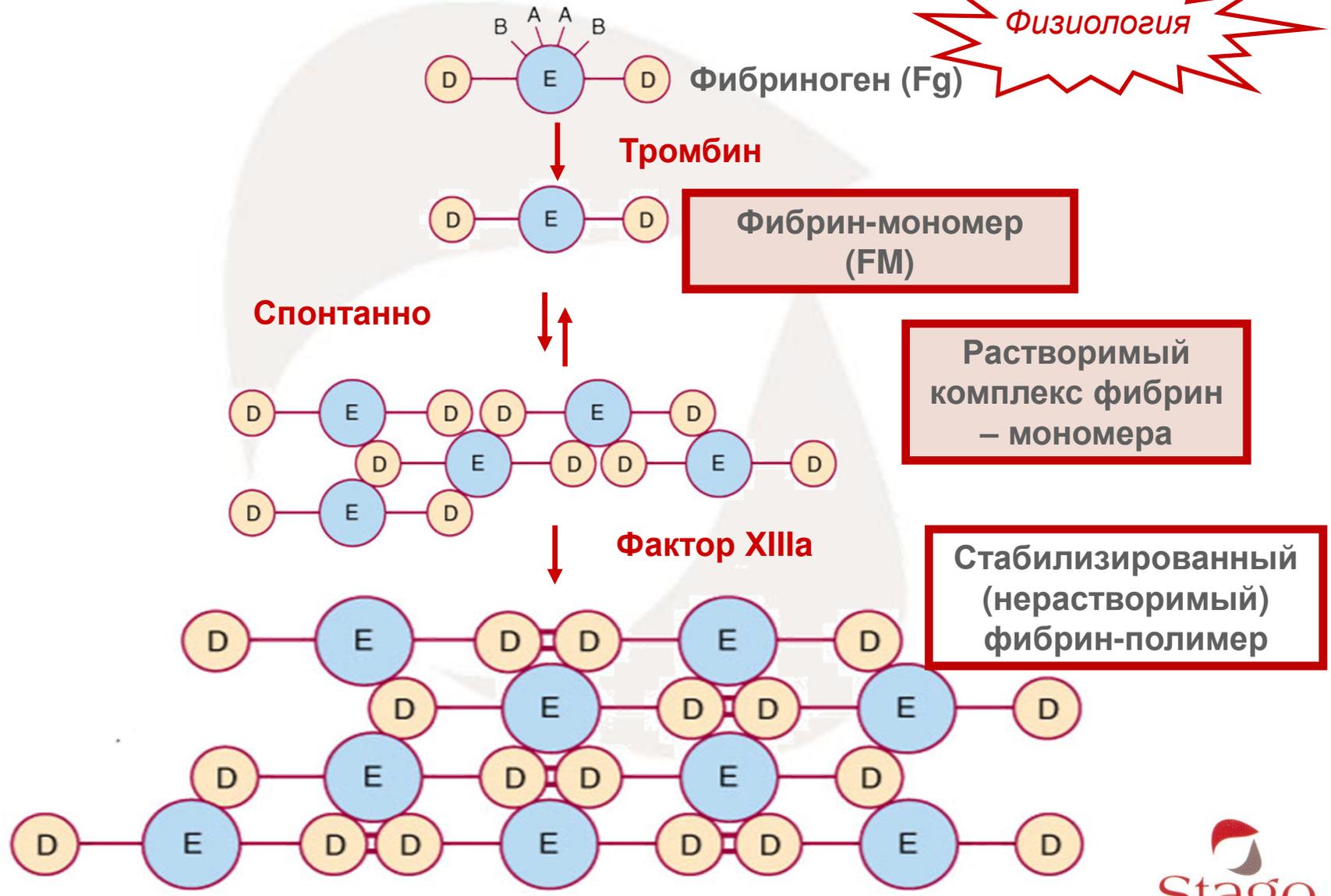
Физиологическая коагуляция

Образование и деградация 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
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

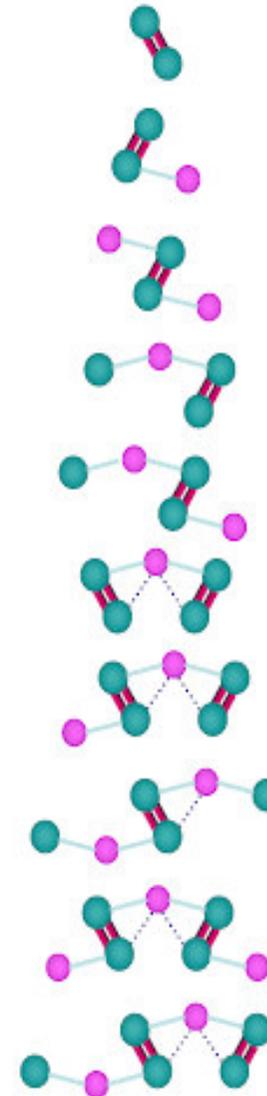
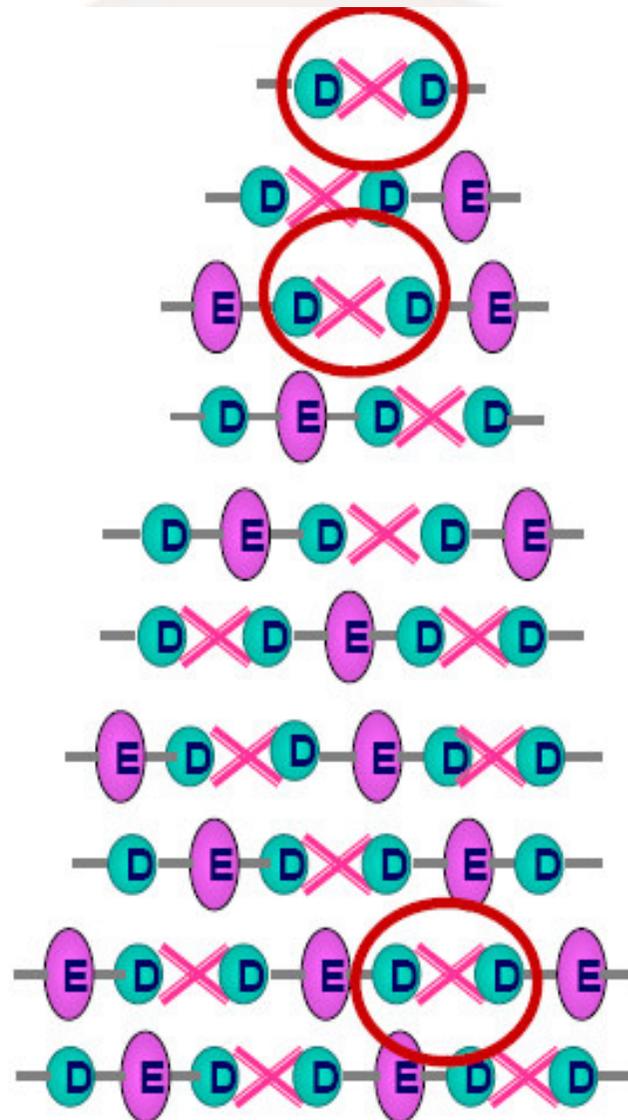
DXD

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

Ограничения в использовании D-димера

→ D-димер может быть отрицательным

- ❖ при ТЭЛА, если сгусток старый (2 недели и более после образования тромба)
- ❖ У больных с гипофибринолизом
- ❖ У больных с подозрением на ТГВ/ТЭЛА, получающих гепарин, варфарин или НОАК

→ D-димер должен быть использован с осторожностью (низкая специфичность):

- ❖ До 30 дней после оперативных вмешательств
- ❖ Поздние сроки беременности
- ❖ Онкология
- ❖ У пациентов на лизисной терапии и заболеваниями крови

→ D-димер может быть ложно завышенным при наличии высокого титра IgM, РФ и антимышиных антител

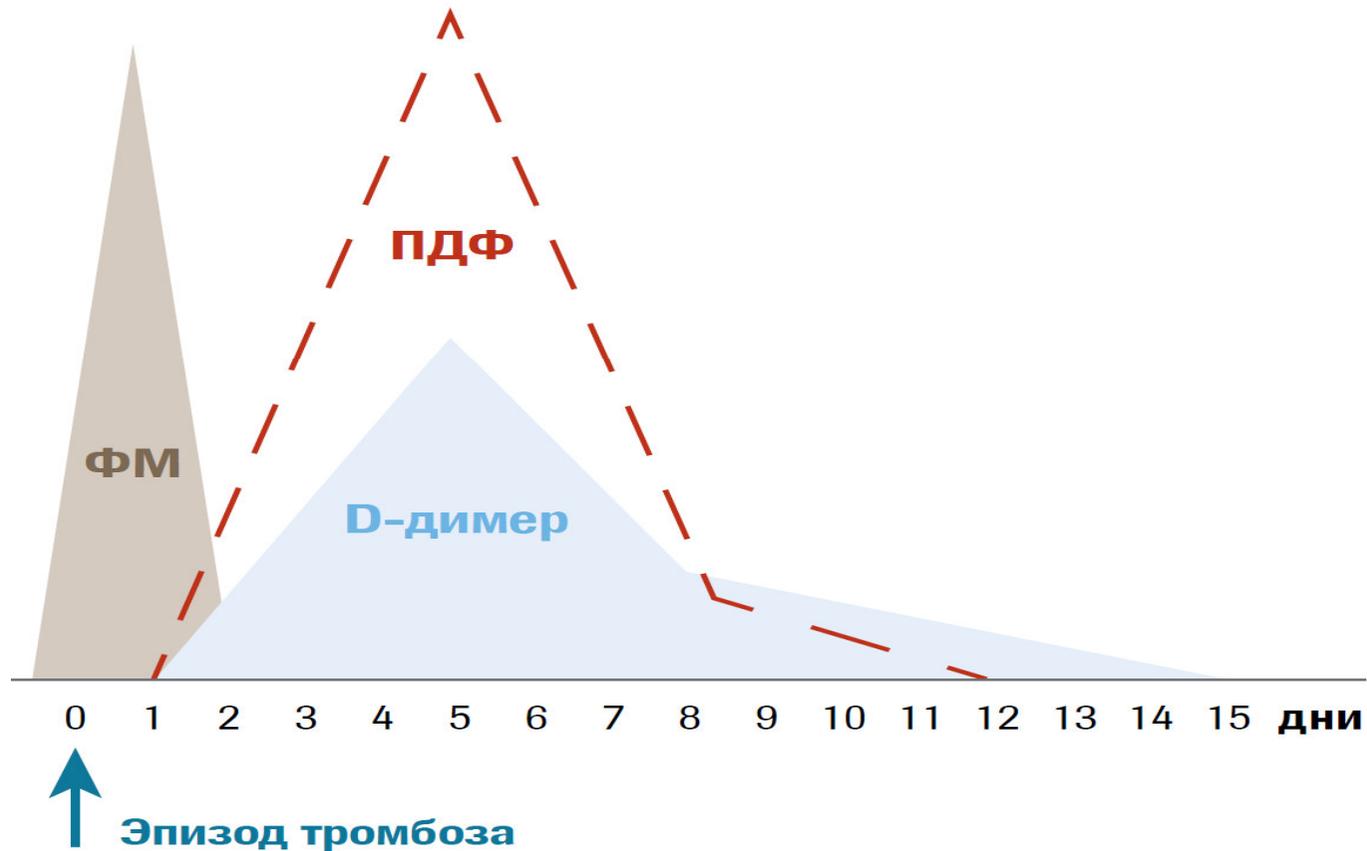
D-димер – оценка результата

- Повышение уровня D-димера может наблюдаться при множестве клинических ситуаций
- Любой результат с повышенным уровнем D-димера должен быть внимательно рассмотрен (вероятность развития тромбоза очень велика)
- Уровень D-димера ниже cut-off означает отсутствие активного сгустка, т.е. вероятность развития тромбоза очень низка

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



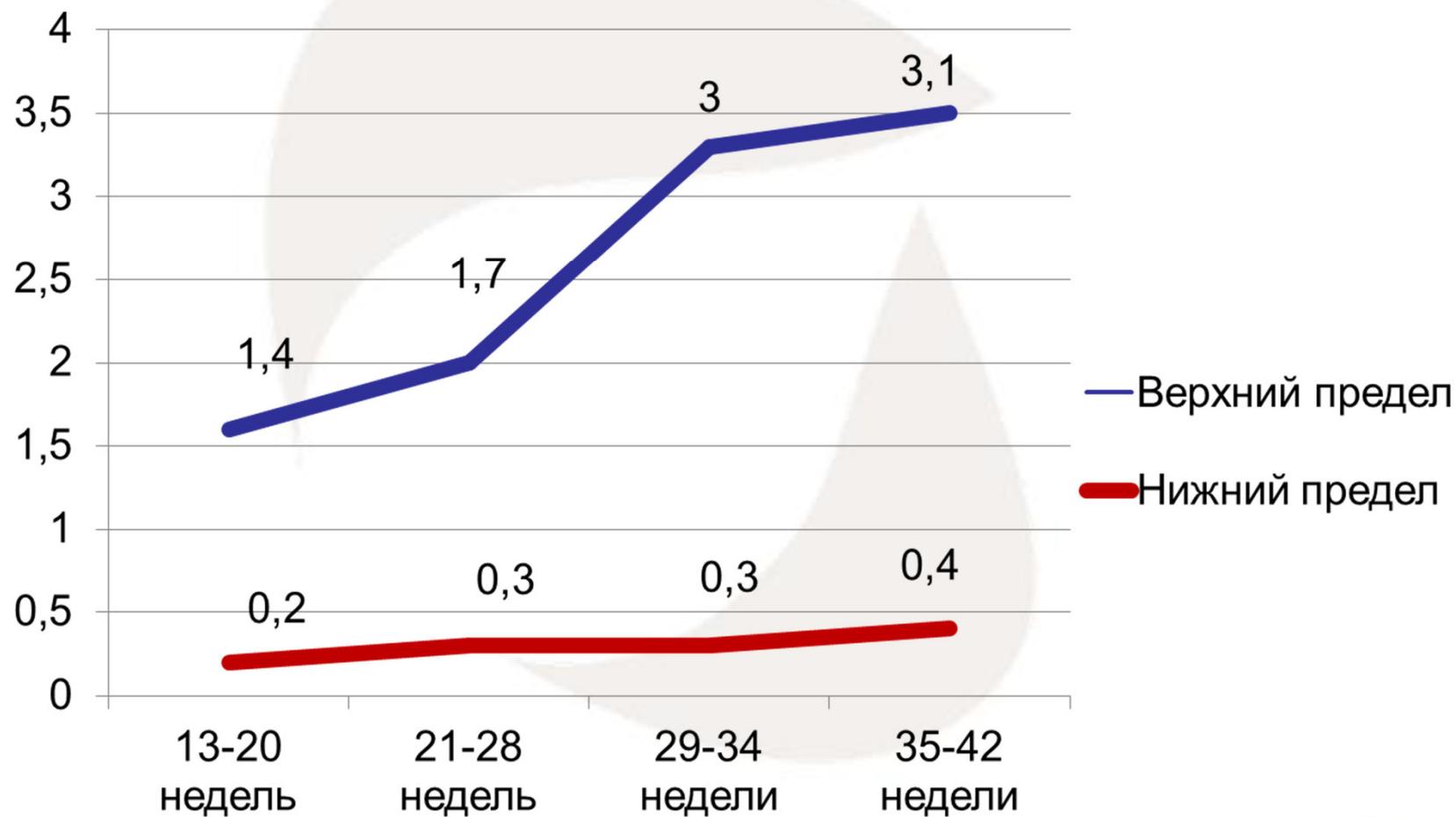
1. ФМ - пре-тромботический маркер

→ Используется для ранней диагностики гиперкоагуляционного статуса

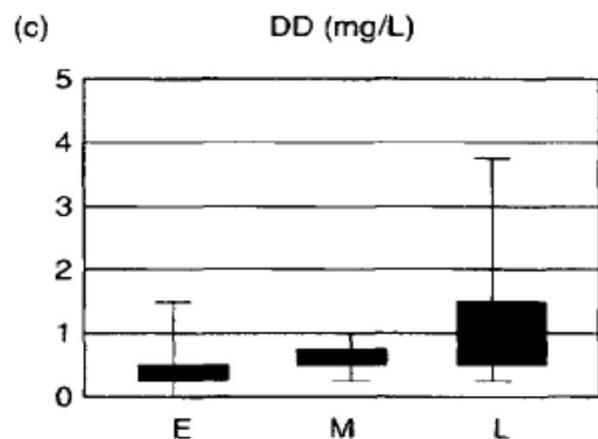
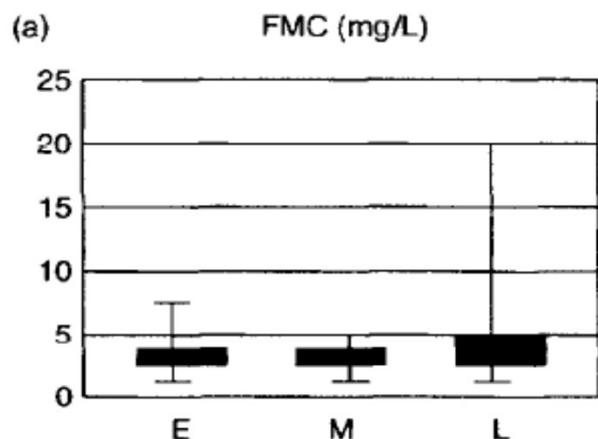
2. D-димер/ПДФ - маркеры фибринолиза

→ используются для мониторинга тромботических состояний

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

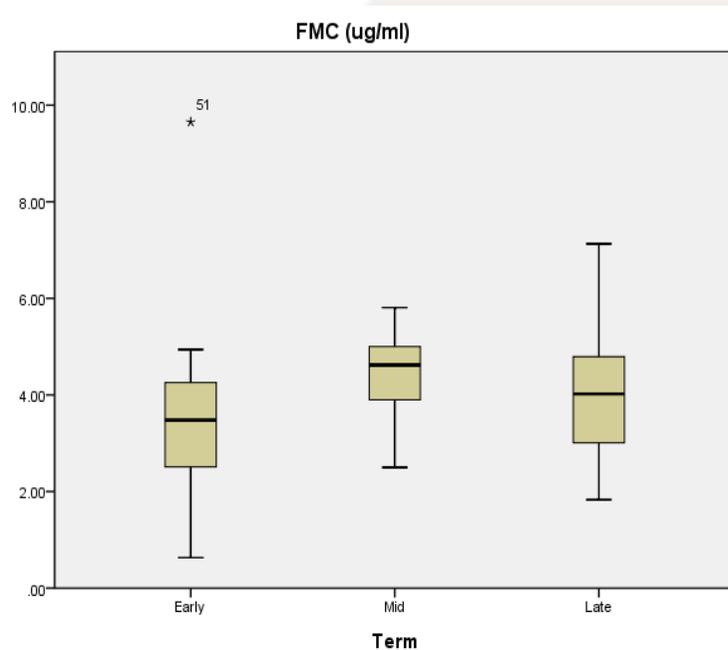
Hiroaki Onishi¹, Kimiko Kaniyu¹, Mitsutoshi Iwashita², Asashi Tanaka³ and Takashi Watanabe¹

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

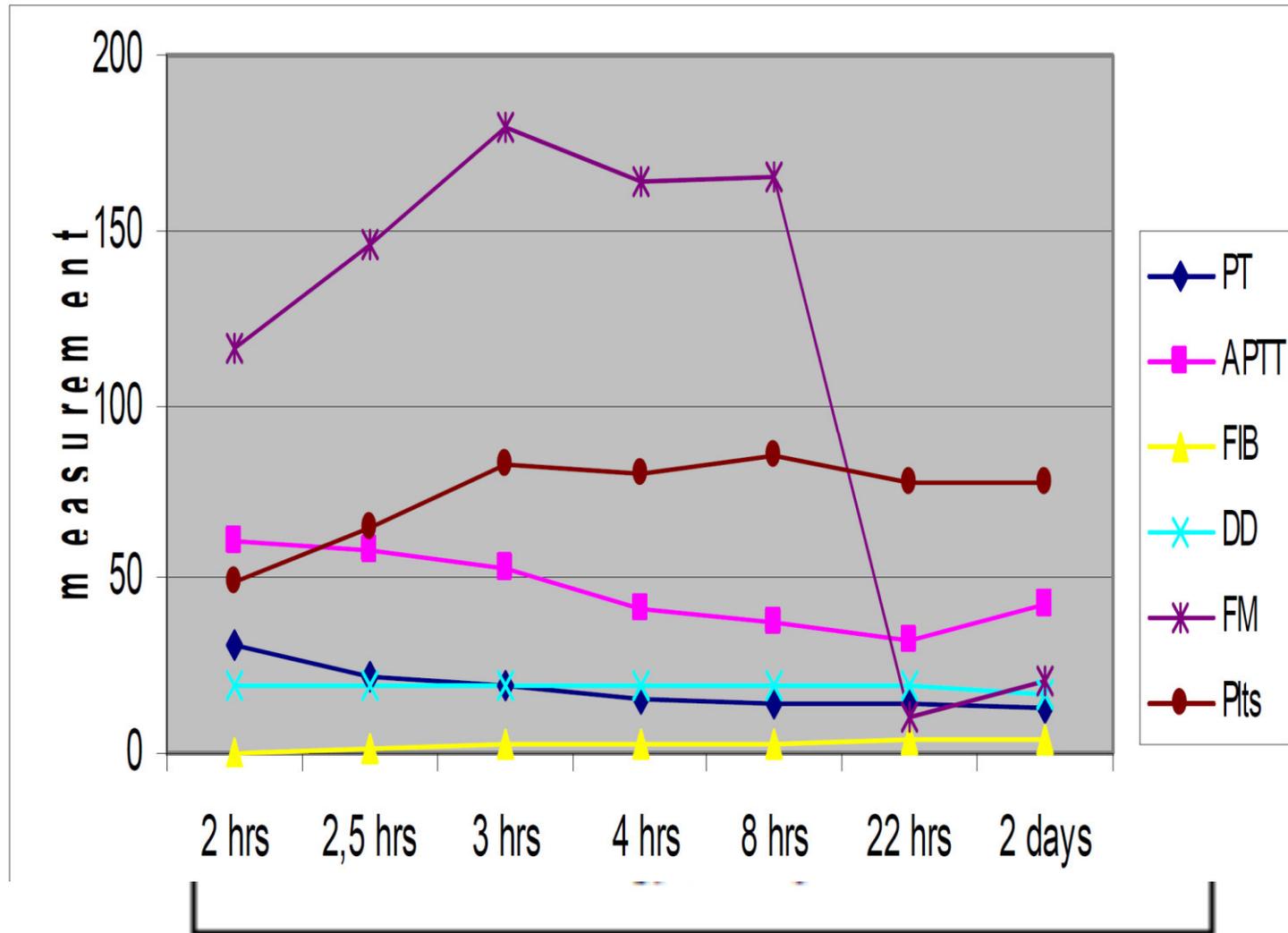
3 триместр	ФМ (мкг/мл)
n=	38
Mean	4
Range (min-max)	1.2-6.4

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**

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

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



Скрининг ВТЭ у беременных

- Use of fibrin monomer complex for screening for venous thromboembolism in the late pregnancy and post-partum period

J. Obstet. Gynaecol. Res. 2013

Table 1 Characteristics of patients in whom a thrombus was detected by ultrasonography

Case	Gestational age (weeks + days)	FMC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	D-dimer ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	37 + 1	194	9.62
2	36 + 6	86.38	3.31
3	36 + 2	89.33	3.44
Embolism case	Delivery day	89.1	1.81
	36 + 2	4.88	1.17

FMC, fibrin monomer complex.

Диагностика ТГВ и ТЭЛА

➤ New Combinational Assay Using Soluble Fibrin and Ddimer Determinations: A Promising Strategy for Identifying Patients with Suspected Venous Thromboembolism

Shahsoltan Mirshahi, Claudine Soria, Basile Kouchakji, Ge´rald Kierzek, Jeanne Yvonne Borg, Re´mi Varin, Jean Chidiac, Ludovic Drouet, Massoud Mirshahi, Jeannette Soria*

PLOS ONE | www.plosone.org 1 March 2014 | Volume 9 | Issue 3 | e92379

Table 5. Sensitivity, Specificity, Positive- (PPV) and Negative-Predictive Values (NPV) (95% Confidence Intervals) for Soluble Fibrin (SF) and D-dimer concentrations in Pulmonary Embolism and Deep Vein Thrombosis.

Parameter	Pulmonary embolism			Deep vein thrombosis		
	SF	D-dimer	p	SF	D-dimer	p
Sensitivity	0.94 (0.86–1)	0.94 (0.86–1)	NS	0.92 (0.83–1)	0.96	NS
Specificity	0.95 (0.87–1)	0.54 (0.38–0.7)	<0.01	0.86 (0.66–0.98)	0.5 (0.29–0.7)	<0.01
PPV	0.94 (0.86–1)	0.65(0.51–0.78)	<0.01	0.89 (0.74–0.99)	0.70 (0.56–0.85)	<0.01
NPV	0.95 (0.87–1)	0.91 (0.79–1)	NS	0.90 (0.77–1)	0.92 (0.76–1)	NS

Ранняя диагностика ИМ

➔ Tohoku J. Exp. Med., 2009, 219, 25-31

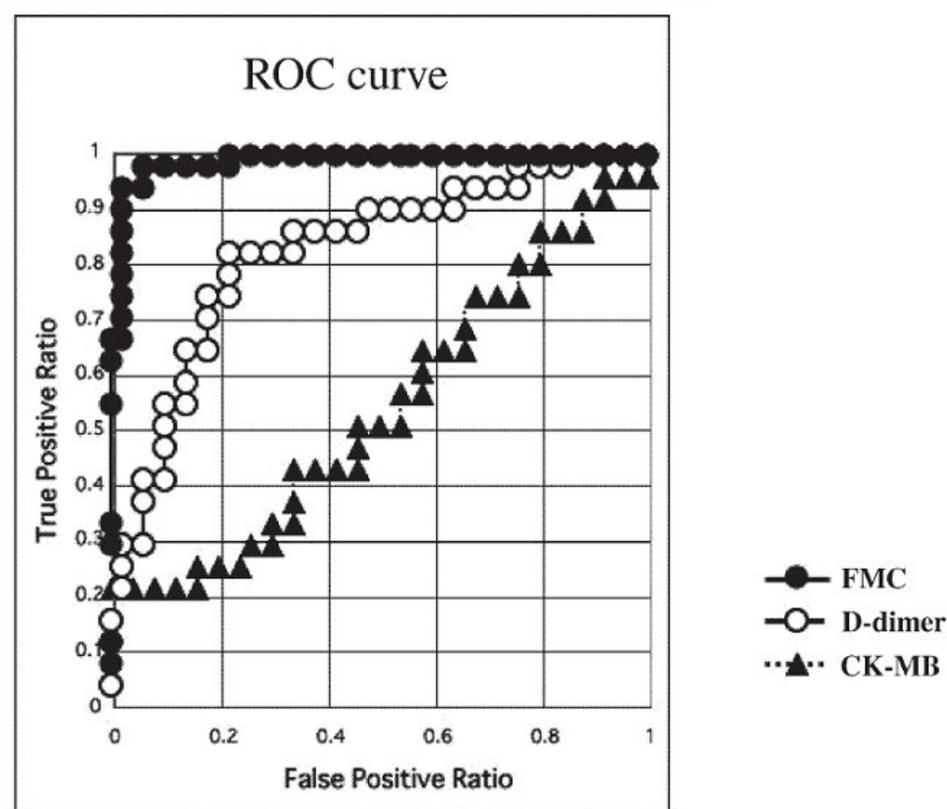


Fig. 3. ROC analysis for early diagnosis of MI within 24 hours of onset.
Closed circles: FMC, open circles: D-dimer, closed triangles: CK-MB.

Дифференциальный диагноз вариантов ишемического инсульта

Study of Hemostatic Biomarkers in Acute Ischemic Stroke by Clinical Subtype

Koji Hirano, MD, PhD,* Shutaro Takashima, MD, PhD,* Nobuhiro Dougu, MD, PhD,*
Yoshiharu Taguchi, MD, PhD,* Takamasa Nukui, MD, PhD,* Hirohumi Konishi, MD,*
Shigeo Toyoda, MD,* Isao Kitajima, MD, PhD,† and Kortaro Tanaka, MD, PhD*

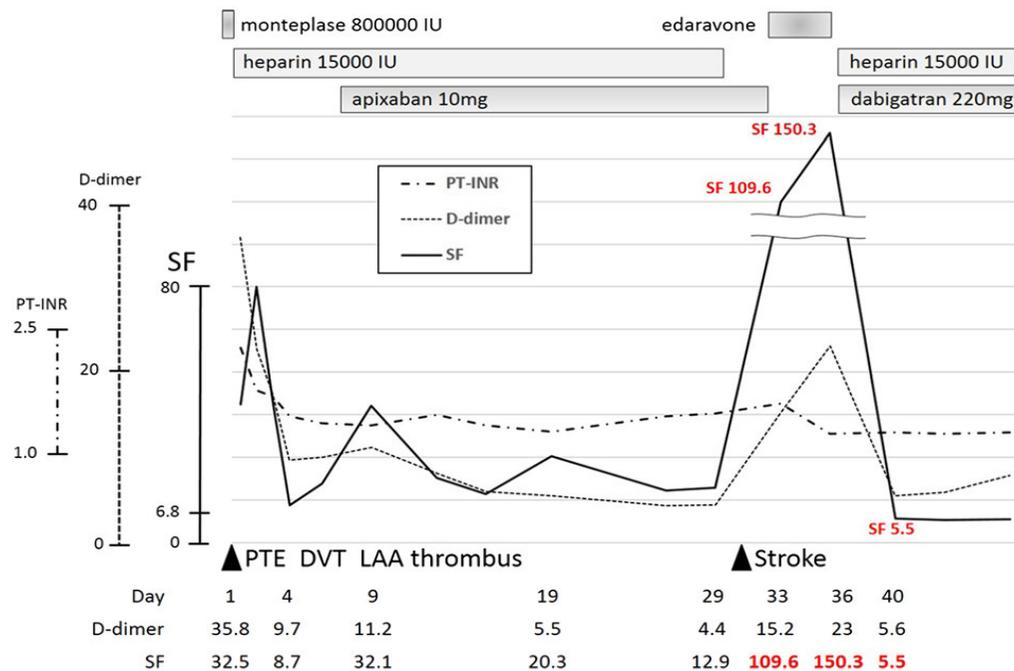
Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, Vol. 21, No. 5 (July), 2012: pp 404-410

Увеличенный уровень ФМ указывает на
кардиоэмболическую форму ишемического инсульта

ФМ и выбор эффективной антикоагулянтной терапии

➔ Kawakami et al. Thrombosis Journal (2015) 13:23

The role of soluble fibrin during anticoagulant therapy: a case report



Автоматические методы определения маркеров активации свертывания

STA[®] - Liatest[®] D-Dimer

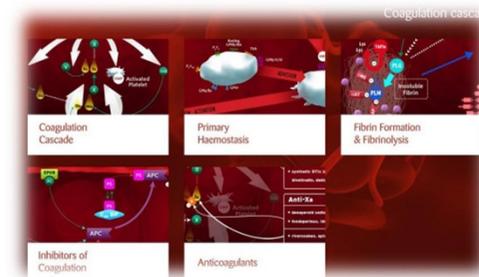
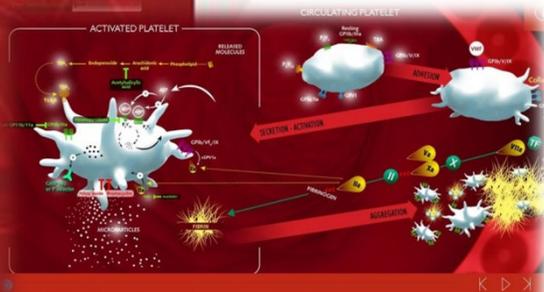
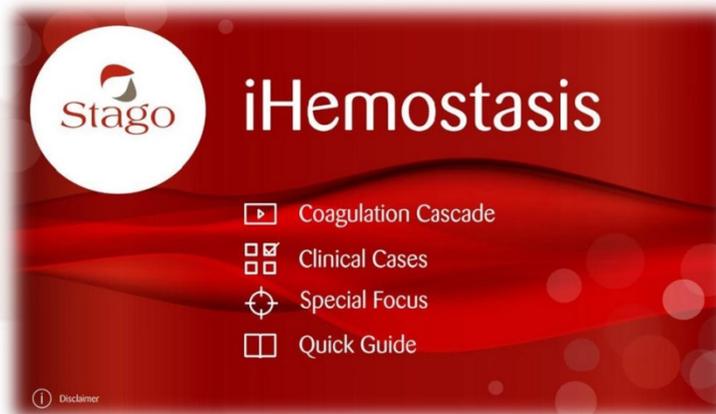
STA[®] - Liatest[®] FM

STA[®] - Liatest[®] FDP

Бесприборные тесты тромбообразования

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

Бесплатное обучающее приложение iHemostasis для смартфонов/планшетов (на базе iOS и Android) уже доступно в iTunes и Google Play



1. Физиология системы гемостаза
2. Клинические случаи
3. Фокус: гепарин индуцированная тромбоцитопения (ГИТ), ДВС и маркеры активации свертывания, новые оральные антикоагулянты (НОАК)
4. Краткий справочник: патогенез и диагностика нарушений системы гемостаза

➔ Спасибо за внимание 😊

We  **Coag**

www.hemostatica.ru

www.stago.com