



Обязательна ли при отсроченном исследовании на ВА заморозка плазмы именно на -70°C , или можно замораживать на -20°C ? Не приводит ли заморозка на -20°C к разрушению каких-либо комплексов, существенных для диагностики АФС?

Prof. Vittorio Pengo / Prof. Armando Tripodi:

При заморозке на -20°C со временем может разрушаться фактор свертывания VIII, что может приводить к некорректным результатам в модифицированном тесте АЧТВ. Таким образом, допустима заморозка при -20°C (хранение пробы до 1 месяца), для более отсроченного исследования требуется заморозка при -70°C (хранение пробы до 2ух лет).

Те же авторы в 2009 году дают следующие рекомендации:

1. Забор крови у пациентов производится перед началом приема антикоагулянтных препаратов или по прошествии достаточного времени после прекращения их приема.
2. Венозная кровь отбирается в пробирку с 0,109 М цитратом натрия в соотношении 9:1.
3. Рекомендуется проводить двойное центрифугирование. Повторное центрифугирование позволяет получить образцы с минимальным содержанием тромбоцитов. После первичного центрифугирования (при 2000g в течение 15 минут при комнатной температуре) при помощи пластиковой пипетки плазма переносится в чистую пластиковую пробирку для центрифугирования, после чего центрифугируется повторно при увеличенной скорости (2500g) в течение 10 минут. Следите, чтобы при перенесении аликвоты плазмы во вторичную пробирку не захватывался осадок тромбоцитов со дна пробирки. Не рекомендуется использовать фильтрацию плазмы, поскольку это может привносить дополнительные искажения результатов (различный тип фильтра, количество фильтруемой плазмы, потери фактора Виллербранда при фильтрации) и увеличивает финансовые затраты.
4. Если проведение тестов по выявлению ВА откладывается, плазму необходимо немедленно заморозить. Чтобы избежать потери факторов свертывания, замораживание образцов должно производиться сразу после забора крови. Достаточно заморозить плазму в холодильной установке при температуре -70°C или ниже.
5. Размораживать плазму необходимо при 37°C . Перед проведением анализов замороженная плазма должна быть разморожена в течение 5 минут на водяной бане при 37°C , чтобы предотвратить холодовую активацию свертывания, а затем тщательно перемешана.

Обновление руководства по определению волчаночных антикоагулянтов. V. Pengo, A. Tripodi, G. Reber, J.H. Rand, T.L. Ortel, M. Galli, P. G. de Groot. JTH



Нужна ли постановка теста dRVVT (подтверждение), если dRVVT (скрининг) - отрицательный? Не приведет ли это к гипердиагностике?

Prof. Armando Tripodi:

Останавливать диагностические процедуры в случае, если тест на скрининг оказался отрицательным является целесообразным, так как если значение теста на скрининг не выходит за рамки нормального, то это говорит о том, что ВА отсутствуют в исследуемом образце (первым критерием их присутствия является аномальный результат для скринингового теста). Может возникнуть вопрос, какие результаты для данного образца будут получены в тесте на подтверждение? Варианта два: результаты теста на подтверждение практически такие же, как и для теста на скрининг (вывод - ВА отсутствуют), или время для подтверждения короче, чем время для скрининга (вывод - ВА присутствуют, но, так как тест на скрининг показал отрицательный результат, скорее всего данные результаты являются ложно-положительными).

Единственной убедительной причиной, по которой можно решить продолжать диагностику после негативных результатов скринингового теста, является присутствие ВА-кофактора - очень редкий случай, описанный много лет назад. В этих случаях значения для скринингового теста близки к нормальному или лишь незначительно удлинены и ВА не проявляют активности, кроме случаев, когда плазма пациентов смешана с нормальной плазмой. Было выяснено, что нормальные времена свертывания в скрининговых тестах сильно удлиняются при миксовых тестах, так как в нормальной плазме присутствует кофактор, необходимый для полноценной экспрессии ВА, при этом он отсутствует в плазмах пациентов. Однако в любом случае такие ситуации (их реальная частота не была исследована) могут быть выявлены только при помощи миксовых стадий, которые отсутствуют в интегрированных тестах (таких, как SCT).

Я бы советовал прекращать диагностику, если скрининговый тест дает нормальные результаты (ниже порогового уровня) и проводить миксовые тестирования, если результаты скринингового теста выше порогового уровня. Для подтверждения положительных результатов для скрининга необходимо ставить подтверждающий тест.



Известно, что определение волчаночных антикоагулянтов у пациентов, принимающих варфарин, затруднено. Результаты тестов на присутствие волчаночных антикоагулянтов для пациентов с МНО более 1,5 будут не корректными, и в этих случаях следует временно прекратить прием антикоагулянтов или перевести пациента на низкомолекулярный гепарин. Можно ли оценивать присутствие волчаночных антикоагулянтов на фоне приема НОАК?

Prof. Vittorio Pengo / Prof. Armando Tripodi:

Ситуация с новыми антикоагулянтами (прямыми ингибиторами Ха фактора) аналогична определению ВА на фоне приема других антикоагулянтов. Если МНО на фоне приема НОАК не превышает 1,5 – результаты можно считать достоверными.

Те же авторы в 2009 году дают следующие рекомендации:

Выявление ВА у пациентов находящихся на длительном лечении антагонистами витамина К (АВК).

1. При применении АВК удлиняется общее время свертывания, что осложняет интерпретация результатов анализа на ВА. Чтобы исключить ошибочную интерпретацию результатов, рекомендуется проводить лабораторные исследования через 1-2 недели после прекращения лечения АВК, после того, как МНО опустится ниже 1,5. Рекомендуется прекращение терапии АВК и терапии низкомолекулярным гепарином, причем последнее введение низкомолекулярного гепарина должно проводиться за 12 и более часов до анализа крови на ВА.

2. В противном случае, если значения МНО находятся между 1,5 и 3,0, можно использовать плазму пациента, разведенную пулом нормальной плазмы в соотношении 1:1. Следует отметить, что и после разведения интерпретация результатов может оставаться затруднительной, и что содержание ВА в этом случае будет снижено в два раза.

Обновление руководства по определению волчаночных антикоагулянтов. V. Pengo, A. Tripodi, G. Reber, J.H. Rand, T.L. Ortel, M. Galli, P. G. de Groot. JTH

Антикоагулянтная терапия



Какие существуют методики/рекомендации по синхронизации МНО между разными инструментами и реагентами? Можно ли осуществлять мониторинг МНО пациентов на ОАК (антагонисты витамина К) на разных инструментах/реагентах?

GALEN:

МНО было создано, чтобы можно было осуществлять мониторинг ОАК независимо от того, где был проведен анализ. Если

- соблюдаются рекомендации по приему препарата и преаналитике,
- правильно определено значение среднего протромбинового времени,
- выполняется внешний контроль МНО (INR Validate) и результаты отклоняются не более чем на 15%,

то результаты таких лабораторий можно сравнивать.



Какой интервал после последней дозы НОАК является оптимальным для забора крови на тестирование эффективности НОАК?

GALEN:

Измерение активности антикоагулянтов проводят в двух ситуациях:

1. Когда требуется подобрать дозу препарата (пациент ведется в терапевтическом интервале концентраций, здесь время забора крови имеет критическое значение), однако для НОАК терапевтические интервалы на данный момент не выработаны.
2. В некоторых ситуациях (подтверждение отсутствия препарата перед инвазивными вмешательствами, подтверждение отсутствия препарата перед началом тромболитической терапии, оценка приверженности пациента к терапии, оценка возможной причины гипокоагуляции в случае гемморагических осложнений, оценка возможной причины гиперкоагуляции в случае неэффективности терапии) требуется определить концентрацию препарата. Максимальная концентрация препарата в плазме для НОАК достигается через 1-3 часа после приема. В случае больших кровотечений или срочных операций, время забора крови не имеет решающего значения, а решающее значение имеет минимально- и максимально- допустимая концентрация препарата в плазме, для ее определения необходима существенная статистика, которая наберется только со временем.

Венозный тромбоз



Как использовать тест ПДФ и как предлагать данный тест, если лаборатория всегда делала только d-димер? Насколько он информативен? Для клинической оценки вероятности ДВС используются маркеры тромбообразования (например, d-димер), ПДФ также расценивается как маркер тромбообразования. Достаточно ли использовать один из этих тестов, или желательно оценивать результаты как d-димера, так и ПДФ? Какая дополнительная информация может быть получена из оценки обоих тестов по сравнению с одним d-димером или ПДФ? Какие еще клинические ситуации, кроме ДВС, могут нуждаться в анализе ПДФ и как трактовать результаты, если нет cut off?

Dr. Alberto Tosetto / Проф. А. Б. Добровольский:

При использовании теста на d-димер для исключения ТГВ и ТЭЛА, ПДФ и РФМК не дают дополнительной информации.

С другой стороны, соотношение между низкомолекулярными (ПДФ) и высокомолекулярными (РКФМ) производными может существенно отличаться при ряде патологий. Однако исследований, в которых прямо сравнивались разные методы очень мало. Более того, известно, что тесты на d-димер разных производителей могут на порядок отличаться по чувствительности к низко- и высокомолекулярным продуктам деградации фибриногена и все сопоставления относятся только к тем реактивам, которые сравнивались.



Известно, что для некоторых случаев специфичность d-димера снижается (пожилые, госпитализированные пациенты, пациенты с повторной ВТЭ), что приводит к ложноположительным результатам. Зная это, верно ли рекомендовать специфичные cut off для разных групп пациентов? Существуют ли публикации с cut off для пожилых пациентов на платформе IL? Рекомендуете ли вы использовать эти нормы в клинической практике?

Dr. Alberto Tosetto:

Использование пороговых значений, специфичных для различных групп пациентов, повышает специфичность исследования. Для пожилых пациентов рекомендуется использовать следующий алгоритм:

Для пациентов моложе 50 лет:

d-димер cut off (нг/мл) = 230 нг/мл

d-димер cut off (FEU) = 500 FEU

Для пациентов старше 50 лет:

d-димер cut off (нг/мл) = Возраст x 5

т.е. для 70 лет cutoff = 350 нг/мл

d-димер cut off (FEU) = Возраст x 10

т.е. для 70 лет = 700 FEU

Using an age-dependent D-dimer cut-off value increases the number of older patients in whom deep vein thrombosis can be safely excluded. Douma RA et al., Haematologica. 2012 Oct;97(10):1507-13.



D-димер может использоваться в качестве прогностического маркера при определении вероятности повторного тромбоза у пациентов с тромбозом в анамнезе. Для пациентов, у которых d-димер повышен, вероятность тромбоза выше, чем для пациентов, у которых d-димер ниже cut off. Если у пациента d-димер ниже cut off, но он принимает АКТ, то делать выводы о вероятности тромбоза нельзя. Является ли целесообразным отменять АКТ в целях проверить реальную вероятность развития рекуррентного тромбоза или нет? И является ли интервал 3-4 недели безопасным для пациента? Аналогичная ли ситуация для НОАК?

Prof. Gualtiero Palareti:

Независимо от того, какой антикоагулянт применяется (варфарин, НОАК или др.), на фоне терапии d-димер будет снижен. После отмены антикоагулянта для части пациентов d-димер останется в пределах нормы, а для других пациентов d-димер будет повышен. Такое повышение после отмены терапии и можно рассматривать как прогностический маркер повышенной вероятности повторного тромбоза.

? Существуют ли публикации с нормальными диапазонами d-димера для беременных на платформе IL? Рекомендуете ли вы использовать эти нормы в клинической практике?

Prof. Gualtiero Palareti / Проф. А. Б. Добровольский:

Существует ряд публикаций, определяющих значения d-димера у пациенток на различных сроках беременности. Однако, до сих пор нет публикаций, однозначно показывающих, что назначение антикоагулянтной терапии пациенткам с повышенным d-димером снижает риск осложнений беременности. Более того, еще нет работ, в которых было бы показано, что использование дифференциальных значений d-димера для разных сроков беременности повышает специфичность теста в диагностике тромбозов.

? На конец 2013 – начало 2014 была намечена публикация мультицентрового исследования под руководством Пьера Туллона по получению педиатрических норм. Получены ли уже эти нормы? Рекомендуете ли вы использовать эти нормы в клинической практике?

GALEN:

Исследование еще не завершено. Однако, недавно были опубликованы референсные диапазоны для приборов Siemens. Из публикации видно, что до 19 лет фибриноген снижен, что приводит и к удлинению тромбинового времени, по сравнению с пациентами старше 19 лет. И чем меньше возраст, тем ниже среднее значение по фибриногену. С другой стороны, на приборах и реагентах Инструментэйшн Лаборатори также было проведено исследование в Астраханской области, где разницы для разных возрастных групп обнаружено не было.

? Встречаем в практике случаи повышения d-димера (бывают значительные) у пациентов при отсутствии воспалительных, онкологических, аутоиммунных и послеоперационных процессов. В инструкциях к наборам упоминается о влиянии ревматоидного фактора на показатель d-димера. Но и ревматоидный фактор у данных пациентов в норме. Что может ещё влиять на показатель d-димера? Возможно ли влияние предшествующих инъекции иммуноглобулина (например, при прививках)?

Dr. Alberto Tosetto:

d-димер является неспецифическим маркером активации свертывающей системы. Известные причины, приводящие к повышению d-димера выше порогового значения, но не связанные с ТГВ или ТЭЛА (снижение специфичности):

- Возраст
- Нормальная беременность
- Онкология
- Мерцательная аритмия
- Внутрисердечный тромб
- ДВС
- Преэклампсия и эклампсия
- Аномальный фибринолиз; использование тромболитических средств
- Сердечнососудистые заболевания
- Тяжелая инфекция / сепсис / воспаление
- Хирургия / травма (например, ишемии тканей, некроз)
- Вазоокклюзивный эпизод серповидно-клеточной анемии
- Тяжелые заболевания печени (сниженный клиренс)
- Нефротический синдром (например, тромбоз почечных вен)
- Острая почечная недостаточность
- Хроническая почечная недостаточность и сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания
- Нарушение развития вен
- Синдром системного воспалительного ответа

Гепарин-индуцированная тромбоцитопения



В статье Patrick AR et al. Pharmacoconomics. 2007; 25 (11): 949-961 делается вывод, что ни одна стратегия ведения ГИТ (из четырех) не является эффективной на 100% для всех тестируемых пациентов. Степень эффективности зависит от конкретного пациента. Из вашего опыта, какие стратегии можно рекомендовать для различных групп пациентов?

Dr. Davide Imberti:

В нашем центре мы используем следующую стратегию при подозрении на ГИТ:

- Немедленная остановка терапии гепарином (даже НМГ).
- Старт терапии альтернативными (не-гепариновыми: лепирудин (Рефлудан), арготробан (Новостан), данапароид (Оргаран)) антикоагулянтами в терапевтической дозировке не дожидаясь ответа лаборатории.
- Избегать или отложить назначение препаратов кумаринового ряда до восстановления и стабилизации нормального количества тромбоцитов.
- Избегать трансфузии тромбоцитов.
- Лабораторный тест на антитела ГИТ.
- Провести дуплексное ультразвуковое сканирование сосудов нижних конечностей для выявления возможного ТГВ.
- В случае если лабораторный тест и ультразвуковое сканирование - отрицательные, можно вернуться к терапии гепарином.

Реагенты Инструментэйшн Лаборатори



Планируются ли у ф. Инструментэйшен Лаборатори, а может и уже существуют, наборы реагентов для автоматических коагулометров для диагностики фибринолиза (т.к. мы до сих пор выполняем спонтанный эуглобулиновый фибринолиз ручным методом)?

GALEN:

У компании Инструментэйшн Лаборатори для диагностики нарушений фибринолиза существуют тесты Плазминоген и Ингибитор плазмина. В ближайшее время выпуск новых тестов не планируется.

Проф. А. Б. Добровольский:

Лизис эуглобулиновой фракции (спонтанный и Хагеман-зависимый) – это тесты 50-х гг. По современным представлениям они вряд ли дают какую-либо информацию о системе фибринолиза. Эти тесты можно определить как методы полуколичественного определения фибриногена, причем длительные и трудоемкие.



Активность системы протеина С снижена (использовали тест-«Тромбориск»). Дальнейшие исследования всех компонентов системы протеина С (на протеины С и S (полный комплекс тестов), РАПС, VIII фактор, ВА, плазминогена, гомоцистеина) дают нормальные результаты. Что дальше? Могут ли патология тромбомодулина или эндотелиального рецептора протеина С быть причиной неполноценности всей системы протеина С? И есть ли тесты (наборы) для их исследования?

Проф. А. Б. Добровольский:

На мой взгляд ценность теста Тромбориск заключается именно в том, что он позволяет выявлять нарушения функции системы протеина С, которые обусловлены не только дефицитом ее компонентов, но и другими причинами (нарушения метаболизма, воспаление и т.д.). К сожалению, публикаций по этому тесту еще очень мало.

? Каков полный комплекс наборов реагентов Вашей фирмы сейчас существует для полноценной диагностики болезни Виллебранда?

GALEN:

У компании Инструментейшн Лаборатори для диагностики болезни Виллебранда существуют следующие тесты:

- Антиген фактора Виллебранда (vWF:Ag). Определяет концентрацию фактора Виллебранда. Доступен на приборах ACL TOP, ACL Elite и AcuStar.
- Активность фактора Виллебранда (vWF:Act). Определяет функциональную способность фактора Виллебранда к связыванию с рецептором-мишенью на тромбоцитах (гликопротеиновый рецептор GP1b α). Доступен на приборах ACL TOP и ACL Elite.
- Ристоцетин кофакторная активность фактора Виллебранда (vWF:RCo). Определяет функциональную способность фактора Виллебранда к связыванию с рецептором-мишенью на тромбоцитах (гликопротеиновый рецептор GP1b α) в присутствии ристоцетина. Имеет хорошую корреляцию с ристоцетин-зависимой агрегацией тромбоцитов. Доступен на приборах ACL TOP и AcuStar.
- На 2015 год намечен выпуск теста Коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда (vWF:CB). Будет доступен на приборах ACL TOP и AcuStar.
- На 2016 год намечен выпуск теста ADAMTS-13. Будет доступен на приборах AcuStar.
- Фактор VIII.

	vWF:Ag	vWF:RCo	vWF:RCo/Ag отношение	FVIII	vWF:CB	vWF:CB/Ag отношение
Тип 1	↓	↓	1	↓	↓	N
Тип 1C	↓	↓	1 или ↓	↓	↓	N
Тип 2A	↓	↓↓	1	N или ↓	↓↓	↓
Тип 2B	↓	↓↓	1	N или ↓	↓	↓
Тип 2M	↓	↓	1	N или ↓	N или ↓	N или ↓
Тип 2N	↓	↓	1	↓↓↓	N или ↓	N
Тип 3	Отсутствие	Отсутствие	N/A	↓↓↓	Отсутствие	N/A

? Каковы основные причины, приводящие к повышению содержания фактора Виллебранда (антиген) в крови потенциально здоровых людей? Или, какие факторы могут повлиять на получение повышенных результатов ф. Виллебранда, когда все основные параметры системы гемостаза в норме? Довольно часто наблюдаются высокие (более 200%) результаты ф Виллебранда у поликлинических пациентов.

GALEN:

Повышение концентрации фактора Виллебранда чаще всего является следствием повреждения эндотелия сосудов. Нарушение сосудистой стенки может быть вызвано многими раздражающими факторами, такими как:

- атеросклероз
- артериальная гипертензия
- нарушение липидного обмена
- курение
- гипоксия
- избыточная масса тела
- воздействие веществ химической природы
- гормональные нарушения
- подагра
- вирусные и бактериальные инфекции

? Есть ли прямая корреляция между повышенным содержанием ф. Виллебранда и повышением активности FVIII?

Проф. А. Б. Добровольский:

Да, очень часто повышение vWF ассоциируется с повышением FVIII. Во-первых, vWF является носителем и "стабилизатором" FVIII, во-вторых – оба повышаются при многих патологиях.