

Организация лабораторной диагностики врожденных коагулопатий



КЛИМОВА Н.И.
Республиканский центр по лечению гемофилии
Санкт-Петербург

Приказ 380, приложение 12

**Расчетные нормы рабочего времени на проведение
клинических лабораторных исследований**

**Расчет годового бюджета рабочего времени
медицинского персонала КДЛ**

Наименование должности	Общегодовой бюджет рабочего времени, мин.	Годовой бюджет раб. времени на проведение исследований, мин.
Специалист с высшим образованием (36-раб. час./ нед.)	$232 \times 7,2 \times 60 = 100224$	$100224 \times 75 / 100 = 75168$
Специалист с высшим образованием (36-раб. час./ нед.)	$232 \times 7,7 \times 60 = 107184$	$107184 \times 75 / 100 = 80388$
Специалист со средним образованием (38,5-раб. час./ нед.)	$232 \times 7,7 \times 60 = 107184$	$107184 \times 75 / 100 = 85747 \text{ 2}$

Приказ 380, приложение 12

Расчетные нормы рабочего времени на проведение клинических лабораторных исследований

№	Наименование исследования	Время на 1 исслед. (мин.), затраченное специалистом	
		Со средним образовани ем	С высшим образованием
5.1	Определение активированного времени рекальцификации плазмы с суспензией каолина		
	Единичное	20	
	Каждое последующее	11	
5.2	Определение протромбинового (тромбопластинового) времени с тромбопластин- кальциевой смесью		
	Единичное	2	
	Каждое последующее	2	

Приказ 380, приложение 12

Расчетные нормы рабочего времени на проведение клинических лабораторных исследований

№	Наименование исследования	Время на 1 исслед. (мин.), затраченное специалистом	
		Со средним образованием	С высшим образованием
5.11	Определение тромбинового времени (ТВ) со стандартным количеством тромбина		
	Единичное		12
	Каждое последующее		3
5.16	Определение фактора V в плазме крови с применением плазмы с дефицитом фактора V	2	15
5.17	Определение фактора VIII в плазме крови с применением плазмы с дефицитом фактора VIII	2	15
5.18	Определение фактора IX в плазме крови с применением плазмы с дефицитом фактора IX	2	15
5.19	Определение фактора X в плазме крови с применением плазмы с дефицитом фактора X	2	15
5.20	Определение фактора XI в плазме крови с применением плазмы с дефицитом фактора	2	15

Приказ 380, приложение 12

Расчетные нормы рабочего времени на проведение клинических лабораторных исследований

№	Наименование исследования	Время на 1 исслед. (мин.), затраченное специалистом	
		Со средним образованием	С высшим образованием
5.21	Агрегация тромбоцитов, стимулированная		
5.21.1	АДФ	5	10
5.21.2	Адреналином	5	10
5.21.3	Коллагеном	15	10
5.21.4	ристомицином	5	10
5.22	Определение времени кровотечения	10	
5.23	Определение времени свертывания крови	15	

Затраты рабочего времени мед. персонала КДЛ на проведение исследований

№	Наименование исследования с указанием методики исследования	Число анализов	Время (в мин.), затраченное специалистами			
			С средним образованием		С высшим образованием	
			На 1 анализ	Всего	На 1 анализ	Всего
Исследование гемостаза						
1.	Определение протромбинового времени с тромбопластиновой смесью - единичное - каждое последующее	240	3 мин.	720		
		1760	2 мин.	3520		
2.	Определение тромбинового времени со стандартным количеством тромбина - единичное - каждое последующее	220			12 мин.	2640
		1860			3 мин.	5580
3.	Определение фVIII в плазме крови с применением дефицитной плазмы - единичное - каждое последующее	240	2	480	15	7200
		2220	2	4440	15	33300
4.	Агрегация тромбоцитов, стимулированная АДФ - единичное - каждое последующее	240	5	1200	10	2400
		960	5	4800	10	9600

Приказ 380, приложение 9
Примерный перечень лабораторных исследований для
клинико-диагностических лабораторий ЛПУ

- Краевые, областные больницы и больницы с числом коек 600 и более
- Поликлиники (в том числе и детские) с числом посещений 751 и более
- Диагностические центры- обязаны проводить полный перечень исследований состояния системы гемостаза!!!

Оборудование лаборатории

- **Агрегометр для исследования функции тромбоцитов**
- **Коагулометр автоматический, (полуавтоматический)- любого типа .**
- **Лабораторная центрифуга с ускорением до 2500g (желательно рефрежераторная)**
- **pH-метр**

Оборудование лаборатории

- Холодильник +4°C, морозильная камера, желательно (-70°C).
- Термостат с прозрачными стенками T +37° C
- Секундомеры
- Полуавтоматические пипетки 0,5- 10мкл, 20-200мкл, 200-1000мкл , 1-5мл.
- Пластиковые наконечники.
- Пробирки для забора крови с антикоагулянтом (3,8% цитрат натрия - 0,129M).

Этапы лабораторной диагностики

- **Преданалитический этап**
- **Аналитический этап**
- **Постаналитический этап**



Образцы для исследования

- **Капиллярная кровь:**

крайне редко- в основном для мониторинга антикоагулянтной терапии, подсчета тромбоцитов.

- **Венозная кровь :**

Чаще- из кубитальной вены, смешивают с 0,129M раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 (при гематокрите 25-55%)

Методы забора

- В градуированную пластиковую пробирку, содержащую антикоагулянт
- Моновет - (аспирационный метод) коммерческая система (градуированный шприц), содержащий антикоагулянт
- Вакутейнер- коммерческая система (пробирка с определенным отрицательным давлением, содержащая антикоагулянт)
- СТАД-пробирки-специальные пробирки для транспортировки крови для исследования гемостаза. Содержат цитрат натрия, теофиллин, аденозин и дипиридомол, которые предотвращают активацию тромбоцитов.

Центрифугирование крови

- Цитратная плазма, богатая тромбоцитами - 5-7мин. При 100-110g. Используется для исследования функции тромбоцитов.
- Цитратная плазма, бедная тромбоцитами - 10мин. При 1500-2000g. Используется для большинства коагуляционных тестов.
- Бестромбоцитная плазма - 20мин. при 2000g плазму, бедную тромбоцитами. Используется для большинства коагуляционных тестов и замораживания для дальнейшего исследования.

Длительность хранения



- Все исследования должны быть выполнены не позднее 4-часов после взятия крови
- Определение уровня фVIII в течение 2 часов после взятия крови.

Автоматизированные коагулометры

- **Механические**
 - «Amelung» (Германия)
- **Оптико-механические**
 - «Минилаб» (Россия)
- **Турбидиметрические**
 - «Carmay» (Польша)
- **Нефелометрические**
 - «Systex» (Япония)

Преимущества и недостатки различных принципов определения сгустка

Принцип	Преимущества	Недостатки
Механический	<ul style="list-style-type: none">• Возможность работы на цельной крови• высокая толерантность к типу используемых реактивов и пробирок• низкая стоимость анализаторов	<ul style="list-style-type: none">• Низкая чувствительность- нет определения слабых сгустков• Нужно применять в пробах металлические мешалки
Оптико-механический	<ul style="list-style-type: none">• Более точный, чем механический• Проба во время измерения перемешивается	<ul style="list-style-type: none">• Чувствительность ниже, чем нефелометрических• Нужно применять в пробах металлические мешалки
Турбидиметрический	<ul style="list-style-type: none">• Более чувствительны, чем предыдущие анализаторы• Низкая стоимость	<ul style="list-style-type: none">• Чувствительность ниже, чем нефелометрических

Алгоритм диагностики коагулопатии

- **Общие скрининговые исследования:**
- Число тромбоцитов
- ✓ Длительность кровотечения
- ✓ Активированное частичное тромбопластиновое время
- ✓ Протромбиновое время
- ✓ Тромбиновое время
- ✓ Концентрация фибриногена по Клаусу.
- **Уточнение диагноза:**
- Определение активности факторов свертывания VIII и IX. определение активности и свойств ф.Виллебранда
- **Определение наличия ингибиторов:**
- Количественное определение ингибиторов факторов свертывания в единицах Бетесда.

Интерпретация скрининговых тестов

Тест	Дефект системы гемостаза	Причины
АЧТВ ↑	Дефицит одного или нескольких факторов: фибриноген, FII, FVIII, FV, FIX, FX, FXI, FXII	<ul style="list-style-type: none">• Гемофилия,• б-нь Виллебранда• лечение гепарином, варфарином• волчаночный антикоагулянт
протромбиновое время ↑	Дефицит одного или нескольких факторов: фибриноген, FII, FV, FVII, FX	<ul style="list-style-type: none">• Лечение варфарином• Дефицит витамина К• Цирроз печени• Тяжелый ДВС- синдром• Дисфибриногенемия

АЧТВ является общим коагуляционным самым распространенным скрининговым тестом, определяющим суммарное содержание всех факторов внутреннего пути свертывания. Не определяются FVII, FXIII
ПВ- МНО- определяет сумму факторов свертывания VII, V, X, II и фибриногена

Три метода определения активности фактора VIII и IX.

- **Одностадийный метод** (*Langdell, 1953*)
- **Двухстадийный метод.** (*Biggs, 1955*)
- **Метод с хромогенными субстратами**
(*Seghatchian, 1978*)

Характеристика методов определения активности факторов VIII/IX

- Одностадийный метод. Наиболее простой и более широко распространенный метод. Основан на линейной зависимости между активностью ф. VIII/IX и временем свертывания в тесте АЧТВ.
- Двухстадийный метод. Более сложен по исполнению. Основан на определении времени генерации тромбопластина.
- Метод с хромогенными субстратами. Непрямой метод. Имеет естественные ограничения.

Появление ингибиторов к факторам свертывания VIII, IX

У больных гемофилией могут появиться ингибиторы к VIII или IX факторам – одно из самых тяжелых осложнений заместительной терапии. Под воздействием ингибитора введенный фактор VIII быстро теряет прокоагулянтную активность. Он также стимулирует дополнительную продукцию антител – повышает титр и активность ингибитора в циркулирующей крови. Кровотечение приобретает неконтролируемый характер. Антитела к ф. VIII отмечаются значительно чаще и составляют 10-35%, чем к ф. IX -3-10%.

Определение активности ингибиторов к факторам VIII и IX чаще всего проводится в случаях, когда уровень дефицитного фактора ниже 5%.

Свидетельство развития ингибитора

- Изменение клинической картины у пациента.
- При тяжелой гемофилии А (<1 МЕ/дл) у пациентов с ингибитором, как правило, более удлиненное АЧТВ, чем у пациентов без ингибитора.
- Более короткий период полураспада введенного фVIII.
- Более низкое, чем ожидается, восстановление введенного фVIII.

Обязательно определять ингибитор:

- у каждого больного независимо от степени тяжести заболевания перед началом и в процессе лечения
- при отсутствии клинического эффекта от проводимой гемостатической терапии факторами свертывания крови VIII/IX в адекватных дозах
- при отсутствии подъема уровня дефицитного фактора в плазме пациента после введения расчетных доз концентрата фактора свертывания крови VIII | IX или при неожиданно слабо выраженной реакции на введение дефицитного фактора
- больным с тяжелой и среднетяжелой формой 1 раз в год
- перед проведением операций и удалением зубов независимо от тяжести заболевания

Алгоритм определения ингибитора:

- у каждого больного независимо от степени тяжести заболевания перед началом и в процессе лечения:
- у ранее не леченных пациентов в начале лечения через каждые 3-5 дней введения (ДВ) до 50ДВ, затем через каждые 3 месяца до 100ДВ, в последующем через 6-12 месяцев
- у ранее леченных пациентов через каждые 6 - 12 месяцев, при смене препарата через 10 -20 ДВ, а затем через 6-12 месяцев

European Medicines Agency.

Pre-authorisation an Evaluation of Medicines for Human Use.

London, 22 February, 2007.

Методы определения ингибитора

- **Количественный: Бетезда метод, Мальме метод и др.**
- **Иммуноферментный**
- **Метод эпитопного картирования**

Количественное определение ингибитора фактора VIII/IX

■ Принцип метода

- ✓ Основан на способности ингибитора в процессе инкубации с нормальной плазмой снижать в ней активность фактора VIII /IX. После 2 часов инкубации определяют остаточную активность (ОА) фактора VIII /IX в разведениях плазмы. Следует найти то разведение, где ОА находится в пределах 25-75%.
- ✓ 1 единица Бетесда определяется как количество ингибитора в плазме пациента, нейтрализующее за 2 часа инкубации при 37°C 50% активности фактора VIII /IX в нормальной плазме.

Классический Бетезда метод

- Используется нормальная плазма с содержанием фVIII
- Контрольная смесь: Нормальная плазма + буфер рН 7,4 1:1
- Тестируемая смесь: нормальная плазма + плазма пациента 1:1
- Инкубируется в течение 2 двух часов при 37оС
- Часть активности фактора VIII теряется
- ф.VIII опыт (%)
- **Остаточная активность**
- фVIII контроль (%)
- Если ОА менее 25%, то делается разведение плазмы пациента имидозоловым буфером (рН7,4) 1:2, 1:4, 1:8... чтобы ОА была в интервале 25-75%

Классический Бетезда метод

Проблемы:

- Не может быть воспроизводимым при низких результатах
- Возможно возникновение ложных положительных результатов из-за потери активности фVIII, не связанной с активностью ингибитора

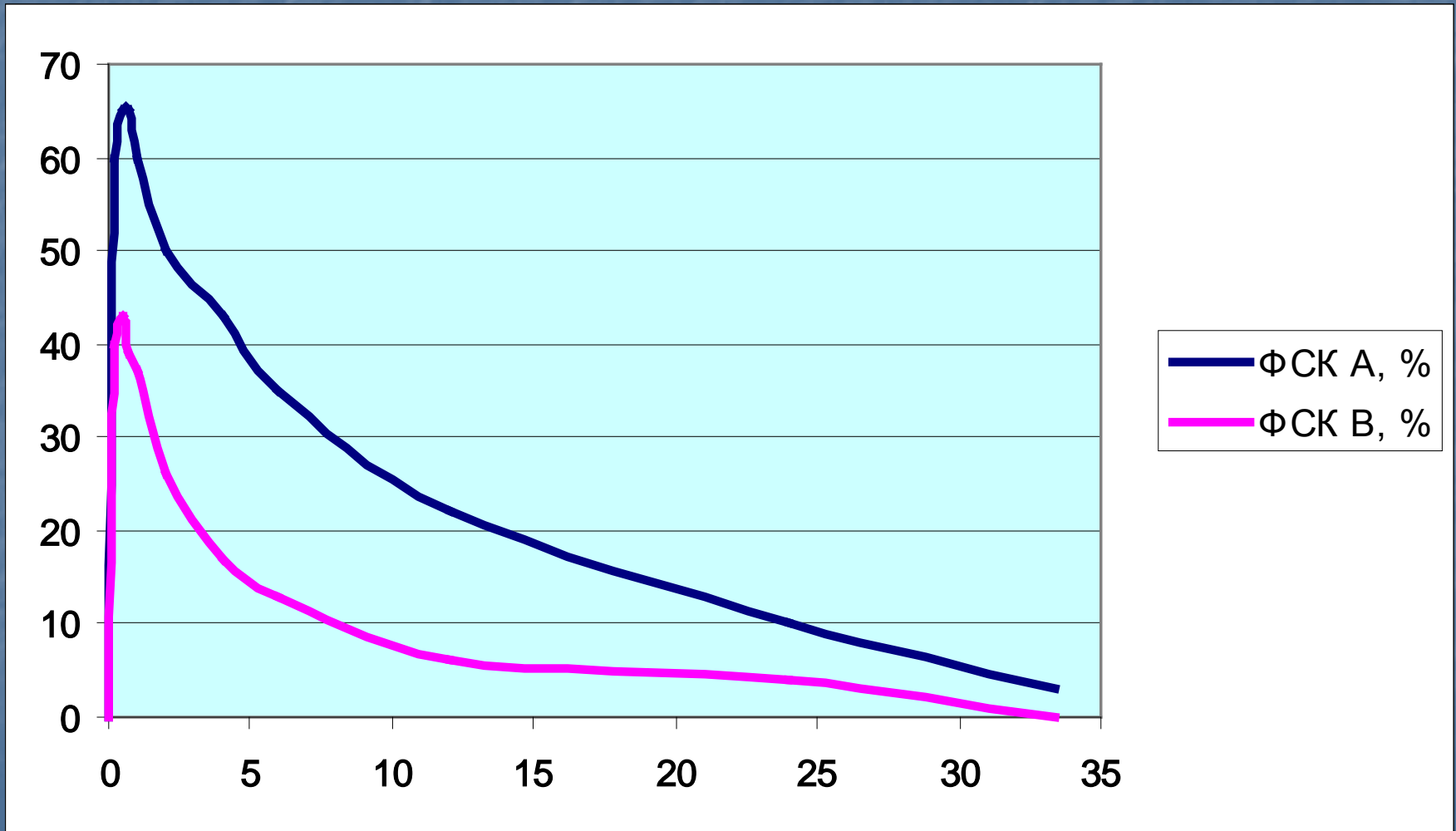
Модификация Нимегена

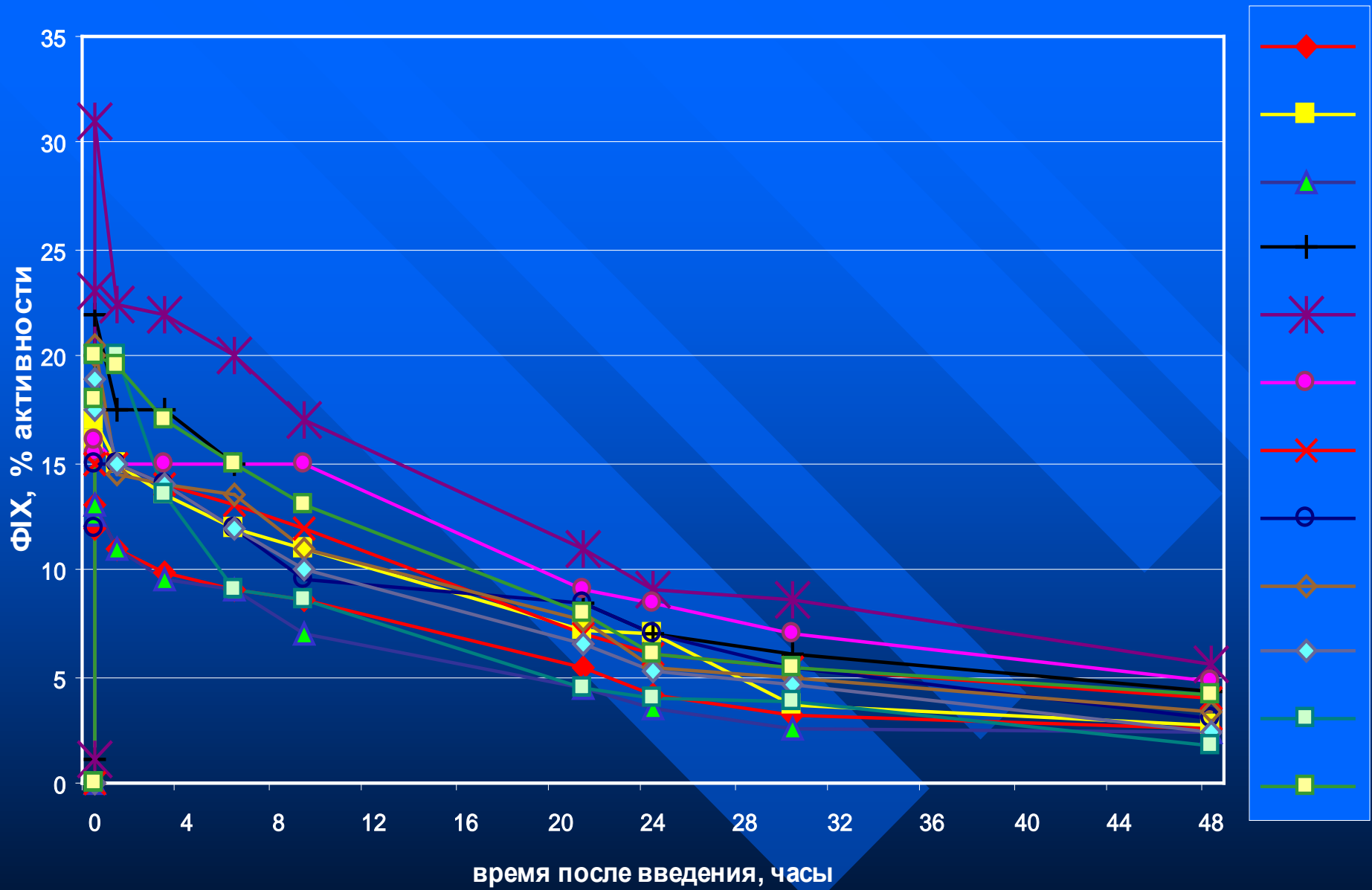
- Используется буферизированная (0,1М имидазолом) нормальная плазма pH 7,4. (Примечание: коммерческая лиофилизированная НП может быть буферизирована по-другому)
- Контрольная смесь, подготовленная с плазмой, дефицитной по фVIII, вместо буфера

Уровень pH и остаточной активности фVIII в тестовых и контрольных смесях оригинального и модифицированного метода Бетезда.

Смеси анализа	pH до инкубации	pH после 2-х часов инкубации	Остаточная активность фVIII в %
Небуферизированная нормальная плазма и гемофильная плазма (без ингибитора) 1:1	7,7 ±0,1	8,3 ±0,1	68 ± 6
Небуферизированная нормальная плазма и 0.1 М имидазолового буфера 1:1	7,6 ±0,1	7,8 ±0,1	83 ± 6
Нормальная плазма буферизированная 0.1 М имидазола и гемофильная плазма (без ингибитора) 1:1	7,4 ±0,1	7,4 ±0,1	95 ±0,1
Нормальная плазма буферизированная 0.1 М имидазола и дефицитная по фVIII плазма (без ингибитора) 1:1	7,4 ±0,1	7,4±0,1	97 ± 4

Фармакокинетика фактора VIII в дозе 30 МЕ/кг у пациента с гемофилией А при введении двух разных препаратов ФСК

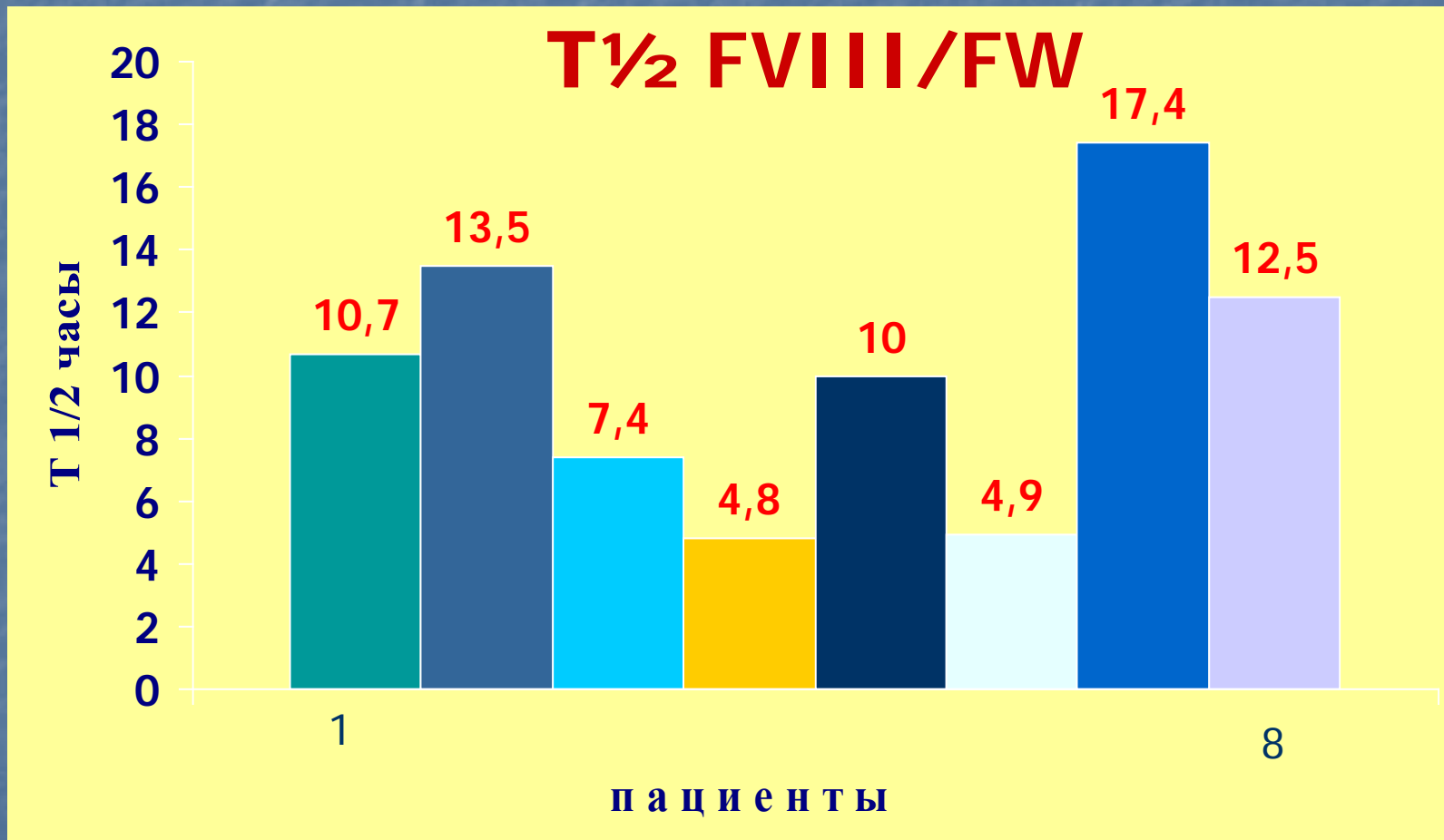




Экспериментальные кривые по результатам 12 фармакокинетических тестов

Почему персонализация и почему индивидуальный подход к заместительной терапии?

40 МЕ/КГ



Утвержден
приказом Министерства здравоохранения и
социального развития Российской Федерации
от 14 ноября 2007 г. № 705

**СТАНДАРТ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ
БОЛЬНЫМ С НАСЛЕДСТВЕННЫМ ДЕФИЦИТОМ ФАКТОРА VIII,
С НАСЛЕДСТВЕННЫМ ДЕФИЦИТОМ ФАКТОРА IX, БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЛЕБРАНДА**

2. Модель пациента

Категория возрастная: взрослые, дети

Нозологическая форма: наследственный дефицит фактора VIII, наследственный дефицит фактора IX

Код по МКБ-10: D66, D67

Фаза: кровотечение или кровоизлияние любой локализации

Стадия: любая

Осложнение: вне зависимости от осложнений, в том числе при наличии ингибиторов к факторам VIII или IX

Условие оказания: амбулаторно-поликлиническая помощь

2.1. ЛЕЧЕНИЕ ИЗ РАСЧЕТА 12 МЕСЯЦЕВ

A09.05.194	Определение активности фактора VIII	1	2
A09.05.193	Определение активности фактора IX	1	2
A12.05.052	Определение активности ингибиторов к фактору VIII	0,1	1
A12.05.053	Определение активности ингибиторов к фактору IX	0,1	1

3. Модель пациента

Категория возрастная: взрослые, дети

Нозологическая форма: наследственный дефицит фактора VIII, наследственный дефицит фактора IX

Код по МКБ-10: D66, D 67

Фаза: профилактика кровотечений и кровоизлияний

Стадия: любая

Осложнение: без осложнений

Условие оказания: амбулаторно-поликлиническая помощь

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИЗ РАСЧЕТА 12 МЕСЯЦЕВ

A12.05.052	Определение активности ингибиторов к фактору VIII	1	2,4
A12.05.053	Определение активности ингибиторов к фактору IX	1	2,4
A09.05.049	Исследование уровня факторов свертывания в крови	1	2
A09.05.193	Определение активности фактора IX	1	6
A09.05.194	Определение активности фактора VIII	1	6

4. Модель пациента

Категория возрастная: взрослые, дети

Нозологическая форма: наследственный дефицит фактора VIII; наследственный дефицит IX;

Код по МКБ-10: D66; D67

Фаза: элиминация антител к факторам VIII и IX (индукция иммунной толерантности)

Стадия: любая

Осложнение: наличие ингибиторов (антител) к факторам VIII и IX, частые кровотечения

Условие оказания: амбулаторно-поликлиническая помощь



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ