



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0711145-2 A2**

(22) Data de Depósito: 03/05/2007
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/86 2006.01
C12Q 1/56 2006.01

(54) Título: **DETECÇÃO DE DOENÇAS VENOSAS TROMBOEMBÓLICAS PELA MEDIÇÃO DE NÍVEIS DE FIBRINA SOLÚVEL E DíMEROS D**

(30) Prioridade Unionista: 05/05/2006 FR 0604072

(73) Titular(es): Assistance Publique - Hopitaux De Paris,
Diagnostica Stago

(72) Inventor(es): Bibi Shah Soltan Mirshahi, Jeannette Soria

(74) Procurador(es): Tavares & Companhia

(86) Pedido Internacional: PCT FR2007000764 de 03/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/128916 de 15/11/2007

(57) Resumo: DETECÇÃO DE DOENÇAS VENOSAS TROMBOEMBÓLICAS PELA MEDIÇÃO DE NÍVEIS DE FIBRINA SOLÚVEL E DíMEROS D. O presente pedido refere-se a um método e a um teste para detecção da ativação da coagulação, especialmente quando ela é responsável por doenças venosas tromboembólicas, empregando ensaio de dímeros D e da fibrina solúvel produzida durante um processo de fibrinólise ativado em uma amostra de sangue. O método da invenção diz respeito à comparação do nível de dímeros D correspondendo à degradação da fibrina solúvel e do nível de dímeros D da amostra com valores limite normais. O teste da invenção também pode ser usado para determinar se a anticoagulação é suficiente em um paciente.



PI0711145-2

Relatório Descritivo da Patente de Invenção
para **“DETECÇÃO DE DOENÇAS VENOSAS
TROMBOEMBÓLICAS PELA MEDIÇÃO DE NÍVEIS DE
FIBRINA SOLÚVEL E DÍMEROS D”.**

5 O presente pedido refere-se a um método e a um teste para detecção da ativação da coagulação, especialmente quando ela está relacionada a doenças venosas tromboembólicas, usando um ensaio de Dímeros D e ensaiando a fibrina solúvel durante um processo de ativação de coagulação no sangue.

10 A fibrinólise é o processo de degradação da fibrina no sangue. Ela está envolvida em uma série de processos fisiopatológicos, sendo desencadeada em situações em que o ativador de plasminogênio tecidual e o plasminogênio se ligam à fibrina, formando um complexo fibrina-plasminogênio ternário
15 dentro do qual o t-PA tem alta afinidade pelo plasminogênio, acarretando geração de plasmina, uma enzima que degrada a fibrina em Dímeros D. Na ausência da fibrina, o t-PA tem pouca afinidade pelo plasminogênio, explicando o fato de que a fibrina circulante não é degradada.

20 A degradação da fibrina, ou fibrinólise, leva à formação de produtos de degradação, compreendendo principalmente fragmentos de “dímeros D”. Esses Dímeros D estão associados ao fragmento E da degradação de outra molécula de monômero de fibrina formando o complexo DDE, mas mesmo
25 nessa forma, eles são normalmente chamados de Dímeros D.

A fibrina passando pelo processo de fibrinólise é formada pela conversão do fibrinogênio sob a ação de uma enzima de coagulação, chamada trombina. Durante a ativação da coagulação, a trombina assim gerada induz a formação de depósitos de fibrina, que irão constituir o trombo e a formação de fibrina solúvel. Para tanto, a trombina ataca quatro ligações peptídicas do fibrinogênio localizado, respectivamente, nas duas cadeias alfa A e nas duas cadeias beta B, provocando a liberação de dois fibrinopeptídeos A das duas cadeias alfa A e a liberação de dois fibrinopeptídeos B das cadeias beta B, resultando na formação de monômeros de fibrina que se polimerizam espontaneamente na forma de um polímero por meio das ligações de hidrogênio estabelecidas pela interação entre os sítios de polimerização A e B desmascarados durante a liberação dos fibrinopeptídeos A e B e os sítios a e b que estão disponíveis nas extremidades das cadeias gama e beta, respectivamente. O polímero da fibrina é então estabilizado imediatamente pelo fator XIII(a). A geração da trombina é muito maior durante os ensaios *in vitro* do que a que ocorre *in vivo*. Por essa razão, a geração de monômeros de fibrina é muito mais lenta no processo de ativação de coagulação *in vivo* do que nos gerados *in vitro*, o que faz com que parte dos monômeros se polimerizem para produzir fibrina insolúvel constituindo o trombo e outra parte dos ditos monômeros reaja com fibrinogênio em que os sítios a e b são acessíveis, ou com produtos de degradação de fibrinogênio para

produzir fibrina solúvel em que os monômeros da fibrina são associados ao fibrinogênio.

A determinação da concentração da fibrina solúvel é importante para confirmar a ativação da coagulação em um paciente. Essa determinação pode ser realizada usando amostras de sangue ou plasma obtido de uma amostra de sangue retirada de um paciente.

Foi demonstrado que o ensaio da fibrina solúvel é um complemento útil para ensaiar os produtos de degradação da fibrinólise, visto que a fibrina solúvel é capaz de detectar a ativação da coagulação que está em curso enquanto que a concentração de Dímeros D indica a degradação de um trombo, mesmo se o processo de coagulação de ativação estiver parado.

Em suma, o nível de Dímeros D no plasma é aumentado enquanto o coágulo de fibrina se degrada *in vivo*. Por consequência, se o trombo estiver presente e sofrendo degradação, o nível de Dímeros D é elevado, mesmo que a coagulação persista ou esteja parada. Em contrapartida, o nível de fibrina solúvel aumenta apenas se a coagulação persistir.

Comparado ao nível de Dímeros D, a medição específica do nível de fibrina solúvel no plasma permite, dessa forma, determinar se ocorre coagulação em um paciente no momento que a amostra a ser ensaiada é obtida, junto com uma avaliação do equilíbrio coagulolítico.

A determinação do nível de Dímeros D na amostra, chamado de nível base, é, portanto, uma reflexão da

degradação do trombo que ocorre *in vivo*, enquanto que a determinação do nível de Dímeros D obtidos após a adição exógena de um agente trombolítico específico da fibrina representa a soma dos Dímeros D de base e dos Dímeros D
5 originados da degradação da fibrina solúvel, também chamada de fibrina circulante.

O pedido de patente internacional WO-A-02/18628 descreve um método para ensaiar a fibrina solúvel em uma amostra de sangue, o qual requer colocar o
10 plasma em contato com um ativador de plasminogênio com alta afinidade pela fibrina solúvel (PA-Fb sp), seguido da determinação do nível dos produtos de degradação da fibrina (Dímeros D). A diferença entre a concentração de Dímeros D em uma amostra tratada com PA-Fb sp e a dos Dímeros D de base
15 determinados no plasma não tratado com PA-Fb sp representa, portanto, os Dímeros D associados à degradação da fibrina solúvel. Os inventores observaram agora que o método proposto no pedido Internacional WO-A-02/18628 do estado da técnica pode ser vantajosamente suplementado para ser realizado no
20 contexto do diagnóstico de doenças venosas tromboembólicas, bem como no diagnóstico e monitoração de coagulações intravasculares disseminadas (DIVC). Ele também permite determinar se o tratamento com anticoagulantes será eficaz.

As doenças venosas tromboembólicas
25 compreendem principalmente trombos venosos dos membros e do embolismo pulmonar, este resultando de uma complicação das

primeiras trombooses. Também são encontradas trombooses venosas além daquelas nos membros, uma vez que todas as regiões venosas estão sujeitas a uma trombose. As veias renais e as veias mesentéricas podem ser citadas especificamente dentre as que estão na origem das patologias. Doenças tromboembólicas, como a trombose venosa profunda (TVP) e/ou o embolismo pulmonar (PE) são doenças fatais e representam grande proporção das invalidezes e mortes nos países industrializados, sendo vital o estabelecimento do diagnóstico dessas doenças para concluir investigações por exames de imagens, como imagens de ultrassom, para o diagnóstico de trombooses venosas, e a cintigrafia ou angiografia para diagnosticar embolismos pulmonares. Esses métodos investigativos são de difícil realização e nem sempre podem ser realizados com a rapidez necessária.

Como consequência, há a necessidade permanente de definir um teste que permita rápido diagnóstico de doenças tromboembólicas em um paciente, esse diagnóstico incluindo a possibilidade de descartar essa doença sem ter de recorrer necessariamente a investigações adicionais.

Na área do diagnóstico de doenças relacionadas à coagulação, a capacidade do uso de Dímeros D, caso seus níveis estejam normais, é conhecida por ser um indicador negativo da trombose, uma vez que o princípio de que a formação de um trombo envolve tanto a ativação da coagulação quanto a fibrinólise é reconhecido.

No entanto, a única contagem de Dímeros D medida até agora carece de especificidade e não permite que se chegue a uma conclusão precisa de se houve formação de um trombo intravascular, uma vez que os Dímeros D presentes na circulação podem se originar da degradação dos depósitos de fibrina vascular extra. Os Dímeros D formados *in situ* podem então passar para a circulação, produzindo, por consequência, um alto nível de Dímeros D circulantes. No contexto da presente invenção, os inventores avaliaram a pertinência de um diagnóstico baseado no teste de Dímeros D em associação com um teste rápido para determinar a fibrina solúvel, que representa a ativação da coagulação intravascular. Essa combinação de ensaios demonstrou ser vantajosa no contexto de um diagnóstico da trombose venosa profunda (TVP) e/ou do embolismo pulmonar (EP), bem como no texto de um diagnóstico da coagulação intravascular disseminada (CID). O teste de fibrina solúvel realizado, denominado SDF para a fibrina degradável solúvel, permite que a fibrina solúvel seja ensaiada determinando-se os produtos de degradação gerados durante sua degradação pelo ativador de plasminogênio tecidual (ou outro agente trombolítico, tal como um ativador de plasminogênio específico da fibrina) fornecido de forma exógena a uma amostra.

Dessa forma, a invenção diz respeito a um método *in vitro* para o diagnóstico da ativação da coagulação partindo de uma amostra de sangue obtida de um paciente, compreendendo:

i) medir a quantidade de produtos de degradação da fibrina contidos na amostra de teste, consistindo em medir a quantidade de Dímeros D presentes na amostra e constituir o nível de base dos Dímeros D;

5 ii) tratar a amostra por incubação com um ativador de plasminogênio com alta afinidade pela fibrina (Pa-Fb sp) sob condições que permitem a degradação da fibrina solúvel contida na amostra em produtos de degradação sem resultar na degradação do fibrinogênio, e medir a quantidade de Dímeros D
10 contidos na amostra tratada;

 iii) calcular a diferença entre a quantidade de Dímeros D medidos após a ativação pelo ativador Pa-Fb sp na etapa ii) e a quantidade de Dímeros D antes da referida ativação medida na etapa i), a referida diferença constituindo o grau de
15 degradação da fibrina solúvel (SDF);

 iv) comparar o nível de Dímeros D medido na etapa i) com um valor limite normal determinado para o referido produto de degradação e comparar o nível de SDF calculado na etapa iii) com um valor limite normal determinado para o SDF.

20 Quando o método de ensaio é realizado, partindo de uma amostra, é possível determinar o risco de doença tromboembólica: existe o risco de que se pelo menos um dos níveis calculados do referido produto de degradação da fibrina ou SDF (Dímeros D) for maior do que o valor normal, e esse risco é
25 eliminado quando o nível calculado do referido produto de

degradação da fibrina e o nível de SDF são menores do que os respectivos valores limite normais.

O método de diagnóstico da invenção é aplicável ao diagnóstico de coagulação sanguínea, seja o processo
5 de coagulação localizado (tais como trombozes venosas profundas) ou generalizado (como no caso da CID).

Caso seja apropriado, antes de adicionar o ativador de plasminogênio na etapa a)ii) acima, uma mistura de ácido cítrico e citrato de sódio é adicionada à porção da amostra
10 na qual os produtos de degradação da fibrina solúvel são determinados.

O reagente utilizado para ensaiar os produtos de degradação é selecionado para medir um certo grupo de produtos de degradação. Como exemplo, utilizam-se anticorpos com uma
15 especificidade predeterminada com um tipo específico de produtos de degradação da fibrina.

Quando a concentração dos Dímeros D de base medida na etapa i) tem um valor maior do que o valor limite de 500 ng/mL [nanogramas/mililitro], o Nível de Dímeros D é
20 considerado como aumentado. Quando a concentração de Dímeros D correspondendo à degradação da fibrina solúvel e que é calculada na etapa iii) tem um valor maior do que o valor limite de 300 ng/mL determinado em pacientes saudáveis, ela é considerada como aumentada.

25 Os referidos valores limite foram determinados com um reagente constituído por um anticorpo do teste “Lia” da

Diagnostica Stago ou do teste VIDAS da Bio-Mérieux. Para os outros reagentes, o valor limite deve ser determinado pela comparação com os resultados obtidos com os referidos reagentes.

5 Quando as medições de Dímeros D e as medições da fibrina degradável solúvel tiverem sido realizadas, pressupõe-se que no paciente cuja amostra de sangue está sendo testada, existe um risco de doença tromboembólica quando o nível de (Dímeros D) produzidos degradação da fibrina de base é
10 de 500 ng/mL ou maior ou quando o nível de fibrina solúvel determinado pela diferença entre o nível de Dímeros D presentes no plasma tratado com o ativador de plasminogênio específico da fibrina e o do Nível de base de Dímeros D é maior do que o valor limite, por exemplo, 300 mg/mL.

15 A amostra biológica é, de preferência, um líquido biológico, por exemplo, um plasma ou amostra de sangue, ou um líquido de punção, contanto que o nível de plasminogênio nesse líquido seja idêntico ao do plasma. No caso de líquidos de punção contendo pouco plasminogênio, a adição de Glu-
20 plasminogênio deve ser considerada de modo que a concentração de plasminogênio fique próxima à do plasma.

O ativador de plasminogênio com alta afinidade pela fibrina (isto é, que ativa apenas o plasminogênio na fibrina) utilizado no método para ensaio da fibrina solúvel pela geração de
25 produtos de degradação específicos pode ser selecionado dentre diversos compostos conhecidos por serem ativadores de

plasminogênio. No entanto, alguns deles degradam tanto o fibrinogênio quanto a fibrina, tal como a estreptoquinase e a uroquinase. Esses compostos não são adequados para uso no método da invenção, pois resultam na degradação da fibrina, dando origem a produtos de degradação de fibrinogênio que interferem naqueles originados da degradação da fibrina.

Outro grupo de ativadores de plasminogênio é constituído por compostos descritos como tendo alta especificidade pela degradação da fibrina, se comparado ao fibrinogênio. O método da invenção utiliza de forma vantajosa a especificidade desse outro grupo de compostos para realizá-la e utilize, por exemplo:

- o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) ou seus derivados, tal como TNK-tPA, que é um mutante de t-PA que possui altíssima especificidade pela fibrina (Cannon C P e col, “TNK tissue plasminogen activator compared with front loaded altephase in acute myocardial infarction results of the TIMI 10B trial”, Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10B Investigators, Circulation 98 (25), 2805-14, 1998);

- o ativador originado de *Desmodus rotundus* (bat-tpa ou vPA = ativador de plasminogênio da glândula salivar de morcego-vampiro) ou seus derivados: DSPAs = APs de saliva de *Desmondus rotundus*, FEKP = DSPA alfa 1 e alfa 2, EKP = DSPA beta, KP = DSPA gama (Bringmann e col: “Structural features mediating fibrin selectivity of vampire bat plasminogen activators”, J Biol Chem 270, 25596-603, 1995),

estafiloquinase (SAK), um polipeptídeo secretado por *Staphylococcus aureus* (Collen D: “Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent”, *Nat Med*, 4-279-84, 1998; Sakharov D V e col: “Fibrin specificity of a plasminogen activator affects the efficiency of fibrinolysis and responsiveness to ultrasound: comparison of nine plasminogen activators in vitro”. *Thromb Haemos*, 81, 605-12, 1999) ou um de seus mutantes (Collen D e col., “Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. I: Construction and characterization”. *Circulation* 94, 197-206, 1996).

Para realizar o método de diagnóstico descrito acima, anticorpos anti-Dímeros D são utilizados para realizar os dois ensaios (Dímeros D de base e Dímeros D após a ação do ativador de plasminogênio específico da fibrina) do método da invenção. Os referidos anticorpos foram descritos no estado da técnica e também se encontram comercialmente disponíveis, por exemplo, pela Diagnostica Stago sob o nome “Lia-test” ou sob o nome “Vidas” da Bio-Mérieux.

De modo a serem comparados, os ensaios das etapas i) e ii) devem utilizar o mesmo anticorpo anti-Dímeros D.

Os dímeros D originados da degradação da fibrina solúvel na presença de Pa-Fb sp podem ser ensaiados usando qualquer técnica de ensaio analítico rotineira, como os métodos do tipo ELISA, métodos de aglutinação em partículas de látex sensíveis (do tipo usado no teste Lia), métodos imunocromatográficos, etc. Exemplos dos vários testes de ensaio

de dímeros D comercialmente disponíveis que podem ser citados incluem ASSERACHROM D-Di ou STA LIATEST D-Di, ambos vendidos pela Diagnostic Stago. No entanto, no contexto da presente invenção, as condições para uso do teste ELISA de ASSERACHROM D-Di foram modificadas vantajosamente para encurtar o teste (15 min de incubação com anticorpo imobilizado e 15 minutos com anticorpo marcado com peroxidase).

De forma vantajosa, o método de diagnóstico *in vitro* da invenção também compreende o tratamento de uma amostra de controle positivo, em especial um plasma de controle positivo.

Para obter o plasma de controle positivo, o plasma é primeiramente incubado com uma pequena quantidade de trombina por um período predeterminado para permitir a formação de fibrina solúvel, sem a formação de um coágulo de fibrina. O processo de coagulação que foi desencadeado é então bloqueado pela adição de um inibidor de trombina para impedir que a reação continue. Como inibidor, pode-se utilizar, por exemplo, hirudina ou heparina.

O tempo de incubação do plasma e as concentrações de trombina e do inibidor para bloqueio são determinadas vantajosamente de modo a obter a ativação da coagulação, resultando na geração de fibrina solúvel sem formar um coágulo de fibrina.

A incubação na presença do ativador de coagulação (trombina) é, de preferência, realizada por um período

de incubação de 2 minutos à temperatura ambiente. O inibidor é então adicionado em grande excesso para assegurar o bloqueio da coagulação.

- se ele for a hirudina, esta é utilizada preferencialmente a uma concentração final de 100 µg/mL para uma concentração final de trombina de 0,18 U/mL;

- se ele for a heparina, esta é utilizada a uma concentração final de 500 U/mL quando a concentração final de trombina utilizada for 0,18 U/mL.

Em outra implementação vantajosa da invenção, o método de diagnóstico *in vitro* também compreende o tratamento de uma amostra de controle negativo, em especial um plasma de controle negativo. Uma descrição voltada para as preparações dos referidos controle é apresentada nos exemplos, junto com detalhes complementares.

A avaliação da fibrina solúvel de acordo com a presente invenção emprega uma primeira etapa para degradação da fibrina solúvel por Pa-Fb sp, seguido da medição dos produtos de degradação específicos originados da ação de Pa-Fb sp.

É vital que os resultados do método da invenção sejam obtidos o mais rápido possível, enquanto sendo representativos da quantidade de fibrina solúvel presente na amostra. Para esse fim, as condições de uso da Pa-Fb sp devem ser determinadas de modo que a degradação da fibrina solúvel seja rápida e não seja acompanhada pela “contaminação” da degradação do fibrinogênio plasmático circulante, dando origem a

produtos de degradação que interferem nos da fibrina solúvel no ensaio.

As doses de Pa-Fb sp a serem utilizadas e o período de incubação com o plasma são, dessa forma, selecionados para induzir um aumento no nível dos produtos de degradação de fibrina, que é maior nos controles positivos, e um aumento praticamente nulo nos controles negativos (isto é, aqueles que não foram sujeitos ao tratamento com um ativador de coagulação).

Vários ativadores da fibrinólise permitindo a degradação específica da fibrina solúvel podem ser utilizados no contexto da presente invenção. De forma vantajosa, a Pa-Fb ssp é selecionada dentre um grupo constituído pelos ativadores citados acima, a saber: t-PA ou seus derivados, VPA ou seu derivado e estafiloquinase ou um de seus mutantes. De preferência, utiliza-se t-PA ou estafiloquinase, mais preferencialmente t-PA.

Sob as condições em que as amostras são incubadas por 15 minutos a 37°C, a concentração final da estafiloquinase testada está na faixa de 1 a 12 µg/mL. A concentração final retida é, preferencialmente, de 10 µg/mL. O período de incubação pode ser modificado e sua variação é determinada em função da natureza e da concentração da Pa-Fb sp utilizada.

O t-PA é preferencialmente usado em uma faixa de concentração final de 1 a 2,5 µg/mL. De preferência, o t-PA é

usado em uma concentração de 2 µg/mL por um período de incubação de 15 minutos a 37°C.

Em uma implementação específica da invenção, a degradação da fibrina solúvel pelo ativador de plasminogênio sem a degradação do fibrinogênio pode ser bloqueada após a 5 degradação da fibrina solúvel adicionando-se um inibidor de plasmina, por exemplo, aprotinina. Características particulares para o uso de aprotinina ou de outro inibidor da plasmina de forma equivalente são apresentadas nos exemplos. A quantidade 10 de aprotinina utilizada é, por exemplo, equivalente à quantidade de ativador de plasminogênio utilizada. Sendo assim, o inibidor de plasmina é adicionado após 15 minutos de incubação a 37°C com o ativador de plasminogênio.

Em uma implementação particular da invenção, 15 antes de adicionar o ativador de plasminogênio, um anticoagulante, tal como uma solução contendo ácido cítrico e citrato de sódio, pode ser adicionada tanto à amostra ensaiada quanto às amostras-controle. As quantidades e modo de adição do ácido cítrico e do citrato de sódio são indicados nos exemplos.

20 No contexto da presente invenção, o método de diagnóstico descrito acima é aplicado à investigação da formação de um trombo venoso.

Em uma aplicação particular do método de diagnóstico da invenção, o método é realizado para exclusão 25 diagnóstica de uma trombose venosa profunda.

Em uma implementação específica da invenção, o método de diagnóstico é realizado para exclusão diagnóstica de um embolismo pulmonar.

Em uma implementação particular da invenção,
5 o método é realizado em uma amostra de sangue retirada de um paciente antes de realizar um tratamento com anticoagulante.

Em princípio, o ensaio da fibrina solúvel para a exclusão diagnóstica de uma trombose venosa deve ser realizado antes de qualquer tratamento com anticoagulante. Se o paciente
10 for submetido a tratamento com anticoagulantes, a concentração da fibrina solúvel se reduz muito rapidamente e atinge valores normais. Nos pacientes tratados, a determinação da concentração de fibrina solúvel no plasma pode determinar apenas se o anticoagulante foi eficaz.

15 Em uma concretização específica do método, o ensaio de fibrina solúvel é realizado usando t-PA como ativador de plasminogênio.

Outras características da invenção se tornarão visíveis nos exemplos seguintes e nas figuras.

20 As Figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, uma comparação dos dímeros D e SDF em pacientes com suspeito de embolismo pulmonar ou com suspeita de trombose venosa profunda. Em cada caso, os círculos pretos correspondem aos pacientes doentes e os círculos brancos aos pacientes normais.
25 A linha demarca o limite superior do valor normal.

EXEMPLOS

Exemplo nº 1:

Seleção da concentração de trombina utilizada para obter um controle de plasma positivo compreendendo fibrina solúvel:

5 O plasma de controle positivo foi preparado usando o seguinte protocolo:

Plasma normal 200 µL

Trombina humana (Stago, ref 00896), 0,5 a 1 U/mL (dependendo do plasma utilizado) 20 µL

10 Incubação por 2 min à temperatura do laboratório.

Hirudina (Knoll) 100 µg/mL (concentração final)

ou

15 Heparina (Choay) 5000 IU/mL (concentração final) 20 µL

Para verificar:

- se não há formação de coágulo no tubo;
 - se um teste de detecção de fibrina solúvel
- 20 comercial é positivo (por exemplo, o teste FS da Stago Laboratories).

	Controle positivo	Controle negativo
Plasma	200 µL	200 µL
Trombina 1 U/mL ou 0,5 U/mL	20 µL	-
Soro fisiológico	-	20 µL
2 min (± 10 seg) à temperatura ambiente		
Heparina, 5000 IU/mL	20 µL	-
Soro fisiológico	-	20 µL

Exemplo nº 2

Determinação da quantidade de Pa-Fb sp a ser utilizada sob condições de incubação definidas

Para realizar o método da invenção, a
 5 quantidade de ativador a ser adicionada à amostra de teste deve ser tal que induza a geração de muitos dímeros D no plasma de controle positivo conforme obtido no exemplo nº 1, com uma geração insignificante de dímeros D no plasma de controle negativo (controle não tratado com trombina).

10 Dessa forma, realizou-se a incubação dos plasmas-controle e dos plasmas de controle positivo (n = 21) com diferentes doses de Pa-Fb sp por 15 minutos a 37°C. Ao término do período de incubação, os dímeros D foram determinados pelo teste Lia ou por ELISA rápida (D-Di Stago) (incubação por 15
 15 minutos a 37°C com anticorpo de captura e 15 minutos a 37°C com anticorpo revelador).

Os resultados mostrados na Tabela II foram obtidos com o teste ELISA

Resultados substancialmente análogos foram
 20 obtidos com o teste Lia (n = 5).

Tabela II: Degradação da fibrina solúvel pelo aumento das quantidades de t-PA e SAK.

	Dímeros D (ng/mL)	Fibrina solúvel* (ng/mL)	Dímeros D (ng/mL)	Fibrina solúvel* (ng/mL)
	Controle negativo		Controle positivo	
Sem adição	375		375	

de Pa-Fb sp				
Após a estafiloquinase				
10	400	< 50	1750	1375
2	390	< 50	1615	1240
1.5	375	< 50	1700	1325
1	350	< 50	1657	1282
0.5	410	< 50	1125	750
Após t-PA (µg/mL)				
2	350	< 50	1790	1415
1	360	< 50	1420	1045
0.5	360	< 50	1210	835

*fibrina solúvel = Nível de dímeros D após a adição de t-PA ou estafiloquinase - dímeros D de base antes da adição de t-PA ou estafiloquinase.

A dose selecionada de Pa-Fb sp é a que produz:

- 5
- um aumento de <300 µg/mL em plasmas de controle não tratado (controles negativos);
 - o maior aumento nos plasmas de controle positivo.

10 Com base nesses resultados, sucede-se que as concentrações finais preferidas de Pa-Fb sp a serem utilizadas são:

- 2 µg/mL para t-PA: sob essas condições, a dose de t-PA que pode ser neutralizada pelos inibidores do ativador de plasminogênio (POI) é desprezível;
- 15 • 10 µg/mL para doses menores de SAK induziram degradabilidade insatisfatória da fibrina solúvel em

certos pacientes ou em certos controles positivos, mais provavelmente devido à presença de anti-estafiloquinase na amostra, anti-estafiloquinase esta que pode aparecer após a infecção por estafilococos).

5 **Exemplo nº 3: Ensaio de dímeros D e fibrina solúvel**

Na investigação, os dímeros D e a fibrina solúvel foram ensaiados em 87 pacientes consecutivos consultados em unidades emergenciais com suspeito de trombose venosa e/ou embolismo pulmonar e que não receberam tratamento
10 prévio. Nesses pacientes, uma investigação por ultra-som foi realizada para diagnosticar trombozes venosas profundas; uma cintigrafia ou angiografia pulmonar foi realizada para diagnosticar embolismo pulmonar. Os níveis de dímeros D e de fibrina
15 solúvel degradável (SDF) foram determinados antes de se iniciar o tratamento com anticoagulantes. Foi demonstrado que a sensibilidade do ensaio da fibrina solúvel degradável foi similar à do ensaio de dímeros D (96% para dímeros D e para fibrina degradável solúvel). Curiosamente, os “falsos negativos” para os
20 níveis de dímeros D e fibrina degradável solúvel foram observados em diferentes pacientes. Portanto, combinar os dois testes poderia aumentar a sensibilidade do diagnóstico da trombose (100%). Além do mais, a especificidade da fibrina degradável solúvel no diagnóstico de doenças venosas
25 tromboembólicas é maior (86% e 87%, respectivamente, para o embolismo pulmonar e para a trombose venosa profunda) do que

a dos dímeros D (36% e 42%, respectivamente, para o embolismo pulmonar e a trombose venosa profunda).

Observou-se rápida normalização da fibrina degradável solúvel em pacientes sob tratamento com anticoagulantes a uma dose terapêutica. Assim que o tratamento com anticoagulantes foi instituído, houve queda no nível de fibrina solúvel. Como resultado, a fibrina degradável solúvel não pode ser usada como teste de diagnóstico em pacientes já tratados com anticoagulantes. Entretanto, a fibrina degradável solúvel pode ser útil para monitorar o tratamento com anticoagulantes. Em conclusão, é indicado que o nível de fibrina degradável solúvel, em associação com o dos dímeros D, é um meio clínico útil para prognosticar ou descartar o embolismo pulmonar e/ou a trombose venosa profunda.

A fibrina solúvel está presente durante a ativação da coagulação. Seu aumento é observado desde os estágios iniciais da referida ativação.

No estado da técnica, diversos testes já foram desenvolvidos para avaliar a fibrina solúvel em pacientes apresentando uma trombose, mas, por causa da variabilidade nos resultados dos testes disponíveis, a importância da determinação da fibrina solúvel em um diagnóstico excluindo doenças venosas tromboembólicas ainda não tinha sido estabelecida (1-21).

O objetivo do presente estudo é o de avaliar a possível utilização de um novo teste baseado na determinação do nível de fibrina degradável solúvel que seja simples, rápido,

sensível e altamente específico para os polímeros de fibrina solúvel plasmática.

Esse teste se baseia na avaliação dos dímeros D gerados após a incubação do plasma com t-PA sob condições que induzem a degradação da fibrina solúvel, mas que não induzem a degradação do fibrinogênio plasmático. Dessa forma, esse teste foi chamado de teste de fibrina degradável solúvel (SDF). De fato, apesar do pequeno número de monômeros de fibrina na fibrina solúvel, os monômeros de fibrina são reticulados uns aos outros porque a ativação do fator XIII coincide com a liberação do fibrinopeptído A, e além disso, a ativação do fator XIII pela trombina é acelerada pela presença da fibrina (22). A fibrina degradável solúvel foi selecionada a partir de marcadores para a geração da trombina *in vivo*, tal como o fibrinopeptídeo A (HPA, meia-vida 3 minutos (23) ou o complexo trombina-antitrombina (TAT, meia-vida 15 minutos (24)), pois sua medição pode ser mais sensível já que é menos sensível a anomalias de medição.

O presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar o desempenho do teste de diagnóstico baseado em uma combinação dos níveis de dímeros D e da fibrina solúvel degradável em pacientes consecutivos não tratados com suspeita clínica de embolismo pulmonar ($n = 38$) ou trombose venosa profunda ($n = 49$) levados a unidades emergenciais de 3 centros diferentes. No caso de suspeito de trombose venosa profunda, o diagnóstico foi confirmado pelo exame da compressão com ultrassom; um diagnóstico de embolismo pulmonar foi confirmado

tanto por cintigrafia como por angiografia pulmonar. O valor limite para a fibrina degradável solúvel para um teste que foi considerado positivo foi 300 ng/mL.

Neste estudo, com o objetivo de analisar os efeitos da anticoagulação, os perfis da mudança da fibrina degradável solúvel e dos dímeros D também foram examinados nos pacientes sofrendo de embolismo pulmonar e/ou trombose venosa profunda, após iniciar o tratamento com anticoagulantes, para testar a eficácia da terapia na doença tromboembólica.

10 **Método e aparelho**

Amostras de plasma: O sangue foi coletado em citrato 0,13 M (1 parte de citrato por 9 partes de sangue). Após centrifugação a 2500 g por 15 minutos, o plasma foi coletado e congelado a -20°C até o uso.

15 No entanto, quando o nível de fibrina degradável solúvel estava muito alto, como acontece na coagulação intravascular (CID), a fibrina degradável solúvel pode formar um complexo insolúvel durante as etapas de congelamento e degelo, e como consequência, recomenda-se que esse teste seja
20 realizado com plasma recém-coletado.

O sangue foi obtido de voluntários saudáveis ou de pacientes de ambulatório que tinham se apresentado a unidades de emergência. Os pacientes que receberam um tratamento com anticoagulantes foram considerados apenas para monitoração. A
25 população de pacientes consistia de pacientes consecutivos apresentando sinais clínicos de embolismo pulmonar ou trombose

venosa profunda que tinham sido diagnosticados por análise de ultra-som da compressão das veias proximais da perna, por cintigrafia pulmonar e por angiografia pulmonar para verificar o diagnóstico.

5 **Testes biológicos**

Determinação dos dímeros D

Os dímeros D foram medidos por aglutinação de micropartículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais contra dímeros D usando o teste Lia (Diagnostica Stago) em um
10 aparelho STA ou por ELISA utilizando-se VIDAS (bio-Mérieux).

*Medição da fibrina degradável solúvel:
realizada em 3 etapas*

1 - degradação da fibrina: 20 μ L de t-PA, 20 μ g/ml (plasma tratado) ou 20 μ L de soro fisiológico (plasma não
15 tratado) foram adicionados a 200 μ L de plasma. Após incubação por 15 minutos a 37°C, a plasmina gerada foi bloqueada adicionando-se 20 μ L de aprotinina (Pentapharm), 12,5 TIU/mL.

2 - A concentração de dímeros D foi então determinada usando o teste de dímeros D Lia-test da Diagnostica
20 Stago.

3 - O nível de fibrina degradável solúvel foi calculado como a diferença entre a concentração de dímeros D no plasma tratado e aqueles presentes no plasma não tratado.

Quando o nível de dímeros D no plasma foi
25 maior do que 4000 ng/mL, a amostra foi diluída após a etapa de degradação.

A fibrina solúvel usada como controle positivo foi obtida por incubação do plasma normal com pequenas doses de trombina por um curto período, após o que a trombina foi bloqueada com heparina.

- 5 O plasma da amostra a ser testada, e também o controle positivo e o controle negativo para ensaiar a fibrina solúvel, foram ensaiados da forma apresentada na Tabela III.

TABELA III

	Dímeros D de Base	SDF + Dímeros D de Base
Plasma	200 μ L	200 μ L
AC puro	20 μ L	20 μ L
Tpa	-	20 μ L
Soro fisiológico	40 μ L	-
15 min a +37°C		
Aprotinina	-	20 μ L

- 10 A adição de aprotinina bloqueou a plasmina em um tempo predeterminado, levando à degradação da fibrina sozinha e não do fibrinogênio.

- os controles positivos e negativos foram reconstituídos com ACd, isto é, AC diluído em 1:5.

Preparação do AC:

- 15 Ácido cítrico, H₂O MWt = 210,14 0,16 g

Citrato trissódico, 2 H₂O MWt = 294,10 0,44 g

H₂O 20 mL

Resultados

Especificidade das medições

- Em voluntários saudáveis normais ($n = 180$), o nível de fibrina solúvel foi muito pequeno, de 300 ng/mL ou inferior.

- Além disso, não houve correlação entre a
5 concentração plasmática de fibrina solúvel e a dos dímeros D, uma vez que, após tratar os pacientes com heparina, a concentração de fibrina caiu muito rapidamente, enquanto que a concentração de dímeros D caiu muito mais lentamente, pois reflete a degradação do coágulo que persiste após o bloqueio da
10 ativação da coagulação.

Níveis de dímeros D e nível de fibrina solúvel em pacientes com suspeita de doença venosa tromboembólica ou embolismo pulmonar

Em voluntários saudáveis normais ($n = 180$):

15 O valor médio foi de 80 ± 106 ng/mL e dos 180 voluntários testados, 140 tiveram um nível não detectável de fibrina degradável solúvel. O valor limite considerado para um teste positivo foi de 300 ng/mL.

*Em pacientes com suspeita de embolismo
20 pulmonar ou trombose venosa profunda*

Dos 38 pacientes com suspeita de embolismo pulmonar, 23 eram positivos de acordo com a análise de imagens e de 49 com suspeita de trombose venosa profunda, 25 eram positivos, de acordo com a observação da compressão anormal
25 das veias proximais da perna em ultra-som.

Dos dois grupos de pacientes, aqueles que apresentavam embolismo pulmonar ($n = 23$) ou uma trombose venosa profunda (25), dois tinham contagens de fibrina solúvel que também eram falsos negativos, um do grupo apresentando embolismo pulmonar (confirmado por angiografia) e o outro no grupo de pacientes apresentando trombose venosa profunda (confirmado por ultra-som); no entanto, esses dois pacientes tinham níveis de dímeros D bem maiores do que o valor limite de 500 ng/mL. Em contrapartida, os níveis de dímeros D eram normais (<500 ng/mL) em 2 pacientes (um do grupo com embolismo pulmonar e o outro no grupo de pacientes apresentando trombose venosa profunda), enquanto que os níveis de fibrina degradável solúvel eram > 300 ng/mL. Esses níveis de dímeros D que eram falsos negativos foram observados quando o nível de dímeros D foi determinado pelo teste Lia® ou pelo teste Vidas®.

Com uma combinação de dímeros D e fibrina solúvel, não foram detectados falsos negativos nos valores biológicos.

Os índices de pertinência (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo) para os dímeros D e para a fibrina solúvel degradável foram calculados.

TABELA III: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos dímeros D e da fibrina degradável solúvel

	SDF+		Dímeros D + fibrina solúvel	
	EP	TVP	EP	TVP
VPP	92%	88%	71%	60%
VPN	92%	95%	83%	90%
Sensibilidade	96%	96%	96%	96%
Sensibilidade	86%	87%	36%	37%

VVP = valor preditivo positivo

VPN = valor preditivo negativo

EP = embolismo pulmonar

TVP = trombose venosa profunda

SDF = fibrina degradável solúvel

5

Alteração nos níveis de dímeros D e fibrina degradável solúvel em pacientes sob tratamento de anticoagulação

Observou-se rápida normalização da fibrina degradável solúvel em pacientes sob heparina não fracionada ou sob heparina de baixo peso molecular administrada em uma dose terapêutica. Após o primeiro dia, os níveis de fibrina degradável solúvel estavam normais ou no limite superior do normal. A análise diária dos níveis mostrou que a fibrina degradável permaneceu dentro dos parâmetros normais durante o tratamento com heparina. Em contrapartida, os níveis de dímeros D reduziram lentamente e os níveis não atingiram níveis normais durante o tratamento com heparina. Em um paciente, a fibrina solúvel foi aumentada ainda mais durante o tratamento terapêutico, indicando um efeito terapêutico insuficiente.

20

Discussão

Há a necessidade de uma ferramenta de diagnóstico não invasiva adequada para o diagnóstico do embolismo pulmonar e/ou da trombose venosa profunda que possa permitir a tomada de uma decisão imediata na maioria dos casos quanto ao tratamento a ser dado.

O presente estudo visou determinar se a combinação de dímeros D e fibrina degradável solúvel poderia ser útil para o diagnóstico do embolismo pulmonar e/ou da trombose venosa profunda e para avaliar a eficiência de um tratamento de anticoagulação para inibir a trombogênese.

Quanto à sensibilidade das medições no embolismo pulmonar e na trombose venosa profunda: Os 2 pacientes apresentando resultados falsos negativos relacionados ao nível de dímeros D (um do grupo com embolismo pulmonar e o outro do grupo de pacientes apresentando trombose venosa profunda) tinham níveis de fibrina degradável solúvel muito maiores que o limite superior do valor limite. Isso pode ter ocorrido por causa de uma estrutura de coágulo de fibrina anormal (congenita ou adquirida), tornando os coágulos anormalmente resistentes à fibrinólise. Essa anomalia poderia contribuir diretamente para um risco maior de trombose devido à trombólise imperfeita.

Essa hipohibrinólise pode explicar os 3% a 5% de casos de "falsos negativos" para dímeros D em pacientes apresentando uma trombose constituída. Ao determinar a fibrina degradável solúvel, a fibrina já está imediatamente acessível às

enzimas fibrinolíticas. Já a fibrina do trombo, quando formada de fibrinas finas e muito rígidas é menos acessível às enzimas fibrinolíticas, explicando os 3% a 5% de falsos negativos dos dímeros D observados nas trombooses. Os níveis negativos
5 relativos à fibrina degradável solúvel foram detectados em dois pacientes (um do grupo apresentando embolismo pulmonar e o outro no grupo de pacientes apresentando trombose venosa profunda), enquanto que o nível de dímeros D nesses dois pacientes foi maior do que 500 ng/mL. Isso poderia indicar que a
10 trombogenicidade é um processo não evolutivo, uma vez que a atividade da trombina é transitória.

Os inventores demonstraram que uma combinação dos dois testes (fibrina solúvel degradável e dímeros D) pode ser utilizada para distinguir um diagnóstico de
15 embolismo pulmonar da trombose venosa profunda em pacientes.

Na maioria dos casos, os dímeros D plasmáticos satisfazem aos critérios exigidos para um diagnóstico do embolismo pulmonar e da trombose venosa profunda, pois são marcadores sensíveis para a trombose, mas carecem de
20 especificidade (26-35).

Atualmente, está bem estabelecido que os dímeros D não podem ser usados para realizar um diagnóstico positivo de doenças venosas tromboembólicas, uma vez que o teste não é específico o suficiente. No entanto, quando o nível de
25 dímeros D é normal, o diagnóstico da doença tromboembólica pode ser efetuado em 95% dos pacientes.

Neste estudo, foi demonstrado que a especificidade da fibrina solúvel é muito superior a dos dímeros D. Essa baixa especificidade para as medições de dímeros D no diagnóstico de doenças venosas tromboembólicas pode ser devido
5 à degradação das enzimas fibrinolíticas locais da fibrina presente nos tecidos. Os produtos da degradação da fibrina solúvel formada localmente nos tecidos se difunde no sangue por causa de seu peso molecular relativamente baixo. Isso é reforçado pela observação de que o nível de dímeros D é geralmente alto nos
10 pacientes com doenças inflamatórias.

Neste estudo, também foi demonstrado que o nível de fibrina degradável solúvel é aumentado em eventos trombóticos; porém, assim que os tratamentos anticoagulantes são administrados, a concentração de fibrina degradável solúvel
15 diminui a um valor normal em poucas horas. Isso indica que os fármacos anticoagulantes são capazes de bloquear de maneira eficaz o processo trombótico. A persistência do nível elevado de dímeros D se deve à degradação do trombo formado antes do tratamento anticoagulante. Como consequência, propomos que a
20 determinação da fibrina degradável solúvel para seguir a eficácia do tratamento anticoagulante ou teste a eficácia ou testar a eficácia de novos fármacos antitrombóticos seja de importância.

Em conclusão, os resultados desse estudo indicam que a determinação da fibrina degradável solúvel em
25 associação com a dos dímeros D pode ser considerada um recurso clínico útil para o diagnóstico da trombose venosa profunda e do

embolismo pulmonar, e também de outros eventos trombóticos. Ademais, sugere-se que a fibrina degradável solúvel pode ser útil na monitoração dos efeitos de um tratamento anticoagulante.

REFERÊNCIAS

- 5 1. Arkel YS, Ku DH, Le P, Carr AM. Comparison of a test for soluble fibrin polymer (TpP) with a standard quantitative ELISA for D-dimer in patients, without current thrombosis, who have cancer or renal disease. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 1127 -8.
- 10 2. Arkel YS, Paidas MJ, Ku DH. The use of coagulation activation markers (soluble fibrin polymer, TpP, prothrombin fragment 1.2, thrombin-antithrombin, and D-dimer) in the assessment of hypercoagulability in patients with inherited and acquired prothrombotic disorders. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 15 2002;13 :199-205.
3. Brimble KS, Ginsberg JS. Evaluation of the combination of a bedside D-dimer assay and enzyme-linked immunosorbent soluble fibrin assay in patients with suspected venous thromboembolism. *Thromb Res.* 1997; 88:291-7.
- 20 4. Dempfle CE, Dollman M, Lill H, Puzzovio D, Dessauer A, Heene DL. Binding of a new monoclonal antibody against N-terminal heptapeptide of fibrin alpha-chain to fibrin polymerization site 'A': effects of fibrinogen and fibrinogen derivatives, and pre-treatment of samples with NaSCN. 25 *Fibrinolysis.* 1993; 4:79-86.

5. Dempfle CE, Pfitzner SA, Dollman M, Huck K, Stehle G, Heene DL. Comparison of immunological and functional assays for measurement of soluble fibrin. *Thromb Haemost.* 1995; 74:673-9.

5 6. Dempfle CE, Zips S, Ergul H, Heene DL; FACT study group. The fibrin assay comparison trial (FACT): correlation of soluble fibrin assays with D-dimer. *Thromb Haemost.* 2001; 86:1204-9.

7. Dempfle CE, Wurst M, Smolinski M, Lorenz S, Osika A, Olenik D, Fiedler F, Borggrefe M. Use of soluble fibrin antigen instead of D-dimer as fibrin-related marker may enhance the prognostic power of the ISTH overt DIC score. *Thromb Haemost.* 2004; 91 :812-8.

8. Derhaschnig U, Laggner AN, Roggla M, Hirschi MM, Kapiotis S, Marsik C, Jilma B. Evaluation of coagulation markers for early diagnosis of acute coronary syndromes in the emergency room. *Clin Chem.* 2002; 48:1924-30.

9. Ginsberg JS, Siragusa S, Douketis J, Johnston M, Moffat K, Stevens P, Brill-Edwards P, Panju A, Patel A. Evaluation of a soluble fibrin assay in patients with suspected deep venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1995; 74:833-6.

10. Ginsberg JS, Siragusa S, Douketis J, Johnston M, Moffat K, Donovan D, McGinnis J, Brill-Edwards P, Panju A, Patel A, Weitz JI. Evaluation of a soluble fibrin assay in

patients with suspected pulmonary embolism. *Thromb Haemost.* 1996; 75:551-4.

11. Hetland O, Knudsen A, Dickstein K, Nilsen D.W. Characteristics and prognostic impact of plasma fibrin monomer (soluble fibrin) in patients with coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002; 13:301-8.

12. Koga S. A novel molecular marker for thrombus formation and life prognosis- clinical usefulness of measurement of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex (SF) *Rinsho Byori.* 2004; 52:355-61.

13. LaCapra S, Arkel YS, Ku DH, Gibson D, Lake C, Lam X. The use of thrombus precursor protein, D-dimer, prothrombin fragment 1.2, and thrombin antithrombin in the exclusion of proximal deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000; 11:371-7.

14. Mac Gillavry MR, Sanson BJ, de Monye W, Lijmer JG, Huisman MV, Buller HR, Nieuwenhuizen W, Brandjes DP. Use of a new monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for soluble fibrin to exclude pulmonary embolism. *ANTELOPE-Study Group. Thromb Haemost.* 2000; 84:474-7.

15. Nakahara K, Kazahaya Y, Shintani Y, Yamazumi K, Eguchi Y, Koga S, Wada H, Matsuda M. Measurement of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex in plasmas derived from patients with various underlying clinical situations. *Thromb Haemost.* 2003; 89:832-6.

16. Nieuwenhuizen W, Hoegee-De Nobel E, Laterveer R. A rapid monoclonal antibody-based enzyme immunoassay (EIA) for the quantitative determination of soluble fibrin in plasma. *Thromb Haemost.* 1992; 68:273-7.

5 17. Nieuwenhuizen W. Soluble fibrin as a molecular marker for a pre-thrombotic state: a mini- review. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993; 4:93-6.

18. Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K. Determination of plasma soluble fibrin using a
10 new ELISA method in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol.* 1996; 51 :186-91.

19. Reber G, Bounameaux H, Perrier A, de Moerloose P. Performances of the fibrin monomer test for the exclusion of pulmonary embolism in symptomatic outpatients.
15 *Thromb Haemost.* 1999; 81 :221-3.

20. Scarano L, Prandoni P, Gavasso S, Gomiero W, Carraro G, Girolami A. Blood Coagul Failure of soluble fibrin polymers in the diagnosis of clinically suspected deep venous thrombosis. *Fibrinolysis.* 1999; 10:245-50.

21. Wada H, Sase T, Matsumoto T, Kushiya F, Sakakura M, Mori Y, Nishikawa M, Ohnishi K, Nakatani K, Gabazza EC, Shiku H, Nobori T. Increased soluble fibrin in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2003; 9:233-40.

25 22. Brummel KE, Butenas S, and Mann KG. FXIII activation associated with a primary cleavage in the A-

subunit at Arg-37 releasing an NH₂-terminal activation peptide (54), is coincident with FPA release. J Biol Chem, 1999; 274:22862-22870

23. Nossel HL, Yudelman I, Canfield RE,
5 Butler VP Jr, Spanondis K, Wilner GD, Qureshi GD.
Measurement of fibrinopeptide A in human blood. J Clin Invest.
1974; 54:43-53

24. Shifman MA, Pizzo SV. The in vivo
metabolism of antithrombin III and antithrombin III complexes. J
10 Biol Chem. 1982;257 :3243-8.

25. Lee L. V., Ewald G. A., McKenzie C. R,
Eisenberg P. R. The Relationship of Soluble Fibrin and Cross-
linked Fibrin Degradation Products to the Clinical Course of
Myocardial Infarction. Arteriosclerosis, Thrombosis, and
15 Vascular Biology. 1997, 17: 628-633.

26. Bounameaux H, Schneider PA, Siosman D,
De Moerloose P, Reber G. Value of the plasma measurement of
D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. J Mal
Vasco 1991;16:133-6.

20 27. Kelly J, Rudd A, Lewis RR, Hunt BJ.
Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism.
Arch Intern Med. 2002;162:747-56.

28. Kevorkian JP, Halimi C, Segrestaa JM,
Drouet L, Soria C. Monitoring of patients with deep-vein
25 thrombosis during and after anticoagulation with D-dimer.
Lancet. 1998; 351 :571-2.

29. Kuruvilla J, Wells PS, Morrow B, MacKinnon K, Keeney M, Kovacs MJ. Prospective assessment of the natural history of positive D-dimer results in persons with acute venous thromboembolism (DVT or PE). *Thromb Haemost.* 5 2003;89:284-7.
30. Nunes JP. D-dimers in diagnosis of pulmonary embolism. *Lancet.* 2002 Aug 10;360(9331):489.
31. van Beek EJ, Schenk BE, Michel BC, van den Ende B, Brandjes DP, van der Heide YT, Bossuyt PM, Buller 10 H R. The role of plasma D-dimers concentration in the exclusion of pulmonary embolism. *Br J Haematol.* 1996;92:725-32. Erratum in: *Br J Haematol* 1996; 95:218.
32. Perrier A, Roy PM, Aujesky D, Chagnon I, Howarth N, Gourdier AL, Leftheriotis G, Barghouth G, Cornuz J, 15 Hayoz D, Bounameaux H. Diagnosing pulmonary embolism in outpatients with clinical assessment, D-dimer measurement, venous ultrasound, and helical computed tomography: a multicenter management study. *Am J Med.* 2004;116:291-9.
33. Reber G, Bounameaux H, Perrier A, de 20 Moerloose P. Evaluation of advanced D-dimer assay for the exclusion of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2002;107:197-200.
34. Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Forgie M, Kearon C, Dreyer J, Kovacs G, Mitchell M, Lewandowski B, 25 Kovacs MJ. Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis. *N Engl J Med.* 2003;349:1227-35.

35. Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Stielll, Dreyer JF, Barnes D, Forgie M, Kovacs G, Ward J, Kovacs MJ. Excluding pulmonary embolism at the bedside without diagnostic imaging: management of patients with suspected pulmonary embolism presenting to the emergency department by using a simple clinical model and D-dimer. *Ann Intern Med.* 2001;135:98-107.

REIVINDICAÇÕES

1. – Método *in vitro* para o diagnóstico da ativação da coagulação partindo de uma amostra de sangue removida de um paciente, caracterizado por compreender:

5 i) medir a quantidade de produtos de degradação da fibrina contidos na amostra de teste, consistindo da medição da quantidade de dímeros D presentes na amostra e da constituição do nível de base dos dímeros D;

 ii) tratar a amostra por incubação com um
10 ativador de plasminogênio com alta afinidade pela fibrina (Pa-Fb sp) sob condições que permitem a degradação da fibrina solúvel contida na amostra em produtos de degradação sem resultar na degradação do fibrinogênio, e medir a quantidade de dímeros D contidos na amostra tratada;

15 iii) calcular a diferença entre a quantidade de dímeros D medida após a ativação pelo ativador Pa-Fb sp na etapa ii) e a quantidade de dímeros D antes da referida ativação medida na etapa i), a referida diferença constituindo o grau de degradação da fibrina solúvel (SDF);

20 iv) comparar o nível de dímeros D medido na etapa i) com um valor limite normal determinado para o referido produto de degradação e comparar o nível de SDF calculado na etapa iii) com um valor limite normal determinado para o SDF;

 o risco de doença tromboembólica existindo se
25 pelo menos um dos níveis de dímeros D medidos na etapa i) ou o nível calculado de SDF for maior do que o respectivo valor

normal determinado, e o referido risco sendo descartado quando o nível de dímeros D obtido na etapa i) e o nível de SDF obtido na etapa iii) forem menores que os respectivos valores limite normais.

5 2. – Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser para a investigação de uma doença venosa tromboembólica.

 3. – Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por ser aplicado à investigação da formação de
10 um trombo venoso.

 4. – Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser para o diagnóstico de uma trombose venosa profunda.

 5. – Método, de acordo com qualquer uma das
15 reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser para o diagnóstico de um embolismo pulmonar.

 6. – Método de diagnóstico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a amostra de sangue é uma amostra de plasma.

20 7. – Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a amostra de sangue é a de um paciente sendo beneficiado por uma terapia anticoagulante.

 8. – Método, de acordo com qualquer uma das
25 reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fato de que o ativador de plasminogênio Pa-Fb sp é t-PA.

9. – Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a degradação de fibrinogênio é impedida pela adição de um inibidor de plasmina.

5 10. – Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o inibidor de plasmina é a aprotinina, que é adicionada após incubar a amostra por 15 minutos a 37°C com o ativador de plasminogênio Pa-Fb.

10 11. – Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que antes da incubação da amostra com o ativador de plasminogênio Pa-Fb, um anticoagulante, tal como uma composição de ácido cítrico e citrato trissódico, é adicionado à amostra.

15 12. – Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por adicionalmente compreender ensaiar os produtos de degradação da fibrina solúvel em uma amostra de controle negativo e em uma amostra de controle positivo.

20 13. – Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que os dímeros D são medidos usando um anticorpo monoclonal anti-dímeros D.

25 14. – Método de diagnóstico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por adicionalmente compreender medir a SDF presente em uma amostra de controle positivo constituída por uma amostra de plasma normal por meio de etapas que compreendem:

i) incubar uma amostra de plasma com um ativador de coagulação para permitir a formação de fibrina solúvel sem formar um coágulo de fibrina, o ativador sendo, por exemplo, uma pequena quantidade de trombina para induzir a
5 formação de fibrina solúvel;

ii) incubar a amostra tratada com um inibidor de coagulação em uma quantidade suficiente para bloquear a coagulação, o inibidor sendo heparina ou hirudina, por exemplo;

iii) colocar a amostra preparada compreendendo
0 monômeros de fibrina solúvel em contato com um ativador de plasminogênio com alta afinidade pela fibrina (Pa-Fb sp), especialmente t-PA, sob condições que permitem a degradação da fibrina solúvel contida na amostra em seus produtos de degradação, especialmente dímeros D, sem degradar o
15 fibrinogênio.

15. – Método de diagnóstico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o valor limite normal para a quantidade de dímeros D é de 500 ng/mL e o valor limite normal para SDF é de 300 ng/mL, um
20 diagnóstico descartando doenças tromboembólicas sendo feito quando os valores medidos da amostra de teste forem menores do que os dois respectivos valores limite.

16. – Kit para o diagnóstico de doenças tromboembólicas usando um método de acordo com qualquer
25 uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por compreender:

- anticorpos monoclonais anti-dímeros D;

- um ativador de plasminogênio com alta especificidade para fibrina (Pa-Fb sp);

- uma amostra de controle positivo para fibrina solúvel e, caso convenha, uma amostra de controle negativo.

5

17. – Kit, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por adicionalmente compreender um inibidor de plasmina.

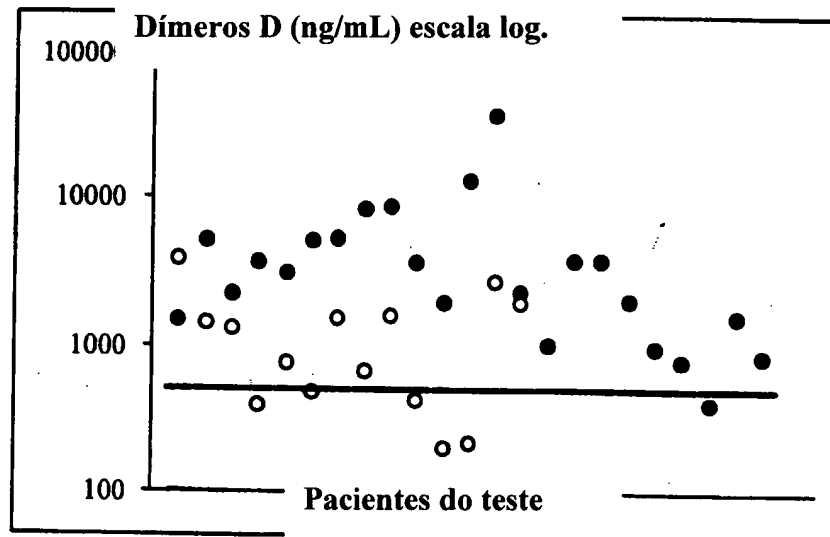
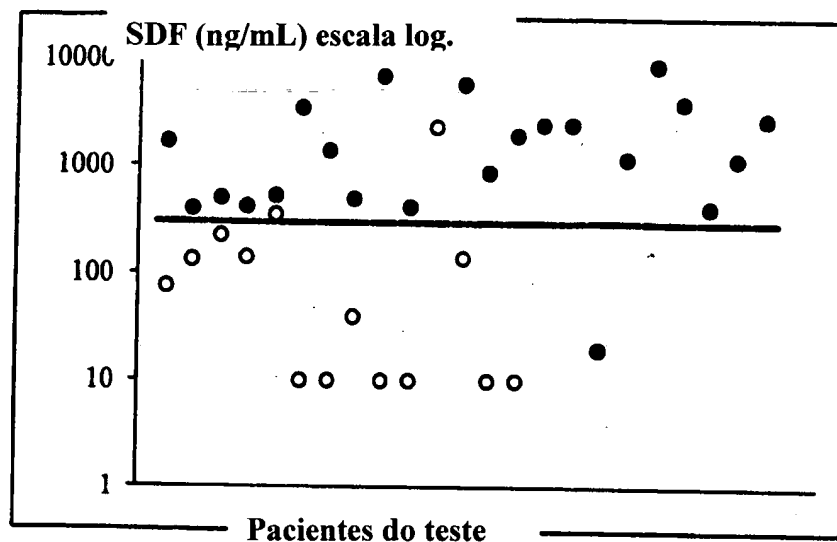


Figure 1

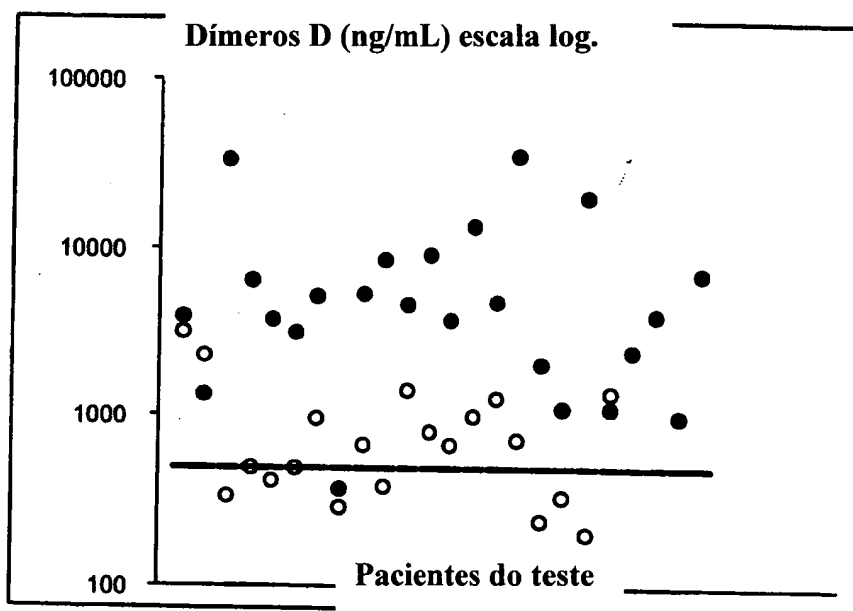
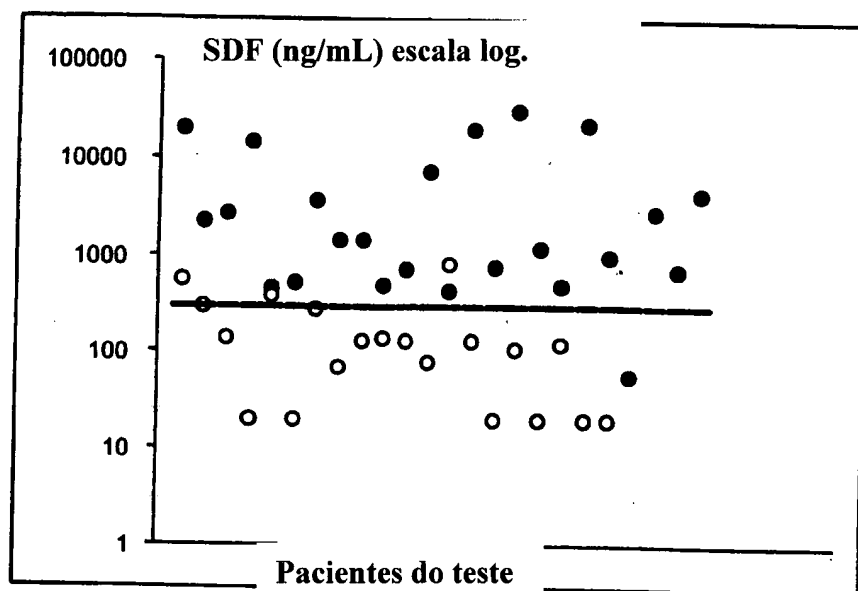


Figure 2

RESUMO

Patente de Invenção para "DETECÇÃO DE
DOENÇAS VENOSAS TROMBOEMBÓLICAS PELA
MEDIÇÃO DE NÍVEIS DE FIBRINA SOLÚVEL E
5 DÍMEROS D".

O presente pedido refere-se a um método e a um
teste para detecção da ativação da coagulação, especialmente
quando ela é responsável por doenças venosas tromboembólicas,
empregando ensaio de dímeros D e da fibrina solúvel produzida
10 durante um processo de fibrinólise ativado em uma amostra de
sangue. O método da invenção diz respeito à comparação do nível
de dímeros D correspondendo à degradação da fibrina solúvel e
do nível de dímeros D da amostra com valores limite normais. O
teste da invenção também pode ser usado para determinar se a
15 anticoagulação é suficiente em um paciente.