

НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ОШИБКИ И РЕКОМЕНДАЦИИ КАК ИХ ИЗБЕЖАТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОАГУЛОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

А.А. Козлов, Н.Д. Качалова, Т.М. Простакова
Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук

Все тесты по исследованию системы гемостаза имеют свои естественные ограничения, т.к. они только моделируют *in vitro* процесс свертывания крови, который происходит в живом организме. Моделированием *in vitro* внутреннего пути свертывания является тест определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Во внешнем пути свертывания ключевое место отводится тканевому фактору — гликопротеину, связанному с мембранами и присутствующему во многих тканях. Внешний путь свертывания принято *in vitro* моделировать тестом протромбинового времени, когда к исследуемой цитратной плазме, бедной тромбоцитами, добавляют так называемый тромбопластин, представляющий собой солевой экстракт тканей, содержащий тканевый фактор и фосфолипиды клеточных мембран.

К ориентировочным тестам, которые, как правило, проводятся при каждом первичном обследовании пациентов, относятся:

- протромбиновое время;
- активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ);
- тромбиновое время;
- количественное определение фибриногена.

Эти тесты легко выполнимы и достоверно указывают на нарушения в плазменном компоненте гемостаза.

Несмотря на простоту выполнения этих тестов, необходимо, чтобы полученные результаты были точными и воспроизводимыми, а для этого следует обращать внимание на особенности получения проб плазмы для анализа, на правильную работу с пробами, на условия хранения проб и на использование адекватных контролей и стандартов.

Наиболее распространенные технические ошибки, возникающие при исследовании гемостаза, связаны со следующим:

- неправильное взятие проб крови, при котором уже произошла активация процесса свертывания;
- неправильное соотношение объемов крови и антикоагулянта;
- попадание гепарина в пробу (выраженное удлинение АЧТВ);
- неправильная температура термостатирования при проведении тестов;
- использование несиликонизированной стеклянной посуды (активация свертывания);
- многократное использование пластиковой одноразовой посуды (активация свертывания);
- использование для мытья посуды детергентов, влияющих на свертывание.

Фирма «РЕНАМ» рекомендует следующее:

1. Получение плазмы для анализов

Кровь следует брать утром, натощак, из локтевой вены силиконированной иглой с широким просветом, без шприца и без наложения жгута. Первые капли крови отбрасывают, т.к. в них содержится тромбопластин.

Кровь сразу же смешивают (в силиконированной стеклянной или в пластиковой пробирке) с раствором натрия лимоннокислого (цитрата) в соотношении 9:1.

Следует отметить, что цитрат натрия может быть в 2 формах: трехзамещенный 5,5 водный (МазСб NS 07 x 5,5 Fh O) и двухводный (МазСб Н,5 0-і x 2 Fb O). В первом случае для приготовления раствора необходимо растворить в 1,0 л дистиллированной воды 38,0 г. соли, во втором — 31,3 г. соли. Фирма «РЕНАМ» для удобства пользователей выпускает концентрированный в 10 раз раствор цитрата натрия (38%, 3-замещенного, 5,5-водного). Для получения рабочего раствора концентрат нужно просто развести в 10 раз (1:9) дистиллированной водой.

Для исследования гемостаза используют 2 типа плазмы крови: плазму, бедную тромбоцитами, и плазму, богатую тромбоцитами.

Плазму, богатую тромбоцитами, получают центрифугированием цитратной крови в течение 5-10 мин при 1000-1500 об/мин (450-500 g).

Плазму, бедную тромбоцитами, получают двойным центрифугированием: сначала получают плазму, богатую тромбоцитами, а затем плазму, богатую тромбоцитами переносят в чистую пластиковую пробирку и еще раз центрифугируют в течение 15-20 мин при температуре 4° С при 3000-4500 об/мин (1200-2000 g).

Плазму рекомендуется хранить при комнатной температуре (18-25° С), если ее используют для определения протромбинового времени, анализа активности фактора VII или для исследования функций тромбоцитов, т.к. при 2-8° С происходит активация фактора VII. Для проведения всех прочих тестов плазму хранят при температуре 2-8° С.

Обязательным условием является проведение всех анализов не позднее, чем в течение 2 часов после взятия крови. Допускается однократное замораживание проб бедной тромбоцитами плазмы при температуре — 20 - 40° С на срок нескольких недель без значительной потери активности факторов свертывания крови.

2. Обработка лабораторной посуды

Для обеспечения точности и воспроизводимости результатов анализа системы гемостаза большое внимание необходимо уделять подготовке лабораторной посуды: пробирок, кювет, пипеток. Наиболее целесообразно использовать для этого одноразовую пластиковую посуду, что и практикуется за рубежом. При необходимости повторного использования лабораторной посуды, в том числе стеклянной, ее нужно правильно очищать. Недопустимо применение хромпика, различных стиральных порошков, т.к. даже в минимальном количестве хромовые смеси ингибируют факторы свертывания крови, а детергенты снижают воспроизводимость результатов.

Мы рекомендуем пластиковую и стеклянную посуду (кюветы, пробирки, наконечники пипеток) после использования обрабатывать в течение 2-3 час в 6% растворе перекиси водорода в ультразвуковой мойке. Затем посуду необходимо тщательно промыть в проточной воде, сполоснуть в дистиллированной воде и высушить. Пластиковую посуду сушат на воздухе, стеклянную — в сушильном шкафу при температуре 180 — 200°C в течение 1-2 часов.

После промывания и высушивания стеклянную посуду необходимо силиконировать.

3. Силиконирование стеклянной посуды

Стеклянную лабораторную посуду нельзя использовать для исследования системы гемостаза, т.к. поверхность стекла отрицательно заряжена и активирует процессы свертывания крови. Учитывая это, стеклянную посуду перед работой силиконизируют — покрывают тонким слоем силана. Вся процедура силиконирования проводится только в вытяжном шкафу.

Чаще всего применяют диметилдихлорсилан. 5 % раствором этого силана в толуоле заполняют чистые сухие стеклянные пробирки, затем раствор сливают для повторного использования. Стеклянные пипетки наполняют из резиновых груш. Затем посуду высушивают на воздухе в вытяжном шкафу в течение 10-12 часов и досушивают при температуре 100-150°C в сушильном шкафу. После 4-5-кратного использования силиконирование посуды повторяют.

4. Требования к приборам

Измерение результатов тестирования проводится как ручным методом с использованием термостатируемых водяных бань и секундомеров, так и с применением полностью или частично автоматизированных коагулометров.

Коагулометры по принципу своего действия делятся на 3 типа: механические, оптико-механические и оптические. По степени автоматизации коагулометры делят на полностью автоматизированные и на полуавтоматы.

Все коагулометры перед использованием требуют проверки и сопоставления данных анализа с результатами, полученными ручным методом. Необходимо убедиться также в правильности показаний температуры и в правильности регистрации конечной точки реакции. Следует постоянно проверять работу всех коагулометров. При сравнении результатов тестирования, полученных при работе с разными коагулометрами, нужно помнить, что приборы по-разному регистрируют конечную точку реакции, что сказывается на полученных данных. У водяных бань температура не должна варьировать в пределах, превышающих $\pm 0,5^\circ \text{C}$.

Протромбиновое время

Внешняя система коагуляции резервная, мобилизуется организмом при чрезвычайных обстоятельствах и процесс свертывания происходит очень быстро — за 15-20 сек. Внешний путь свертывания принято *in vitro* моделировать тестом протромбинового времени, предложенного А. Квиком в 1935 г. Для проведения теста Квика тканевый фактор (ТФ) получают из частично очищенных водных экстрактов тканей мозга человека, кроликов, быка, экстрактов легких или плаценты человека, получивших название тромбопластинов.

В медицинской практике широко распространено лечение расстройств,

сопровождающихся тромбообразованием, с использованием пероральных антикоагулянтов типа кумарина. Дозу этих лекарственных средств нужно периодически контролировать, чтобы обеспечить адекватный, но не избыточный уровень антикоагуляции. Такая коррекция проводится по тесту Квика на Протромбиновое время, основным реагентом которого является тромбопластин. Однако разнообразное по происхождению исходное сырье для получения тромбопластина (мозговая, легочная ткань, плацента животных и человека), а также различные методы получения тромбопластина, оказывают существенное влияние на результаты тестирования протромбинового времени.

За последние 20 лет было сделано несколько попыток стандартизации тромбопластинов, т.е. использование единой схемы тестирования и представления результатов, калибровка тромбопластинов по единому стандарту, использование стандартной плазмы. В основе стандартизации метода, принятой ВОЗ в 1983 г., лежит установленное исследованиями Международного Комитета по Стандартизации в Гематологии и Международного Комитета по Тромбозу и Гемостазу наличие линейной зависимости между логарифмами протромбинового времени, определенными с использованием разных тромбопластинов. Если по оси ординат отложить логарифмы величин протромбинового времени для плазмы донора и 6-7 плазм больных, определенные с использованием Международного стандарта тромбопластина, а по оси абсцисс — те же значения для исследуемого тромбопластина, то по тангенсу угла наклона графика определяют Международный Индекс Чувствительности — МИЧ (ISI — английская аббревиатура от International Sensitivity Index). При возведении значения протромбинового отношения (ПО), определенного с любым тромбопластином, в степень МИЧ, будет получено то значение МНО (Международного Нормализованного Отношения), которое было бы получено для данной плазмы с использованием Международного эталонного препарата ВОЗ. (Подробнее о расчете ПО и МНО ниже).

В 1982 г. был учрежден Международный эталонный препарат тромбопластина кроличьего (кодировый номер RBT/79) с МИЧ 1,4. В настоящее время в связи с распространением ВИЧ и вирусов гепатита использование тромбопластинов из кадаверного мозга запрещено, и разработаны рекомбинантный эталон тромбопластина (rTF/95) и кроличий — RBT/90, оба реагента с МИЧ 1,0.

Обращаем внимание на недопустимость смешивания понятия «активность» и «чувствительность» тромбопластинов. Активность - это Протромбиновое время (в сек) в нормальной плазме, чем оно короче, тем тромбопластин «активнее». Однако в данном случае важнее понятие «чувствительность», которое означает, что данный реагент «чувствует» снижение уровня факторов протромбинового комплекса (Протромбиновое время увеличивается). Только тромбопластины с низким МИЧ (до 2,0) в настоящее время считаются чувствительными к снижению уровня факторов протромбинового комплекса (II, VII, X, V). «Чувствительный» тромбопластин производит менее быструю активацию фактора X комплексом VIIa-ТФ, что приводит к большему удлинению протромбинового времени при инактивации факторов свертывания кумариновыми антикоагулянтами. Напротив, менее «чувствительный» тромбопластин активирует фактор X быстро, что

приводит к меньшему удлинению протромбинового времени при снижении активности факторов свертывания под действием антикоагулянтов.

Результаты анализа протромбинового времени можно представить как:

1. **Протромбиновое время (ПВ)** в сек (время свертывания исследуемой плазмы);

2. **Протромбиновое отношение (ПО).** $ПО = \frac{ПВ \text{ свежей плазмы больного в сек}}{ПВ \text{ свежего пула нормальной плазмы в сек}}$. ПО свежего пула плазмы равно 1,0. Если работа проводится с лиофильно высушенной нормальной плазмой, необходимо введение поправки, и в данном случае ПО рассчитывают по формуле:

Пример расчета ПО:

Пусть ПВ исследуемой плазмы=35 сек,

$ПО = \frac{\text{время свертг, иссл. плазмы в сек}}{\text{время свертг, норм. лиоф. плазмы в сек}}$ – ПО норм. лиоф. плазмы (указано в паспорте)

ПВ лиофильно высуш. нормальной плазмы=16 сек, ПО лиофильно высуш. нормальной плазмы = 1,15 (ПО указано в паспорте). Тогда ПО иссл. пл. = $(35/16) \cdot 1,15 = 2,52$

Эту величину с поправкой ПО очень важно рассчитывать при вычислении МНО.

Международное нормализованное отношение (МНО). Для расчета МНО сначала определяют ПО, как указано выше, с учетом поправки на нормальную плазму. Тромбопластин, использованный для анализа, должен быть аттестован по МИЧ. МИЧ определяется производителем отдельно для каждого тромбопластина, и его значение проставляется в паспорте, причем МИЧ не должен превышать 2,0. МНО получают, возводя ПО в степень МИЧ ($МНО = ПО^{МИЧ}$). Рассчитав МНО, можно использовать для мониторинга пациентов пероральными антикоагулянтами специальные разработанные для этой цели таблицы допустимых значений МНО.

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок

1. При приготовлении растворов цитрата натрия необходимо помнить, что эта соль может содержать разное количество кристаллизационной воды, и рекомендуется использовать точно приготовленные и проверенные растворы фирмы «РЕНАМ».

2. Процент протромбина по Квику не является протромбиновым индексом плазмы. Это различные величины.

3. Протромбиновый индекс - это расчетная величина, полученная делением протромбинового времени нормальной плазмы на Протромбиновое время больного и умноженная на 100.

4. Протромбин по Квику — это активность факторов протромбинового комплекса в процентах, рассчитанная по калибровочному графику. Калибровочный график строят путем разведения нормальной плазмы с аттестованной активностью факторов протромбинового комплекса и измерения времени свертывания каждого разведения.

5. Плазму, приготовленную для анализа протромбинового времени, следует хранить не более 2 часов при комнатной температуре. Охлаждение плазмы вызывает холодовую активацию фактора VII и укорачивает время реакции.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)

Внутренний путь свертывания происходит за несколько минут и осуществляется внутри кровеносных сосудов при повреждении эндотелия или при появлении чужеродной отрицательно заряженной поверхности. Метод моделирования процесса внутреннего свертывания в системе *in vitro* был предложен в 1953 г. (Langdell, Wagner, Brinhaus) и первоначально осуществлялся на стеклянной поверхности. Однако стекло активировало процесс по разному в зависимости от марки, методов обработки, применяемого моющего средства, и с целью унификации в качестве активатора (отрицательно заряженной поверхности) стали использовать каолин, целит, бентонит и ряд других веществ с отрицательно заряженной поверхностью, в последние годы — растворимую в воде эллаговую кислоту. При проведении теста используют также фосфолипиды растительного и животного происхождения или их смесь и ионы кальция для рекальцификации плазмы после действия цитрата.

До настоящего времени в ряде лабораторий проводят 2 других аналогичных, но лишь частично унифицированных теста:

ЧТВ (частичное тромбопластиновое время или кефалиновое время) и АВР (активированное время рекальцификации или каолиновое время). ЧТВ определяют при добавлении в исследуемую плазму фосфолипидного компонента и кальция хлористого, АВР — при добавлении в исследуемую плазму фактора контакта каолина и кальция хлористого.

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок

1. Кровь нельзя брать через катетер, которым пользовались для инъекций гепарина. Происходит значительное увеличение АЧТВ из-за контаминации следами гепарина.

2. Нельзя использовать для анализов кровь с микросгустками, т.к. в такой крови уже начался процесс свертывания и АЧТВ будет укорочено.

3. Нельзя использовать для анализов частично гемолизованную кровь, т.к. при этом происходит изменение нормальной длительности АЧТВ более, чем на 10%, т.к. продукты гемолиза эритроцитов обладают выраженным прокоагулянтным действием.

4. При взятии крови нельзя допускать травмирования прилежащих тканей и сосудов. т.к. при этом выделяются тканевые факторы, активизирующие свертывание крови и укорачивающие АЧТВ.

5. Плазму крови нельзя инкубировать при температуре 37° С более 5 мин, чтобы не допустить инактивации лабильных V и VIII факторов свертывания крови.

6. Не рекомендуется использовать для приготовления 0,025 М раствора кальция хлористого продажный раствор в ампулах, т.к. концентрация этого раствора в ампулах, как показали наши исследования, зачастую определена неточно.

7. Анализы проводить в посуде, не содержащей активаторов или ингибиторов свертывания (хорошо промытая дистиллированной водой, без применения моющих средств).

Тромбиновое время

Тромбиновое время характеризует конечный этап процесса свертывания — превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина, на него влияет концентрация фибриногена и наличие продуктов деградации фибрина. По продолжительности тромбинового времени нельзя диагностировать синдром ДВС и первичный фибринолиз.

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок

1. Стабилизированный раствор тромбина рекомендуется хранить в исходных флаконах, не переливать.
2. В случае длительного использования стабилизированного раствора тромбина допускается разделить его на аликвоты с учетом разовой используемой дозы и хранить в пластиковых пробирках (желательно, новых).
3. Рабочий раствор тромбина следует готовить непосредственно перед использованием и только в пластиковой посуде, учитывая, что тромбин сорбируется стеклом.
4. Рабочий раствор тромбина нельзя использовать для анализов сразу после приготовления, его следует выдержать в течение 15-20 мин при комнатной температуре (18-25° С).

Количественный анализ фибриногена по методу Клаусса

Метод Клаусса был предложен автором в 1957 г. Метод основан на особенностях кинетики реакции фибриноген-тромбин, когда при высоких концентрациях тромбина и низких концентрациях фибриногена время реакции зависит только от количества фибриногена.

Метод Клаусса прост в исполнении, определяет только активный фибриноген и гораздо более точен и стандартен, чем широко применяемый в нашей стране метод Рутберг.

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок

1. Набор предназначен для определения фибриногена по Клауссу только с помощью коагулометров, ручной метод использовать нельзя.
2. При работе на оптических коагулометрах с целью повышения чувствительности метода рекомендуется тромбин разводить специально приготовленной суспензией каолина.
3. Следует внимательно читать инструкцию до применения набора по разделу построения калибровочного графика. Необходимо помнить, что время свертывания фибриногена под действием тромбина прямо пропорционально содержанию фибриногена только при низких концентрациях последнего, поэтому все исследуемые образцы плазмы необходимо разводить в 10 раз буферным раствором.

Определение активности VIII и IX факторов свертывания крови

Одним из наиболее распространенных тяжелых наследственных заболеваний является гемофилия, частота которой в нашей стране составляет 1 на 8-10 тыс. мужского населения. Заболевание характеризуется спонтанными, нередко смертельными кровотечениями, кровоизлияниями в суставы, ведущими к ранней

инвалидности. Очевидно, что для достоверной диагностики гемофилии и при лечении больных чрезвычайно большое значение приобретает метод определения активности дефицитного фактора в плазме крови пациентов.

В настоящее время существуют 3 метода определения активности ф. VIII: одностадийный метод, двухстадийный метод и метод с хромогенными субстратами. Наиболее простой и наиболее широко распространенный одностадийный метод, который основан на линейной зависимости между активностью ф. VIII и временем свертывания в тесте АЧТВ.

Учитывая, что активность ф. VIII в нормальной плазме очень высокая, условлено принимать, что 100% активностью обладает нормальная плазма, разведенная в 5 раз. Для дальнейшего искусственного снижения активности нормальную плазму разводят еще в 10,50 и 250 раз и в полученных разведенных растворах определяют АЧТВ. Для восполнения сниженных при разведении факторов свертывания добавляют плазму больных гемофилией, в которой практически отсутствует (менее 2%) только ф. VIII, а остальные факторы присутствуют в нормальных концентрациях.

Калибровочный график строят, измеряя АЧТВ в этих разведенных растворах контрольной нормальной плазмы с установленной (по зарубежным стандартным плазмам) активностью ф. VIII.

Аналогичным образом (в 5,10 и 50 раз) разводят исследуемую плазму. В разведенных растворах исследуемой плазмы также определяют АЧТВ и строят по 3 точкам второй график, который должен представлять собой прямую линию, параллельную калибровочному графику. В случае параллельности двух графиков дальнейшее определение можно проводить по одной точке. В основу метода положены международные принципы стандартизации коагулологических исследований:

1. наличие стандартов;
2. калибровка «подобное подобным»;
3. независимость результатов от метода исследования;
4. линейность и параллельность калибровочного графика и графика исследуемой плазмы, позволяющие уменьшить ошибку анализа;
5. оценка случайной ошибки (методами математической статистики);
6. учет фактора времени (одномоментный анализ калибратора и исследуемой плазмы).

За единицу биологической активности ф. VIII принята активность, присутствующая в 1,0 мл свежей нормальной плазмы.

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок

1. Для получения достоверных результатов рекомендуем использовать для анализов только коммерческие аттестованные субстрат-дефицитные плазмы (в том числе плазму фирмы «РЕНАМ»), т.к. в неаттестованных плазмах может быть существенное изменение активности V и VIII факторов свертывания крови, связанное с присутствием ингибиторов.

2. Калибровочный график необходимо строить только в день проведения анализов.

• 3. Для получения достоверных результатов рекомендуется исследовать не менее 2 разведений анализируемой плазмы.