

Актуальные вопросы стандартизации и автоматизации методов лабораторной диагностики, предназначенных для выявления нарушений свёртывания крови

Зав. лабораторией гемостаза
МУЗ ГБ11, Барнаул
Редактор сайта *coagulometers.ru*
д.м.н., А.Н.Мамаев

Базовые хронометрические методы

АПТВ/АЧТВ

Протромбиновое время свёртывания

Концентрация фибриногена

АПТВ/АЧТВ

Активированное парциальное тромбопластиновое время/Активированное частичное тромбопластиновое время

Причины, вызывающие трудности стандартизации

- 1) Различный состав АПТВ-реагента.
- 2) Различная техника выполнения (мануальный, коагулометрический, сухая химия).
- 3) Проблемы связанные с контрольными материалами.

История изучения внутреннего пути коагуляции

Методический подход	Нормативы
1. Время свёртывания крови по Ли-Уайту (Lee R.I., White P.D. Am.J.Med.Sci. – 1913. – v.145. – №4. – P.495) В.П.Балуда, З.С.Баркаган Е.Д.Гольдберг и соавт. (1980).	Время свёртывания 10-15 мин 8-12 мин, 5-10 мин,
2. Модификация использованием силиконированных пробирок (Margulies H., Barker N.W.,1949) В.П.Балуда, З.С.Баркаган Е.Д.Гольдберг и соавт. (1980).	35-55 мин.
3. Время рекальцификации плазмы (Howell W.H., Amer.d.Physiol., 1912, v.31, N1., p.1.) Модификация этого теста (Bergerhof, Roka, 1954)	60-150 сек 80-140 сек
4. Силиконовое время рекальцификации плазмы (Beller F.K., Graeff H., 1971)	200-260 сек
5. Частичное (парциальное) тромбопластиновое время свертывания (Larrieu M.J., Weilland C., 1957)	60-70 сек
6. Каолиновое время свёртывания (Hattersley P.J., 1966)	70-120 сек
7. Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (Caen et al., 1968)	45-55 сек 20-30, 30-40 и т.д.

Компоненты АПТВ-реагента

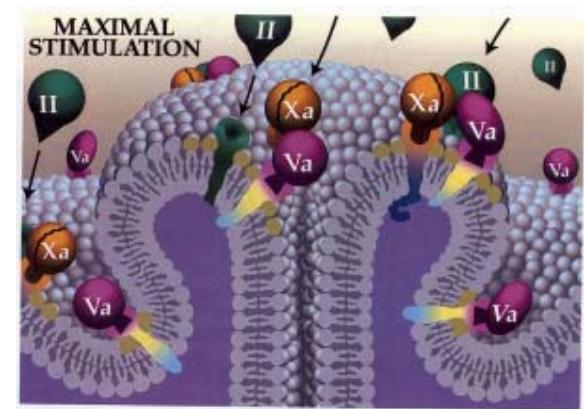
1. Активирующий компонент

- Каолин
- Элаговая кислота
- Кремний
- Целит

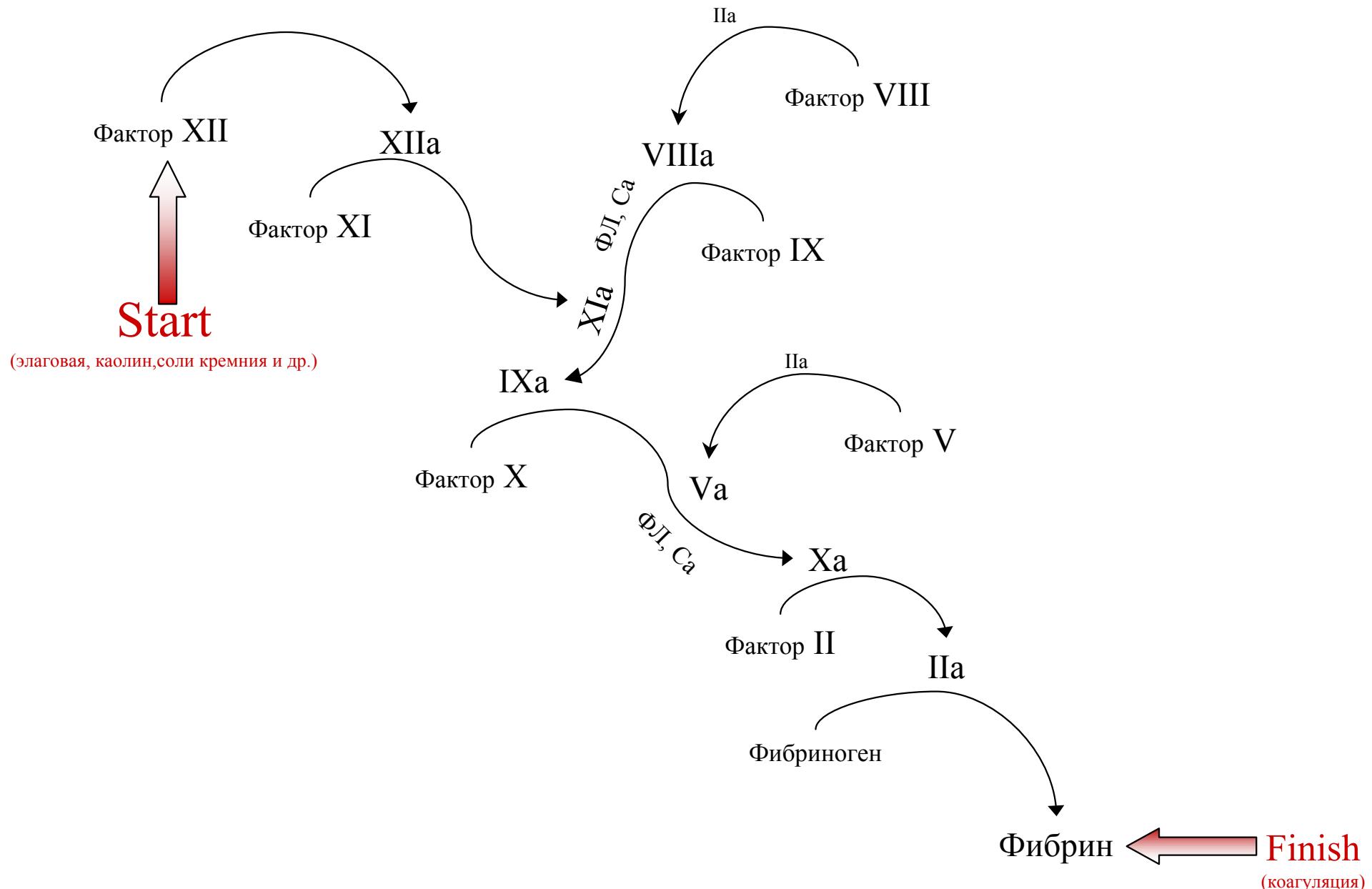
2. Фосфолипидный компонент

- Растительные фосфолипиды
- Фосфолипиды животного происхождения
- Искусственно составленные смеси

Как результат - разные диапазоны нормы, различная чувствительность к дефектам гемостаза.



Последовательность биохимических реакций в АПТВ-тесте



Причины гипокоагуляции в АПТВ (X+2SD)

1. Дефицит или аномалия коагуляционных факторов (II, X, V, VIII, XII, XI, IX).
2. Наличие ингибиторов к коагуляционным факторам.
3. Дефицит фактора Фицжеральда-Фложе и фактора Флетчера.
4. Антифосфолипидный синдром с циркуляцией волчаночного антикоагулянта.
5. Разведение плазмы кровезаменителями и лечение декстранами
6. Болезнь Виллебранда.
7. ДВС-синдром.
8. Синдром массивных гемотрансфузий.
9. Гипофибриногенемия.
10. Высокая концентрация ПДФ.
11. Дефекты преаналитического этапа исследования (цитрат).

Причины гиперкоагуляции в АПТВ (X-2SD)

Активация коагуляционных факторов:

- ДВС-синдром.
- Патология беременности.
- Онкологические и онкогематологические заболевания.
- Лечение рекомбинантным фактором VIIa.
- Дефекты преаналитического этапа исследования (цитрат, забор шприцом).



Несогласованность производителей реагентов

1. Различная чувствительность реагентов к дефектам гемостаза.
2. Отсутствие единого контрольного и патологического стандарта.
3. Использование производителями разных биохимических компонентов (каолин, элаговая кислота, соли кремния, фосфолипиды животного и растительного происхождения) как следствие различные нормы и разная чувствительность к дефектам гемостаза при использовании реагентов различных производителей.

АПТВ у 4 пациентов, получающих гепаринотеоапию,
полученное с использованием 3 разных АПТВ реагентов

Пациент	АПТВ1,сек	АПТВ2,сек	АПТВ3,сек
1	50,5	94,8	131,3
2	53,4	113,2	176,2
3	63,6	135,6	219,6
4	81,2	186,5	>300
нормальная плазма	29,2	34,3	36,7

Пути стандартизации АПТВ/АЧТВ

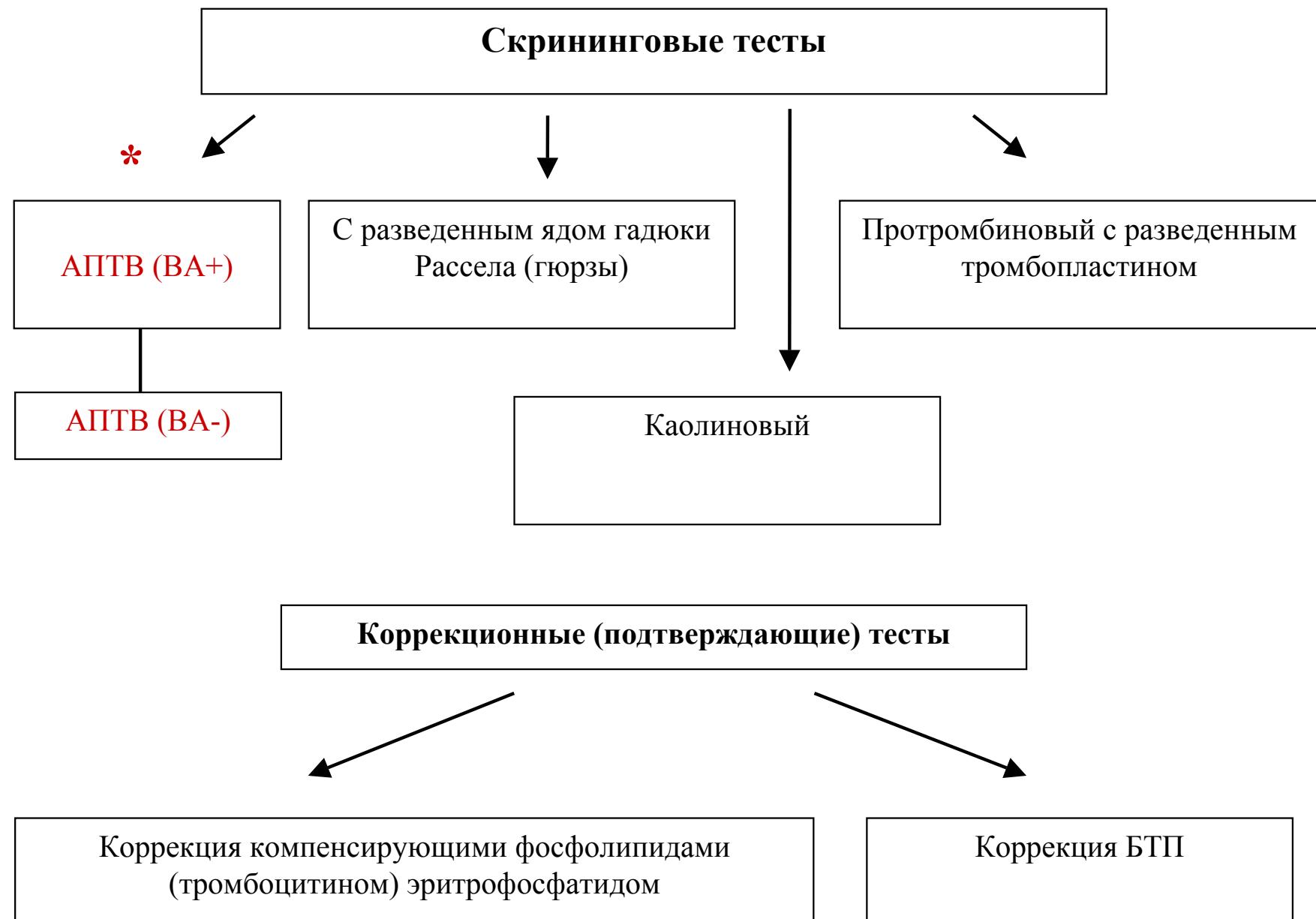
1. Применение АПТВ-отношения

$$(\text{Ratio}_{\text{АПТВ}} = \text{АПТВ}_{\text{больной}} / \text{АПТВ}_{\text{контроль}})$$

2. Использование различных по назначению реагентов АЧТВ

3. Изготовление производителями различных по назначению контрольных материалов

Алгоритм выявления волчаночных антикоагулянтов



Диагностика нарушений гемостаза

- 1 этап (клинический), тщательный сбор жалоб и анамнеза;
- 2 этап (лабораторный).
 - а) применение скрининговых процедур (времени кровотечения, количества тромбоцитов, АПТВ/АЧТВ, протромбинового теста, концентрации фибриногена);
 - б) уточняющая диагностика (определение концентрации факторов свёртывания, определение функции тромбоцитов, диагностика дисфибриногенемии, выявление ингибиторов коагуляции).

История изучения внешнего пути свёртывания

В 1836 году Buchanan впервые заметил, что различные ткани ускоряют свертывание крови (1836, 1845).

В 1904 году Morawitz протромбин назвал II фактором коагуляции.

В 1912 году Howell показал, что водный экстракт из мозга содержит липид и белок с сильным гемокоагулирующим действием.

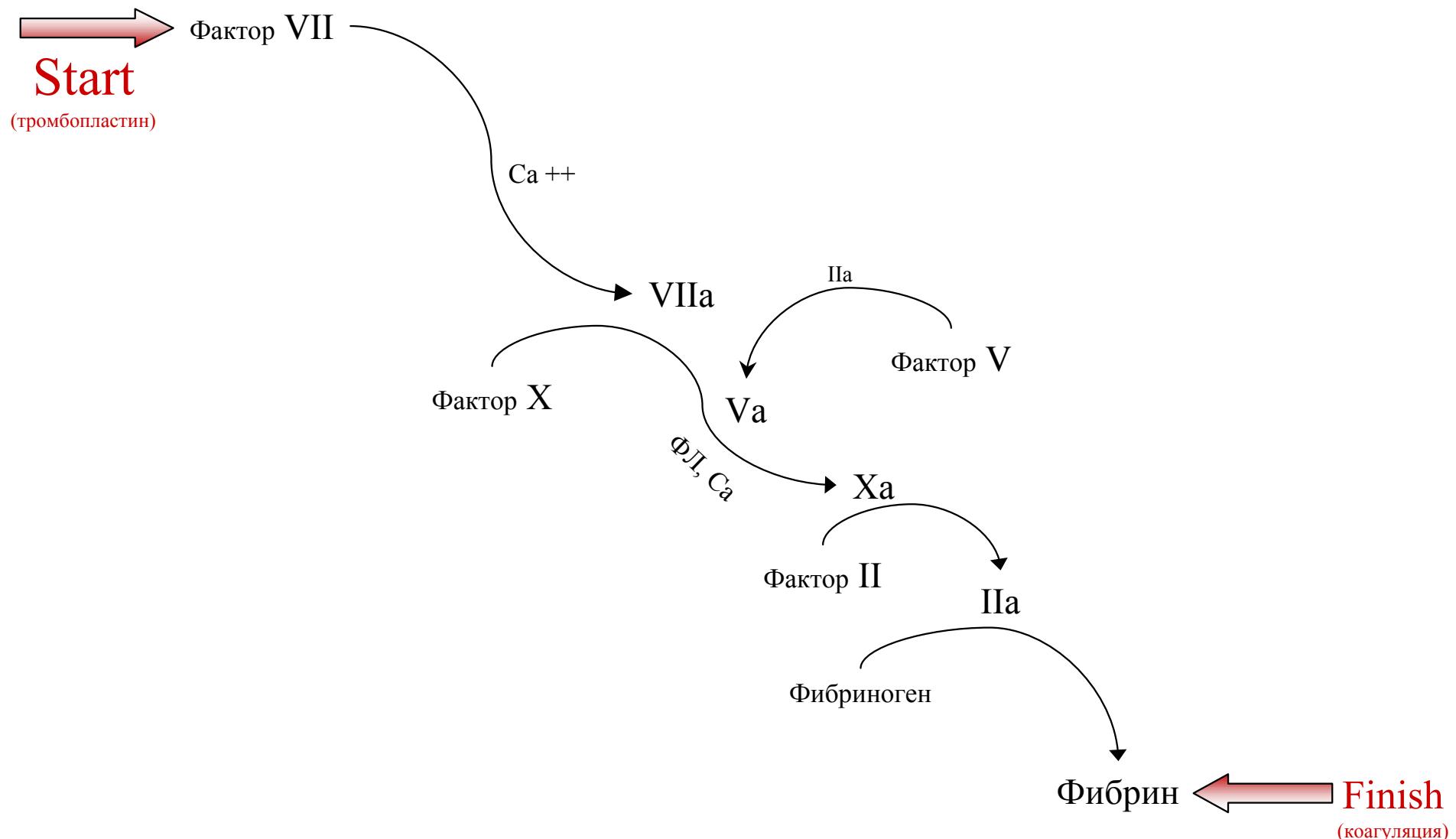
В 1935 году Armand J. Quick году предложил протромбиновый тест*.

В 1941 году K.P. Link обнаружил 4-гидрокси-кумарин (дикумарол) в плесени гнилого клевера, который вызывал гибель питающихся этим клевером животных от кровотечений.

В 1947 году Owren первый описал больного с очень удлиненным протромбиновым временем, что исправлялось нормальной плазмой, но не витамином К («парагемофилия»).

*Quick A.J. The prothrombin time in hemophilia and in obstructive jaundice. //J. Biol. Chem. – 1935. – V.109. – P.73-74

Последовательность биохимических реакций в протромбиновом тесте



Современный подход для оценки результатов протромбинового теста:

$$MHO = \left(\frac{\text{Протромбиновое время больного в секундах}}{\text{Нормальное протромбиновое время в секундах}} \right)^{МИЧ}$$

МНО (INR) = Международное нормализованное отношение

МИЧ (ISI)= Международный индекс чувствительности тромбопластина

Состояния, при которых выявляется нарушение в протромбиновом тесте

1. Лечение непрямыми антикоагулянтами.
2. Болезни печени.
3. Дефицит факторов свёртывания (X, VII, V, II, I).
4. Наличие ингибиторов, в том числе антифосфолипидный синдром.
5. Лечение гепарином.
6. ДВС-синдром.
7. Лечение рекомбинированным фактором VIIa.

Основные непрямые антикоагулянты

Основные фармакологические группы	Время полужизни
<u>Кумарины</u>	
- варфарин (мареван, кумадин, орфарин)	{ 40-70 ч
- пелентан (диндерал, неодикумарин, дикумарил)	{ Около 5 ч
- синкумар (аценокумарин, аценокумарол)	{ Около 10 ч
<u>Индандионы</u>	
- фенилин (фениндион, диндеван, фенилининдиндион)	{ Около 9 ч
- омефин	

Причины, влияющие на удлинение протромбинового времени при приеме АНД

1. Дозировка (2,5-20,0 мг.).
2. Ошибки аналитического и преаналитического этапов.
3. Индивидуальная чувствительность к варфарину.
4. Особенности питания.
5. Лекарственные препараты (поливитамины, азатиоприн, барбитураты, некоторые антибиотики).
5. Заболевания печени и желчевыводящих путей (обтурационная желтуха, гепатиты и циррозы).
6. Употребление алкоголя.
7. Возраст.
8. Антифосфолипидный синдром.
9. Заболевания щитовидной железы.
10. Почечная недостаточность.

Рекомендуемые уровни МНО при приеме АНД

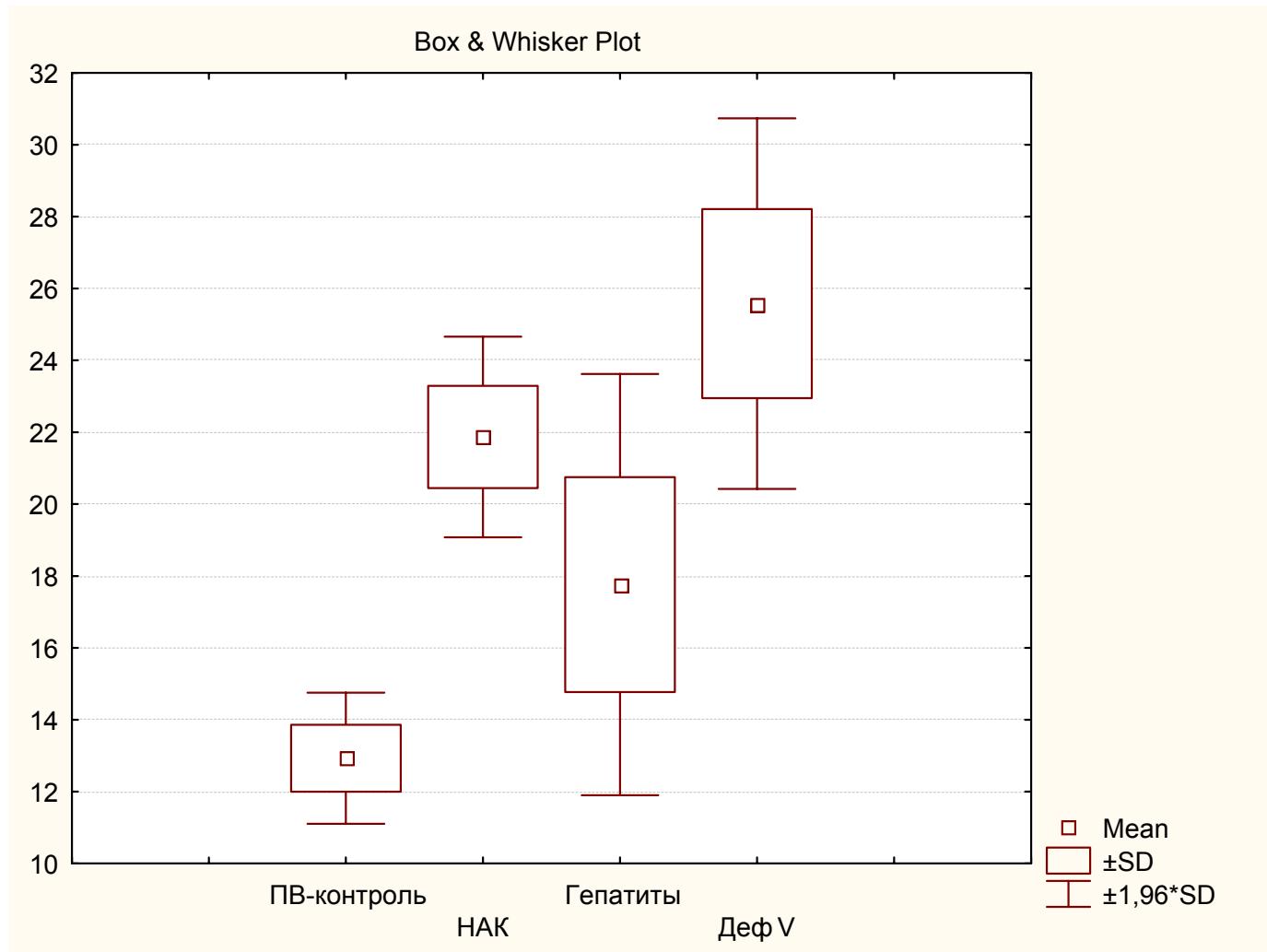
В зависимости со значениями МНО (международного нормализованного отношения) при назначении непрямых антикоагулянтов различают три уровня интенсивности гипокоагуляции:

Высокий	МНО от 2,5 до 3,5
Средний	МНО от 2,0 до 3,0
Низкий	МНО от 1,6 до 2,0

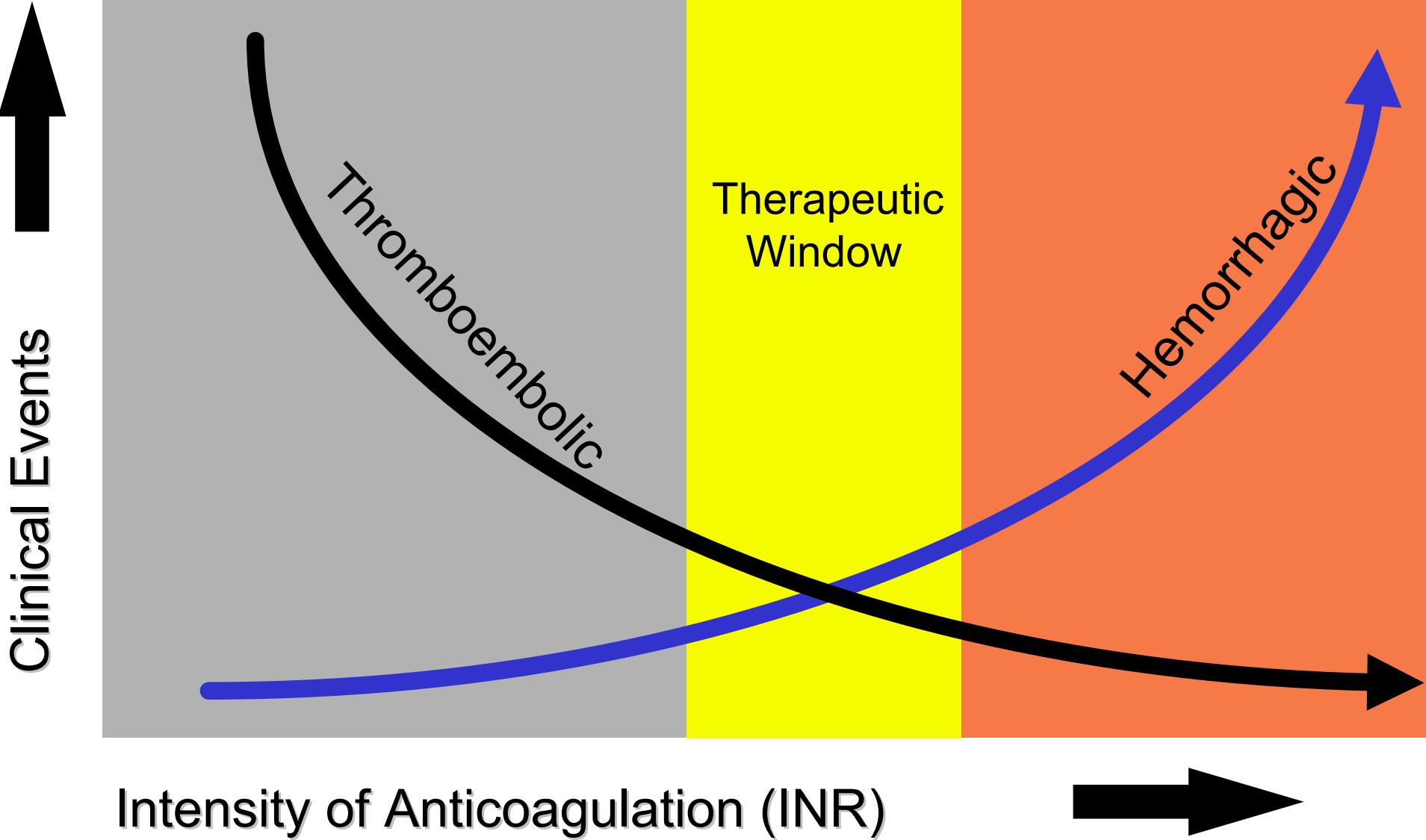
и два периода индуцированной гипокоагуляции при подобранный (фиксированной) дозировке варфарина:

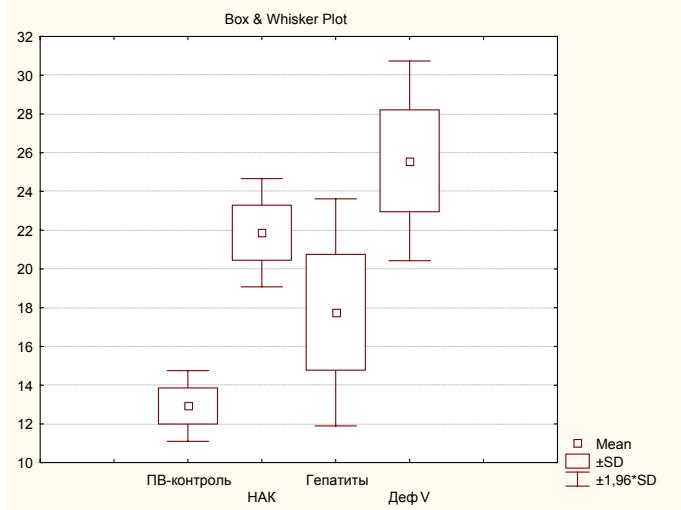
- нестабильный период (до 6 недель от начала приема варфарина)**
- стабильный период (после 6 недель).**

WHO Expert Committee on Biological Standardization. 33rd Report. Technical Report Series No. 687/ WHO, Geneva 81, 1983.



Результаты определения протромбинового времени у больных с разными причинами гипокоагуляции в протромбиновом тесте при использовании стандартизированного тромбопластина (МИЧ=1,1; норма 11-15 сек)





Пути стандартизации и повышения точности протромбинового теста

1. Применение известных образцов плазмы со стандартами INR в различных диапазонах (2-3; 3-4; 5-8)
2. Калибровка различных тромбопластинов для выполнения протромбинового теста различными способами (оптический, механический, мануальный)
3. Решение вопроса о целесообразности применения МНО при лечении рекомбинантным фактором VIIa

Новые надежды

Ксимегалотраны

Exanta



Идеальные требования к антикоагулянтам:

Применение per os; медленная фармакокинетика; отсутствие взаимодействия с пищей; отсутствие мониторинга коагуляции; отсутствие геморрагических осложнений

Традиционные методы определения концентрации фибриногена

- б) метод Клаусса (Clauss, 1957)**
- а) метод Рутберг (1961)**

Методы определения концентрации фибриногена, которые не получили широкого распространения

- а) метод с осаждением сульфатом аммония (Parfentjev et al., 1953)**
- б) колориметрический метод (Т.Н.Горшкова, Х.Д.Ломазова, 1965)**
- в) с использование яда Эфи (И.Я.Цейман и соавт., 1996)**
- г) метод ИФА**

Определение концентрации фибриногена

Нормальные значения (2-4 г/л)

Причины гипофибриногенемии

- а) врождённая гипофибриногенемия;
- б) ДВС-синдром;
- в) болезни печени;
- г) дисфибриногенемия;
- д) алиментарная дистрофия, кахексия

Причины гиперфибриногенемии

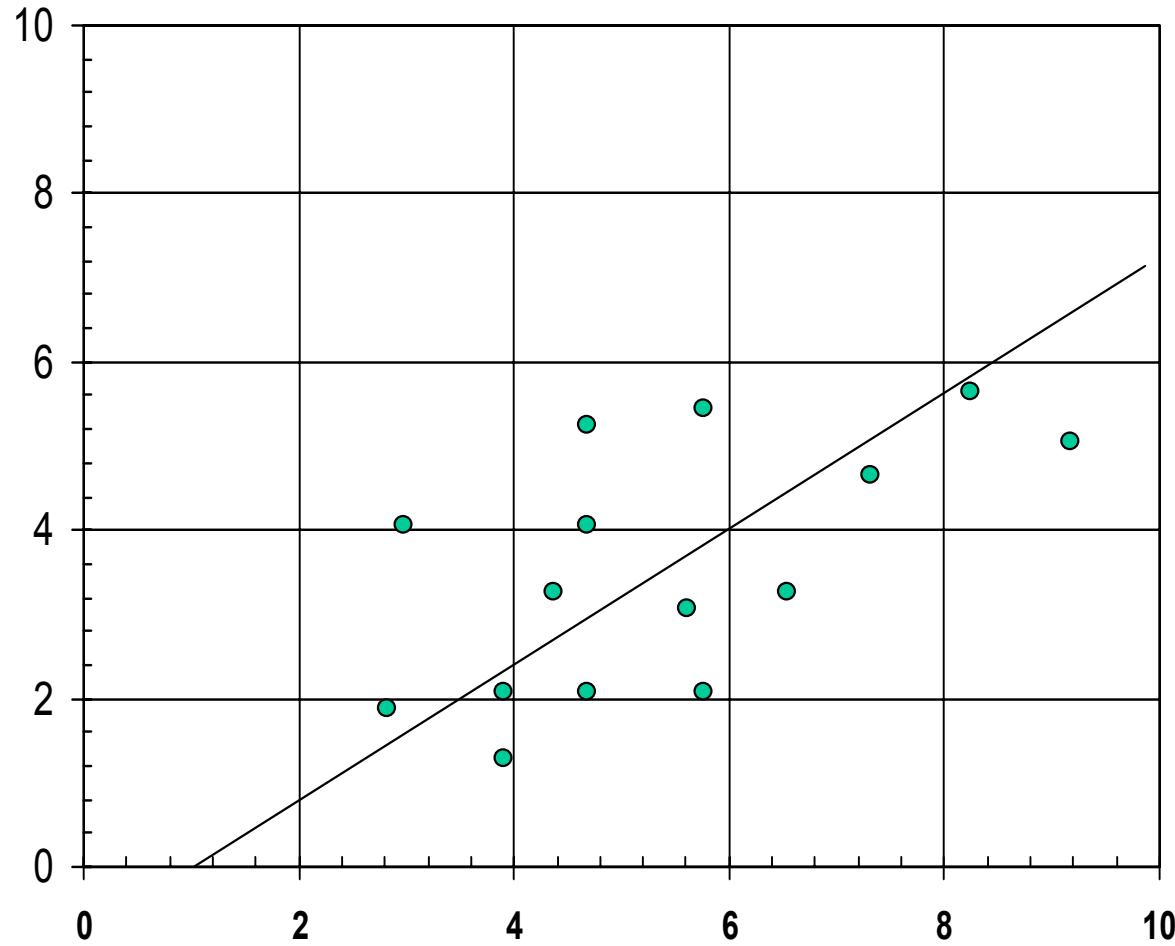
- а) заболевания инфекционной и воспалительной этиологии;
- б) онкологические заболевания
- в) сердечно-сосудистые заболевания
- г) беременность
- д) тромбозы и варианты ДВС-синдрома.

Вариант дисфибриногенемии

- а) показания метода Клаус – нет свёртывания;
- б) показания метода Рутберг – 2,3 г/л;
- в) тромбиновое время – нет свёртывания;
- г) анцистроновое время – 98 сек (N-25сек)
- д) эхитоксовое 38 сек (N-27сек)

Сравнительные результаты определения концентрации фибриногена хронометрическим и гравиметрическим способами

Метод Клауса



$r=0,62$; $P<0,05$; $n=15$

Метод Рутберг

Преаналитический этап

В первые 30 секунд после наложения венозной манжеты не обнаружено какого-либо влияния на результаты скрининговых тестов или на активность отдельных факторов.

После стаза длительнее 3 минут обнаружены следующие изменения:

- укорочение протромбинового времени, АПТВ и тромбинового времени
- повышение примерно на 10% уровня фибриногена, антитромбина III и
- увеличение концентрации фактора VIII:C на 20%, а в некоторых случаях увеличение может быть существенно большим.

При превышении значений гематокрита 0.55, отношение кровь/цитрат необходимо изменить. Количество крови, которое необходимо взять, может быть рассчитано по следующей формуле:

9 x объем цитрата, мл x **0,55/(1-Ht)**

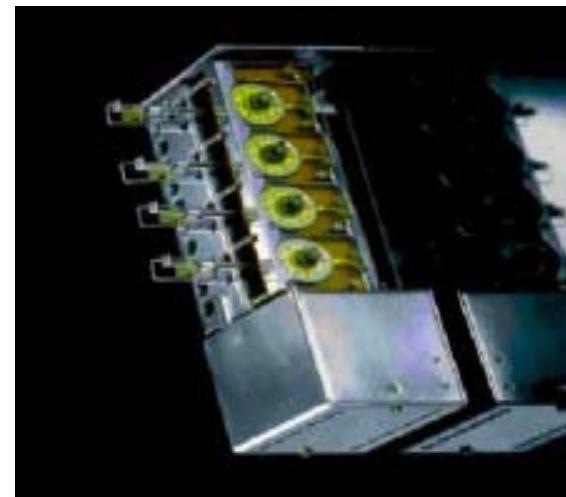
Например. Ht пациента 0.8:

Объем крови = 9 x 1мл x 0.55/(1-0.8) = 24,75 мл.,

т.е. к 1 мл. цитрата необходимо добавить 24,75 мл венозной крови.

Мануальные методы

- метод наклона пробирки - пробирка наклоняется повторяющимися движениями пока образец не свернется;
- метод крючка - крючок или петля повторяющимися движениями опускается внутрь пробирки до образования прилипающего к ней сгустка.



**Schnitger + Gross 4 Channel
Analyser (1955)**

Несколько причин, которые вынуждают отказаться от мануальной техники выполнения коагуляционных тестов

Объективные причины:

1. При мануальной технике выполнения невозможно поддерживать постоянную **температуру** в тестируемой пробирке после ее извлечения из водяной бани (например, в каолиновом teste время свертывания 65-100 секунд в норме, а при патологии это время может достигать 200 секунд и более , т.е. после добавления хлорида кальция приходится извлекать из водяной бани исследуемую пробирку, где температура 37°. и встряхивать ее в течение двух трех минут до появления коагуляции. Конечно же, ко второй-третьей минуте после извлечения из водяной бани температура пробирки будет близка к комнатной.
2. Невозможно поддерживать стандартную **освещенность** при мануальном варианте выполнения коагуляционного теста.
3. **Встряхивание** не может быть стандартным при мануальной технике выполнения.
4. Наиболее часто выполняемый тест для определения **фибриногена** (гравиметрический метод Рутберг и его модификации) зачастую дает неправильные (+/-2гр/л) и невоспроизводимые показания (часто его выполняют с грубейшими нарушениями большинства санитарных норм).

Субъективные причины:

Некоторые лаборанты определяют время коагуляции останавливая секундомер при появлении первых фибриновых нитей в тестируемой смеси, а другие останавливают секундомер при появление сгустка.

По принципу регистрации образования сгустка фибрина

- а) механические;
 - б) оптические (в том числе и оптико-механические);
 - в) совмещенные.
- Электромеханическая детекция по конечной точке - клоттинговое время определяется либо с помощью пластины, либо с помощью металлического шарика;
 - Оптическая детекция - клоттинговое время регистрируется по значительному возрастанию оптической плотности при переходе фибриногена в фибрин. Определение может производиться фотометрически или нефелометрически.

При использовании методов сухой химии появление сгустка регистрируется на основе сниженного отражения на эритроцитах.

По уровню автоматизации

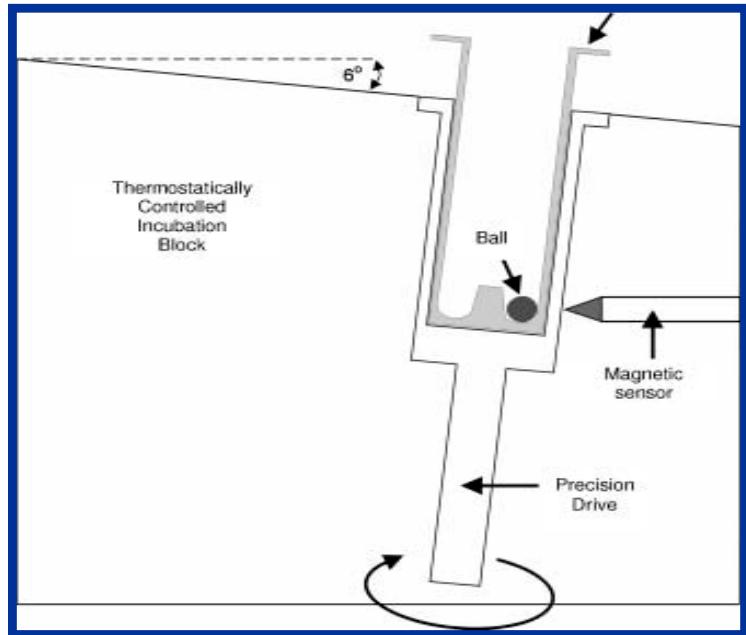
- а) автоматические;
- б) полуавтоматы;
- в) без автоматических функций с программируемым модулем вычислений;
- г) коагулаторы.

По числу регистрирующих каналов коагулометра

- а) одноканальные;
- б) двухканальные;
- в) четырёхканальные;
- г) многоканальные

Комбинирование с другими устройствами

- а) простые;
- б) комбинированные.

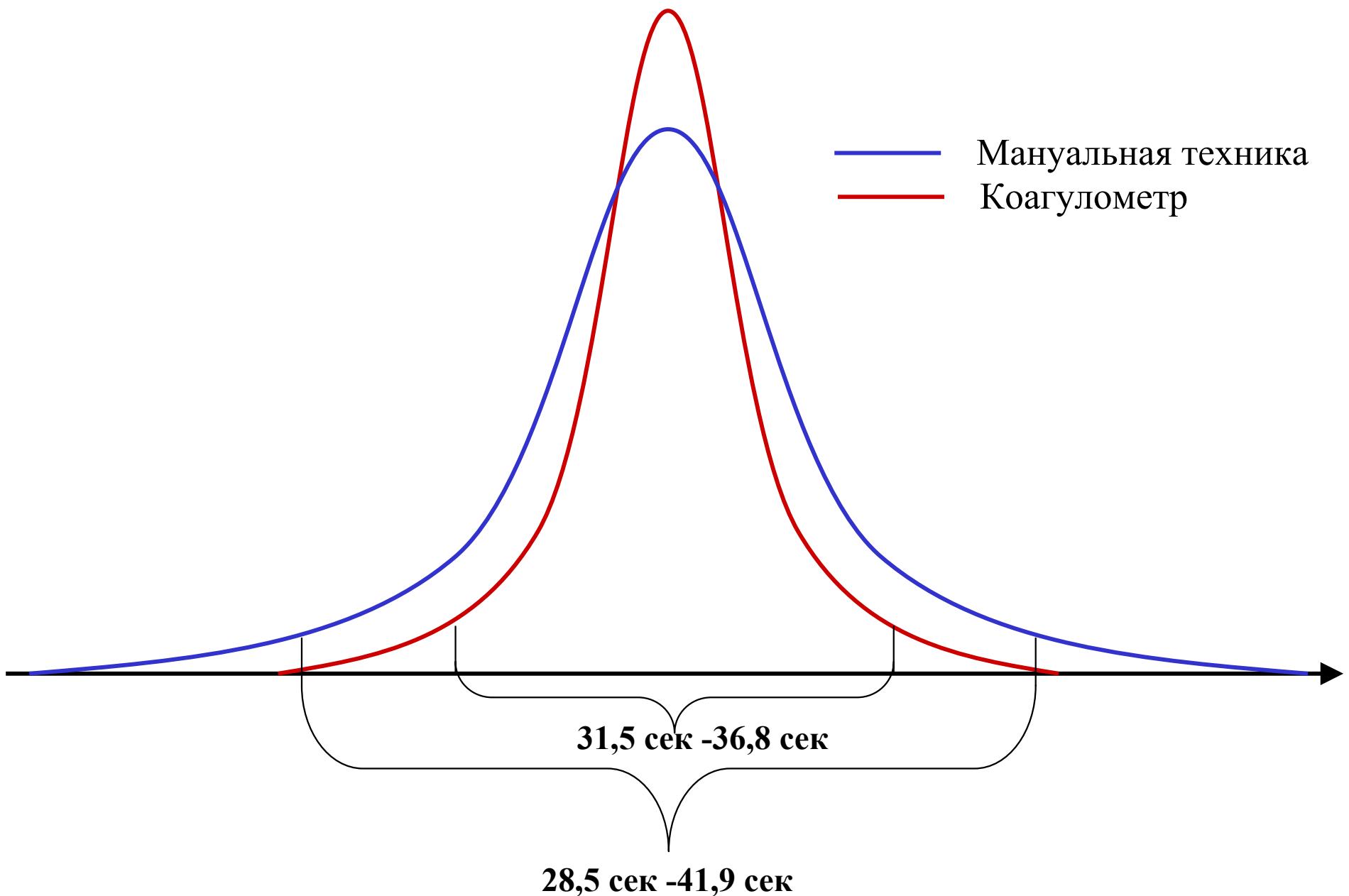


Патент 1979 г.





Полигон частот при разной технике выполнения АПТВ теста



Спасибо за внимание!