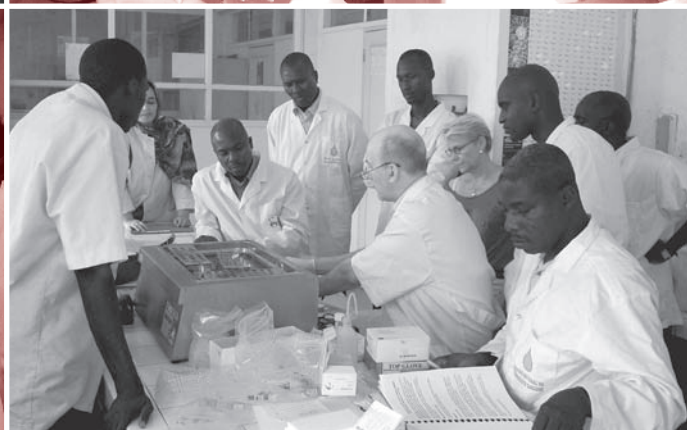


ДИАГНОСТИРОВАНИЕ ГЕМОФИЛИИ И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРОВИ

РУКОВОДСТВО ЛАБОРАТОРИИ

Второе издание



Steve Kitchen

Angus McCraw

Marión Echenagucia

WORLD FEDERATION OF
HEMOPHILIA
FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOFILIE
FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA
Treatment for All



Публикация Всемирной Федерацией Гемофилии (ВФГ)

© World Federation of Hemophilia, 2010

ВФГ поощряет распространение своих публикаций в образовательных целях некоммерческими организациями, которые занимаются заболеваниями, связанными с гемофилией и кровоизлияниями.

Чтобы получить разрешение на перепечатку, распространение или перевод этой публикации, свяжитесь, пожалуйста, с Отделом информации, адрес которого приведен ниже.

Данная публикация доступна на веб-сайте Всемирной Федерации Гемофилии www.wfh.org. Дополнительные копии также доступны у ВФГ:

World Federation of Hemophilia
1425 René Lévesque Boulevard West, Suite 1010
Montréal, Québec H3G 1T7
CANADA

Тел.: (514) 875-7944

Факс: (514) 875-8916

Электронная почта: wfh@wfh.org

Диагностирование Гемофилии И Других Заболеваний Крови

РУКОВОДСТВО ЛАБОРАТОРИИ

Второе издание (2010)

Steve Kitchen

Обучающий Специалист
Лаборатории ВФГ
Sheffield Haemophilia
and Thrombosis Centre
Royal Hallamshire Hospital
Sheffield, U.K.

Angus McCraw

Обучающий Специалист
Лаборатории ВФГ
Katharine Dormandy
Haemophilia Centre
and Thrombosis Unit
The Royal Free Hospital
London, U.K.

Marión Echenagucia

(соавтор, Автоматизация)
Banco Municipal
de Sangre del D.C.
Universidad Central
de Venezuela
Caracas, Venezuela

От имени

Комитет Лабораторных Изучений ВФГ

Председатель (2010): Steve Kitchen, Sheffield, U.K.

Заместитель председателя: Suresh Nair, Vellore, India

Данное издание было проверено следующими лицами, которые в период написания данного материала являлись членами Комитета Лабораторных Исследований Всемирной Федерации Гемофилии.

Mansoor Ahmed

Norma de Bosch

Ampaiwan Chuansumrit

Marión Echenagucia

Andreas Hillarp

Clarence Lam

Suresh Nair

Alison Street

Alok Srivastava

Некоторые части данного издания были также проверены членами Комитета болезни фон Виллебранда и Редких Заболеваний Крови Всемирной Федерации Гемофилии.

Признание: Несколько описываемых методов базируются на стандартных лабораторных процедурах, отобранных Анетт Бойер из Центре Гемофилии Шеффилда, чей вклад в данное дело был отмечен и признан. Авторы данного руководства и ВФГ выражают большую благодарность Доктору Павлу Свиринову из Измайловского Детского Клинического Госпиталя, г. Москва за его тщательную рецензию данного перевода.

Обращаем внимание на то, что коммерческие источники, приведенные в данном руководстве, являются простым примером, подходящим в момент написания. Всемирная Федерация Гемофилии (ВФГ), авторы и Комитет Лабораторных Исследований ВФГ не намеревались использовать их в качестве подтверждения написанного. Также это никак не означает, что другие источники являются ненадежными или неподходящими. Производители материалов, используемых в лабораторных тестах, могут изменять состав материалов. Поэтому неизвестно, останутся ли эти источники настолько же надежными в будущем.

Контактная информация автора:

steve.kitchen@sth.nhs.uk

amccraw@nhs.net

Содержание

1	Оборудование Лаборатории.....	1
2	Проверка Пипеток И Градуировка Весов.....	3
3	Безопасность Лаборатории	5
4	Взятие пробы и предварительные данные для проведения анализа крови ..	11
5	Контроль Внутреннего Качества И Оценка Внешнего Качества.....	15
6	Техника Ручного Наклона Пробирки.....	21
7	Подготовка И Градуировка Собранной Стандартной Плазмы (ССП).....	23
8	Установление Стандартного Диапазона.....	25
9	Реагенты.....	29
10	Подсчет Тромбоцитов.....	31
11	Время Кровотечения.....	36
12	Протромбиновое Время (ПВ).....	38
13	Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ).....	41
14	Тесты Смешения Для Дальнейшего Исследования Анормального Пв И Ачтв	46
15	Время Свертывания Тромбина.....	50
16	Тромбиновое Время При Наличии Протамин Сульфата Для Определения Наличия Гепарина.....	52
17	Рептилазное Время.....	53
18	Фибриноген (Измененный Анализ Клауса).....	56
19	Извлечение Гепарина Из Плазмы.....	59
20	Проведение Анализа Антиген Фибриногена Путем Радиальной Иммунодиффузии (РИ).....	61
21	Скрининг Фактора XIII	63

22	Анализы, Основанные На Протромбиновом Времени (Факторы II, V, VII, X).....	65
23	Анализы Факторов, Основанные На Ачтв (Одноэтапные анализы Факторов VIII:С, IX, XI или XII).....	68
24	Анализ Фактора VIII:С В Криопреципитате	72
25	Двухступенчатый Анализ На Свертываемость Фактора VIII:С.....	73
25.1.	Производство комбинированного реагента для двухступенчатого анализа фактора VIII:С.....	75
26	Хромогенный Анализ Фактора VIII:С	78
27	Одноэтапный Внутренний Анализ Прекалликрейна (ПК) И Высокомолекулярного Кининогена (ВМК)	81
28	Скрининг Ингибитора Фактора Свертываемости На Основе Ачтв.....	83
29	Активность Кофактора Ристоцетина / Активность Фактора Виллебранда...85	
29.1.	Приготовление неподвижных тромбоцитов.....	87
30	Антиген Фактора Виллебранда По Ифа.....	89
31	Связующий Анализ Коллагена Фактора Фон Виллебранда.....	92
32	связующий анализ фактора viii для диагностирования болезни фон виллебранда тип нормандия.....	95
33	Анализ Мультимера Фактора Фон Виллебранда.....	101
34	Количественное Измерение Ингибиторов Фактора VIII.....	110
35	Анализ Ингибитора Фактора IX	116
36	Анализ Активности Фактора Xiii.....	117
37	Волчаночный Антикоагулянт И Антифосфолипидные Антитела.....	121
38	тест на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела	124
38.1	Подготовка Промытых Тромбоцитов Для Проведения Теста На Свертываемость Крови С Применением Разбавленного Яда Гадюки Рассела ..	127
39	Тестирование Функционирования Тромбоцитов	129
39.1.	Сокращение Сгустка	130
39.2.	Измерение Соединений Сгустка.....	131
40	Лиофилизация Плазмы	141
41	Оценка И Использование Коагулометров	143
42	Молекулярный Генетический Анализ.....	151

Любой лаборатории, проводящей диагностику и лечение заболеваний крови и использующей все или только некоторые техники, описанные в данном пособии, необходимо иметь минимальный набор основного оборудования. Следует заметить, что оценка и использование автоматических или полуавтоматических коагулометров описывается в Разделе 41.

БАЗОВЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К АППАРАТУРЕ:

- Холодильник или место хранения реагентов с температурой 4°C. Обычно реагенты должны храниться при температуре 2°C–8°C, если не обусловлено иначе производителем. Может быть вполне достаточно холодильника местного производства хорошего качества.
- Камера глубокой заморозки, способная держать температуру от -35°C. Более низкие температуры до -70°C используются для более длительного хранения. Факторы свертываемости остаются неизменными при этой температуре на протяжении как минимум шести месяцев. Морозильных камер с температурой -25°C, как правило, бывает недостаточно для хранения плазмы и реагентов для большинства анализов на гемостаз. Совершенно не подходят морозильники с циклом авто размораживания.
- Регулируемые водяные ванны, способные удерживать температуру 37°C ± 0.5°C. Сухие горячие приборы могут быть пригодными, но не все, в зависимости от прибора. Обычно температура регулируется лучше в водяных ваннах.
- Измеритель уровня pH
- Источник света (например, лампа Anglepoise)
- Секундомер
- Градуированные автоматические пипетки, способные аккуратно и точно собрать образцы крови и реагента объемом 0 µl–200 µl и более 1000 µl. Важно, чтобы точность пипеток была проверена (см. Раздел 2).
- Градуированные пипетки, способные собирать образцы объемом до 5 ml.
- Центрифуга объемом не менее 1700 г
Для большинства анализов коагуляции возможно центрифугирование при температуре 20°C–25°C. (При использовании некоторых техник рекомендуют центрифугировать 2500 г при температуре 4°C.)

- Градуированные аналитические весы, аккуратно измеряющие в граммах веса с точностью до трехзначных десятичных чисел. Смори Раздел 2 для процедуры проверки на точность.

Для некоторых процессов потребуется дополнительное оборудование:

- Ридер с микротитровым планшетом для реакции электроиммунной диффузии меченых ферментами антител
- Тромбоцитный агрегометр
- Оборудование, указанное в специальных инструкциях

В странах с жарким климатом необходимо в каждой комнате установить кондиционер.

Необходим надежный запас расходных материалов. Необходимо избегать повторного использования пробирок и пипеток для анализов, так как вещества, оставшиеся после мытья этих приборов, могут неблагоприятно сказаться на результатах анализа и приведут к потере реагентов и времени.

ССЫЛКА

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, and Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229–36.

Для соблюдения точности измерений необходимо проверять градуировку весов и объем пипеток каждые 3-6 месяцев. Приборы, слегка отклоняющиеся от точной градуировки, должны быть немедленно изъяты из обращения до того момента, пока точная градуировка не будет установлена заново. На каждой пипетке должен быть уникальный идентификатор.

МЕТОД ПРОВЕРКИ КАЛИБРОВКИ ПИПЕТОК

1. Пипетки могут быть одного объема, двух или трех объемов или иметь множественный диапазон объемов.
 - Для пипеток с одним или двумя установленными параметрами проверка этих параметров производится для каждой отметки.
 - Для пипеток с тремя установленными параметрами производится проверка только верхней и нижней границы.
 - Для пипеток с множественным диапазоном параметров: проверьте максимальную границу, а также объем, равный 25% от максимальной величины, например:
 - Для пипеток объемом 10 мл – 10 мл и 2.5 мл
 - Для пипеток объемом 5 мл - 5 мл и 1.25 мл
 - Для пипеток объемом 1 мл - 1 мл (1000 μ л) и 0.25 мл (250 μ л)
 - Для пипеток объемом 0.2 мл - 0.2 мл (200 μ л) и 0.05 мл (50 μ л)
 - Для пипеток объемом 0.1 мл – 0.1 мл (100 μ л) и 0.025 мл (25 μ л)
 - Для пипеток объемом 50 μ л - 50 μ л и 15 μ л
2. Проверять градуировку нужно путем повторного измерения (до 5 раз) дистиллированной воды комнатной температуры на чаше весов. Показатели каждого измерения записываются в граммах с точностью до трехзначных чисел. К сведению, 1.000 мл составляют 1.000 гр.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все результаты и действия должны быть записаны.

Если установлено, что пипетка показывает неправильный результат, и объем тестируемой жидкости отличается от эталонного более чем на 10%, то такую пипетку необходимо немедленно изъять из обращения и не использовать до тех пор, пока заново не будет произведена ее градуировка, следуя инструкции производителя. Показатели измерений пипеток должны быть точными, допускается небольшое отклонение до 10%.

Следует заметить: Если неточность данных пипеток превышает следующие параметры (вес тестируемой жидкости), то такие пипетки должны быть немедленно изъаты из обращения:

- | | |
|--|---|
| • Пипетки объемом 10 мл
10 мл: 9.000 г-11.000 г
2.5 мл: 2.250 г-2.750 г | • Пипетки объемом 0.2 мл
0.2 мл: 0.180 г-0.220 г
0.05 мл: 0.045 г-0.055 г |
| • Пипетки объемом 5 мл
5 мл: 4.500 г-5.500 г
1.25 мл: 1.125 г-1.375 г | • Пипетки объемом 0.1 мл
0.1 мл: 0.090 г-0.110 г
0.025 мл: 0.0225 г-0.0275 г |
| • Пипетки объемом 1 мл
1 мл: 0.900 г-1.100 г
0.25 мл: 0.225 г-0.275 г | • Пипетки объемом 50 µl:
50 µl: 0.045 г-0.055 г
15 µl: 0.013 г-0.165 г |

МЕТОДЫ ПРОВЕРКИ ВЕСОВ

Для установления точности показателей весов, необходимо совершать их поверку каждые 6 месяцев. Данные нужно записывать.

1. Обнулите весы.
.....
2. По очереди измерьте три градуированных веса. Запишите показатели с точностью до трехзначных чисел (например, 1.003 г).
.....
3. Если показания весов отклоняются от стандартных более чем на 2%, изымите их из использования до тех пор, пока проблема не будет устранена.
.....

Лаборатории, содержащие в себе химикаты и биологические образцы, являются потенциально опасными.

За последние годы значительно возросла значимость безопасности рабочих мест по причинам здравоохранения и защиты окружающей среды. Такая осведомленность отразилась на повышенном внимании к таким проблемам как безопасность документации, обучение персонала и оценка рисков.

Работодатели несут ответственность за предоставление необходимой защитной одежды и оборудования, также они обязаны проводить тренинги по безопасности на рабочих местах.

Если предприняты все меры безопасности на рабочих местах, то вероятность травмы для всех работников значительно снижается.

ГЛАВНЫЕ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

Важно назначить главного по безопасности в каждом отделе. Этот человек (или несколько людей) будет нести ответственность за внедрение и поддержание мер безопасности. Тем не менее, безопасность лаборатории – дело каждого ее работника.

РУКОВОДСТВО ПО БЕЗОПАСНОСТИ

Необходимо иметь полное руководство по безопасности, затрагивающее все аспекты работы всего отдела.

Все работники лаборатории должны прочесть руководство и подписать декларацию о том, что содержание им понятно.

Копии руководства должны храниться у главных по безопасности, а также должны быть легко доступны всем работникам лаборатории.

ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ: ОБЩИЕ ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Система общих предостережений требует ликвидации или минимизирования любого риска инфицирования от любого источника путем соблюдения правил безопасности.

Все образцы крови, продукты крови (включая реагенты и наборы на основе плазмы) и другие продукты человеческого тела считаются потенциальными источниками инфицирования.

При работе с любыми веществами необходимо соблюдать все возможные меры безопасности.

Нет необходимости в дополнительной классификации рисков. При работе с любыми другими веществами и жидкостями следует соблюдать такую же осторожность, как и при работе с кровью, независимо от того, были ли они собраны в лаборатории или их принесли туда для тестирования или других целей.

Лаборатория

Лаборатория должна всегда содержаться в чистоте и порядке. Бумаги нужно хранить в помещении, отдельном от того, где проводятся тестирования. Постарайтесь не хранить в лаборатории крупные предметы. Постарайтесь проследить за тем, чтобы все работники лаборатории содержали ее в порядке.

Защитная одежда

Все, кто входит в лабораторию, включая посетителей, должны надеть больничный халат. Если халат заражен, его следует немедленно снять и одеть другой.

Одноразовые перчатки

Многие не любят носить перчатки, однако любой образец, содержащийся в лаборатории, потенциально опасен. При работе с токсичными материалами следует всегда надевать перчатки.

Перчатки и халаты, конечно, не спасут от случаев ранения, полученных в результате неосторожного обращения с острыми предметами, но они могут предотвратить, например, проникновение ВИЧ-инфицированной сыворотки или токсина в рану или ссадину на коже.

Порванные или проколотые перчатки всегда заменяйте на новые.

Промывание глаз

Большинство инфекций передается при контакте со слизистой оболочкой глаза.

В случае контакта с вероятно инфицированным веществом немедленно промойте глаза под струей холодной воды.

Острые предметы

Острые предметы, такие как иглы или разбитое стекло, представляют большую опасность: для их хранения используйте контейнер, не повреждаемый острыми предметами.

Известны случаи заражения работников лаборатории от ран, полученных в результате неаккуратного обращения с острыми предметами.

Аэрозоли

В лаборатории избегайте всех мероприятий, которые могут привести к разбрызгиванию и распылению воздушных капель или пыли.

Действия, вызывающие аэрозоль, должны всегда проводиться в специальных шкафах для испарений. Также необходимо носить защитные очки.

Случайно пролитые вещества нужно немедленно убрать при помощи отбеливателя или нейтрализующего агента.

Токсичные и взрывоопасные вещества

Токсичные и взрывоопасные вещества должны всегда находиться в специальных шкафах для испарений или безопасных контейнерах.

Электрическое оборудование

Нужно относиться с особым вниманием к оборудованию, в применении которого используется жидкость, например, резервуары для электрофореза и водяные бани.

Установка, обслуживание и ремонт должны осуществляться квалифицированным персоналом.

Личные вещи и поведение персонала

Никогда не приносите в лабораторию свои личные вещи, такие как ручки, сумки или расчески.

Находясь в лаборатории, избегайте прикасаться руками к своему лицу или слизистой оболочке (глаза, нос, рот). Если вам все же нужно это сделать, вымойте сперва руки.

Никогда не приносите в лабораторию еду, сигареты или косметику.

Никогда не берите пипетки в рот.

Перед тем как покинуть лабораторию, тщательно вымойте руки.

Несчастные случаи

В случае возникновения, нужно немедленно заявить о несчастном случае и сделать запись в соответствующей книге, находящейся у главного по безопасности отделения. Это особенно важно в случае с травмами, полученными в результате неправильного обращения с острыми предметами. В этих случаях следуйте указаниям местной системы здравоохранения и сообщите о случившемся.

КОНТРОЛЬ ЗА ВЕЩЕСТВАМИ, ОПАСНЫМИ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ (КВОЗ)

Данное законодательство, используемое в лабораториях Великобритании, является полезным руководством при определении рисков и опасностей.

Риски и опасности

Представляющие опасность вещества являются потенциальным источником нанесения вреда. Риски, соотносимые с использованием данных веществ, могут предоставлять реальную угрозу нанесения вреда в момент их использования.

Идентификация рисков

Идентификация рисков является важным условием их оценки. Время, потраченное на определение рисков, варьируется в зависимости от вещества, с которым работают.

Оценка рисков

Следует обратить внимание на следующие факторы:

- Риски
- Условия использования
- Используемые количества
- Возможные пути проникновения или участки, подверженные воздействию (попадание через носовые пути, через рот, кожу или глаза)

Результат оценки рисков определит:

- Условия хранения
- Способы обращения
- Способы утилизации
- Необходимые условия мониторинга и контроль за здоровьем
- Действия в случае критического положения

Оценка рисков должна производиться ежегодно, при необходимости вноситься изменения.

Для примера записи данных, касающихся оценки риска, смотрите ниже Таблицу 3.1 и 3.2., где используется процедура контроля за веществами, опасными для здоровья.

Цель данной формы – установление рисков и методов контроля, связанных с оборудованием, используемым в конкретной методике. Только компетентные работники могут совершать данную операцию и только после прочтения материала по правилам безопасности, касающегося данного конкретного испытания.

Таблица 3.1. Контроль веществ опасных для здоровья (КВОЗ) при анализе на определение протромбинового времени и анализы на фактор свертываемости крови, основанные на АЧТВ

Ссылки КВОЗ Тест 1
Ссылки лаборатории. Одноэтапные тесты II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII

Название процесса/эксперимента:

Вещество	Прибли- зительное количество	Выявленный риск
Буферный раствор глюоксалина (имидазола), содержит (смотри**)	<5 мл	Вреден при попадании внутрь.
**Иммидазол	3.4 г/л	Едкий: вызывает ожоги. Вреден при вдыхании, проглатывании и проникновении через кожу. Раздражителен для глаз.
**Хлорид натрия	5.85 г/л	Раздражает глаза и легкие. Избегайте контакта с кожей.
Обедненная фактором плазма	1 мл	Риск инфицирования
Тромбопластин	2 мл	Небольшой риск
Реагент АЧТВ	2 мл	Небольшой риск
0.025М хлорида кальция	5 мл	Небольшой риск
Буфер Оурена	<500 мл	Содержит барбитон. Вреден при проглатывании. При контакте с кожей или проглатывании может вызвать повышенную чувствительность.
Раствор для промывания коагуляционного анализатора 1	<50 мл	Вызывает ожоги: вреден для глаз, кожи и т.д. Не смешивать с другими дезинфицирующими средствами. Едкий. При контакте с легковоспламеняющимися веществами может вызвать пожар. При контакте с кислотами выделяет токсичный газ. Сильно реагирует на контакт с аммиачными солями; при контакте с органическими растворителями есть риск взрыва.
Раствор для промывания коагуляционного анализатора 2	<50 мл	Содержит 0.16% хлористоводородной кислоты и детергент. Вызывает раздражение: вреден для глаз и кожи.
Стандартная (контрольная) плазма пациента	<1000 µл	Риск инфицирования.

Таблица 3.2. Анализ КВОЗ для фактора XIII

Название процесса/эксперимента:		
Вещество	Прибли- зительное количество	Выявленный риск
Реагент активатор: коровий тромбин; ингибитор свертываемости (0.01 G GLY-PRO-ARG-ALA-AMIDE); хлорид кальция; гексадиметрина бромид (40мГ); коровий альбумин; буфер бицина (100М м/л); 2.5 мг азид натрия	5 мл пузырек	Содержит азид натрия: очень токсичен при попадании в организм через кожу или проглатывании. Может вызвать передаваемые по наследству генетические повреждения. Взрывоопасен при контакте с определенными материалами.
Реагент NADH: 2 мг NADH; коровий альбумин и 2.5 мг азида натрия	5 мл пузырек	Содержит азид натрия: очень токсичен при попадании в организм через кожу или проглатывании. Может вызвать передаваемые по наследству генетические повреждения. Взрывоопасен при контакте с определенными материалами.
Реагент выявления: синтетический пептид; глицин этил эстер (7 мг); альфа-кетоглутарат (13.5 мг); коровий альбумин; буфер HEPES; и 5 мг азида натрия	5 мл пузырек	Содержит азид натрия: очень токсичен при попадании в организм через кожу или проглатывании. Может вызвать передаваемые по наследству генетические повреждения. Взрывоопасен при контакте с определенными материалами.
Стандартная (контрольная) плазма пациента	<1000 μ л	Риск инфицирования.

Взятие пробы и предварительные данные для проведения анализа крови

4

ВЗЯТИЕ ПРОБЫ

Некоторые руководства обстоятельно описывают процедуры взятия и обработки проб крови для тестирования на гемостаз (CLSI 2007, 2008a, 2008b).

Если есть возможность, то венозную кровь следует брать из вены в локтевом сгибе с применением резинового жгута для облегчения забора необходимого количества крови. Жгут следует накладывать перед самым взятием пробы. Размеры иглы для взрослых не должен превышать 21G, а сама проба должна браться шприцом и / или с использованием вакутайнера, позволяющим выполнить быстрое взятие пробы крови. Кровь в шприц следует всасывать плавно. Для детей возможно использование иглы размером 22G или 23G.

Все пробы, которые не удалось быстро взять после успешного ввода иглы в вену, должны быть уничтожены в связи с возможной активацией коагуляции. Набранную в шприц кровь не следует переливать при помощи той же иглы. Перед тем как переливать кровь из шприца в контейнер с антикоагулянтом, необходимо снять иглу. Не допускается никаких задержек с момента взятия пробы до смешивания ее с антикоагулянтом.

После смешения крови с антикоагулянтом, контейнер следует запечатать и плавно перевернуть пять раз. Избегайте энергичного встряхивания. Некоторые авторы рекомендуют не использовать первые 5 мл извлеченной крови для анализа на гемостаз.

Следует отметить, что в случае применения заданной системы забора крови, после введения крови в антикоагулянт, все же необходимо производить плавное переворачивание пробирки с забранной кровью до 5 раз.

Кровь необходимо смешать с антикоагулянтом крови натрия цитратом (sodium citrate) в соотношении 9 частей крови на 1 часть антикоагулянта. Это должно составлять 0.109 М (3.2% дигидрата тринатрия цитрата (trisodium citrate dihydrate)) или аналогично этому (например, в некоторых системах вакуумирования в качестве антикоагулянта успешно используется 0.105 М цитрата). Раствор антикоагулянта можно хранить в течение трех месяцев при температуре 4°C, однако перед использованием его следует проверить на отсутствие в нем твердых взвешенных частиц. В случае обнаружения заражения раствора его следует уничтожить. Контейнер для пробы не должен индуцировать активацию пробы из-за контакта с материалом, из которого он изготовлен (например, при использовании пластмассы или стекла с кремниевым защитным слоем). Если у пациента пониженный гематокрит, или, что очень существенно, если гематокрит повышенный, то это может

повлиять на результаты. Объем антикоагулянта должен корректироваться с учетом уменьшения объема плазмы. Ниже на Рисунке 4.1. приведены указания, касающиеся объема антикоагулянта, необходимого для пробы объемом 5 мл.

Рисунок 4.1. Объем крови и антикоагулянта, необходимого для проб с аномальным гематокритом

Гематокрит	Объем антикоагулянта	Объем крови
25%–55%	0.5 мл	4.5 мл
20%	0.7 мл	4.3 мл
60%	0.4 мл	4.6 мл
70%	0.25 мл	4.75 мл
80%	0.2 мл	4.8 мл

С другой стороны, объем антикоагулянта может всегда составлять 0.5 мл, а объем добавляемой крови варьироваться с учетом гематокрита. Объем добавляемой крови (для цитрата 0.109 М объемом 0.5 мл) рассчитывается по формуле:

$$\frac{60}{100 - \text{гематокрит}} \times 4.5$$

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Обогащенная тромбоцитами плазма (PRP) для тестирования функций тромбоцитов готовится путем центрифугирования 150 - 200 г крови с антикоагулянтом в течение 10 минут при комнатной температуре. Супернатант удаляется и в процессе использования содержится в сосуде с запорной пробкой при комнатной температуре не более двух часов.

Для большинства тестов на коагуляцию используется обеднённая тромбоцитами плазма (platelet-poor plasma, PPP). Минимальное количество пробы крови должно составлять 1700 г, которое необходимо центрифугировать не менее 10 минут. Эту процедуру можно выполнять при комнатной температуре, если она не превышает 25°C. В противном случае следует пользоваться охлажденной (4°C) центрифугой.

Для некоторых методов тестирования плазму необходимо центрифугировать дважды. Для этого после первого центрифугирования необходимо переместить обедненную тромбоцитами плазму в пробирку с пластиковой запорной пробкой и центрифугировать ее второй раз. Следует обратить внимание на то, что после второго центрифугирования нижний слой плазмы не должен использоваться, так как в нём могут содержаться тромбоциты, оставшиеся после первого центрифугирования.

ПРОБЫ ДЛЯ НЕМЕДЛЕННОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

По возможности тестирование проб следует выполнять в течение четырех часов после их взятия. Следует избегать более длительного хранения при проведении скрининговых тестов и при взятии анализов на свёртываемость крови, хотя установлено, что пробы необработанной крови, хранившиеся при комнатной температуре, могут оставаться неизменными при измерении протромбинового времени (Baglin и Luddington, 1997). Пробы для скрининговых тестов и для анализа на фактор VII следует хранить при комнатной температуре, чтобы избежать возможности холодной активации.

ПРОБЫ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫЕ ЗАРАЖЕНИЕМ

Следует проявлять осторожность при обращении со всеми пробами плазмы из-за риска передачи гепатита, ВИЧ и других вирусов.

См. раздел 3, Безопасность лаборатории.

ПЛАЗМА ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Пробы могут храниться в состоянии глубокой заморозки для проведения тестирования позже. Рекомендуемая температура хранения - минус 70°C и ниже. Показатели свертываемости крови при этой температуре остаются неизменными более шести месяцев (Woodhams et al. 2001). Для большинства тестов вполне приемлемым является краткосрочное хранение проб при температуре -35°C. Хранение при температуре -20°C, как правило, не приемлемо. Двойное центрифугирование (см. выше раздел Центрифугирование) следует применять в том случае, если пробы подвергались глубокому замораживанию до анализа на волчаночный антикоагулянт.

Следует избегать заморозки и размораживания проб крови до определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), поскольку это может повлиять на результаты, определяемые с помощью некоторых методик. Перед проведением анализов все образцы замороженной плазмы должны быть немедленно помещены в ванну с температурой воды 37°C для размораживания в течение четырех-пяти минут. Затем их следует смешать плавно перевернув. Следует избегать медленного размораживания при более низкой температуре, чтобы предотвратить образование криопреципитата, уменьшающего количество факторов VIII:C, VWF, и содержание фибриногена супернатантной плазмы.

ССЫЛКИ

Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: Approved standard*, 6th ed. 2007; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H3-A6: 27(26).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures and devices for the collection of diagnostic capillary blood specimens: Approved standard*, 6th ed. 2008 (a); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H4-A6: 28(25).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: Approved guideline*, 5th ed. 2008 (b); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H21-A5: 28(5).

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229-36.

Контроль Внутреннего Качества И Оценка Внешнего Качества

5

Гарантия качества (ГК) – общий термин, используемый для описания всех мер, принимаемых для обеспечения надежности лабораторных тестов и отчетов. Это включает в себя выбор теста, забор действенных образцов у пациента, их анализ, при необходимости, аккуратная и своевременная запись результатов и передача этих результатов соответствующему специалисту.

Контроль внутреннего качества (КВК) и оценка внешнего качества (ОВК) (иногда именуемые тестированием квалификации) – два отдельных, но дополнительных компонента программы оценки качества работы лаборатории. КВК применяется для того, чтобы установить последовательно ли выполняется ряд методов и операций в течение определенного временного промежутка. Поэтому для подтверждения ежедневной последовательности работы лаборатории программу представляют в более развернутом виде. КВК используется для установления степени согласованности результатов лаборатории и результатов, полученных в других центрах.

В крупных системах КВК ретроспективные анализы результатов, полученных в тестируемых лабораториях, позволяют установить не только плохое качество работы отдельных лабораторий, но также реагентов и методов, приводящих к ненадежным или неправильным результатам.

Основная функция КВК – проверка качества отдельных лабораторных тестов. Международная система КВК Всемирной Федерации Гемофилии включает в себя анализ уместности к конкретному диагнозу и управления заболеваниями крови (для дальнейшей информации обращайтесь во Всемирную Федерацию Гемофилии). Результаты работы системы внешнего контроля качества были опубликованы, ниже приведены ссылки:

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Development of a World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme: results of a pilot study. *Haemophilia* 1996; 2: 4-46

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Laboratory performance of haemophilia centres in developing countries: 3 years' experience of the World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme. *Haemophilia* 1998; 4: 739-746.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the WFH EQA programme 2003-2008. *Haemophilia*. 2009; 15:571-7.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВА ОЦЕНКИ ВНЕШНЕГО КАЧЕСТВА ВСЕМИРНОЙ ФЕДЕРАЦИИ ГЕМОФИЛИИ (2010):

Директор: Проф. Эрик Ф. Прэстон
Научный директор: Др. Стив Китчен

Ратледж Мьюз
3 Саусборн Роад
Шеффилд
S10 2QN
Великобритания
Тел.: + 44 -114 – 267 3300
Факс: + 44 -114 – 267 3309
Вэбсайт: www.ukneqasbc.org

Более крупные системы КВК могут предоставить информацию по сравнительному исполнению аналитических действий, включая принципы метода, реагенты и инструменты. Установлено, что продолжительное участие в работе системы КВК ведет к улучшению качества функционирования лаборатории. Это улучшение было установлено не только в работе всех лабораторий в совокупности, но и в работе отдельных лабораторий. Доказательством тому служит сокращение непостоянства результатов среди лабораторий.

Такая оценка качества работы отдельных лабораторий является существенным компонентом системы КВК. Система оценки внешнего качества Всемирной Федерации Гемофилии сравнивает результаты лабораторий, участвующих в эксперименте, с результатами тестирований таких же экземпляров, проводимых в более 700 центрах по всему миру, участвующих в работе британской национальной системы оценки внешнего качества при тестировании свертываемости крови.

Есть ряд причин считать результаты лабораторных испытаний неудовлетворительными. В то время как причина такого неудовлетворения может быть выявлена сразу же, выявить скрытую проблему бывает довольно сложно. Более крупные системы способны выявить проблемы в работе лаборатории, особенно касающиеся различий реагентов или методик.

Характерной особенностью работы всех систем КВК является ее полная конфиденциальность. В Международной КВК, упомянутой выше, разглашение информации о работе конкретной лаборатории происходит только с письменного разрешения главы департамента.

КОНТРОЛЬ ВНУТРЕННЕГО КАЧЕСТВА

Контроль внутреннего качества применяется для того, чтобы установить последовательно ли выполняется ряд методов и операций в течение определенного промежутка времени. Термин «контроль качества» широко употребляется для описания набора действий, направленных на проверку

того, что результаты лабораторных испытаний достаточно надежны для их использования при принятии клинических решений, мониторинге лечения и диагностики заболеваний крови. Методики контроля качества должны применяться таким образом, чтобы установить непременный и постоянный контроль качества получения результатов.

В самой лаборатории существует множество факторов, влияющих на качество достигнутых результатов, включающие в себя:

- Сбор образцов надлежащим образом и обращение с ними
- Выбор подходящих методик и своевременное ведение книги записей о стандартных методиках действий
- Использование надежных реагентов и исходных материалов
- Выбор подходящей аппаратуры и ее правильное обслуживание
- Точные записи
- Система отчета о результатах

В дополнение следует отметить, что качество результатов, достигаемых при каждодневной деятельности, очень зависит от выбора, обучения и мотивации набранного персонала.

Контроль внутреннего качества особенно помогает при выявлении степени точности конкретного метода, точность является порядком согласованности среди повторяющейся совокупности действий, совершаемых при изучении одного экземпляра. Важно осознавать, что точный метод не всегда является верным; под верностью понимается совпадение оцениваемой величины с эталонной.

МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЗУЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для того чтобы оценить точность конкретного метода, необходимо провести анализ нескольких частей одного и того же образца. Важно включать образцы контроля качества со стандартными и аномальными величинами для того, чтобы убедиться, что метод контролируется на различных уровнях, так как при тестировании аномального контроля относительно небольшие изменения в аналитическом процессе могут быть слишком очевидны.

Материал контроля качества по своим качествам должен быть похож на образцы тестирования, также нужно одновременно проводить и его анализ. Материалы контроля качества человеческого происхождения больше всего напоминают человеческие образцы для тестирования. Все пробирки или части контрольного материала должны быть практически идентичными, для того чтобы любое отклонение в результатах тестирования не являлось следствием изменений в самих пробирках.

Материал, используемый для проведения контроля качества также должен оставаться неизменным на протяжении всего периода его использования. Что касается тестов и анализов на гемостаз, то образцы плазмы должны быть подвергнуты глубокой заморозке (предпочтительно до -35°C или ниже) или лиофилизированы для того, чтобы оставаться неизменными в качестве материала для исследований. Для приведения лиофилизированных образцов в обычное состояние важно использовать дистиллированную воду с рН-балансом 6.8–7.2. Процесс займет около 5 минут.

При использовании коммерчески доступного материала для проведения контроля качества, приведение лиофилизированных образцов в обычное состояние должно проводиться согласно инструкции производителя с использованием точной системы измерения пипетками. При использовании глубоко замороженного материала образцы необходимо быстро разморозить при температуре 37°C в течение 5 минут. При выборе материала для проведения контроля качества следует опасаться риска передачи вирусов кровеносной системы. Следует избегать применения материала с высоким риском заражения.

По крайней мере, один материал, используемый при проведении контроля качества, должен быть включен в каждую группу скрининговых тестов и анализов. Для скрининговых тестов было бы более уместно включить в группу стандартные материалы, а аномальные тестировать один раз в день или в смену, или когда возникают сомнения в том, что данный метод находится под контролем. Для руководства по устранению проблем, связанных с контролем качества ПВ и АЧТВ, а также проблем внутреннего контроля качества при анализе двух различных уровней, смотри ниже Рисунок 5.1.

Рисунок 5.1. Устранение проблем внутреннего контроля качества (ВКК)

ПВ Уровень 1 ВКК	ПВ Уровень 2 ВКК	АЧТВ Уровень 1 ВКК	АЧТВ Уровень 2 ВКК	Заключение/ Проверка
Не включен	Включен	Включен	Включен	ПВ Уровень 1 материалов ВКК
Не включен	Не включен	Включен	Включен	Реагент ПВ
Включен	Включен	Не включен	Включен	АЧТВ Уровень 1 материалов ВКК
Включен	Включен	Не включен	Не включен	Реагент АЧТВ
Не включен	Не включен	Не включен	Не включен	Прибор

Материал более низкого уровня, используемый при проверке качества, должен быть включен в проверку для диагностики и мониторинга врожденных пороков крови.

Во всех случаях, с контрольным материалом нужно обращаться, по возможности, точно так же, как и с образцами для тестирования. Так как

возможна небольшая вариация в показаниях результатов вследствие их биологической, технической и аналитической природы, то каждый результат тестирования на качество должен быть записан и оценен согласно взятому за образец диапазону, пример тому приведен ниже.

ДОПУСТИМЫЕ ГРАНИЦЫ ВАРИАЦИИ

Для коммерческих образцов, применяемых при проведении контроля качества, производители часто предлагают целевой диапазон приемлемых значений. При проведении скрининговых тестов и отдельных анализов полученные результаты будут зависеть от реагентов и конечной системы определения, используемой для проведения тестирования. Данные результаты должны учитываться при определении целевого диапазона. При невозможности установления целевого диапазона для конкретной методики его устанавливают локально.

Если известно, что производится контроль метода, (как отмечалось ранее, например, тестирование альтернативного материала в рамках желаемых результатов), то материал для проведения контроля внутреннего качества тестируется несколько раз (минимум 10 раз) в разные дни.

Затем высчитывается среднее и стандартное отклонение полученных результатов. Стандартное отклонение – это квадратный корень от суммы d^2 разделенной на $n-1$, где d – это разница отдельных результатов от среднего показателя, а n – количество анализов. Стандартное отклонение – это степень разброса результатов; чем выше показатель стандартного отклонения, тем больше разброс в результатах. Другой важный параметр – это коэффициент вариации (КВ), который при стандартном отклонении высчитывается как процент от среднего отклонения ($КВ = \text{показатель стандартного отклонения, разделенное на показатель среднего, умноженное на } 100\%$). Показатели коэффициента вариации протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени образцов для контроля качества в различные дни должны составлять не более 8%. Для анализов на факторы VIII:C и IX такие показатели должны составлять не более 10%.

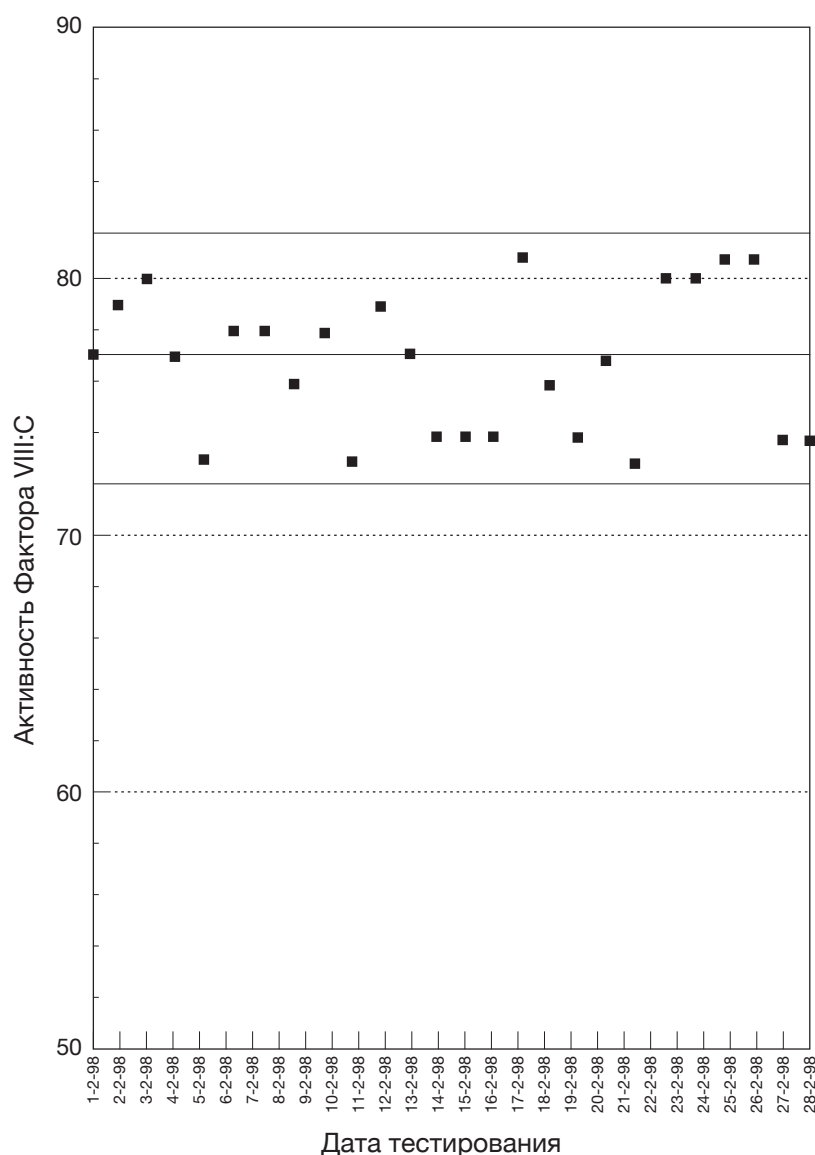
В большинстве случаев, результаты тестирования образцов при проведении контроля внутреннего качества будут показывать стандартное распределение (распределение Гаусса). Обычно, для результатов тестирования внутреннего контроля качества устанавливается средняя стандартная величина в ± 2 от стандартной величины, так как это включает в себя 95% всех величин.

Данные индивидуальных результатов должны быть внесены в таблицу, устанавливающую целевой диапазон. Пример тому приведен в Таблице 5.2. ниже. Любые величины, которые будут вписываться в эти границы, считаются приемлемыми.

Результаты вне данного диапазона устанавливают, что материал, используемый для проведения контроля качества, был испорчен или с ним неправильно обращались, или же что метод не находится под должным контролем. Повторное тестирование материала определит, какой из этих двух вариантов

приводит к неправильным результатам. Дальнейшее получение подобных результатов подтвердит факт того, что система тестирования не находится под контролем. Долгосрочное или среднесрочное отклонение в результатах тестирования на проверку контроля качества (например, из-за порчи или замены инструментов или реагентов) можно выявить при тщательной проверке таблиц совокупных данных.

Рисунок 5.2. Результаты анализов образцов Фактора VIII:С, собранные в различные дни, при проведении тестирования на контроль качества



Каждая точка обозначает данные тестирования при использовании одного и того же материала. Непрерывные линии представляют показатели средней и двух стандартных отклонений при тестировании одного и того же материала 20 раз и обозначают границы допустимых результатов.

Несмотря на то, что сейчас доступно и используется множество приборов для тестирования коагуляции во всем мире (смотри Раздел 41), техника ручного наклона пробирки до сих пор успешно практикуется во многих центрах. Даже при использовании автоматике иногда бывает необходимо произвести тесты вручную из-за несовместимости отдельных образцов с некоторыми используемыми инструментами. Например, это может быть в случае чрезмерной концентрации липидов плазмы, при анализе образцов желтухи, или же когда структура образования сгустка образца сильно отличается от обычных образцов, особенно когда концентрации фибриногена значительно снижены.

Тесты на свертываемость крови, проводящиеся вручную, лучше всего проводить в стеклянных пробирках. Самым подходящим считается размер 75 × 10 мм. Можно с успехом использовать различные виды стекла, однако они могут влиять на показатели времени свертываемости крови, в частности при проведении скрининговых тестов, таких как активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). При смене поставщика пробирок для тестирования (смена производителя или состава) нужно учитывать их возможное влияние на результаты тестирования. Это можно сделать путем сравнения небольшого количества тестов, таких как АЧТВ, в двух различных пробирках. При систематических различиях нужно установить стандартный диапазон заново. По возможности следует избегать повторного применения пробирок после их мытья.

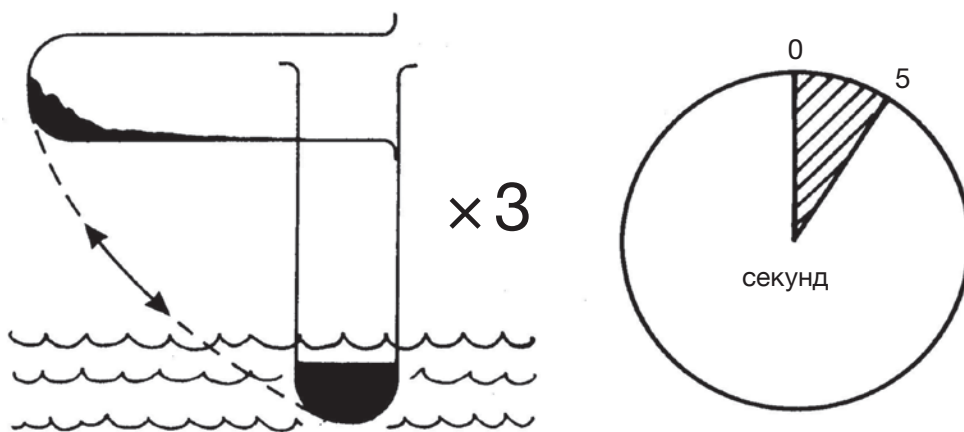
Из-за наличия многих переменных и возможных источников заражения, связанных с применением данной техники, ее следует проводить дважды. В любом случае, если время свертывания крови при повторном тесте отличается от первоначального более чем на 10%, тест следует провести еще раз.

При использовании техники ручного наклона пробирки следует учитывать следующее:

- Перед использованием в тесте на свертываемость крови реагенты следует нагреть в течение 5 минут до температуры 37°C.
- После добавления последнего компонента смесь тестируемой плазмы и реагента следует немедленно смешать, встряхивая пробирку в течение 1-2 секунд, и одновременно с этим засечь секундомер.
- Пробирку со смесью следует перевернуть на 90° три раза через каждые 5 секунд и записать время сворачивания крови. Порядок выполнения показан ниже на Рисунке 6.1.

- После каждого переворачивания пробирку с тестом нужно опустить в ванночку с теплой водой 37°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) так, чтобы основание пробирки было погружено в воду на 3-4 см. Это делается для того, чтобы температура инкубационной смеси была максимально приближена к 37°C .
- Смесь нужно тщательно рассмотреть под настольной лампой или под другим источником света и записать время свертывания.

Рисунок 6.1. Техника переворачивания пробирки вручную при тестировании коагуляции



Переверните 3 раза через каждые 5 секунд.

Подготовка И Градуировка Собранной Стандартной Плазмы (ССП)

7

Таблица 7.1. Сбор стандартной плазмы

Доноры	Как минимум 20 обычных здоровых человек, не принимающих никаких медикаментов, оказывающих воздействие на факторы свертываемости крови и реакцию коагуляции. В эту группу можно включать женщин, принимающих оральные контрацептивы. Желательно, чтобы было равное количество мужчин и женщин в возрасте от 20 до 50 лет.
Антикоагулянты	0.109M (3.2%) дигидрат три-натриевого цитрата смешанный с буферным раствором N-2-гидролэтилпиперазина. 5 г N-2-этансульфоновой кислоты (HEPES) на 100 мл три-натриевого цитрата.
Сбор крови	Сбор крови происходит с 9:00 до 11:00 утра при помощи 60 мл одноразового пластикового шприца и 21 г иглы-бабочки.

ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ СБОРА СТАНДАРТНОЙ ПЛАЗМЫ

1. В пластиковом контейнере смешайте 54 мл крови с 6 мл антикоагулянта.
2. На время подготовки пула пометите образцы в лед.
3. Центрифугируйте 2500 г на протяжении 15 минут при температуре 4°C.
4. Поместите плазму в пластиковый бесконтактный контейнер.
5. Распределите ее в пластиковые пробирки объемом 1.5 мл по 0.5 мл в каждую.
6. Быстро заморозьте, положив на сухой лед или, по возможности, твердый CO₂. Или же поместите на полку в помещении с температурой -70°C.
7. Завершите описанную выше процедуру в течение четырех часов.
8. Храните при температуре -70°C более шести месяцев.

Уровни факторов II, V, VII, IX, X, XI, XII, HMWK и прекалликреина в собранной стандартной плазме, подготовленной таким способом, будут находиться на уровне 1 Е/ мл или 100 Е/дл, несмотря на то, что уровни фактора VIII и фактора фон Виллебранда очень варьируются в зависимости от пула собранной стандартной плазмы. Собранная локально стандартная плазма должна измеряться в международных единицах (МЕ), так как международные стандарты сейчас доступны для всех вышеупомянутых факторов свертываемости крови, за исключением фактора XII. Для фактора XII возможно использование некалиброванного пула с предполагаемым содержанием в нем веществ 100 Е/дл или 1 Е/мл. Для проведения градуировки в международных единицах необходимо приобрести образцовые градуированные препараты ВОЗ (приобрести их можно в Национальном Институте Биологических Стандартов и Контроля, находящимся в Саус Мимс, Поттерс Бар, Хертс, Великобритания) или приобрести подходящую коммерческую образцовую плазму уже градуированную производителем в международных единицах. Следует обратить внимание на то, что такую плазму необходимо менять каждые 12-18 месяцев, если только нет подтверждения того, что результаты внутреннего контроля качества остаются стабильными.

МЕТОД ГРАДУИРОВКИ ЛОКАЛЬНО СОБРАННОЙ ПЛАЗМЫ

1. Стандартизировать градуировку, например, при помощи международных стандартов ВОЗ (минимум 2 капсулы).
2. В разные дни используйте одну капсулу с международными стандартами, а другую с четырьмя частями локально собранной плазмы.
3. В первый день протестируйте образцы в таком порядке: международный – локальный – локальный – локальный – локальный – международный. Повторите действие, используя свежий раствор каждого из образцов плазмы.
4. Во второй день протестируйте образцы в порядке: локальный – локальный – международный – международный – локальный – локальный. Повторите действие, используя свежий раствор каждого из образцов плазмы.
5. Подсчитайте содержание веществ в каждой части локальных стандартов в сравнении со средним показателем результатов двух образцов международных стандартов.

Средний результат 4 составных частей × 2 раствора × 2 дня (n = 16) считается локальным стандартом содержания веществ.

Установление Стандартного Диапазона

8

Для правильной интерпретации результатов любого лабораторного теста важно, чтобы показатели, связанные с результатами тестирования, брались у здоровых людей. Здоровье – термин широко употребляемый и довольно относительный. В некоторых случаях идеальной может быть та группа людей, которая совпадает с исследуемой популяцией по возрасту, полу, а в случаях факторам VIII/фактором фон Виллебранда, по системе группы крови ABO.

Однако, при проведении многих тестов на коагуляцию такой тщательный выбор возможно и не нужен. На практике выбор здоровых субъектов для установления стандартного диапазона будет происходить с учетом практических соображений. Можно с успехом использовать образцы здоровых работников госпиталя, не принимающих никакие препараты, а также кровь здоровых доноров или партнеров пациентов, находящихся на исследовании, у которых не обнаружено никаких симптомов заболеваний. Ниже приведен ряд вещей, которые нужно учитывать при применении стандартных диапазонов.

Состояние субъектов исследования при сборе крови может повлиять на полученные результаты. Некоторые из таких переменных в недавнем времени были рассмотрены в методических рекомендациях Международного Сообщества Тромбоза и Гемостаза, посвященных вопросам здоровья женщины. Это включает в себя обзор очевидных результатов физического стресса (например, увеличение факторов VIII/фон Виллебранда до 2.5 раз, наблюдаемое на протяжении 10 часов), моральный стресс (увеличение факторов VIII и фон Виллебранда после сильного морального стресса), гормональный сбой, циркадные изменения и изменения в осанке и режиме питания. Были сделаны некоторые общие рекомендации, которые не ограничиваются исследованием пациентов только женского пола:

- Воздерживаться от чрезмерных физических нагрузок за 24 часа до взятия крови.
- Проводить исследования в среде с пониженным уровнем морального и физического стресса.
- Воздерживаться от жирной пищи и курения утром перед взятием крови.
- Брать образцы рано утром (с 7 до 9 утра), после того, как человек провел 20-30 минут в сидячем расслабленном состоянии.

Стандартный диапазон нужно всегда устанавливать локально. Литературу и информацию производителя нужно использовать только в качестве руководства.

Образцы следует собрать, обработать, а данные анализировать при помощи таких же методик, которые используются для анализа образцов пациента.

При проведении скрининговых тестов в особенности (ПВ, АЧТВ), следует учитывать возможность того, что новая партия реагента того же производителя может иметь другой стандартный диапазон, отличающийся от предыдущего похожего материала. Нужно тщательно изучить данные внутреннего контроля качества, частично совпадающие с какими-либо изменениями. Любые изменения указывают на необходимость изменения стандартного диапазона.

При проведении исследований литературу и информацию производителя реагента следует использовать только в качестве руководства. Самыми подходящими методами исследования являются те, для которых локально установленный стандартный диапазон в общих чертах схож с тем, который описывается в литературе.

Стандартные диапазоны некоторых коагуляционных тестов отличаются у новорожденных (преждевременно и во время) и детей и взрослых людей (Andrew et al. 1987, 1990, 1992).

Стандартные диапазоны, в особенности скрининговых тестов, должны использоваться только как содействие клинической информации. Для изучения анализов некоторых пациентов с подходящей личной и семейной историей болезни понадобятся дальнейшие исследования, даже при стандартных результатах скринингового теста. Для некоторых пациентов с аномальным результатом скринингового теста дальнейшее исследование не понадобится даже при установлении каких-либо отклонений. Поэтому не существует четких границ, обозначающих необходимость вмешательства и принятия соответствующего решения.

Существуют статистические причины того, почему, по меньшей мере, для 120 стандартных субъектов требуется создание действенного стандартного диапазона, однако, на практике приблизительные данные можно вычислить путем тестирования гораздо меньшего количества субъектов. Некоторые эксперты в данной области считают подобные результаты приемлемыми для дальнейших клинических исследований. Количество субъектов, выбранных для проведения анализа на гемостаз с целью исследования заболеваний крови, должно быть не меньше 30.

При создании стандартных диапазонов, образцы обычных субъектов необходимо локально собрать, обработать и провести анализ при помощи тех же методик, что использовались при анализе образцов пациента. Если практикуется глубокая заморозка образцов для дальнейшего проведения целого ряда анализов, то те же самые действия должны быть совершены с обычными образцами. Если образцы пациента подверглись обработке после задержки в несколько часов, на протяжении которых образцы транспортировали в лабораторию, то тестирование образцов обычных субъектов нужно проводить с такой же точно задержкой. Литературу и информацию производителя реагента следует использовать только в качестве руководства.

Для каждого анализа результаты тестирования образцов обычных здоровых субъектов используются для установления стандартного диапазона. Разброс результатов большинства тестов, направленных на исследование заболеваний крови, являются стандартной дистрибуцией Гаусса. Было бы не лишне подтвердить это визуально изучив данные графика, как показано на Рисунке 8.1. Показатели, находящиеся довольно далеко от стандартных значений, вероятно, являются неправильными. Такие результаты можно исключить из дальнейших вычислений.

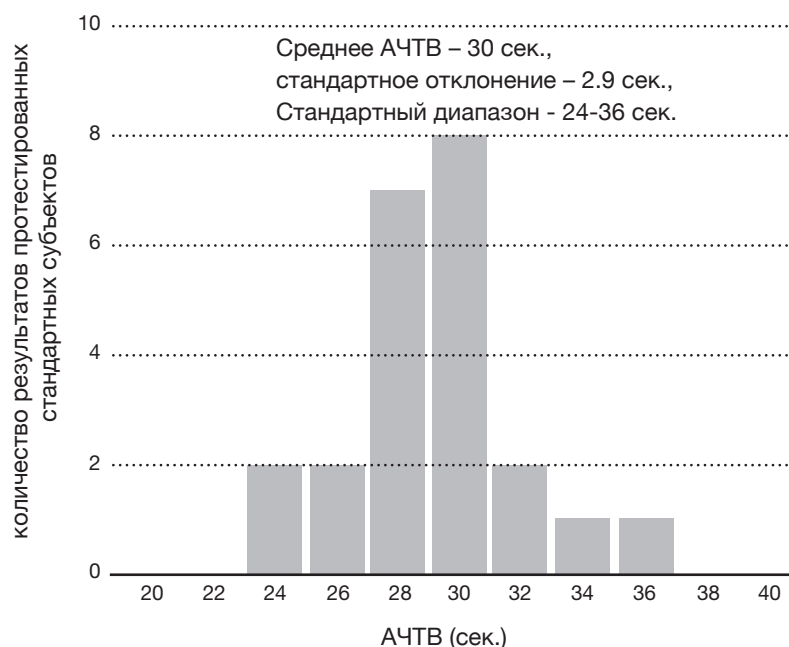
Как правило, для установления стандартного или обычного диапазона используют 95% величин, находящихся в центре графика. В случае если дистрибуция сильно отличается от той, что показана на рисунке 8.1., например, ассиметрична в одном направлении, то потребуется взятие дополнительных стандартных образцов. Удобным способом считается исключение 2.5% данных с каждой стороны, оставляя 95% данных, находящихся по центру.

При стандартной дистрибуции нужно вычислить среднее и стандартное отклонение от обычных величин (как описано в Разделе 5), и использовать среднее число плюс 2СО в качестве верхней границы, а среднее число минус 2СО в качестве нижней границы, где СО – среднее отклонение.

В любом случае, стандартный диапазон можно использовать в качестве руководства и помощи при клинических трактовках.

Для более полного обсуждения установления стандартных диапазонов, смотрите информацию Института Клинических и Лабораторных Стандартов (2000).

Рисунок 8.1. Распределение результатов АЧТВ у нормальных здоровых субъектов



Примечание: Данные показывают нормальную дистрибуцию, равномерно распределенную по каждой стороне среднего показателя.

ССЫЛКИ

- Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:95–104.
- Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70:165–72.
- Andrew M, Vegh P, Johnston, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80:1998–2005.
- Blomback M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R on behalf of the ISTH SSC on Women's Health Issues. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *Thromb Haemost* 2007; 5:855–858.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: Approved guideline*, 2nd ed. 2000; Clinical and Laboratory Standards Institute Document C28-A2.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-stage prothrombin time (PT) test and activate partial thromboplastin time (APTT) test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

ХЛОРИД КАЛЬЦИЯ

Например, BDH Хемикалс. Молярный раствор.

25 мМ раствора: в волюметрической фляге разведите 25 мл 1М раствора с 1 л дистиллированной воды.

БУФЕР БАРБИТУРАТНОГО РАСТВОРА ОУРЕНА pH 7.35

5.875 г диетилбарбитурата натрия (барбитон натрия)

7.335 г хлорид натрия

.....
1. Поместите в волюметрическую флягу и разведите при помощи примерно 780 мл дистиллированной воды

.....
2. Добавьте 215 мл 0.1М хлористоводородной кислоты

.....
3. При помощи дистиллированной воды доведите объем до 1 литра

.....
4. Проверьте pH-баланс, чтобы он составлял pH 7.35

СОЛЕВОЙ БУФЕР ОУРЕНА

200 мл барбитуратного раствора Оурена

800 мл обычного солевого раствора (0.9 г% хлорида натрия)

БУФЕРНЫЙ РАСТВОР ГЛИОКСАЛЯ

2.72 гр глиоксали (иммидазола)

4.68 гр хлорида натрия

.....
1. Поместите в волюметрическую флягу и разведите при помощи примерно 650 мл дистиллированной воды.

.....
2. Добавьте 148.8 мл 0.1М HCl, доведите pH-баланс до 7.3.

-
3. По необходимости доведите объем до 1 литра при помощи дистиллированной воды.
-

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СКРИНИНГОВЫХ ТЕСТОВ

На начальных стадиях исследования и диагностики заболеваний крови очень важным является выбор и применение подходящих реагентов для проведения скрининговых тестов, в частности для тестов на установление протромбинового времени (ПВ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Во всем мире существует большой выбор реагентов. Там, где есть большое разнообразие, выбор должен делаться с учетом изменений чувствительности. При изучении заболеваний крови по показателям ПВ и АЧТВ следующие источники информации, касающиеся возможной эффективности конкретного реагента, могут приниматься во внимание:

- Сравнительные данные с другими реагентами системы оценки внешнего качества, такие как международная система оценки качества (см. Раздел 5)
- Опубликованные данные
- Локальное тестирование плазмы пациентов с выявленными заболеваниями
- Данные производителя

Местное производство реагентов для определения ПВ и АЧТВ может быть финансово выгодно, но его следует избегать из-за возможной сложности их стандартизации.

Также следует отметить, что некоторые производители предлагают различные реагенты. К тому же, состав реагентов, называемых одинаково, может варьироваться от случая к случаю. Это значит, что нельзя давать рекомендации по использованию конкретного источника материала.

ПРИНЦИП

Кровь смешивается с растворителем, что вызывает гемолиз эритроцитов. Гемоцитометр наполняют этим раствором и производят подсчет тромбоцитов под микроскопом, желательно фазово-контрастным, если такой имеется в наличии.

МАТЕРИАЛЫ / ОБОРУДОВАНИЕ

- Плоскодонная полость с градуировкой для тонкого подсчета (фазово-контрастный гемоцитометр с правой Нойбауэр)
- Фазово-контрастный гемоцитометр, оборудованный фазовым конденсатором с большим рабочим расстоянием, или же обычный световой микроскоп
- Пипетка 20 μ л
- 2 мл градуировочная пипетка
- Пробирка размером 12 $\times$ 75 мм
- Механический микшер

РЕАГЕНТЫ

Раствор: 1% оксалат аммиака и дистиллированной воды

Раствор хранить в холодильнике и всегда фильтровать перед употреблением.

ОБРАЗЕЦ

Если кровь берется из пальца, то место прокола должно быть чистым, а кровь должна течь свободно. Вытрите первую каплю крови. Если кровь берется из вены, то ее нужно собрать в сухой пластиковый шприц (можно из силиконизированного стекла) при помощи короткой иглы, калибровки не менее 24 мм. Иглу необходимо вытащить, прежде чем кровь попадет в пластиковый контейнер с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Кровь необходимо сразу плавно смешать с антикоагулянтом, не образуя пены.

МЕТОД

1. При помощи пипетки налейте 0.38 мл раствора в пробирку для тестирования.
2. Полностью наполните пипетку объемом 20 μ л и вытрите пипетку снаружи.

3. Вылейте содержимое пипетки в раствор и промойте ее несколько раз, набирая кровь в пробирку и выливая ее обратно. Смешивайте на протяжении не менее 10 минут вручную или при помощи микшера.
4. Заполните гемоцитометр так, как показано ниже.
5. Накройте емкость чашкой Петри и дайте тромбоцитам настояться в течение 10-20 минут. Для предотвращения испарения накройте емкость куском влажной ваты или фильтровальной бумагой.
6. При помощи микроскопа подсчитайте тромбоциты в больших 1 мм квадратах (= 0.1 μ л). Подсчитывайте тромбоциты в квадратах до тех пор, пока не насчитаете хотя бы 100. Тромбоциты бывают, как правило, овальной или круглой формы, и их можно отличить от других частиц по их внутренней гранулярной структуре и пурпурному отблеску. На заднем плане заметны тени красных кровяных клеток, растворившихся в оксалате аммиака. В случае, если фазовый контраст недоступен, возможно использование обычного светового микроскопа, при этом нужно уменьшить мощность конденсатора для менее насыщенного света.
7. Подсчитать количество тромбоцитов на каждый литр крови по формуле, приведенной ниже.

ГЕМОЦИТОМЕТР

Приспособление для подсчета, гемоцитометр с правящей Нойбауэр, или с усовершенствованной правящей Нойбауэр, изготовлен таким образом, что расстояние между нижней частью стеклянной крышки и поверхностью полости составляет 0.1 мм. Поверхность полости содержит две разграфленные области с величинами, как показано на Рисунке 10.1. Центр размером 1мм² ограничен двумя или тремя линиями. По центру расположены 25 квадратов усовершенствованной правящей Нойбауэр и 16 квадратов правящей Нойбауэр. Размер каждого квадрата 0.04 мм² (0.2 $\times$ 0.2 мм). Эти квадраты, в свою очередь, разделены на еще меньшие квадраты, каждый по 0.0025 мм² (0.05 $\times$ 0.05 мм). Размер внешних квадрантов разграфленной области составляет 1 мм² и каждый разделен еще на 16 квадратов.

РАСЧЕТЫ

Формула для расчета количества клеток:

$$\text{Количество (клетки/л)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

Где N = количество подсчитанных клеток

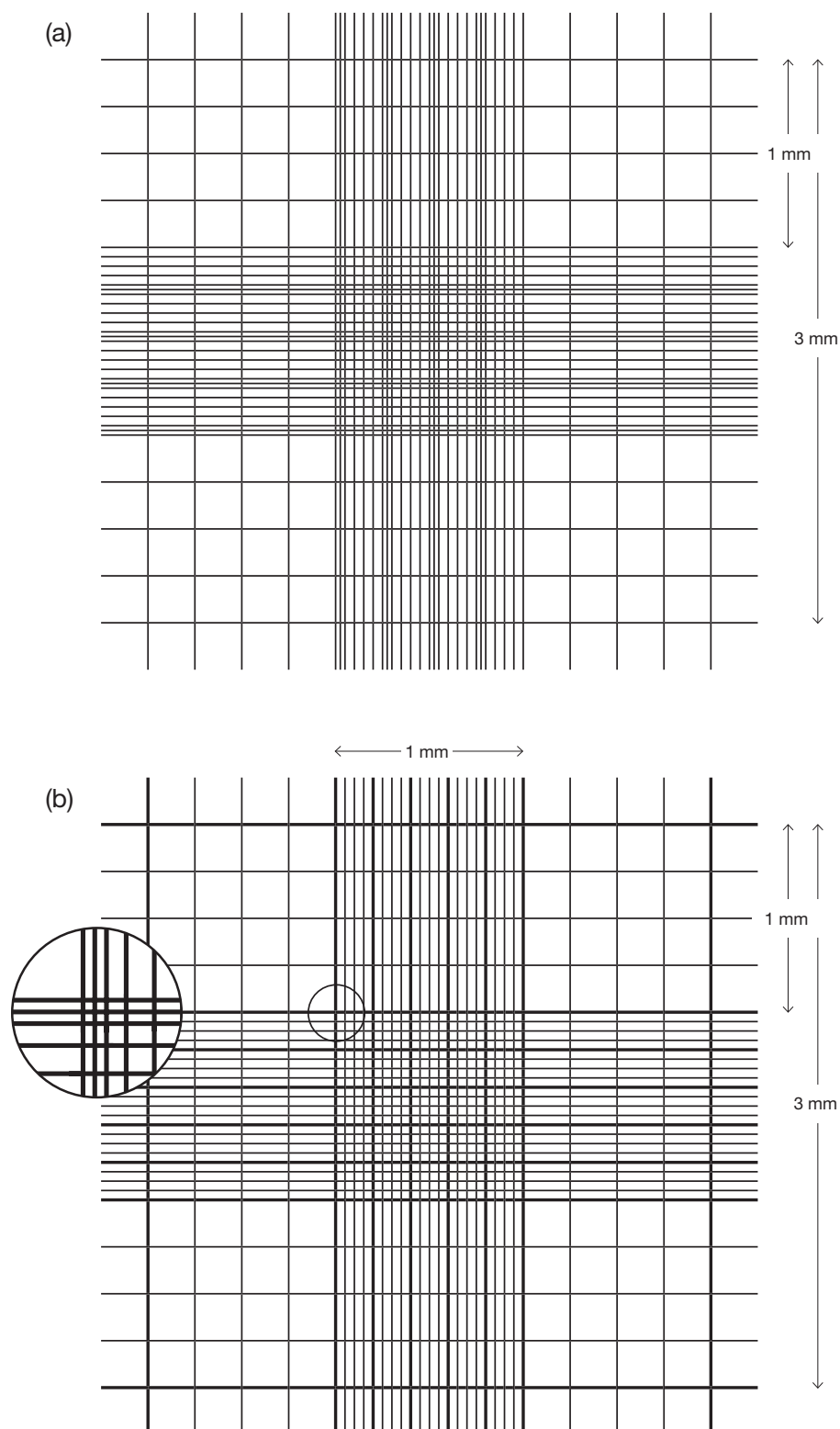
D = раствор

A = подсчитываемая область (в мм²)

10 = фактор расчета объема в μ л из области (в мм²) и глубины полости (0.1 мм)

10⁶ = фактор преобразования подсчета/ μ л в подсчет/л

Рисунок 10.1. Полость для подсчета в гемоцитометре (а) правящая Нойбауэр и (b) усовершенствованная правящая Нойбауэр



ИСТОЧНИК ОШИБОК ПРИ ПОДСЧЕТЕ КЛЕТОК

При использовании капиллярной крови нужно, чтобы кровь непрерывно капала.

При использовании антикоагулированной крови перед забором образца экземпляра следует осторожно перемешать, перевернув пробирку с кровью, по меньшей мере, 20 раз. Не встряхивайте пробирку, так как встряхивание приводит к образованию пены, что препятствует аккуратному измерению крови с использованием пипетки. Наклоните пробирку с хорошо смешанной кровью на 45° или немного больше и при помощи пипетки возьмите из горлышка образец, следуя той же последовательности действий, что и при работе с капиллярной кровью.

Пипетки для работы с кровью должны быть чистыми и сухими.

Пипетку следует быстро наполнить; при помощи приспособления на конце пипетки нужно аккуратно взять кровь и наполнить пипетку до желаемой отметки. Если взяли немного больше желаемого количества, то лишнюю кровь можно убрать, прикоснувшись кончик пипетки к бумажному фильтру или мягкой ткани. Если взяли слишком много крови, то нужно использовать новую пипетку.

В столбике с кровью не должно быть никаких пузырьков.

Снаружи пипетку нужно вытереть от крови, прежде чем переливать ее содержимое в раствор (нужно быть осторожным, чтобы не вытянуть лишнюю кровь через кончик пипетки).

После того как содержимое пипетки вылили в раствор, необходимо набрать раствор в пипетку еще раз и вылить обратно. Эту процедуру повторить несколько раз пока не убедитесь, что вся кровь из пипетки полностью перешла в раствор.

Пробирку с разведенной кровью нужно осторожно встряхивать на протяжении нескольких минут вручную, или в механическом шейкере. После встряхивания пробирки полость следует немедленно заполнить с помощью пипетки Пастера или капиллярной трубки.

Наполнение полости происходит капиллярным способом, таким образом, что течение жидкости из пипетки или капилляра регулируется и происходит быстро и плавно. Полость наполняется полностью, но жидкость не должна переливаться за края. Дайте клеткам осесть в зоне подсчета на протяжении 10-20 минут, затем приступайте к подсчету.

Полость гемоцитометра и поверхность стеклянной крышки должны быть чистыми и сухими. Отпечатки пальцев и маслянистая пленка могут привести к серьезным ошибкам.

В целях минимизации ошибок нужно подсчитать достаточное количество клеток из-за их возможного распределения. Как показывает практика, нужно насчитать, по меньшей мере, 100 клеток. В качестве дальнейшей

проверки правильности распределения клеток в полости, количество клеток, подсчитанных в каждой зоне, не должно отличаться более, чем на 10% (например, в больших квадратах).

КОНТРОЛЬ

Нужно приготовить два раствора и взять среднюю величину проведенных подсчетов; их показатели не должны расходиться более чем на 10%.

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК ПРИ ПОДСЧЕТЕ ТРОМБОЦИТОВ

Предпочтительно брать кровь из вены, а не из пальца, так как тромбоциты прилипают к ране, и повторный раствор не всегда можно сделать успешно.

Общие ошибки при использовании пипеток и гемоцитометра приведены выше. В дополнение следует сказать, что полость для подсчета тромбоцитов должна быть безупречно чистой, так как грязь и остатки каких-либо веществ могут быть приняты за тромбоциты. Вымойте полость мыльной водой, затем сполосните дистиллированной водой, дайте высохнуть, затем протрите тряпочкой, не оставляющей осадков. Перед употреблением убедитесь, что крышка тоже чиста.

Наличие слипшихся комков препятствует успешному подсчету. Если в образце присутствуют комки, то нужно использовать новый образец.

Раствор оксалата аммиака следует хранить в холодильнике и при обнаружении бактериального заражения его следует вылить.

Следует сделать подсчет образца в течение трех часов после сбора крови.

11

Время Кровотечения

ПРИНЦИП

Время кровотечения – это время, прошедшее от стандартного разреза кожи установленной глубины и длины до остановки кровотечения.

Более длительное время кровотечения наблюдается у пациентов с тромбоцитопенией, болезнью фон Виллебранда, Тромбастения Гланцманна, синдром Бернар-Сулье, болезнью недостаточного пула хранения и других нарушений тромбоцитов. Наличие фибриногена в этом случае необходимо, и было предложено уделить повышенное внимание наличию фактора V. Поэтому у пациентов с нехваткой фибриногена фактора V время кровотечения может быть продлено. Длительное кровотечение также встречается у пациентов с заболеванием почек, диспротеинемией и сосудистыми заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ / ОБОРУДОВАНИЕ

- Сфигмоманометр
- Очищающие тампоны
- Приспособление для измерения времени кровотечения образца
- Фильтрационная бумага толщиной 1 мм
- Секундомер

МЕТОД

1. Обернуть Сфигмоманометр манжеты вокруг верхней части руки и надуть до показания давления в 40 мм. Это давление должно поддерживаться на протяжении всего теста.
2. Тыльную сторону локтевого сгиба протереть, поместить на кожу прибор для подсчета времени кровотечения, не надавливая. Ослабить давление и засечь секундомер.
3. Следует избегать поверхностных вен, шрамов и синяков.

.....

4. Промокайте кровяной поток фильтровальной бумагой через каждые 30 секунд. Поднесите фильтровальную бумагу поближе к месту надреза, не задевая раны.

.....

5. Запишите время, прошедшее от прокола до остановки кровотечения.

.....

ТРАКТОВКА ДАННЫХ

Нормальным диапазоном у взрослого человека считается время до 8 минут, но оно может варьироваться в зависимости от используемого метода.

ПРИМЕЧАНИЯ

- На момент написания данного материала существует два коммерчески доступных одноразовых приспособления для проверки времени кровотечения. Стандартный диапазон следует устанавливать локально, несмотря на то, какое используется приспособление.
- Надрез следует делать в направлении, параллельном длине руки. Разрезы, выполненные перпендикулярно, кровоточат дольше.
- При нетипичном результате процедуру следует повторить.
- Нет необходимости записывать время остановки кровотечения, если оно продолжается более 20 минут.
- Следует учитывать воздействие медикаментов, препятствующих нормальному функционированию тромбоцитов. Например, медикаменты, содержащие Аспирин, способствуют продлению кровотечения. Таким образом, по возможности, следует избегать их приема за 7 дней до проведения тестирования.
- На месте разреза может образоваться шрам. Прежде чем делать надрез, нужно сообщить об этом пациенту.

ССЫЛКА

Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52:210–211.

12 Протромбиновое Время (ПВ)

ПРИНЦИП

Данный тест отражает общую эффективность внешней системы. Он чувствителен к изменениям фактора V, VII, X, и менее чувствителен к изменениям фактора II (протромбин). Он также не подходит для определения минимальных изменений уровня фибриногена, однако, если уровень фибриногена очень низок или присутствует фибриноген, то это может считаться отклонением от нормы. Реагент и используемая методика влияют на чувствительность теста, также стандартный диапазон важно устанавливать локально.

Путь, измеренный протромбиновым временем, показан ниже на Рисунке 12.1. Реагент ПВ, часто называемый тромбопластином, содержит тканевой фактор и фосфолипиды.

Коммерчески доступно множество подходящих реагентов. Указания по выбору реагента включены в Раздел 9.

РЕАГЕНТЫ

- Тромбопластин (может содержать хлорид кальция)
- 25 мМ хлорида кальция (необходим, только если реагент не содержит хлорид кальция)

МЕТОД: РУЧНОЙ

1. В первые две пробирки добавьте по 0.1 мл обычной плазмы и подогрейте ее в течение 2 минут до температуры 37°C.
2. Добавьте по 0.2 мл реагента тромбопластина, подогретого до 37°C (если в нем присутствует кальций).
3. Запустите секундомер, смешайте и запишите время свертывания.
4. Повторите процедуру для каждого образца.
5. Зафиксируйте в секундах время свертывания крови каждого пациента.

При использовании техники вручную, повторите все тесты дважды. Время сворачивания при повторном тесте не должно отличаться от первого более чем на 10%. Для автоматизированных тестов с коэффициентом вариации менее 5% бывает достаточно одного теста, при учете того, что результаты, показавшие более длительное время, подвергаются проверке.

ПРИМЕЧАНИЯ

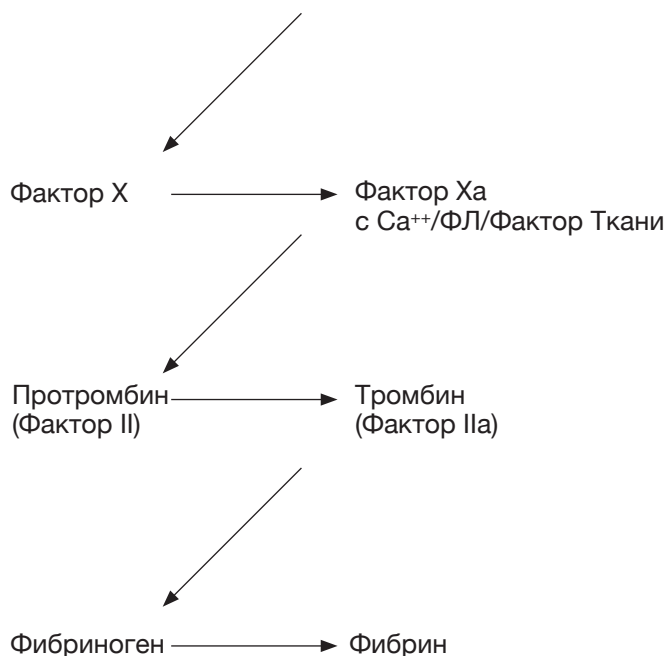
- Если реагент тромбопластина не содержит кальций, то процедура теста следующая: 0.1 мл плазмы, 0.1 мл тромбопластина, и сгустки с 0.1 мл подогретого 25 мМ хлорида кальция.
- Активация фактора IX фактором ткани VII происходит *in vivo* (внутри). При проведении большинства тестов на ПВ фактор X активизируется настолько сильно, что анализ становится нечувствительным к фактору IX или VIII.
- Тромбопластин / хлорид кальция перед использованием следует подогревать в течение 5-30 минут.
- Использование различных коагулометров обычно влияет на время сворачивания крови, в зависимости от того, как и где происходит определение конечного этапа. В дальнейшем это подчеркивает важность установления стандартного диапазона для того метода, который используется лабораторией в данный момент.
- При наличии небольшой нехватки факторов II, V, VII, и X, степень пролонгирования может быть минимальной. В случае нехватки фактора II, ПВ может находиться в рамках нормы.
- На некоторые реагенты ПВ может влиять наличие волчаночного антикоагулянта /антифосфолипидных тел, и некоторые редкие виды антител могут продлевать ПВ, не продлевая АЧТВ. Наиболее подвержены такому влиянию реагенты с более низкими фосфолипидными концентрациями, включая некоторые реагенты, структурным компонентом которых является липидный рекомбинантный фактор ткани.
- Наличие активированного фактора VII, следующее за лечением с применением рекомбинанта VIIa, или при активизации природного фактора VII, может привести к сокращению ПВ. Эффект зависит от того, какой используется фактор ткани реагента. Реагенты, содержащие коровий фактор ткани, особенно восприимчивы этому воздействию. Перед определением ПВ образцы не следует хранить при температуре 2°C–8°C, так как холод может вызвать активизацию фактора VII.
- Цельная кровь, используемая для определения ПВ, может не подвергаться изменениям на протяжении 24 часов, в зависимости от используемого реагента.
- Протромбиновое время, определенное при помощи реагентов, содержащих фактор человеческой ткани, может отличаться от того ПВ, которое

было определено при помощи реагентов, содержащих фактор ткани представителей других биологических видов, например, кролика. В таких случаях результат, достигнутый при помощи реагентов, содержащих фактор человеческой ткани, может в большей степени свидетельствовать о риске кровотечения.

- Для полного обсуждения вопросов, связанных с определением ПВ, смотрите изучение Института Клинических и Лабораторных Стандартов (2008).

Рисунок 12.1 Направление измерений при тестировании ПВ

Ca⁺⁺/ФЛ/Фактор Ткани + Фактор VII



ФЛ = Фосфолипид

→ = Активация

ССЫЛКИ

Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68:301-5.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)

13

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Это не точный тест внутренней системы. Выполненный в течение обычного протромбированного времени, этот тест является самым приемлемым скрининг-тестом при обнаружении дефицита факторов VIII, IX, XI и XII.

АЧТВ также будет также увеличиваться при любой недостаточности, включая общие пути свертывания крови (дефицит факторов V, X, II и, в меньшей степени, фибриногена), а также в присутствии ингибиторов. Присутствие некоторых терапевтических ингибиторов коагуляции, таких как гепарин, также продлевает АЧТВ. Важно исключить возможность использовать такие методы обработки при начальном исследовании пролонгированного АЧТВ.

АЧТВ увеличивается при наличии прекалликреина или при дефиците кининогена с высоким молекулярным весом, если только испытание не проводится с помощью реагента, в качестве активатора содержащего эллаговую кислоту. В этом случае АЧТВ будет стандартным даже при полном отсутствии этих факторов.

Путь свертывания крови, измеренный АЧТВ, показан на Рис. 13.2.

РЕАГЕНТЫ

- реагент АЧТВ
- 25 мМ хлористого кальция

МЕТОД

1. Перед использованием, на 5 минут поместите пробирку содержащую хлористый кальций в помещение с температурой 37°C.
2. При помощи пипетки при температуре 37°C добавьте 0.1 мл реагента АЧТВ в две стеклянные пробирки для свертывания.
3. При помощи пипетки добавьте 0.1 мл контрольной плазмы в первую пробирку.
4. Включите секундомер. Смешайте.
5. Добавьте 0.1 мл контрольной плазмы во вторую пробирку. Смешайте.

6. По истечении рекомендованного инкубационного времени* добавьте по 0.1 мл хлористого кальция в каждую пробирку поочередно, секундомером начав новый отсчет времени для каждой пробирки. Смешайте. Зафиксируйте время, потребовавшееся для образования сгустка.

При тестировании вручную следует проводить все тесты дважды. Показатель длительности свертывания крови при повторном тесте не должен отличаться от первого более чем на 10%. Для тестов, выполненных автоматизированным методом, при коэффициенте вариаций между тестами менее 5%, как правило, достаточно проведения одного теста, при условии, что результаты, показавшие более длительное время, будут проверены.

* Соблюдайте рекомендации производителя реагента. Обычно весь процесс тестирования занимает от двух до пяти минут. Важно точно определить продолжительность периода инкубации, так как неточное определение этого времени может повлиять на конечный результат, например, продление инкубационного периода дает более короткое время свертываемости крови для каждого отдельного реагента.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Стандартный диапазон должен устанавливаться на месте.

Длительное АЧТВ при нормальном протромбиновом времени указывает на возможный дефицит факторов VIII, IX, XI, XII, высокомолекулярный кининоген, прекалликреин или на наличие ингибитора. В случае длительного АЧТВ следует протестировать смесь равных частей обычной и тестируемой плазмы (т. е. смесь, содержащую 1 часть тестируемой плазмы и 1 часть обычной, далее именуемой смесью 50:50). Если АЧТВ отличается от разницы между временем свертывания нормальной и временем свертывания тестируемой плазмы более чем на 50% - это указывает на наличие недостатка фактора. Незначительное отличие предполагает возможное присутствие ингибитора, влияющего на один из факторов свертываемости крови в системе, или на наличие ингибитора неспецифического типа, например, волчаночный антикоагулянт (см. Раздел 25).

Рисунок 13.1. Пример интерпретации АЧТВ

Пример	Результат
Фиксация АЧТВ	35 секунд
Время тестирования	60 секунд
Для смеси 50:50	42 секунды (Это хорошая поправка, поэтому, возможна нехватка какого-то фактора)
Для смеси 50:50	52 секунды (Это плохая поправка, поэтому, вероятно наличие ингибитора)

КОММЕНТАРИИ

- В продаже имеется много подходящих реагентов, в том числе материалы с различной чувствительностью. Комментарии, касающиеся выбора реагентов, приведены в Разделе 9.
- Что касается протромбинового времени, то использование коагулометра может повлиять на продолжительность свертываемости крови.
- В процессе тестирования плазмы высокие уровни одного фактора свертываемости крови могут компенсировать низкие уровни других факторов ее свертываемости. Например, заметно повышенный уровень фактора VIII во время острой реакции в фазе может показать стандартное АЧТВ при условии уменьшения IX или XI факторов, что может быть клинически важно. Если у пациента имеется личная или семейная история болезни нарушения свертываемости крови, то при более полном обследовании, включая проведение специальных анализов на конкретные факторы, может быть выявлено стандартное АЧТВ, в частности, если этот результат оказывается в верхней части диапазона номинальных значений.
- Концентрация фосфолипидов заметно отличается в зависимости от реагента. Это одна из причин, почему реагенты существенно меняют свою чувствительность к наличию антикоагулянтов волчанки. Если для определения начального АЧТВ используется реагент, чувствительный к волчанке, то целесообразно выполнить второе измерение АЧТВ с использованием такого реагента, как актин Actin FS (компания-изготовитель Dade Behring, Марбург, Германия), имеющего очень высокую концентрацию фосфолипидов (Kitchen et al. 1999 г.). Если продление времени с использованием первого реагента обусловлено наличием волчаночного антикоагулянта, то АЧТВ, полученное при втором исследовании, почти всегда стандартно, так как очень немногие волчаночные антикоагулянты влияют на увеличение АЧТВ при применении актина Actin FS.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЬНОГО БОЛЕЕ ДЛИТЕЛЬНОГО АЧТВ

Для тестирования пациентов с нормальным протромбиновым временем и более длительным АЧТВ следует придерживаться следующей стандартной последовательности исследования:

1. Определите тромбиновое время (см. Раздел 15). Если оно стандартное, перейдите к этапам 2 и 3. Если тромбиновое время увеличено, проведите повторное исследование с использованием протамина сульфата (см. Раздел 16). Если тромбиновое время становится стандартным, то это указывает на наличие гепарина, и дальнейшие нижеприведенные испытания проводить не требуется. Если же известно, что пациент ни в каком виде не принимал гепарин, то следует сделать повторную пробу.

2. Определите АЧТВ используя смесь нормальной плазмы и плазмы пациента (см. Раздел 14), в соотношении 1:1 (50%), «нормальная плазма: плазма пациента». Если при использовании подобной смеси АЧТВ не стало стандартным, значит в крови присутствует ингибитор.
3. Определите АЧТВ при помощи второго реагента, содержащего высокие концентрации фосфолипидов, таких как актин Actin FS (компания-изготовитель Dade Behring). Если исходное АЧТВ явно продлено (то есть более чем на три секунды превышает верхнюю границу используемой стандартной пробы) и актин Actin FS соответствует норме, то вероятной причиной этого является волчаночный антикоагулянт. В дальнейшем это может быть подтверждено специальными тестами, такими, как тест на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела (Russell) (DRVVT; см. Раздел 38), хотя это и необязательно, если нет каких-либо предписаний к исследованию на наличие волчаночного антикоагулянта как фактора риска развития тромбоза. Очень редко дефицит прекалликреина является другой возможной причиной стандартного АЧТВ при наличии Актина FS и заметного увеличения АЧТВ с каким-либо реагентом, где в качестве активатора используется диоксид кремния или каолин. Как и в большинстве случаев с волчаночным антикоагулянтом, это не вызывает опасность кровотечения. Поэтому и в этом случае подтверждение также может не потребоваться.
4. Если начальное АЧТВ явно выше (три секунды и более), а время АРТТ с актином Actin FS стандартно, то нет необходимости выполнять анализ факторов.
5. Если оба показателя АЧТВ продолжительны, то необходимо провести исследования, касающиеся факторов VIII: C, IX и XI (см. Раздел 23). Если нужно, можно провести анализ на наличие фактора XII, так как его нехватка довольно распространена и выявление этого фактора можно объяснить более длительным АЧТВ. Не стоит исключать наличия заболевания свертываемости крови, так как дефицит фактора XII не связан с повышенной опасностью кровотечений.
6. Такие реагенты, как актин FS, в которых в качестве контактного активатора используется эллаговая кислота, показывают нормальные результаты даже при остром дефиците прекалликреина.

Если необходимо, для экономии времени этапы 1 - 3 могут выполняться одновременно.

ПРИМЕЧАНИЯ

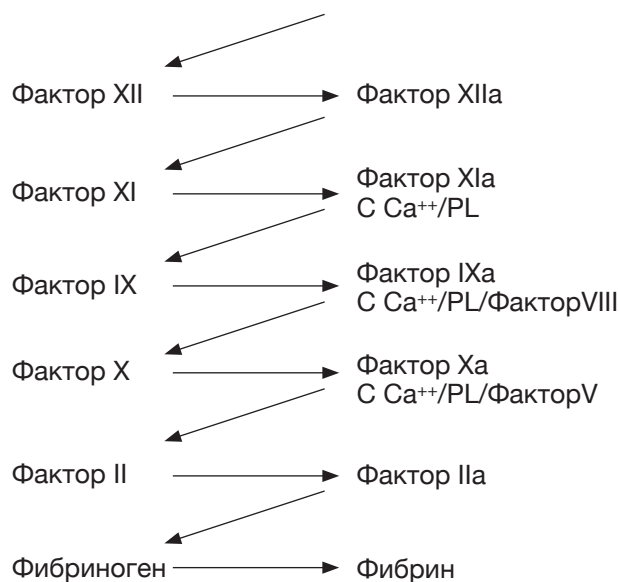
- Стандартное АЧТВ с актином Actin FS в сочетании с начальным удлинненным АЧТВ (Synthasil / IL), как правило, исключает наличие дефицита фактора VIII, FIX или FXI, и в этом случае нет необходимости проводить анализ по факторам.

- В редких случаях может быть зафиксирована стандартная продолжительность АЧТВ при любых реагентах, если содержание FIX или FXI (30-50 ед./дл) несколько снижено, а содержание фактора VIII повышено.
- АЧТВ с актином FS часто является стандартным, если сниженное содержание фактора XII находится в диапазоне 20 ед./дл - 50 ед./дл, а время АЧТВ при активации каолином или диоксидом кремния слегка повышено. Этот дефект не имеет клинического значения.
- Несколько мощных волчаночных антикоагулянтов увеличивают АЧТВ с актином FS.
- Специфические антитела к фактору VIII (или IX, или XI) увеличивают АЧТВ независимо от реагента.

Всестороннее обсуждение вопросов, связанных с определением АЧТВ, приведено в CLSI (2008).

Рисунок 13.2. Путь, измеряемый АЧТВ

Контактная активация, включающая Преккаликрейн, Высокомолекулярный Кининоген и негативно заряженную поверхность



PL = Фосфолипид —> = Активация

ССЫЛКИ

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of 7 APTT reagents in relation to heparin sensitivity *Br J Haematol* 1999; 106:801-8.

ПРИНЦИП

Образцы плазмы показавшей аномальные результаты при проведении скрининговых тестов (ПВ/АЧТВ) могут подвергнуться дальнейшему исследованию при помощи тестов смешения. Прежде всего, необходимо показать, что недостаток плазмы пациента исправляется при помощи обычной плазмы для того, чтобы устранить наличие ингибитора. Коррекция отклонений путем добавления одного из описанных ниже реагентов указывает на то, что в добавленном реагенте содержится вещество, недостающее в образце тестирования.

Скрининговые тесты, выдающие аномальные результаты, проводятся заново при помощи смеси тестируемой плазмы и добавляемого вещества в равных пропорциях (ниже называемых 50:50).

Следующие агенты используются для тестов смешения:

- Обычная плазма
- Состаренная плазма
- Абсорбированная плазма
- Плазма с недостающим фактором VIII
- Плазма с недостающим фактором IX

СОСТАРЕННАЯ ПЛАЗМА

1. Обычная венозная кровь добавляется к 1/9 объема 0.1М оксалата натрия.
2. Кровь центрифугируется для создания плазмы, объединенной тромбоцитами, в стерильных условиях отделяется и хранится в инкубаторе 2-3 дня при температуре 37°C.
3. К концу этого периода при чувствительных тромбопластинах протромбиновое время должно превышать 90 секунд.
4. Затем плазма разделяется на части, распределяется в пластиковые контейнеры и хранится при температуре -35°C (или ниже).

В состаренной плазме наблюдается нехватка факторов V и VIII.

АБСОРБИРОВАННАЯ ПЛАЗМА

1. Гель гидроокиси алюминия готовится путем смешения 1 г влажного геля и 4 мл дистиллированной воды до получения однородной суспензии.
2. Обычная плазма, обедненная тромбоцитами, собирается у пяти обычных доноров и смешивается.
3. В подогретую плазму добавляют 1/10 объема гидроокиси алюминия, смешивают и содержат в инкубаторе в течение 3 минут при температуре 37°C.
4. Затем смесь немедленно центрифугируется (1700 г, 3 минуты при комнатной температуре) для того, чтобы гель дал осадок.
5. Супернатантную плазму собирают в пластиковые контейнеры и хранят при температуре -35°C в течение нескольких недель.

В абсорбированной плазме наблюдается нехватка факторов II, VII, IX, и X (факторы, зависимые от витамина К). Протромбиновое время должно составлять >60 минут при чувствительном реагенте.

Примечание: нужно уделять особое внимание времени абсорбирования, так как чрезмерное абсорбирование может привести к потере других факторов свертываемости.

ПЛАЗМА, ОБЕДНЕННАЯ ФАКТОРАМИ VIII/IX

Плазма пациентов с отдельными тяжелыми случаями нехватки факторов VIII и IX (< 1 МЕ/дл) вполне подходит для изучения тестов смешения.

По возможности, их использование нужно предпочесть использованию состаренной или абсорбированной плазмы. Плазма, выбранная для этих целей, должна иметь стандартное ПВ, подтверждая то, что другие факторы свертывания, синтезирующиеся в печени, вероятнее всего, находятся на нормальном уровне.

Подобные виды плазмы могут быть лиофилизированы или храниться в виде плазмы при температуре -35°C (или ниже) по меньшей мере, на протяжении 3 месяцев.

При использовании смеси плазмы пациентов и добавляемой плазмы в соотношении 50:50 можно совершить характеристику отклонения.

В ситуации, когда выявлена отдельная пролонгация АЧТВ, плазма, обедненная фактором FVIII предпочтительнее состаренной плазмы. Точно так же, плазма, обедненная фактором IX предпочтительнее абсорбированной плазмы.

ПРИМЕЧАНИЯ

- Гидроокись алюминия доступна у компании BDH, Пул, BN15 LTD, Великобритания.
- Нетипичные ингибиторы, влияющие на АЧТВ (такие как волчаночный антикоагулянт), обычно не показывают какую-либо коррекцию, в то время как плазма, содержащая более слабые или низкие титровые ингибиторы, может быть частично скорректирована обычной плазмой.
- Специфические ингибиторы на фоне фактора VIII могут быть связаны с тем, что коррекция АЧТВ путем смешения с обычной плазмой произошла не сразу. В других случаях происходит немедленная корректировка обычной плазмой, за которой затем по истечению времени происходит продление АЧТВ в смеси. Тестирование смеси нормальной и тестируемой плазмы можно производить спустя 1 час при температуре 37°C совместно с определением АЧТВ обычной и тестируемой плазмы, которые были инкубированы отдельно друг от друга в одно и то же время.
- Специфические ингибиторы других факторов свертываемости могут встречаться, но довольно редко. Невозможно сделать общую характеристику их поведения в экспериментах смешения, за исключением того, что ингибиторы фактора IX обычно действуют довольно быстро.
- Некоторые примеры АЧТВ у субъектов с приобретенной гемофилией А, демонстрирующих титры антител анти-фактора VIII и результат добавления 20% и 50% обычной собранной плазмы, показаны на Рисунке 14.2. При используемом методе верхняя граница стандартного диапазона АЧТВ составляет 37 секунд. Это говорит о том, что в присутствии подобных антител анти-фактора VIII, в некоторых случаях может происходить полная коррекция смеси плазмы пациента и стандартной собранной плазмы в соотношении 50:50. При хранении таких смесей в инкубаторе при температуре 37°C наблюдается прогрессивное возрастание АЧТВ, так как антитела анти-фактора VIII сдерживают фактор VIII.

Рисунок 14.1. Образец результатов тестов смешения при нехватке отдельных факторов

Дефект тестируемой плазмы	АЧТВ	Состаренная или недостающая фактора VIII	Абсорбированная или недостающая фактора IX	Обычная плазма
Фактор VIII	Анорм.	Без корр.	Корр.	Корр.
Фактор IX	Анорм.	Корр.	Без корр.	Корр.
Фактор XI/XII	Анорм.	Корр.	Корр.	Корр.
Ингибитор	Анорм.	Без корр.	Без корр.	Без корр.

Дефект тестируемой плазмы	ПВ	АЧТВ	Состаренная плазма	Абсорбированная плазма	Обычная плазма
Фактор II	Аном.	Аном.	Корр.	Без корр.	Корр.
Фактор V	Аном.	Аном.	Без корр.	Корр.	Корр.
Фактор VII	Аном.	Норм.	Корр.	Без корр.	Корр.
Фактор X	Аном.	Аном.	Корр.	Без корр.	Корр.

Аном. = аномальная; Без корр. = без коррекции; Корр. = коррекция

Рисунок 14.2. Изучение смешения приобретенной гемофилии А

Титр Вифеда (Е/мл)	АЧТВ (сек.)	АЧТВ + 20% обычной плазмы (сек.)	АРТТ + 50% обычной плазмы (сек.)
1.0	210	137	77
1.1	83	52	38
2.0	82	43	34
6.6	107	51	37
8.4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

15

Время Свертывания Тромбина

ПРИНЦИП

Тромбиновое время отражает реакцию, происходящую между тромбином и фибриногеном.



Тромбиновое время продлено при следующих условиях: если уровень фибриногена очень низок (менее 1.0 г/л), в присутствии гепарина и его заменителей, в присутствии других заменителей, таких как продукты деградации фибриногена, а также когда качество фибриногена довольно низкое (дисфибриногенемия), включая как врожденные, так и приобретенные пороки, вторичные заболеванию печени.

РЕАГЕНТ

Раствор тромбина, который провоцирует свертываемость нормальной плазмы в течение 15 секунд.

Более сильные растворы приводят к сокращению времени свертывания и могут быть стандартными при наличии небольших пороков.

МЕТОД: РУЧНОЙ

1. При помощи пипетки налейте 0.2 мл плазмы в стеклянную пробирку.
2. Подогрейте до 37°C.
3. Добавьте 0.2 мл тромбина.
4. Запустите секундомер. Запишите время свертывания.
5. Стандартный диапазон должен быть установлен локально.
6. Проведите эксперимент дважды.

ПРИМЕЧАНИЯ

- Используемая концентрация тромбинов должна быть такой, время сворачивания которой со стандартной собранной плазмой около 15 секунд. При использовании концентрированного тромбина, разведите около 10-15 Е/мл в соляном растворе и продолжайте разводить далее до тех пор, пока не будет достигнуто подходящее контрольное время.
- Реконструированный тромбин может храниться при температуре -35°C или ниже, перед употреблением его необходимо развести.
- При комнатной температуре разведенный тромбин испортится.
- Образец собранной стандартной плазмы, используемый для проведения контроля, должен быть включен в каждую тестируемую группу.

Тромбиновое Время При Наличии Протамина Сульфата Для Определения Наличия Гепарина

Наличие неразделенного низкомолекулярного гепарина может вызвать продление тромбинового времени.

Более крупные формы гепарина, вызывающие продление тромбинового времени, могут быть нейтрализованы путем добавления протамина сульфата. Протамин сульфат доступен во многих аптеках госпиталей, где он используется в качестве терапевтического агента для реверсии действия гепарина.

Концентрация медикамента в терапевтических препаратах, как правило, гораздо выше, чем требуется для лабораторных испытаний. Поэтому, при необходимости, он должен быть разведен в солевом растворе до концентрации 40 мг% в качестве рабочего раствора. Рабочий раствор тромбина с протамином сульфата готовится путем смешения девяти частей реагента тромбина с одной частью 40 мг% протамина сульфата. Затем он используется вместо раствора тромбина, так, как показано в Разделе 15. Необходимо провести анализ обычного контрольного образца. Если тромбиновое время продлено, но находится в пределах результата контрольного испытания с точностью до 2 секунд, то наличие гепарина подтверждается.

ПРИНЦИП

Рептилаз – это яд змеи, добытый у *Bothrops atrox*. Это схожий с тромбином фермент, и воздействует он напрямую на фибриноген для преобразования его в фибрин. Он не сдерживается антитромбином, поэтому наличие гепарина не оказывает на него никакого влияния. Поэтому его можно использовать для оценки скорости преобразования фибриногена в фибрин в присутствии гепарина.

Необходимо проверить вызвано ли продленное тромбиновое время присутствием гепарина в образце. Если тромбиновое время продлено и рептилаз находится в пределах нормы, то вероятной причиной является наличие гепарина. При наличии дисфибриногенемии рептилазное время может быть более чувствительным (продлено), чем тромбиновое время.

РЕАГЕНТЫ

- Рептилаз, растворенный до концентрации в 25 мг в 15 мл солевого раствора Оурена. Этот яд очень опасен в сыром виде, нужно соблюдать осторожность во избежание вдыхания порошка. Работая с сырым ядом, оператор должен надеть перчатки и маску. Запас раствора нужно хранить в глубокой заморозке при температуре -70°C частями по 0.5 мл. При этих условиях яд остается неизменным в течение как минимум 2 лет.

Для приготовления реагента, готового к использованию, дайте запасу реагента растаять и разведите его в солевом растворе Оурена в соотношении 1/10; разделите на части и снова заморозьте при температуре -70°C для дальнейшего использования. При таких условиях подобный готовый к использованию реагент остается неизменным, по меньшей мере, в течение 3 месяцев.

Готовые к использованию замороженные части реагента нужно положить в ванночку с температурой воды 37°C приблизительно на 30 минут. После этого, находясь при температуре окружающей среды в 20°C – 25°C , они пригодны к использованию в течение 12 часов.

- Обычная плазма: обычная собранная плазма готовится так же, как описано в Разделе 7. Дайте растаять в ванночке с температурой воды 37°C в течение примерно 30 минут.

МЕТОД

Проводите все тесты дважды.

1. Поместите достаточное количество стеклянных пробирок для свертывания крови размером 75 × 10 мм в ванночку с температурой воды в 37°C (две на каждого пациента, плюс две контрольные пробирки).
2. При помощи пипетки налейте 0.3 мл плазмы (контрольной или пациента) в теплые пробирки для сворачивания.
3. Подогрейте в течение 1-2 минут.
4. Добавьте 0.1 мл рептилазного раствора и засекайте секундомер.
5. Переверните 3 раза для того, чтобы смешать раствор, а затем переворачивайте по три раза через каждые 5 секунд до образования сгустка.
6. Зафиксируйте время сворачивания.
7. Время сворачивания должно быть от 15 до 18 секунд (Если время меньше, то откорректируйте концентрацию, разводя рептилазный реагент соляным раствором Оурена).
8. Если сгусток не формируется вообще, запишите результат как >90 секунд.

СТАНДАРТНЫЙ ДИАПАЗОН

Время сворачивания крови пациента должно находиться в пределах 3 секунд контрольного времени. Контрольное время должно быть зафиксировано вместе с временем пациента.

ПРИМЕЧАНИЕ

Рептилазовые реагенты доступны в готовых к использованию концентрациях у нескольких коммерческих производителей. Преимуществом их использования является отсутствие необходимости работать с сырым ядом из-за его угрозы здоровью и безопасности. При использовании одного из подобных реагентов следуйте инструкции производителя. Стандартный диапазон может отличаться от описанного выше, но трактовка результатов будет такой же, какая приводится на Рисунке 17.1. Поскольку рептилаз является достаточно дорогостоящим реагентом, то для подтверждения наличия гепарина в тестируемом образце можно использовать метод нейтрализации протромбина/метод тромбинового времени (Раздел 16).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Рисунок 17.1. Интерпретация продленного тромбинового времени

Тромбиновое время	Рептилазное время	Причина	Примечания
Продленное	Продлено в равной степени	Гидро- или афибриногенемия	Измерить фибриноген
Продленное	Сильно продлено	Дисфибриногенемия	Врожденный или приобретенный
Продленное	В норме	Гепарин	
Продленное	Немного продлено	Гепарин с некоторой гипо- или дисфибриногенемией	Редкий случай дисфибриногенемии может дать подобный образец
Продленное	Продлено в равной степени	Диссеминированное Внутрисосудистое Свертывание (ДВС)	Измерить D-димер

ПРИНЦИП

В растворе глиоксаля готовятся растворы обычной стандартной плазмы с известным содержанием фибриногена. Время свертывания измеряется после добавления тромбина, и делается построение графика.

Время свертывания пропорционально концентрации фибриногена, и раствор в соотношении 1/10 берется для предоставления показателя при стандартной подготовке. Тестируемая плазма разводится в соотношении 1/10, и результат считывается со стандартной линии.

РЕАГЕНТЫ

- Стандартная плазма с известной концентрацией фибриногена
- Тромбин 30 Е/мл – 100 Е/мл (концентрации могут варьироваться в зависимости от источника)
- Буфер имидазола (глиоксаля) или буфер Оурена рН 7.35

МЕТОД

1. В буфере имидазола приготовьте растворы стандартной плазмы в соотношении 1/5, 1/10, 1/15 и 1/20.
2. При помощи пипетки налейте дубликат каждого раствора объемом 0.2 мл в стеклянную пробирку для свертывания.
3. Подогревайте в течение 2 минут до температуры 37°C .
4. Добавьте 0.2 мл тромбина (30 Е/мл–100 Е/мл) и засекийте время образования сгустка.
5. При проведении испытания вручную проведите тест дважды. Для большинства коагулометров в этом нет необходимости, если процесс тестирования автоматизирован.

6. На двойной логарифмической бумаге нанесите график среднего значения времени сворачивания в сравнении с концентрацией фибриногена, приняв 1/10 раствора за стандартную величину.

7. Разведите тестируемую плазму в соотношении 1/10, определите время свертывания и считайте значение с графика.

Стандартный диапазон должен быть установлен локально, но обычно он близок к 1.5 г/л–3.5 г/л.

Для большинства методик Клаусса отношение между временем сворачивания и концентрацией фибриногена линейно в течение ограниченного диапазона времени свертывания, что обычно составляет 10 – 25 секунд.

- Для обычной тестируемой плазмы можно использовать раствор в соотношении 1/10.
- Для более слабых концентраций (например, 0.75 г/л–1.5 г/л) плазма должна быть разведена в соотношении 1/5 (значение считывается с графика и умножается на 5/10).
- Для уровней ниже <0.75 г/л тестируемая плазма должна быть разведена в соотношении 1/2 (значение считывается с графика и умножается на 2/10).
- Для более высоких уровней (>4 г/л), тестируемая плазма должна быть разведена в соотношении 1/20 (значение считывается с графика и умножается на 20/10).

Гепарин не влияет на результаты тестирования, если он находится на таком уровне, который используют при лечении венозной тромбоэмболии. Более высокие уровни, используемые при кровообращении, могут, однако, продлить время свертывания, что может привести к недооценке фибриногена, если только в опровержение этому реагент не содержит нейтрализаторы гепарина.

ТИПИЧНЫЕ ДАННЫЕ СТАНДАРТИЗАЦИИ

Примечание: калибровочная кривая должна быть установлена при помощи локально применяемых реагентов.

Стандартная плазма: 2.1 г/л фибриногена

Рисунок 18.1. Пример калибровки фибриногена

Раствор стандарта	Концентрация фибриногена (г/л)	Время Сворачивания (сек.)
1/5	4.2	8.5
1/10	2.1	14
1/15	1.4	19.5
1/20	1.05	24.5

Примеры:

Тестируемая плазма 1: разведена 1 к 10, время свертывания 15 секунд.
Фибриноген = 1.9 г/л (из калибровочного графика)

Тестируемая плазма 2: разведена 1 к 5, время свертывания 16 секунд.
Фибриноген = 1.8 г/л из калибровочного графика $\text{graph} \times 5/10$
(так как используется раствор 1/5 а не 1/10)
= 0.9 г/л

Некоторые коагуляционные анализаторы могут установить уровень фибриногена во время определения протромбинового времени. Это возможно потому, что изменения в световом разбросе или трансмиссии, как результат формирования сгустка, пропорциональны первоначальной концентрации фибриногена. Эти методы обычно называют фибриногеном, полученным из ПВ.

Существуют ограничения на большинство методов ПВ-производных фибриногена. В частности, достигнутые результаты гораздо выше тех, которые были получены при анализе Клаусса, где уровни фибриногена или слишком низкие (<1.5 г/л), или завышены (более 5 г/л). Результаты находятся в норме при наличии дисфибриногенемии.

Для исследования неразведенной тестируемой плазмы существуют методы фибриногена Клаусса, но результаты могут быть не равнозначны результатам широко используемых исследований Клаусса, применяющих разведенную тестируемую плазму.

ССЫЛКИ

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: data from the UK National External Quality Assessment scheme. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20:388-90.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121: 396-404.

ПРИНЦИП

Гепаринез 1 (активный компонент Гепзима(Herzyme®) характерен для гепарина. Гепаринез расщепляет его в молекуле на множество частиц, производя олигосахариды, потерявшие свою антитромботическую активность. Гепзим является очищенным бактериальным гепаринезом 1, выпускаемым в *Flavobacterium heparinum*. Он может отделить до 2 МЕ гепарина на 1 мл плазмы. Гепзим может использоваться для нейтрализации эффекта гепарина в образце, так, чтобы можно было провести оценку базового коагуляционного статуса. В частности, он используется в случаях заражения гепарина.

РЕАГЕНТЫ

Гепзим®, пробирка содержащая сухой препарат гепаринеза 1 со стабилизаторами

Производитель: Dade Behring

Хранение: 4°C

Стабильность: по сроку годности производителя. Каждая пробирка предназначена для тестирования только одного пациента.

МЕТОД

1. Добавьте 1.0 мл обычной обедненной тромбоцитами плазмы в пробирку с Гепзимом.
2. Закупорите и плавно переверните 5-10 раз.
3. Оставьте при комнатной температуре на 15 минут.
4. Перелейте в пластиковый стаканчик объемом 2 мл и дайте пузырькам испариться.
5. Проведите необходимый анализ.

Необходимо включить проверку на тромбиновое время для того, чтобы проверить, что весь гепарин был успешно удален.

Тест должен быть сделан незамедлительно (в рамках руководства для данной процедуры).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Данный фермент не удаляет никаких факторов свертываемости (в отличие от некоторых альтернативных методов удаления гепарина), таким образом, незначительное сокращение времени свертывания при АЧТВ, тромбиновом времени или ПВ после обработки ферментом указывает на наличие гепарина. Данный фермент разлагает как нераздробленный гепарин, так и низкомолекулярные формы.

Проведение Анализа Антиген Фибриногена Путем Радиальной Иммунодиффузии (РИ)

20

ВСТУПЛЕНИЕ

Существуют подозрения на дисфибриногению (II тип нехватки фибриногена), если результат анализа фибриногена Клаусса значительно ниже, чем фибриноген с временным разделением протромбина или результаты антигена фибриногена.

Анализ Клаусса определяет уровень фибриногена путем определения степени образования фибрина после добавления высокой концентрации тромбина, в то время как полученный анализ измеряет оптическую плотность / легкий разброс посредством анализа сформировавшегося сгустка фибрина после того, как образование сгустка закончено.

Анализ антигена фибриногена выявляет дисфибриногению как низкую активность путем анализа Клаусса в присутствии стандартного уровня антигена.

Афибриногения может быть связана с кровотечением из-за недостаточной коагуляции плазмы и функциональности тромбоцитов. Множество дефектов, которые могут быть охарактеризованы нарушенным выделением фибринопептидов А / В и нарушением полимеризации мономера фибрина, вызывают дисфибриногению. Дефекты типа II могут быть асимптоматическими, но некоторые разновидности связаны со склонностью к кровотечению и тромбозу. Кровотечение или склонность к тромбозу у пациента может и не быть связана с дисфибриногенемией, выявить которую предоставляется возможность.

МАТЕРИАЛЫ

Чаша NOR-Partigen Фибриноген R.I.D.

Производитель: Dade Behring

Каждая чаша содержит 12 ячеек

РЕАГЕНТЫ

- Плазма для калибровки с известной концентрацией фибриногена, стандартизацию фибриногена которой можно проследить по Международной Стандартизации ВТО
- Тестируемая плазма: Обычная плазма, как правило, тестируется неразведенной, или разведенной в солевом растворе до уровня приблизительно в 2.5 г/л, если ожидается, что уровень будет больше, чем 5 г/л. Результаты менее 5 г/л записываются как <0.5 г/л (нижний лимит чувствительности).

МЕТОД

1. Дайте чаше RID нагреться до комнатной температуры, затем откройте крышку и оставьте на 5 минут для испарения лишней влаги.
2. Стандартная плазма тестируется аккуратно в солевом растворе 75%, 50% и 25%.
3. Добавьте в ячейки *ровно по* 5 μ л раствора стандартной плазмы, плазмы для проведения контроля и плазмы пациентов (желательно дублируя). Аккуратное измерение пипеткой крайне важно при работе с маленькими объемами.
4. Как только образец растворился в геле (не дольше 5 минут после нанесения), накройте чашу крышкой и положите на ровную поверхность во влажную коробку при комнатной температуре на 48 часов.
5. Результаты уже можно будет оценить после 18 часов, пока диаметр не превышает 5.5 мм. Финальные результаты должны быть доложены после 2 дней, если только диаметр не превышает 8 мм. В этом случае чашу оставляют еще на один день до завершения диффузии. Диаметр >9.3 мм указывает на то, что уровень фибриногена выше, чем степень чувствительности в проводимом тестировании. В этом случае образец нужно развести в соляном растворе и провести тестирование заново.
6. Измерьте диаметры преципитации, используя устройство для считывания чаши Беринга (доступно вместе с чашей). Измерьте ближайшие 0.5 мм и возьмите данные дважды (диаметрами, находящимися под углом 90° друг к другу).
7. На разграфленной линейной бумаге отобразите график стандартной кривой: диаметр² против концентрации.
8. На этой кривой определите уровень контроля качества и пациента.
9. Зафиксируйте результаты в г/л, если контроль качества находится в желаемом диапазоне.

ПРИНЦИП

Тромбин и кальций должны активизировать фактор XIII таким образом, чтобы он переплетался с фибрином в стабильную форму. В этом методе, несмотря на использование обычной плазмы, для активизации фактора XIII ионов кальция все же бывает достаточно.

Для проведения контроля используется обычная ЭДТК коагулированная плазма. В подобной плазме ЭДТК приводит к полной хелатизации ионов кальция, что означает, что фактор XIII не способен на переплетение с фибрином. Добавление 2% уксусной кислоты или 5М мочевины приводит к распаду не переплетенных сгустков, в то время как у обычной плазмы с активностью фактора XIII более, чем 10 Е/дл, сгусток не растворяется. Тест, как правило, более чувствителен, если используется уксусная кислота, нежели мочевина, так как в присутствии уксусной кислоты сгусток растворится при более высоких уровнях фактора XIII.

МАТЕРИАЛЫ / РЕАГЕНТЫ

- Стекланные пробирки размером 75 × 10 мм
- Солевой раствор 0.9%
- 30 Е/мл тромбина
- Обычная плазма ЭДТК
- 2% уксусная кислота

МЕТОД

1. В пробирке смешайте 0.2 мл обычной тестируемой плазмы с 0.2 мл 0.9% солевого раствора. Для положительного контроля повторите то же самое с 0.2 мл плазмы ЭДТК. Для отрицательного контроля повторите действия с 0.2 мл обычной плазмы.
2. Добавьте 0.1 мл тромбина 30 Е/мл. Перемешайте.
3. Оставьте при температуре 37°C на 30 минут.
4. Поцелкайте по пробирке, чтобы отделить сгустки от стенок пробирки.

-
5. Добавьте 5 мл 2% уксусной кислоты и закупорьте пробирку. Оставьте при комнатной температуре на 12 часов.
-

РЕЗУЛЬТАТЫ

- Плазма ЭДТК не должна содержать видимых сгустков.
- В обычной плазме должен находиться видимый здоровый сгусток.
- Если сгустка не наблюдается, то у пациента существует нехватка фактора XIII.

СТАНДАРТНЫЙ ДИАПАЗОН

У обычных экземпляров после нахождения в течение 12 часов в 2% уксусной кислоте образовывается сгусток.

ПРИМЕЧАНИЯ

- 5М мочевины может использоваться вместо 2% уксусной кислоты. Тогда время инкубации для растворения сгустка составляет 18 часов. Этот метод менее чувствителен, чем тот, где используется уксусная кислота (описан выше).
- Сворачивание в присутствии кальция и распад в присутствии мочевины приводит к аномальным результатам только в том случае, если уровни фактора XIII находятся ниже 5 Е/дл. Для сравнения, свертываемость 30 Е/мл тромбина, за которой следует лизис с 2% уксусной кислотой, приводит к аномальным результатам при уровнях ниже, чем 10 Е/дл.
- Иногда кровотечение случается у пациентов, уровень фактора XIII которых находится выше 5 Е/дл.

ССЫЛКИ

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Problems relating to the diagnosis of FXIII deficiency. *Thromb Haemost* 2003; 1: 2603-8.

Анализы, Основанные На Протромбиновом Времени (Факторы II, V, VII, X)

22

Анализ факторов II, V, VII, и X может быть совершен с использованием одноэтапного анализа, основанного на протромбиновом времени. По существу, анализ основан на сравнении способности растворов стандартной или контрольной плазмы и тестовой плазмы к корректровке протромбинового времени плазмы, значительная нехватка которого наблюдается в измеряемом факторе свертываемости. Например, при анализе фактора V (как описано ниже), в плазме наблюдается недостаток фактора V, но содержится достаточное количество факторов II, VII, X и фибриногена. Анализ факторов II, VII, X может быть совершен таким же способом: при помощи замещения подходящей недостающей плазмы на плазму, с недостатком фактора V, как приведено ниже, и используя подходящую стандартную плазму с известной концентрацией анализируемого фактора.

РЕАГЕНТЫ

- Плазма с нехваткой фактора V
Нехватка может быть врожденной или искусственно приобретенной (состаренная плазма)
- Солевой буфер Оурена
Глиоксиловый буфер или OBS (смотри Раздел 9)
- Обычная плазма, обедненная тромбоцитами: тестовая и стандартная
Для стандартизации используйте пул из 20 доноров обычной плазмы (держите ее при температуре -70°C или ниже), коммерческий источник или стандартную плазму.
- Тромбопластин / кальций (такой же, как использовался при тестировании ПВ)

МЕТОД

1. Как для тестов, так и для стандартной плазмы в пластиковых пробирках приготовьте раствор так, как показано ниже на Рисунке 22.1.

Рисунок 22.1. Подготовка растворов тестовой и стандартной плазмы

Раствор	Плазма (мл)	OBS (мл)
1/5	0.1	0.4
1/10	0.1	0.9
1/20	0.5 (1/10)	0.5
1/40	0.5 (1/20)	0.5

Примечание: Для приготовления 1/20 раствора хорошо смешайте 1/10 раствора до его использования. Для приготовления 1/40 раствора хорошо смешайте 1/20 раствора до его использования. Растворы плазмы нужно тестировать сразу после их приготовления. Если температура комнаты превышает 25°C, возможно необходимо положить растворы на влажный лед перед проведением анализа.

.....

2. Протестируйте каждый раствор стандартной плазмы по образцу:

- i.** В стеклянную пробирку размером 75 × 10 мм при помощи пипетки налейте по 0.1 мл каждого из растворов.
- ii.** Добавьте 0.1 мл плазмы, обедненной фактором V.
- iii.** Подогревайте до 37°C в течение 2 минут.
- iv.** Добавьте 0.2 мл подогретого тромбoplastина / реагента кальция.
- v.** Засеките секундомер и смешайте.

Примечание: Если реагент тромбoplastина не содержит кальций, то 0.1 мл тромбoplastина добавляется в смесь раствора и обедненной плазмы. После 1-2 минутной задержки, в течение которой смесь подогревается до 37°C, она сворачивается с 0.1 мл предварительно подогретого (до 37°C) кальция.

.....

3. Запишите время свертываемости.

.....

4. Повторите процедуру для растворов тестируемой плазмы.

Для предполагаемо нормальной стандартной тестируемой плазмы проведите анализ 1/10, 1/20, и 1/40 раствора. Для тестируемой плазмы с предполагаемо сниженным уровнем протестируйте 1/5, 1/10 и 1/20 раствора.

«Пустой» образец также должен быть протестирован по следующему образцу:

- 0.1 мл OBS
- 0.1 мл плазмы, обедненной фактором V
- 0.2 мл тромбoplastина / реагента кальция

Время свертывания «пустого» образца отражает качество недостающей плазмы и должно быть менее 1%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На логарифмической бумаге цикла 3 × 2 отобразите график времени свертывания контрольной и тестируемой плазмы в сравнении с концентрацией фактора V. Пример подобного графика (для анализа фактора VIII) показан в Разделе 23. 1/10 раствора произвольно приравнивается к 100%, следовательно, 1/5 раствора эквивалентна 200% и так далее. Альтернативно, отобразите концентрацию в логарифмическом масштабе, а время сворачивания в линейном.

Относительное количество фактора V в плазме пациента в сравнении с нормальной плазмой или стандартным материалом экстраполируется из графиков. Пример тому показан в разделе об анализах, основанных на АЧТВ (Рисунок 23.1). Время свертывания, эквивалентное 100% критерию (точка, где линии теста проходят через 100% активность), считается со стандартной линии (поэтому, концентрация стандартов, которая могла привести к данному конкретному времени свертывания). Это дает концентрацию теста в процентном соотношении к стандарту. Для того чтобы показать концентрацию в тесте (измеряемое в МЕ/мл), это процентное соотношение умножается на концентрацию фактора свертываемости в стандарте (измеряемое в МЕ/мл).

ПРИМЕЧАНИЯ

- Стандартный диапазон каждого из этих факторов свертываемости должен определяться локально, но чаще всего его нижняя граница составляет 50–70 МЕ/дл для факторов V, VII и X. Нижняя приемлемая граница для фактора II обычно выше. В одном исследовании у обычных субъектов с семейной историей нехватки фактора II, так же как и у других обычных не родственных им субъектов, уровни фактора II находились в диапазоне 84–130 МЕ/дл. В другом центре был зафиксирован диапазон в 84–132 МЕ/дл.
- Личностям со сниженным фактором V нужно также провести анализ фактора VIII, чтобы исключить вероятность совместной нехватки факторов V и VIII.
- В некоторых случаях при нехватке фактора VII может существовать различие между достигнутыми уровнями фактора VII:C, в зависимости от источника тромбопластина. Советуют использовать тромбопластин человека на основании того, что результаты вероятнее всего будут отображать активность *in vivo*. В некоторых редких случаях, при использовании тромбопластина кролика, результаты могут быть очень низкими, но при использовании тромбопластина человека, они могут быть стандартными. Это может являться причиной того, почему в некоторых явных случаях значительной нехватки фактора VII симптомов кровотечения не наблюдается.

ССЫЛКИ

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

Girolami A, Scarano L, Saggiorato G, Girolami B, Bertomoro A, Marchiori A. Congenital deficiencies and abnormalities of prothrombin. *Blood Coagul Fibrinol* 1998; 9: 557-569.

Анализы Факторов, Основанные На АЧТВ (Одноэтапные анализы Факторов VIII:C, IX, XI или XII).

ПРИНЦИП

В этом разделе описывается одноэтапный анализ фактора VIII. Анализ основан на сравнении способности растворов стандартной и тестовой плазмы корректировать АЧТВ плазмы, недостающей фактора VIII, в которой, однако, присутствуют все остальные факторы, необходимые для нормальной свертываемости крови. Для факторов IX, XI, и XII анализ по сути такой же, и происходит он путем замещения релевантной недостающей плазмы на плазму, недостающую фактора VIII и после выбора подходящей стандартной плазмы.

РЕАГЕНТЫ

- Обычная обедненная тромбоцитами тестируемая и стандартная плазма
Используемая стандартная плазма должна быть собрана локально и храниться при температуре -70°C или ниже, или коммерчески доступная стандартная плазма. В любом случае, эта стандартная плазма должна быть градуирована для фактора VIII в соответствии с международными стандартами. Недопустимо предположить, что уровень собранной обычной плазмы равен 100 Е/дл VIII:C.
- Плазма, обедненная фактором VIII
Подобная плазма доступна коммерчески или может быть собрана у доноров, чей уровень фактора VIII ниже 1 Е/дл, у которых нет антител анта-фактора VIII, которые не принимали никаких медикаментов в течение 2 недель и результаты анализов теста работы печени которых находятся в норме. Ненормальное функционирование печени может привести к снижению других факторов свертываемости крови, которые влияют на специфичность данного исследования.
Подобная плазма может храниться по частям при температуре -37°C . Предпочтительнее использовать плазму, обедненную фактором VIII, добытую путем иммунного истощения фактора VIII обычной плазмы при помощи моноклонального антитела. Этот тип вещества доступен коммерчески, и его преимущество заключается в том, что по сравнению с плазмой больных гемофилией, принимавших медикаменты, он не заражен никакими вирусами. Однако уровень не всех иммуно истощенных плазм менее 1 Е/дл, и следует соблюдать осторожность при совершении его проверки. Некоторые эксперты придерживаются мнения, что присутствие обычных концентраций фактора фон Виллебранда в плазме, обедненной фактором VIII, может являться преимуществом, и свидетельством тому является то, что анализы фактора VIII проводятся как часть определения ингибитора фактора VIII.

- Реагенты АЧТВ
- Соляной буфер Оурена (ОВС или буфер глиоксаля, смотри Раздел 9)
- 25мМ CaCl₂

МЕТОД

1. В пластиковой пробирке в солевом буфере разведите 1/10 часть стандартной и тестируемой плазмы. (Если в тестируемой плазме уровень фактора VIII очень низок, начните с 1/5 раствора.)
2. В пластиковой пробирке емкостью 0.2 мл приготовьте дублирующие растворы стандартной и тестируемой плазмы от 1/10 до 1/40. (Хорошо перемешайте растворы прежде чем переходить к следующей пробирке). Растворы плазмы следует тестировать сразу после их приготовления. Если температура комнаты превышает 25°C, возможно есть необходимость поместить растворы на влажный лед, прежде чем преступить к тестированию.
3. При помощи пипетки налейте по 0.1 мл каждого стандартного раствора в стеклянные пробирки размером 75 × 10 мм.
4. Добавьте 0.1 мл плазмы, обедненной фактором VIII, и поместите в водяную ванночку с температурой 37°C.
5. Добавьте 0.1 мл реагента АЧТВ и поместите в инкубатор на 5 минут.
6. По истечении 5 минут добавьте 0.1 мл CaCl₂ и зафиксируйте время свертывания.
«Пустой» образец должен быть подготовлен по следующему образцу:
 - 0.1 мл ОВС
 - 0.1 мл плазмы, обедненной фактором VIII
 - 0.1 мл реагента АЧТВ
 - Инкубировать в течение 5 минут
 - 0.1мл CaCl₂

Время свертывания пустого образца должно быть дольше, чем время активности 1% фактора VIII стандартной плазмы из калиброванного графика. Если это время короче, то это указывает на то, что в субстратной плазме фактор VIII отсутствует не полностью, и поэтому она не является подходящей субстратной плазмой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отображение результатов на графике описано в Разделе 22 и требует использования двойной логарифмической / линейной разграфленной бумаги.

1/10 раствора условно принимается за 100%, 1/20 раствора – за 50%, а 1/40 принимается за 25% раствора.

Нужно добиться прямых линий, параллельных друг другу.

Считайте показатели концентрации плазмы так, как это показано на Рисунке 22.1 (Раздел 22). Например, концентрация фактора VIII в тестовом образце составляет 7% той, что находится в стандартной плазме. Если концентрация стандартной плазмы составляет 85 МЕ/дл, то концентрация в тестовом образце составляет $85 \text{ МЕ/дл} \times 7\% = 6 \text{ МЕ/дл}$.

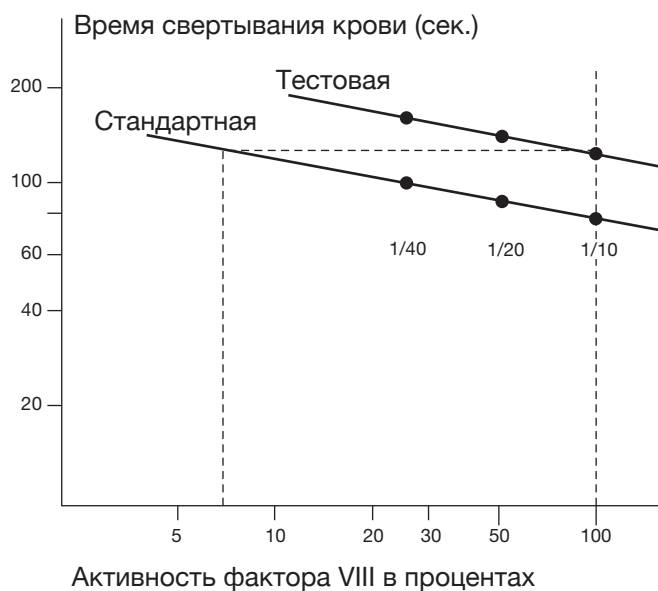
Если линии не параллельны, то анализ нужно повторить.

Линии могут быть не параллельными из-за технической ошибки. Если техническая ошибка была устранена, то линии могут быть не параллельными из-за присутствия ингибитора, который может действовать специально против фактора VIII или может являться «волчаночным типом», демонстрируя перекрестные образцы. Расходящиеся линии типичны для активированного образца.

ПРИМЕЧАНИЯ

- Если концентрация фактора VIII (или IX, XI, и XII) тестируемой плазмы близка нулю (то есть время сворачивания крови всех растворов почти равно нулю), то линии могут быть непараллельными.
- Стандартный диапазон должен быть установлен локально, на зачастую его нижняя граница должна составлять 50–65 МЕ/дл для факторов IX и XI.
- Что касается фактора XI, Международные Единицы (МЕ) были установлены лишь недавно. В момент написания данного материала имелось не так много данных о стандартных уровнях фактора XI в МЕ. В публикациях, предшествующих установлению МЕ указывалось, что нижняя граница приемлемости фактора XI лежит в диапазоне 63–80 Е/дл.

Рисунок 23.1. График анализа фактора VIII



ССЫЛКИ

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

Условия анализа, описанного в Разделе 23, являются подходящими в том случае, если образцы теста содержат стандартный или почти стандартный уровень фактора VIII:С. Если этот уровень больше 150 МЕ / дл, то условия, как правило, необходимо будет изменить для того, чтобы тест считался действительным.

Уровни фактора VIII:С в криопреципитате варьируются в зависимости от различных доноров, но обычно находятся в диапазоне 200 – 1000 МЕ \ дл. Тестируемый материал, находящийся на подобных уровнях, необходимо предварительно развести для того, чтобы снизить его концентрацию перед тестированием. Для большинства единиц криопреципитата предварительное разведение в соотношении 1 к 5 или 1 к 10 снизит концентрацию до такого уровня, что разведенное вещество может использоваться в анализе так, как описано в Разделе 23 (таким образом, предварительно разведенное вещество может быть далее разведено в соотношении 1/5, 1/10, 1/20 в буфере анализа, как описано выше).

Если криопреципитат предварительно не разведен до необходимой концентрации, то вероятнее всего те требования построения прямой линии, соединяющей показатели разведенных растворов тестируемых образцов, и того, что эта линия должна быть параллельна калибровочной кривой, не будут соблюдены. Подобный анализ будет считаться недействительным, а результаты не будут точными.

Предварительное разведение криопреципитата должно быть сделано только перед самым началом анализа фактора VIII:С. Некоторые центры используют буфер, задействованный в анализе фактора VIII:С (например, буфер Оурена или имидазол), в то время как другие центры для этих целей используют плазму, обедненную фактором VIII:С. В общем, подобное предварительное разведение является более надежным если используется плазма, обедненная фактором VIII:С. Поэтому, такая плазма предпочтительнее.

Точность анализа фактора VIII:С на криопреципитат среди центров схожа с точностью анализов тестирования образцов плазмы.

ССЫЛКА

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the World Federation of Hemophilia EQA programme 2003–2008. *Haemophilia* 2009; 15: 571–7.

Двухступенчатый Анализ На Свертываемость Фактора VIII:C

25

ПРИНЦИП

Данный тест был впервые описан в 1955 году как модификация теста раствора тромбопластина. Двухступенчатый анализ фактора VIII:C основан на том принципе, что количество фактора VIII, присутствующего в системе, ограничивает скорость свертывания крови в тестируемой смеси, в избытке содержащей фактор X, активированный фактор IX, фосфолипид, кальций, и фактор V. Абсорбирование плазмы гидроокисью алюминия удаляет активированные факторы и факторы, зависящие от витамина K. Это необходимо для удаления протромбина, так, чтобы он не присутствовал в первоначальной инкубационной смеси. Без совершения этого шага смесь будет содержать все компоненты, необходимые для формирования фибрина, и смесь свернется.

На первом этапе растворы абсорбированной стандартной и тестируемой плазмы находятся в инкубаторе совместно с реагентом. Это производит фактор Ха. На втором этапе из стандартной собранной плазмы добавляется источник протромбина и фибриногена, который позволяет сгустку сформироваться и от которого зависит итоговое время свертывания при первоначальном количестве фактора VIII:C.

РЕАГЕНТЫ

- Комбинированный реагент (смотри «Производство Комбинированного Реагента» ниже)
- Веронал буфера Оурена
- Стандартная собранная плазма (субстратная плазма): хранить при глубокой заморозке
- Стандартная плазма
- Внутренний контроль качества (ВКК)
- 0.0125M CaCl₂ (например, 1 / 2 раствора 0.025M CaCl₂ как используется при тестировании АЧТВ)
- Суспензия алюминия гидроксида (например, каталог SIGMA код A8222): хранить при комнатной температуре.

ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦАМ

Обычная плазма, которая может при необходимости быть глубоко заморожена.

МЕТОД

1. Восстановите стандартную плазму при помощи дистиллированной воды за 10 минут до ее использования, а комбинированный реагент восстановите при помощи 3 мл 0.0125M CaCl₂ по меньшей мере за 15 минут до использования.
2. Подготовьте плазму для ВКК и субстратную плазму. Если какая-либо из них находится в состоянии глубоко заморозки, разморозьте ее при температуре 37°C за 5 минут до использования.
3. Прикрепите этикетку на достаточно вместительные одноразовые пластиковые пробирки для каждого образца, ВКК и стандартного.
4. Налейте 0.45 мл стандартной плазмы, плазмы ВКК и плазмы пациента в каждую пластиковую пробирку.
5. Добавьте 50 µл хорошо смешанной окиси алюминия и хорошенько все перемешайте.
6. Для небольшого количества плазмы используйте 0.225 мл плазмы и 25 µл окиси алюминия.
7. На 3 минуты поместите в инкубатор при температуре 37°C, затем центрифугируйте 5000 г на протяжении 2 минут.
8. Немедленно переместите супернатантную плазму в пластиковые стаканчики или пробирки, совместимые с используемым анализатором. Будьте осторожны, чтобы не повредить остаток окиси алюминия.

Примечание: следующие шаги основаны на использовании анализатора серии Sysmex SA. Тестирование может быть проведено при помощи аппаратов других производителей. Один из соавторов этого руководства провел успешный эксперимент при помощи анализатора Лаборатории Приборов, и, вероятнее всего, метод будет совместим с другими типами анализатора. Таким образом, этот конкретный метод приводиться в качестве примера.

9. Загрузите в автоанализатор комбинированный реагент, буфер анализа и собранную стандартную плазму / субстрат.
10. Абсорбированную плазму предоставляют на анализ в следующем порядке: стандартная, ВКК, плазма пациента и в последнюю очередь вторая стандартная плазма. Образцы с нормальной концентрацией фактора VIII обычно тестируются при помощи трех различных растворов в диапазоне 1/50–1/400.

Для низких уровней фактора VIII (< 0.05 МЕ/дл) могут понадобиться растворы в соотношении 1/10, 1/20 и 1/50. Для более высоких уровней (> 1.5 МЕ/дл) могут понадобиться растворы в соотношении 1/800–1/3200, иначе линии, отображающие реакцию на дозу препарата у пациента, могут не быть параллельны стандартной линии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Зафиксируйте на графике результаты и расчеты активности фактора VIII так, как это показано в одноэтапном анализе (Раздел 23).

25.1. Производство комбинированного реагента для двухступенчатого анализа фактора VIII:C

Возьмите достаточное количество фактора V и фосфолипида для получения соотношения 5:1:1 с разведенной состаренной плазмой (5 частей сыворотки к 1 части фактора V и 1 части фосфолипида). Например, 240 мл разведенной сыворотки, 48 мл фактора V и 48 мл фосфолипида (или соотношение 180 мл:36 мл: 36 мл).

РЕАГЕНТЫ

- Состаренная плазма
 1. 10 мл крови в обычных стеклянных пробирках, взятой, по меньшей мере, от 6 обычных доноров, без добавок.
 2. Поместите в инкубатор на 4 часа при температуре 37°C , затем оставьте на ночь при температуре 4°C .
 3. В течение 10 минут центрифугируйте при 3000 о/м.
 4. Отделите и перемешайте супернатант в не-силиконизированной стеклянной емкости (может храниться в замороженном состоянии).
- Коровий фактор V
Восстановите каждый при помощи 1 мл буфера глиоксаля
- Фосфолипид
Восстановите каждый при помощи 1 мл буфера глиоксаля (5-кратная концентрация)
- Буфер глиоксаля
- HEPES кислота (Sigma H3375)

МЕТОД

1. Разведите состаренную сыворотку буфером глиоксаля в соотношении 1/10.

-
2. На 1 час активируйте разведенную сыворотку путем смешения 1 мл с 1 небольшим стеклянным шаром (шар баллотини) и поместите в ротационный миксер на 1 час, накрыв сверху лабораторной пленкой. (Примечание: 100 шаров баллотини весят 3.7 г)
-

Примечание: на этапах с 3-8 действуйте как можно быстрее.

.....

3. Восстановите плазму с фактором V в 1 мл буфера глиоксаля.
 4. Восстановите фосфолипид в 1 мл буфера глиоксаля.
 5. Смешайте активированную разведенную сыворотку, фактор V и фосфолипид в соотношении 5:1:1.
 6. Хорошо смешайте и добавьте порошок HEPES, сохраняя концентрацию в 1% для стабилизации pH на уровне 7.0 (например, на 300 мл жидкости добавьте 3 г HEPES).
 7. Распределите на части по 0.5 мл.
 8. Эта смесь может быть лиофилизирована (о лиофилизации смотри Раздел 40)
 9. Протестируйте новый реагент на оптимальность условий так, как написано ниже.
-

ОЦЕНКА ГЕНЕРАЦИИ ПЛАТО ФАКТОРА X

Оптимальный раствор образцов, инкубационное время, общее время проведения анализа, общий объем анализа, объем 0.0125M CaCl₂, используемый для восстановления, продолжительность восстановления и стабильность восстановленного комбинированного реагента – все это должно систематически оцениваться для достижения генерации плато фактора X.

Порядок и продолжительность того, что может произойти следующее, еще не определены. Они могут измениться в зависимости от пробы. Хорошей отправной точкой является использование тех же условий, которые используются при действующей пробе, а затем по порядку изменяя один параметр за другим.

- Восстановление объема при помощи 0.0125M CaCl₂: 0.5 мл, 1 мл, 1.5 мл, 2 мл, 2.5 мл, 3 мл, 3.5 мл.
- Продолжительность восстановления перед использованием / стабильность после восстановления: сразу же после использования, через 5 минут, через 10 минут, через 30 минут, через 60 минут, через 120 минут.

- Для каждого проводимого исследования отметьте все результаты на разграфленной двойной логарифмической бумаге, как, например, показано на Рисунке 25.1. Выберите растворы и условия, имеющие наибольшее количество показателей на линейной части кривой. В идеальных условиях время сворачивания будет около 20-30 секунд для первого раствора.

- Стандартная собранная плазма / субстрат собирается из оставшейся обычной плазмы обычного фильтра свертываемости или у обычных здоровых субъектов.
- Показатель ПВ и АЧТВ у составной плазмы должен быть в норме.
- Обычная собранная плазма может храниться в пластиковых пробирках по 3 мл и 5 мл при температуре -80°C на протяжении как минимум 6 месяцев.

Graph Data Ref. 5923

Log 2 Cycles x 3 Cycles

PLATEAU

m180 volume

CR. 22 12 5

30μCR 7100 8mmis
Incubation

4m180
2.3m180
2m180

3m180 40'
3m180 45'
3m180 48mmis

release 1m1 & 10mmis
6rd conductance

26 Хромогенный Анализ Фактора VIII:C

ВСТУПЛЕНИЕ

На протяжении многих лет во всем мире самым распространенным анализом фактора VIII:C был одноэтапный анализ, описанный в Разделе 23.

Существуют некоторые ограничения к проведению одноэтапного анализа, включая нарушения при наличии волчаночного антикоагулянта. Важнее всего то, что при проведении одноэтапного исследования не исключается наличие средней степени гемофилии А даже при нормальном уровне фактора VIII:C. Несколько групп заявили, что у подгруппы пациентов со средней степенью гемофилии А наблюдалось различие активности фактора VIII, как выявилось путем проведения различного типа анализов. Подобное различие наблюдалось у более 20% пациентов со средней степенью гемофилии А, что определило двукратное различие между результатами, достигнутыми при помощи различных систем исследования.

В некоторых случаях результат одноэтапного исследования может быть в 5 раз выше, чем двухэтапное исследование свертываемости или хромогенного исследования. В общем, результат одноэтапного исследования более чем в 2 раза выше, чем результат двухэтапного исследования свертываемости или хромогенного исследования. Более чем у $\frac{3}{4}$ пациентов все результаты исследований находятся ниже предельной границы стандартного диапазона, таким образом, диагноз может быть поставлен наверняка, несмотря на то, какой метод используется для анализа.

Однако у небольшого количества пациентов результаты одноэтапного исследования находятся в пределах стандартного диапазона при сниженных уровнях двухэтапного исследования свертываемости или хромогенного исследования. У таких пациентов имеется история кровотечений, совместимая с низкими уровнями, выявленными при проведении исследовании свертываемости или хромогенного исследования.

В большинстве случаев были выявлены генетические дефекты, так что нет никакого сомнения в том, что у подобные субъекты действительно больны гемофилией. Согласно различным источникам, у приблизительно 5-10% пациентов с подтвержденной генетической формой гемофилии средней степени результат одноэтапного исследования находится в пределах нормы. Так как активность фактора VIII стандартна при проведении одноэтапного анализа, основанного на АЧТВ, не удивительно, что АЧТВ таких пациентов находится тоже в норме. Это означает, что для пациентов с клинической историей, совместимой с гемофилией А, должно проводиться двухэтапное исследование на

свертываемость и хромогенное исследование, даже если АЧТВ при одноэтапном исследовании находится в норме.

Некоторые производители выпускают в продажу наборы для проведения хромогенного исследования фактора VIII. Многие из них пригодны для диагностики гемофилии А в присутствии стандартной одноэтапной активности фактора VIII. Пример результатов таких пациентов приведен ниже на Рисунке 26.1. Для хромогенного исследования применялся набор производителя Siemens/Dade Behring, однако включение в руководство примера с данным набором не устанавливает его преимущества перед другими похожими исследованиями, которые могут быть успешно использованы по ходу исследования.

Рисунок 26.1. Примеры пациентов с генетически подтвержденной формой гемофилии А средней и разброса данных

Случай	Одноэтапное исследование (МЕ/дл)	Двухэтапное исследование свертываемости (МЕ/дл)	Хромогенное исследование (МЕ/дл)
A	101	34	13
B	88	15	28
C	63	30	40
D	55	24	40
E	58	21	33
F	72	21	36
G	84	19	45

Известны случаи, когда активность гемофилии А средней степени при проведении одноэтапного исследования была снижена, но при проведении двухступенчатого хромогенного исследования результаты были нормальными. Во многих (но не во всех) подобных случаях результатом клинического фенотипа, соотносимого с результатом хромогенного или двухступенчатого исследования свертываемости крови, является отсутствие личной или семейной истории кровотечения, где нет необходимости в заместительной терапии фактора VIII.

Основываясь на этих результатах, было бы полезным сделать хромогенное или двухступенчатое исследование свертываемости доступным для всех центров изучения гемофилии. Подобные тесты должны проводиться на субъектах со стандартным АЧТВ и одноступенчатой активностью фактора VIII при наличии личной или семейной истории гемофилии средней степени.

Было описано измененное хромогенное исследование (измененная версия Коаматик исследования, Инструментальная Лаборатория). Оно подходит для исследования очень низких уровней фактора VIII. Заявлено, что этот метод позволяет аккуратно и точно измерить фактор VIII в диапазоне 0.1-2 МЕ/дл (0.1-2% фактора VIII, или 0.001-0.02 МЕ/ мл).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

В некоторых (не во всех) хромогенных анализах, фактор VIII во всех образцах активируется тромбином. В присутствии активированного фактора IX, фосфолипидов и ионов кальция активированный фактор VIII ускоряет переход фактора X в фактор Ха. Активность фактора Ха оценивается путем гидролиза субстрата р-нитроанилина, характерного для фактора Ха. Первоначальный диапазон выделения р-нитроанилина (желтый цвет) в измерении 405 нм пропорционален активности фактора Ха и соответственно активности фактора VIII в образце.

ССЫЛКИ

- Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, Lloyd JV. Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII assay methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol* 1994; 87: 846–848.
- Keeling DM, Sukhu K, Kemball-Cook G, Waseem N, Bagnall R, and Lloyd JV. Diagnostic importance of the two stage FVIII:C assay demonstrated by a case of mild hemophilia associated with His1954 → Leu substitution in the FVIII A3 domain. *Br J Haematol* 1999; 105: 1123–6.
- Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG, White GC. Issues with the assay of FVIII activity in plasma and FVIII concentrates. *Thromb Haemost* 2000; 84:942–8.
- Lyall H, Hill M, Westby J, Grimley C, Dolan G. Tyr346 → Cys mutation results in factor VII:C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype: Is this mild haemophilia A? *Haemophilia* 2008; 14:78–80.
- Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Parquet-Gernez A. Mutations in the FVIII gene in seven families with mild haemophilia A. *Br J Haematol* 1997; 96:426–7.
- Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJD, Manning RA, Kemball-Cook G. A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of FVIII in an individual with FVIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol* 2002; 118:589–594.
- Parquet-Gernez A, Mazurier C, Goudemand M. Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs: Characterisation of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thromb Haemost* 1998; 59:202–206.
- Rudzi Z, Duncan EM, Casey GJ, Neuman M, Favalaro RJ, Lloyd JV. Mutations in a subgroup of patients with mild haemophilia A and familial discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII:C methods. *Br J Haematol* 1996; 94:400–406.
- Yatuv R, Dayan I, Baru M. A modified chromogenic assay for the measurement of very low levels of FVIII activity (FVIII:C). *Haemophilia* 2006; 12:253–257.

Одноэтапный Внутренний Анализ Прекалликрейна (ПК) и Высокомолекулярного Кининогена (ВМК)

27

ПРИНЦИП

Высокомолекулярный кининоген (фактор Фитцджеральда) и прекалликрейн (фактор Флетчера) - коагуляционные факторы, которые можно обнаружить в контактной траектории. Снижение того или иного фактора приводит к значительной пролонгации АЧТВ для большинства реагентов АЧТВ, в зависимости от используемого активатора. При полном отсутствии ПК и ВМК (<1 Е/дл), АЧТВ обычно >200 секунд и больше, чем АЧТВ той же тестовой системы при полной нехватке факторов VIII или IX. Реагенты АЧТВ, использующие эллагиевую кислоту в качестве активатора (например, Actin FS), выдают совершенно нормальные результаты при нехватке того или иного фактора. Таким образом, подобные реагенты не могут использоваться в одноэтапном анализе этих факторов.

Кривая, изображающая реакцию на дозу препарата в одноэтапном исследовании этих факторов, гораздо круче для одних реагентов, чем для других. Метод, описанный ниже, показывает использование одного конкретного реагента, у которого кривая, изображающая реакцию на дозу препарата, особенно высока, что приводит к более точным и верным результатам исследования.

РЕАГЕНТЫ

- Реагент АЧТВ Daptin (Technoclone, Вена, Австрия)
Хранить при температуре 2°C–8°C, следуя инструкции производителя
- 25mM CaCl₂
Хранить при температуре 2°C–8°C
- Буфер Веронал Оурена
Хранить при температуре 2°C–8°C
- Плазма, обедненная прекалликреином (фактор Флетчера)
Например, лиофилизированная (Technoclone, Вена, Австрия)
Хранить при температуре 2°C–8°C
- Плазма, обедненная Высокомолекулярный кининоген (фактор Фитцджеральда)
Например, лиофилизированная (Technoclone, Вена, Австрия)
Хранить при температуре 2°C–8°C
- Стандартная плазма (например, стандартная собранная плазма, смотри Раздел 7)
- Образец внутреннего контроля качества

МЕТОД

1. Модель исследования такая же, как и для одноэтапных исследований фактора VIII, описанная в Разделе 23 (например, 3 разведенные части стандартной, 3 разведенные части тестовой плазмы).
2. Растворы, сделаны при помощи буфера Оурена.
3. Концентрация большинства растворов, подходящих для исследования, обычно выше, чем у тех, которые используются для исследований фактора VIII или IX, как описано выше.
4. Построение и анализ калибровочной кривой, а также расчет результатов тестирования описаны в разделе об одноэтапных анализах фактора VII (смотри Раздел 23).

В литературе представлен следующий стандартный диапазон:

ВМК: 0.70–1.20 Е/мл (70–120 Е/мл)

ПК: 0.70–1.20 Е/мл

На момент написания данного материала не существует международной стандартизации для ВМК и ПК.

Скрининг Ингибитора Фактора Свертываемости На Основе АЧТВ

28

ПРИНЦИП

Коагуляционные ингибиторы, влияющие на АЧТВ, могут быть немедленного действия или замедленного действия. Тестовая плазма, содержащая ингибиторы немедленного действия, при смешении с обычной плазмой будет показывать небольшую коррекцию времени свертывания, или коррекции не будет вообще. С другой стороны, ингибиторам замедленного действия требуется период инкубации с тестовой плазмой, прежде чем они могут быть выявлены.

Стандартная и тестовая плазмы находятся в инкубаторе при температуре 37°C на протяжении 1-2 часов отдельно друг от друга и в качестве смеси 50:50. АЧТВ определяется для стандартной плазмы, тестируемой плазмы и инкубационной смеси, а также для смеси, приготовленной из равных частей тестовой и стандартной плазмы после того, как они были инкубированы по отдельности (смешивать нужно немедленно). Затем сравнивается степень коррекции АЧТВ каждой смеси.

Небольшая коррекция смеси, приготовленной после раздельной инкубации, рекомендуется для ингибитора немедленного действия. Небольшая коррекция уже инкубированной смеси рекомендуется для ингибитора замедленного действия.

РЕАГЕНТЫ

- Обычная плазма, собранная от 20 доноров
- Тестовая плазма
- Реагенты для определения АЧТВ

МЕТОД

1. Приготовьте 3 пластиковые пробирки: А, В, С.
2. В пробирку А налейте 0.5 мл обычной плазмы, в пробирку В – 0.5 мл тестовой плазмы, а в пробирку С – по 0.2 мл обеих: обычной и тестовой плазмы.
3. Поместите в инкубатор на 2-3 часа при температуре 37°C.
4. Из пробирок А и В приготовьте смесь в соотношении 50:50. Для немедленного смешения используйте пробирку D.

-
5. Дважды проведите тест на АЧТВ для веществ в пробирках А, С, D, и В (именно в таком порядке).
-

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ТРАКТОВКА

Рисунок 28.1. Пример скрининга фактора свертываемости ингибитора, основанного на АЧТВ

Образец	1	2	3
А: Обычная плазма	40	40	40
В: Тестовая плазма	90	90	90
С: Тестовая + обычная (инкубируется после смешения)	45	70	70
D: Тестовая + обычная (перед смешением инкубируется отдельно друг от друга)	45	48	70

Пример 1: Плазма с врожденным дефектом, но без ингибитора.

Пример 2: Плазма, содержащая ингибитор замедленного действия.

Пример 3: Плазма, содержащая ингибитор немедленного действия.

Активность Кофактора Ристоцетина / Активность Фактора Виллебранда

29

ВСТУПЛЕНИЕ

Измерение кофактора ристоцетина является необходимым этапом для диагностики болезни фон Виллебранда (БВ). В то время как вызванная ристоцетином агрегация тромбоцитов (в обогащенной тромбоцитами плазме) может быть проведена во время ее изучения, тест не является достаточно чувствительным, и ослабленная агрегация может столкнуться с другими заболеваниями, кроме БВ. Исследование кофактора ристоцетина особенно пригодно для определения типа 2А, 2В, и 2М болезни фон Виллебранда, где активность фактора фон Виллебранда может быть нормальной или почти нормальной при значительном снижении активности фактора ристоцетина.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОФАКТОРА РИСТОЦЕТИНА

Описанный здесь метод соединяет в себе метод макроскопического исследования и технику фиксации тромбоцитов Эванса и Остена.

РЕАГЕНТЫ

- Стандартная плазма
- Неподвижные промытые тромбоциты
Обычные человеческие тромбоциты, зафиксированные формальдегидом, готовятся из концентратов тромбоцитов подобных тем, что используются при лечении пациентов с заболеваниями тромбоцитов по методу Эванса и Остена. Смотри ниже «Подготовка фиксированных тромбоцитов».
- Ристоцетин (Ристоцетин А SO₄ Макрофарм Ltd., Третий Этаж, ул. Кокспур, 27, Трафальгурская площадь, Лондон SW1Y 5BN)
100 мг порошка разводится в 3.3 мл солевого раствора, распределяется в пластиковые пробирки по 0.1 мл в каждой и храниться при температуре -70°C. Концентрация этого запаса раствора составляет 30 мг/мл.
Окончательная концентрация, необходимая для проведения исследования, составляет 1.0 мг/мл. Так как это только 1 раствор из 4, необходимых для проведения исследования, то потребуются развести 4.0 мг/мл. Для концентрации 4.0 мг/мл добавьте 0.65 мл солевого раствора на 0.1 мл запаса раствора, концентрацией 30 мг/мл. (Это должно дать дополнительное время, например, 0.2 тромбоцита+0.1 мл ристоцетина+0.1буфера > 60 секунд).

- 6 г% буфера цитрата альбумина
Используйте цитрат / солевой раствор (одна часть 0.11М 3-натрия цитрата к 5 частям обычного солевого раствора) с добавленным в него альбумином коровьей сыворотки.

МЕТОД

1. При помощи буфера цитрата альбумина разведите стандартную и тестовую плазму как указано ниже:

- Стандартная плазма: 1/2, 1/4, 1/8
 - Тестируемая плазма: 1/2, 1/4, 1/8
-

2. Протестируйте раствор при комнатной температуре следующим образом:

- i. В стеклянную пробирку для свертывания крови поместите:
 - 0.2 мл фиксированных промытых тромбоцитов (при подсчете $800 \times 10^9/\text{л}$ в растворе, приостанавливающем тромбоциты)
 - 0.1 мл разведенной плазмы
- ii. Хорошо смешайте, избегая образования пузырьков. Добавьте 0.1 мл ристоцетина (4.0 мг/мл, доведя смесь до окончательной концентрации в 1.0 мг/мл).
- iii. Засеките секундомер. На темном фоне быстро наклоните пробирку в обе стороны так, чтобы лампа светила на пробирку.
- iv. Запишите время, потребовавшееся для образования большого видимого скопления.

Протестируйте каждый раствор дважды, а если разница между ними составляет >10%, то протестируйте 3 раза.

РАСЧЕТЫ

На двойной логарифмической бумаге постройте график времени, потребовавшегося для скрепления растворов обычной плазмы в сравнении с раствором-концентрацией. Отобразите на графике время, полученное при помощи растворов тестовой плазмы. На графике должны быть две прямые параллельные линии.

Концентрация кофактора ристоцетина тестовой плазмы считывается со стандарта и корректируется для раствора и показателя стандарта способом, похожим на тот, что описан в разделе, описывающим одноэтапный анализ фактора VIII (Раздел 23).

Стандартный диапазон должен устанавливаться локально, но обычно он близок к 50–150 МЕ/дл.

29.1. Приготовление неподвижных тромбоцитов

Рисунок 29.1. Реагенты для приготовления неподвижных тромбоцитов

0.2% раствора ЭДТА	2 г двунатрия-ЭДТА, 8.5 г NaCl, дистиллированная вода до 1 литра, pH 6.4
Раствор для фиксирования	20 мл × 40% формальдегидного раствора (или 22.2 мл 36% формальдегида). 0.2 г 2-натрия-ЭДТА, 8.5 г NaCl, 0.4 фосфат двунатриевого водорода, 1.1 г дигидрат фосфата натрия дигидрогена, дистиллированная вода до 1 литра, pH 6.
Раствор для промывания	1 часть раствора цитрата тринатрия (3.8%) 5 частей солевого раствора, pH 6.4
Нейтрализатор	Раствор для промывания, но с pH 7.4
Раствор для хранения	0.2 г двунатрия-ЭДТА, 8.5 г NaCl, 0.10 г азиды натрия, дистиллированная вода до 1 литра, pH 6.4

МЕТОД

1. В декстрозе фосфата цитрата получите как можно более свежие тромбоциты (так же как использовалось для взятия продуктов крови), или в 0.109M цитрата влейте кровь и приготовьте плазму, обогащенную тромбоцитами (ОТП).
2. Оставьте ОТП в закупоренном пластиковом контейнере на 1 час при комнатной температуре, а затем еще на 1 час при температуре 37°C. Смешайте 9 частей ОТП с 1 частью раствора ЭДТА. Дайте постоять в течение 2 минут при комнатной температуре.
3. При температуре 4°C добавьте достаточный объем раствора для закрепления и оставьте на ночь при этой же температуре.
4. Центрифугируйте 280 г на протяжении 20 минут. Извлеките супернатант и вылейте остаток тромбоцитов.
5. Добавьте раствор для промывания, 2% от изначального объема ОТП, и отложите тромбоциты.
6. Далее разведите до 25% от изначального объема ОТП и оставьте на 1 час при температуре 4°C.

.....

7. Центрифугируйте 280 г на протяжении 20 минут, осушите, затем приостановите действие в нейтрализаторе для немедленного использования или в растворе для хранения при температуре 4°C и использовании позже.

.....

8. Приостановите до концентрации примерно в $800 \times 10^9/\text{л}$.

.....

Тромбоциты осядут в емкости для хранения в виде легкого осадка. Перед началом проведения исследования вылейте раствор для хранения, находящийся над тромбоцитами, и замените его раствором эквивалентного объема для приостановления действия. Таким образом, тромбоциты останутся неизменными на протяжении двух месяцев.

ССЫЛКА

Evans RJ, Austen DE. Assay of ristocetin cofactor using fixed platelets and a platelet counting technique. *Brit J Haemato* 1997; 37: 289-94.

ПРИНЦИП

Поликлональное антитело человеческого фактора фон Виллебранда (ФВ) привязано к пластиковой поверхности ячеек микротитровых плат. Растворы тестовой и стандартной плазмы добавляются и инкубируются, во время чего фактор фон Виллебранда привязывается к антителу. Добавляется второе антитело – фермент, который, в свою очередь, привязывается к ФВ. Количество привязанного антитела и впоследствии присутствующего ФВ подсчитывается прибавлением субстрата фермента, за которым следует проявление цвета.

БУФЕРЫ

- Буфер карбоната 0.05M pH 9.6
Для 1 литра: 1.59 г карбоната натрия
2.93 г натрия гидроген карбоната
0.20 g азид натрия
- Натрий-фосфатный буфер 0.01M pH 7.2
Для 1 литра: 0.345 г натрия дигидроген фосфата
2.680 г динатрия гидроген фосфата $12H_2O$.
8.474 г хлорид натрия
Фосфатно-солевой буфер-твин (PBS Твин) 20 1 мл/л
Фосфатно-солевой буфер-твин 20 0.5 мл/л
- Буфер цитрат фосфата 0.1M pH 5.0
Для 1 литра: 7.30 г лимонной кислоты
23.87 g динатрия гидроген фосфата $12H_2O$

СУБСТРАТНЫЙ РАСТВОР

80 мг 1.2 отрофенилендиамин дихлорид растворить в 15 мл буфера цитрат фосфата и 10 мл 20 частей перекиси водорода.

Примечание: Каждый раз необходимо делать свежий раствор.

ДРУГИЕ МАТЕРИАЛЫ

- Антитело анти-фактора фон Виллебранда
Например, анти человеческого фактор фон Виллебранда кролика, производитель DAKO

- Антитело антифактора фон Виллебранда, сопряженное с ферментом пероксидаза (производитель также DAKO)

Примечание: другие источники антител могут быть использованы с таким же успехом. Раствор антитела, предложенный ниже, может варьироваться в соответствии с источником и номером партии используемого антитела.

- Одноразовые микротитровальные пластины и планшет-ридеры
- 10% раствор серной кислоты

МЕТОД

1. В каждую используемую ячейку добавьте 100 μ л антитела, разведенного в буфере карбоната в пропорции 1/1000. Поместите планшет во влажной коробке в инкубатор на 1 час при комнатной температуре.
2. Промойте ячейки, наполнив их 0.5 мл/л буфер-твин, затем инверсионным раствором, затем легонько промокните *абсорбирующей* бумагой. Повторите 4 раза.
3. Приготовьте раствор стандартной плазмы (1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/80, 1/160, 1/320) и тестовой плазмы (1/20, 1/40, 1/80, 1/160 для стандартной плазмы; 1/5 для той, где ожидаются низкие результаты) в 1 мл/л буфер-твин.
4. Добавьте в ячейки по 100 μ л каждого раствора, поместите в инкубатор на 1 час, как описывалось выше, и промойте так же, как и описывалось выше.
5. В каждую ячейку добавьте 100 μ л пероксидаза DAKO, сопряженным с антителом анти-фактора Виллебранда, разведенным с 1 мл/л буфер-твина в соотношении 1/1000 и поместите в инкубатор, как описывалось выше.
6. Разведите сейчас субстрат; полностью оберните фольгой для предохранения проникновения света и продолжайте перемешивать до тех пор, пока кристаллы или таблетки не растворятся. (Добавьте перекись водорода сразу же после использования.)
7. Включите планшет-ридер.
8. Дважды промойте в 0.5 мл буфер-твин и один раз в 0.1М в буфере цитрат фосфата.
9. Добавьте в каждую ячейку 100 μ л свежего раствора субстрата и во влажной коробке поместите в инкубатор приблизительно на 6 минут при комнатной температуре (до того момента, пока цвет не проявится в растворе низшего стандарта).

.....

10. Прекратите реакцию путем добавления в каждую ячейку 100 μ л 10% раствора серной кислоты такой же дозировки, как и добавленный субстрат. При использовании мультиканальной пипетки удобно добавлять субстрат в каждый ряд ячеек последовательно с интервалом в 10 секунд, а затем добавить серную кислоту в такой же последовательности с 10-секундным интервалом.

.....

11. Оптическая концентрация читается при 492 нм.

.....

Результат достигается путем нанесения графика оптической концентрации в сравнении с раствором на двойной разграфленной бумаге. Метод нанесения графика и расчетов описан в одноэтапном исследовании фактора VIII в Разделе 23.

Связующий Анализ Коллагена Фактора Фон Виллебранда

ПРИНЦИП

Фактор фон Виллебранда (ФВ) имеет несколько функций. В дополнение к тому, что он является носителем протеина для фактора VIII в плазме, формируя комплекс, защищающий фактор VIII от протеолиза, он также действует как посредник при соединении тромбоцитов, прикрепляясь к рецепторам мембраны тромбоцитов после их активации. Он также играет важную роль в первоначальном гемостазе, действуя как посредник между тромбоцитами и суб эндотелием.

Активность фактора риститоцена (Раздел 29) – это мера связующих качеств ФВ, однако она не всегда может отражать физиологическую функцию ФВ. Измерение функциональной активности ФВ для связывания коллагена иногда может в лучшей степени отражать ее физиологическую функцию. В большинстве случаев болезни фон Виллебранда (но не во всех) присутствует схожесть результатов анализа активности фактора риститоцена с результатом анализа связи коллагена ФВ. В редких случаях болезни фон Виллебранда один из этих показателей снижен, а другой находится в пределах нормы. Полная характеристика может понадобиться для обоих анализов, хотя некоторые центры используют только одну из двух. Некоторые авторы выбирают только анализ связи коллагена ФВ в отсутствие соответствующе точного анализа активности фактора ристоцетина.

На момент написания данного материала на рынке существует множество коммерчески доступных наборов для проведения этого теста. Пример приведен ниже, но другие наборы также с успехом применяются. Включение данного конкретного метода не является одобрением использования продукции какой-либо компании. При использовании другого коммерческого продукта важно следовать инструкции производителя.

РЕАГЕНТ

Набор для проведения анализа связи коллагена ФВ по ИФА Технозим (TECHNOZYM) (Техноклон, Вена, Австрия)

Хранить при температуре 2°C–8°C, следуя инструкции производителя.

ОБРАЗЦЫ

Обычная тестовая плазма и измерители перед проведением анализа могут храниться в состоянии глубокой заморозки при температуре ниже -35°C.

МЕТОД

1. Убедитесь, что набор находится в помещении при комнатной температуре на протяжении 30 минут перед началом испытания. Набор может быть разделен на 3 или 4 части, в соответствии с количеством тестируемых экземпляров.
2. Восстановите образцы стандартной и тестовой плазмы при помощи 0.5 мл дистиллированной воды и оставьте на 15 минут, или разморозьте, если они были заморожены. Хорошо перемешайте смесь, мешая на протяжении 10 секунд.
3. Разведите тестовую, контрольную и обычную плазму 1+ 25 (например, 20 μ л плазмы и 500 μ л инкубационного буфера), затем перемешайте смесь.
4. Разделите на части и заморозьте измерители и контрольную плазму и храните их при температуре -80°C .
5. В подходящую ячейку добавьте 100 μ л раствора каждого образца, накройте пленкой и поместите в инкубатор на 45 минут при комнатной температуре ($20-25^{\circ}\text{C}$). Повторите все тесты дважды.
6. Приготовьте буфер для промывания. Разделите 1 часть концентрата буфера для промывания с 9 частями дистиллированной воды и хорошо перемешайте. Перед разведением, любой присутствующий кристалловидный осадок можно растворить путем инкубации на протяжении 10 минут при температуре 37°C .
7. По истечении 45 минут промойте 3 раза, заполнив каждую ячейку 200 μ л разведенного буфера для промывания, затем переверните и промокните абсорбирующей бумагой.
8. Приготовьте конъюгированный рабочий раствор путем разведения 1 части соединителя с 50 частями инкубационного раствора. Разведите его непосредственно перед использованием, так как он остается стабильным только в течение 60 минут. Для 8 ячеек смешайте 20 μ л соединителя с 1000 μ л буфера.
9. Добавьте 100 μ л конъюгированного рабочего раствора в каждую ячейку, закройте и инкубируйте при комнатной температуре 45 минут.
10. Промойте 3 раза при помощи 200 μ л раствора для промывания, как описывалось выше, затем переверните и промокните абсорбирующей бумагой.

.....

11. В каждую ячейку добавьте 100 μ л раствора субстрата, накройте пленкой и поместите в инкубатор на 15 минут при комнатной температуре.

.....

12. В каждую ячейку добавьте 100 μ л раствора для приостановления процесса.

.....

13. Встряхивайте на протяжении 10 секунд. При помощи подходящего микротитрового ридера измерьте оптическую насыщенность в течение 10 минут при 450 нм.

.....

14. На двойной линейной бумаге отобразите на графике (вручную или при помощи статистического комплекта) концентрацию результатов анализа связи реагента ФВ (по оси X) в сравнении с оптической насыщенностью (по оси Y).

.....

Стандартный диапазон: 0.49-1.32 МЕ/мл.

ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПРОЧТЕНИЯ

Favaloro EJ. An update on the VWF collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33:727–44.

Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FG, Keeling D, Peake IR, Pasi KJ. The diagnosis of VWD: A guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia* 2004; 10:199–217.

Связующий Анализ Фактора VIII Для Диагностирования Болезни Фон Виллебранда Тип Нормандия

32

ПРИНЦИП

Тип 2 болезни фон Виллебранда – это количественная форма болезни фон Виллебранда, влияющая на функционирование протеинов ФВ. Тип 2 Нормандия (2Н) характеризуется неестественно низкими уровнями фактора VIII:C, вызванными сниженным сходством ФВ для фактора VIII. Как следствие, объединяется меньше фактора VIII и, следовательно, существует меньше защиты от деградации / удаления, что приводит к более низким концентрациям в плазме. Мутации, ответственные за тип 2Н болезни фон Виллебранда найдены в связующей сфере фактора VIII ФВ. По фенотипу, пациенты со 2 типом болезни фон Виллебранда схожи с пациентами со средней формой гемофилии – снижение фактора VIII:C – зачастую, даже при нормальных уровнях результатов анализа связи коллагена ФВ и антигена ФВ по ИФА. Однако у пациентов со 2 типом болезни фон Виллебранда наблюдается аутомный рецессивный характер наследования.

Связующий анализ фактора VIII – это основанный на ИФА метод определения нормального объединения ФВ с фактором VIII. Моноклональное антитело используется для того, чтобы захватить ФВ, хлорид кальция используется для удаления эндогенного фактора VIII из ФВ, а известное количество рекомбинантного VIII добавляется для скрепления ФВ. Затем скрепленный фактор VIII измеряется хромогенным исследованием фактора VIII. Ниже описывается метод скрепления фактора VIII, основанный на технике, опубликованной ранее.

Данные, полученные при недавно разработанном коммерческом исследовании, были опубликованы в абстрактной форме. Это исследование близко тому, что описывается ниже на начальном аналитическом этапе. Оно утилизирует микротитровые ячейки, покрытые кроличьим антителом анти-ФВ, который скрепляет ФВ / фактор VIII разведенной плазмы пациента. После удаления эндогенного фактора VIII (пациента), добавляется рекомбинант фактора VIII, который скрепляется с ФВ пациента, в зависимости от природы молекулы ФВ пациента. Это исследование отличается от описанного ниже методом определения связанного фактора VIII: в данном коммерческом исследовании используется мышинное пероксидазное конъюгированное не человеческое антитело фактора FVIII. Сообщалось, что чувствительность данного анализа составляла 100% и его специфика то, что оно было основано на анализе 37 уже диагностированных случаев 2 типа болезни фон Виллебранда и 13 гетерозиготных источников мутации с внутренним коэффициентом вариации <10% для измерений % связи фактора VIII.

РЕАГЕНТЫ

- Моноклональное антитело MAS 533p связующего участка GPIb ФВ (Оксфордская технология, ОВТ0085, Оксфорд, Великобритания)

Хранить при температуре 4°C, следуя инструкции производителя. Другие антитела из других источников могут быть также успешно использованы.

- Концентрат VIII 2.5 Е/мл (например, Advate, производитель Бакстер фармасьютикалс).

Хранить при температуре -80°C.

Концентрат разводится в буфере HEPES из:

- 2.763 г/л кислоты HEPES
 - 2.188 г/л соли HEPES
 - 8.19 г/л NaCl
 - Добавьте 1% BSA
 - Приготовьте 100 мл, pH 7.35
- Хромогенный набор Коатест фактора VIII (Инструментальная лаборатория, Лексингтон, Массачусетс, США). Одного набора будет достаточно для двух планшетов. Соберите набор и заморозьте оставшиеся реагенты при температуре -80°C.
 - 20% уксусная кислота
 - Образцы контроля качества
Включите обычный образец и, по возможности, образец болезни фон Виллебранда тип Нормандия.

БУФЕРЫ

Буферы могут быть покрашены пищевыми красителями для того, чтобы их было легче видеть в микротитровом ридере. Для каждого анализа делайте новые буферы.

- Буфер цитрата фосфата 0.1M pH 5.0
Для 0.5 литров:
 - 3.65 г лимонной кислоты (BDH 10081)
 - 4.74 г безводного динатрия фосфата водорода (BDH 102494C)
- 10xTris буферного солевого раствора (TBS): 50mM Tris, 100mM NaCl, pH 8.0
Для 0.5 литров:
 - 30.27 г Tris (Sigma)
 - 29.22 г NaCl (Sigma)

Необходимо около 60 мл 1M HCL для pH.

- Буфер для промывания : TBS/0.1% BSA
Для 1 литра:
 - 100 мл 10 x TBS
 - 900 мл H₂O
 - 1 г коровьего альбумина (Sigma)

- Раствор для разведения плазмы: TBS/3% BSA
Для 100 мл:
 - 10 ml 10 × TBS
 - 90 ml H₂O
 - 3 г бычьего альбумина (Sigma)
- Раствор хлорида кальция 0.35M
Для 50 мл:
 - 17.5 мл 1M раствора хлорида кальция
 - 32.5 мл H₂O
- Раствор фактора VIII
Для 100 мл:
 - 100 мл буфера для промывания
 - 0.147 г хлорида кальция
 - 0.002 мл Твин 20 (Sigma P5927): окуните желтый конец в Твин и капните 1 каплю в буфер.

МЕТОД

Данное исследование проводится на протяжении 3 дней подряд. Убедитесь, что результаты исследования антигена ФВ доступны для каждого теста перед началом его исследования.

День 1 (вечер)

1. Разведите моноклональное антитело MAS 533p (Оксфордская технология) 0.1M буфера цитрата pH 5.0 до концентрации в 2.5 µg/ml (точнее 50 µl антитела в 10 мл буфера).
2. На микротитровый планшет NUNC поместите 100 µl антитела/ буферной смеси и оставьте на ночь при температуре 4°C, накрыв пленкой. Можно заполнить только 11 рядов, так что оставьте 12 ряд незаполненным.

День 2 (вечер)

3. Промойте 4 раза раствором TBS (50mM Tris, 100mM NaCl, pH 8.0), содержащим 0.1% BSA, и промокните излишнюю жидкость.
4. Добавьте 100 µl серийных растворов плазмы (~1 Е/дл антигена ФВ - 0.125 Е/дл антигена ФВ) в TBS/ 3% BSA и поместите в инкубатор во влажной коробке на ночь при температуре 4°C. Смотри ниже «Протокол разведения» и Рисунок 32.1 для расположения планшета.

Протокол разведения

- 4 раствора каждой тестовой плазмы готовятся путем двойного разведения. Начните, по меньшей мере, с 0.6 мл первого раствора.

- Каждый образец должен быть разведен таким образом, чтобы получить 1 Е/дл (0.01 Е/мл), так что антиген ФВ должен быть известен заранее до начала проведения исследования. Например, если антиген ФВ составляет 0.90 МЕ/мл, то приготовьте 1/90 стартового раствора, если антиген ФВ составляет 0.06 МЕ/мл, то приготовьте 1/6 стартового раствора.
- Для образцов пациента и контрольных образцов, в соответствии с уровнем антигена, разведите с точностью до 0.05 Е/мл (например, антиген = 0.13, разведите 1/15 и т.д.).

День 3 (начало около 9.30 утра)

5. Промойте, как описывалось ранее.
6. Для удаления эндогенного фактора VIII поместите в инкубатор дважды с 100 μ л 0.35M CaCl_2 на 1 час при комнатной температуре. Прежде чем добавить второй объем, выньте CaCl_2 . Не промывайте между сменой объемов.
7. Промойте, как показано выше.
8. Разведите 200 μ л фактора VIII на 10 мл раствора фактора VIII для получения 0.05 Е/мл фактора VIII. В каждую ячейку добавьте 100 μ л и поместите в инкубатор на 2 часа при температуре 37°C.
9. Промойте, как делалось ранее.
10. Используйте хромогенный набор Коатест SP4 фактора VIII следующим образом:
 - i. Достаньте из холодильника за 30 минут до использования для того, чтобы он согрелся.
 - ii. Смешайте реагенты в соответствии с вкладышем набора
 - Смешайте фактор IXa с фактором X в дистиллированной воде, приготовьте 2 пробирки
 - S-2765 в 12 мл дистиллированной воды
 - iii. В подходящей одноразовой пластиковой пробирке смешайте:
 - 5 частей фактора IXa с фактором X (4.12 мл) (свежеприготовленный)
 - 1 часть фосфолипида (0.83 мл)
 - 3 части 1/10 раствора буфера из набора (250 μ л буфера и 2.25 мл воды)
 - iv. В каждую ячейку добавьте по 75 μ л этой смеси, затем поместите в инкубатор на 5 минут при температуре 37°C.
11. Не выливая смесь, в каждую ячейку добавьте 25 μ л 0.025M CaCl_2 из набора. Поместите в инкубатор на 5 минут при температуре 37°C.

12. В каждую ячейку добавьте по 50 μ л S-2765 хромогенного субстрата.

13. Оставьте при температуре 37°C до проявления цвета (обычно около 20 минут) и пока оптическая насыщенность (ОН) контрольного 1.0 Е/дл не достигнет 0.8–1.0. Прочтите результаты при 405 нм (фильтр 1).

14. Остановите при помощи 50 μ л 20% уксусной кислоты (сделанной из 2 мл кристаллизованной кислоты и 8 мл воды).

15. Прочтите поглощательную способность каждого образца при помощи ридера при 405 нм (фильтр 1).

16. Зафиксируйте на графике концентрацию антигена ФВ по сравнению с поглощательной способностью скрепленного фактора VIII при 405 nm. Результаты должны быть отображены на графике и в отчетном формате (смотри «Трактовку данных» ниже).

Рисунок 32.1. Расположение 96 ячеек микротитрового планшета

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	CTL 1.0	PT2 1.0	PT4 1.0	PT6 1.0	PT8 1.0	CTL 1.0	PT2 1.0	PT4 1.0	PT6 1.0	PT8 1.0	
B	B2	CTL 0.5	PT2 0.5	PT4 0.5	PT6 0.5	PT8 0.5	CTL 0.5	PT2 0.5	PT4 0.5	PT6 0.5	PT8 0.5	
C	B3	CTL 0.25	PT2 0.25	PT4 0.25	PT6 0.25	PT8 0.25	CTL 0.25	PT2 0.25	PT4 0.25	PT6 0.25	PT8 0.25	
D	B4	CTL 0.125	PT2 0.125	PT4 0.125	PT6 0.125	PT8 0.125	CTL 0.125	PT2 0.125	PT4 0.125	PT6 0.125	PT8 0.125	
E	B5	PT1 1.0	PT3 1.0	PT5 1.0	PT7 1.0	N 1.0	PT1 1.0	PT3 1.0	PT5 1.0	PT7 1.0	N 1.0	
F	B6	PT1 0.5	PT3 0.5	PT5 0.5	PT7 0.5	N 0.5	PT1 0.5	PT3 0.5	PT5 0.5	PT7 0.5	N 0.5	
G	B7	PT1 0.25	PT3 0.25	PT5 0.25	PT7 0.25	N 0.25	PT1 0.25	PT3 0.25	PT5 0.25	PT7 0.25	N 0.25	
H	B8	PT1 0.125	PT3 0.125	PT5 0.125	PT7 0.125	N 0.125	PT1 0.125	PT3 0.125	PT5 0.125	PT7 0.125	N 0.125	

B = пустое

CTL = контрольная плазма

PT = тестовые образцы

N = известный контрольный образец болезни фон Виллебранда тип Нормандия (если имеется в наличии)

Протестируйте 8 пациентов на 1 планшете.

ТРАКТОВКА ДАННЫХ

1. Посчитайте среднюю ОН каждого пациента, контрольный образец и отрицательный контрольный образец.
2. В таблице Excel создайте новый документ и занесите туда следующие данные:
 - Столбец А – в А1: антиген ФВ Е/дл; в А2: 1.0; в А3: 0.5; в А4: 0.25; в А5: 0.125
 - Столбец В – в В1: имя пациента; В2-5 означает оптическую насыщенность растворов 4 пациентов
 - Столбец С – в С1: обычный контроль; С2-5: означает оптическую насыщенность 4 контрольных растворов
 - Столбец D – в D1: контроль Нормандия; D2-5: означает оптическую насыщенность 4 растворов RD
3. Выберите «Построение графиков с разбросанным XY» со сглаженными линиями. Выберите все 4 колонны и убедитесь, что ряды находятся в колоннах.
4. На получившемся графике назовите ось X антигеном Е/мл, а ось Y – связующим фактора VIII 405 нм. Вставьте график в качестве объекта на Листе 1.
5. Добавьте линейную разметку к линии обычного контроля и линии пациента, затем нажмите «Показать уравнение» в таблице. Это выдаст формулу для каждой линии, похожую на $y = 0.x + 0.y$. Используйте часть $0.x$ для расчета соотношения отклонение пациента/отклонение контроля.

ССЫЛКИ

Caron C, Ternisien C, Wolf M, Fressinaud E, Goudemand J, Veyradier A. An accurate and routinely adapted ELISA for Type 2N von Willebrand disease diagnosis. Abstracts of Congress of International Society for Haemostasis and Thrombosis, Boston, 2009.

Nesbitt IM, Goodeve AC, Guilliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Characterisation of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost* 1996; 75:959–64.

Анализ Мультимера Фактора Фон Виллебранда

33

ПРИНЦИП

Принцип анализа мультимера – электрофоретическое разделение мультимеров ФВ на агаровый гель додецилсульфат натрия, основанное на их молекулярном весе, за которым следует не радиоактивная визуализация с использованием конъюгированной системы антител щелочного фосфатаза. В методе Анайата производят три концентрата отдельных гелей в диапазоне от 1% до 1.8% агарозы (обычно 1.2%, 1.4%, и 1.8%) для того, чтобы определить полный диапазон мультимеров ФВ (1%) а также индивидуальную тройную структуру каждого мультимера (1.8%).

Этот метод произошел от метода Анайата (1983) и Рутгери (1981).

Рисунок 33.1. Рабочая таблица анализа мультимера фактора фон Виллебранда

ДЕНЬ/ ВРЕМЯ	Понедельник/ Вторник	Вторник/ Среда	Среда/ Четверг	Четверг/ Пятница
8 утра	За день до испытания приготовьте буферы, за исключением рабочего гель-буфера	Следите за краской маркером. Прекратите реакцию, когда она достигнет фитиля. Возможно усиление тока.		
9 утра		Сполосните гели в H ₂ O.	Сполосните гели в H ₂ O. К концу дня сполосните гели 8 раз в TBS/Твин лицевой стороной вверх	Сполосните гели в H ₂ O. К 3 часам дня сполосните гели 8 раз в TBS/Твин лицевой стороной вверх
10 утра	Подготовьте буфер рабочего геля; добавьте агароз	Высушите гели при помощи потока холодного воздуха фена*		
11 утра	Соорудите планшеты; в микроволновой печи разогрейте буфер рабочего геля			
11.30 утра	Перед тем как наливать, дайте остыть до температуры 65°C– 60°C.			

12 часов дня	Дайте гелю постоять при комнатной температуре на протяжении 30 минут, затем оставьте на 1 час при температуре 4°C.			
2 часа дня	Включите холодильник. Разведите и сбалансируйте pH электрофорезного буфера. Обрежьте фитили. Разморозьте образцы пациента и окрасьте пул в желтый цвет; приготовьте раствор соответственно			
3 часа дня	Обрежьте ячейки. Добавьте плазму пациента. Дайте поработать в течение 30 минут при 30mA (230V).	Поместите в 150 мл 5% молочного TBS геля в орбитальный миксер <i>лицевой стороной вверх</i> .		Вылейте последний раствор для промывания и налейте на гель AP раствор, <i>лицевой стороной вверх</i> .
4 часа дня	Когда достанете образцы из ячеек, заполните их рабочим гелем-буфером и уменьшите ток до 5mA (110V).			После проявления цвета (45–60 минут), прекратите реакцию несколько раз, промыв в H ₂ O. Высушите гель струей холодного воздуха.
5 часов дня		Сполосните гели в H ₂ O. Поместите гель в стеклянную емкость в 25 мл первичного антитела <i>лицевой стороной вниз</i> и оставьте на ночь	Сполосните гели в H ₂ O. Поместите гель в стеклянную емкость в 25 мл вторичного антитела <i>лицевой стороной вниз</i> и оставьте на ночь	

*Не обязательно: для ускорения процесса высыхания раздавите гели в течение 30-60 минут, затем высушите под струей горячего воздуха (например, используя обычный фен).

РЕАГЕНТЫ

Для каждого исследования готовьте свежие буферы. Все реагенты должны быть сделаны при помощи дистиллированной воды и pH-сбалансированы.

- Буфер рабочего геля: 0.4M TRIS, 0.1% додецилсульфат натрия, pH 8.8
 - 4.54 г базы Tris (SIGMA T1503)
 - 0.1 г додецилсульфат натрия (BDH 436696N)
 - 100 мл дистиллированной H₂O

В 100 мл конической фляге смешайте:

- 100 мл рабочего гель-буфера
- 1.6 г Seakem HGT (P) агарозы (Seakem 50050) **или**
- 1.8 г агарозы для тройного различия **или**
- 1.0 г агарозы для высокомолекулярного веса мультимер

Для высокомолекулярного веса мультимер используйте 1.6% и 1.8% для тройного различия.

Примечание: низкая агароза в 1.2% показывает только высокомолекулярный вес мультимера; высокая агароза в 1.8% показывает как низкий, так и высокий высокомолекулярный вес.

Этого объема будет достаточно на 2 геля.

- Электродный буфер: pH до 8.35

Концентрированный 10-кратно

- 15.15 г базы Tris
- 72.1 г глицин
- 5 г додецилсульфат натрия
- 500 мл дистиллированной H₂O

Рабочий

Добавьте 200 мл 10-кратно концентрированного буфера к 1800 мл дистиллированной H₂O; pH до 8.35.

- Образец буфера: 10мМ Tris, 1мМ EDTA, pH 8.0

10-кратно концентрированный раствор для запаса

- 1.21 г Tris/база тризма (SIGMA T1503)
- 0.07 г EDTA динатрий соли (BDH 10093)

При помощи дистиллированной воды приготовьте до 100 мл

Рабочий

Для получения рабочего раствора разведите 10-кратно концентрированный образец буфера в 100 мл дистиллированной воды в соотношении 1:10, затем добавьте:

- 4.8 г мочевины (BDH 102904W)
- 0.2 г додецилсульфат натрия (BDH 436696N) pH до 8.0
- Приготовьте солевой буфер Трис: 50мМ Tris, 150мМ NaCl, pH 7.4
 - 12.1 г базы Tris
 - 18 г NaCl
 - 2 л дистиллированной H₂O
- Блокировочный буфер
 - 20 г 5% обезжиренного молочного порошка
 - 133 мл запаса солевого буфера Трис

- Буфер для промывания
 - 500 μ л Твин 20
 - 1 л запаса солевого буфера Трис
- Первичное антитело
Не человеческое поликлональное антитело кролика ФВ (например, Dako A0082)
- Вторичное антитело
Свиное не кроличье щелочное конъюгированное антитело фосфатаза (например, Dako D0306)
- Щелочной конъюгированный набор фосфатаза (Biorad 170-6432)
- Связующий поддерживающий гель (Молекулярные приложения Biowhittaker 53750)

МЕТОД

День 1: подготовка геля и электрофореза

1. В микроволновой печи разогрейте агарозу и рабочий гель—буфер пока они не станут прозрачными, затем дайте постоять. Когда будете готовы их налить, растопите заново, дав остыть до температуры 65°C (во избежание испарения нужно закрыть сверху фольгой).
2. Налейте гель на «сэндвич», сделанный из двух стеклянных пластин (200 $\times$ 120 мм) и U-образной прокладки (15 мм шириной), находящейся сверху пластины так, как описано ниже.
3. Отрежьте кусок соединенной гелем пленки такого же размера, как и прокладка. Намочите одну из стеклянных пластин и положите сверху связующий гель так, чтобы его сторона (гидрофильная сторона) почти касалась бумаги, находящейся сверху. При помощи валика удалите все воздушные пузырьки. Положите прокладку сверху, затем положите вторую стеклянную пластину и держите клипами бульдог за верхнюю и нижнюю части. Перед тем как наливать гель убедитесь, что устройство выровнено.
4. Пока раствор геля-агарозы остывает до температуры 60°C–65°C, разогрейте оборудование для наливания геля, поместив его под струю горячей воды или воздуха из фена.
5. Перелейте агарозу в подогретый шприц и вылейте его в оборудование для наливания при помощи небольшого куска трубки иглы-бабочки.
6. Оставьте небольшое количество геля-агарозы в тестовой трубке для заполнения ячеек позже.

7. Дайте гелю постоять при комнатной температуре, по крайней мере, 30 минут, затем поместите во влажную коробку и оставьте на 1 час при температуре 4°C. Если гель не используется тут же, храните его во влажной коробке, только запечатав открытые края пленкой во избежание высыхания (гель при необходимости можно оставить на ночь).
8. Настройте резервуар для электрофореза, дав ему остыть до температуры 14°C, и приготовьте 2 литра разведенного 10% буфера для электрофореза (сбалансируйте pH после разведения). Налейте по 1 литру буферного раствора в каждую сторону резервуара.
9. Когда гель усядется, при помощи образца вырежьте сверху 11 ячеек. Увлажните пластину для электрофореза при помощи дистиллированной воды и поместите гель по центру белой/голубой пластины для остывания в резервуаре, ячейки с образцами поместите в дальний конец.
10. Отмерьте кусок бумаги- фильтра 10-15 см в длину (Ватман 3030690), сложите его, и повторите то же самое еще 2 раза. Продавите место сгиба и оторвите (обычно получается более аккуратно, чем резать ножницами), таким образом, в общей сложности у вас получится от трех до пяти слоев для каждой стороны. Отмерьте такую же длину, что и у образца с гелем и обрежьте лишнее. Намочите бумагу-фильтр буфером для электрофореза, затем положите по куску бумаги-фильтра на каждый конец геля, нахлестывая примерно 5 мм.
11. Разведите образцы пациента и окрасьте пул в желтый цвет для проведения контроля. Приготовьте 1/10 раствора буфера рабочего образца для плазмы с антигеном ФВ приблизительно 1.0 МЕ/мл, но используйте только половину, если ожидаются очень низкие результаты. Не рекомендуется использовать не разведенную плазму. (Тромбоциты ФВ обычно разводятся 1/2).
12. После использования промойте оборудование для промывания геля в горячей воде.
13. Добавьте 20 µл разведенного образца, затем в каждую ячейку добавьте по 1 µл 1% бромового голубого. Желтый пул (обычный контроль) находится в линиях 1, 6 и 11.
14. Закройте крышкой резервуар электрофореза и включите его, убедившись, что красный шнур прикреплен к красному соединению, а черный – к черному. Дайте образцам испариться из ячеек при максимальной подаче тока в течение 30-60 минут. Зафиксируйте состояние электрофореза на листе для исследования.
15. Отключите ток и заполните ячейки добавочным гелем агароз.

-
16. Включите электрофорез и дайте ему работать при постоянном напряжении в 5 мА в течение 20 часов (примерно 80 V). Если напряжение чересчур высокое, нужно настроить сопротивление фитилей (закон Ома), таким образом, добавьте фитиль к катодовому концу, пока напряжение не будет приемлемым.
-

День 2: подготовка геля для визуализации.

.....

17. К следующему утру маркер голубого бромофенола переместился к анодной стороне геля.
-
18. Когда голубой маркер находится приблизительно в 1 см от края геля, зафиксируйте параметры электрофореза, и остановите электрофорез. Вылейте гель из оборудования для электрофореза.
-
19. Вылейте оставшийся буфер, хорошо вымойте резервуар водой и осторожно вытрите оранжевые разделители вдоль металлических проводов.
-
20. Поместите гель *лицевой стороной вверх* в пластиковую емкость, наполненную дистиллированной водой и осторожно промывайте в орбитальном миксере на протяжении 1 или 2 часов. Поменяйте воду несколько раз за это время.
-
21. Осторожно выньте гели и промокните салфеткой излишки воды.
-
22. Высушите гели при помощи фена настроенного на средний режим или поместите на 1 или 2 часа между бумагой-фильтром и обычной впитывающей бумагой на стеклянный выравнивающий стол, положив сверху несколько тяжелых книг. Затем высушите феном, как описывалось выше. Один гель может высыхать более часа.
-
23. Когда гели полностью высохли (они становятся блестящими и превратились в гель-соединитель), удалите излишек связующего геля, но оставьте около 5мм у края геля.
-
24. Поместите гель *лицевой стороной вверх* в пластиковую емкость, содержащую TBS + 5% обезжиренного молока (Марвел) и поместите в инкубатор минимум на 90 минут (чем дольше – тем лучше) на медленном режиме в балансир Стюарта.
-
25. Промойте гели дистиллированной водой несколько раз.
-
26. Подготовьте раствор основного антитела анти-фактора фон Виллебранда в TBS в соотношении 1 к 2000. Используйте 12.5 μ л антитела для 25 мл TBS. Поместите разведенное антитело в емкость Pyrex с основным антителом.
-

.....

27. Промокните излишнюю воду в геле и поместите в разведенное антитело гелевой стороной вниз. Убедитесь, что между гелем и разведенным антителом нет воздушных пузырьков.

.....

28. Накройте коробку крышкой и поместите на ночь в инкубатор при комнатной температуре.

.....

День 3

.....

29. Достаньте гель из раствора основного антитела и быстро промойте несколько раз в дистиллированной воде.

.....

30. Поместите гель в пластиковую емкость лицевой стороной вверх. В орбитальном миксере промывайте его в TBS-0.05% Твине (100 мл–150 мл / раствор для промывания) минимум 8 раз в течение дня.

.....

31. Приготовьте раствор вторичного конъюгированного свиного антитела анти-фактора фон Виллебранда в соотношении 1 к 2000. Используйте 12.5 μ л антитела для 25 мл TBS. Поместите разведенное антитело в емкость Ruytex со вторичным антителом.

.....

32. Промойте гель дистиллированной водой, промокните излишки воды и поместите гель в раствор вторичного антитела гелевой стороной вниз. Убедитесь в отсутствии воздушных пузырьков между гелем и разведенным антителом.

.....

33. Накройте коробку крышкой и поместите на ночь в инкубатор при комнатной температуре.

.....

День 4: визуализация мультимеров

.....

34. Достаньте гель из раствора вторичного антитела и промойте несколько раз в дистиллированной воде.

.....

35. Поместите гель в пластиковую емкость лицевой стороной вверх. В орбитальном миксере промывайте гель в TBS-0.05% Твине (100мл-150мл / раствора для промывания) минимум 8 раз в течение дня.

.....

36. Во время последнего промывания (около 3 часов дня) приготовьте 20 мл плазмы рабочего субстрата из 25 х щелочной фосфатазы набора проявления цвета (H102). Для каждого геля разведите 800 μ л 25 х щелочной фосфатазы в 20 мл воды. Затем добавьте в буфер 200 μ л раствора А и 200 μ л раствора В и хорошо перемешайте.

.....

37. Достаньте гель из емкости для промывания и вытрите излишнюю влагу.

.....

.....

38. Поместите гель в емкость для проявления Ругех лицевой стороной вверх и поверх геля налейте подготовленный субстрат.

.....

39. Осторожно потрясите в соответствующей емкости, пока реакция не завершится и мультимеровые связи не проявятся. Это может занять до 45 минут.

.....

40. По завершению реакции вылейте субстрат и промойте гель дистиллированной водой минимум 2 раза, встряхивая их на протяжении 30-60 минут для того, чтобы остановить реакцию.

.....

41. Промокните излишнюю влагу с геля и высушите феном, как описывалось выше.

.....

42. Гель может быть просканирован и храниться в электронном виде, и при необходимости подсчитан при помощи денситометрии.

.....

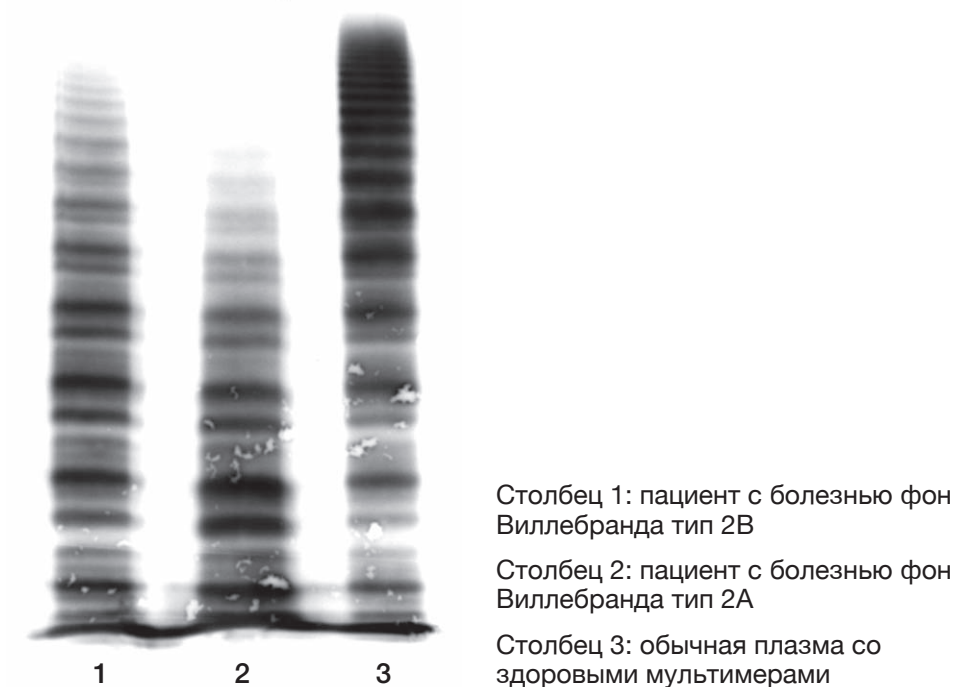
Достигнутые результаты могут быть зафиксированы, как изображено на Рисунке 33.2 ниже, в соответствии с наблюдаемым рисунком мультимеров на геле.

Рисунок 33.2. Интерпретация рисунка мультимера

Рисунок мультимера	Интерпретация
Присутствуют все молекулярные весовые мультимеры	Качественно обычный рисунок
Преувеличенная низкомолекулярная тройная фармация	Снижение высокомолекулярного метакрилата
Значительное снижение высокомолекулярных мультимеров	Небольшое увеличение высокомолекулярного метакрилата
Повышение первой высокомолекулярной связи	Небольшое снижение высокомолекулярного метакрилата
Мультимеры не видимы	Мультимеры не определены

Рисунок 33.3. Пример геля мультимера

Примечание: наиболее высокомолекулярные весовые формы ФВ находятся наверху столбца.



ССЫЛКИ

Enayat MS, Hill FG. Analysis of the complexity of the multimeric structure of FVIII related antigen/von Willebrand protein using a modified electrophoretic technique. *J Clin Pathol* 1983; 36:915–9.

Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Classification of variant VWD subtypes by analysis of functional characteristics and multimeric composition of FVIII/von Willebrand factor. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370:205–9.

ПРИНЦИП

Ингибиторы, получающиеся в результате лечения людей, больных гемофилией, терапией фактора VIII, зависят от времени.

Если фактор VIII добавляется в плазму, содержащую ингибитор, и эта смесь помещается в инкубатор, то фактор VIII будет постепенно нейтрализоваться. Если количество фактора VIII и инкубационный период стандартны, то сила ингибитора может определяться в единицах, согласно тому, сколько из добавленного фактора VIII было нейтрализовано.

Исследование может быть проведено с использованием человеческого или свиного фактора VIII.

Подозрение на наличие ингибитора может идти от сниженного периода полураспада и восстановления фактора VIII.

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕФЕЗДА

Источником фактора VIII является обычная собранная плазма для анти-человеческих титров; свиной концентрат, разведенный в плазме, недостающей фактора VIII, для анти-свиных титров.

Единица Бефезды определяется как количество ингибитора, нейтрализующее 50% одной единицы добавленного фактора VIII, в течение 2 часов при температуре 37°C.

Пациенты, у которых не ожидается наличие ингибитора:

1. Добавьте равные (0.2 мл) части плазмы пациента и обычной собранной плазмы.
2. Для контроля к 0.2 мл обычной собранной плазмы добавьте 0.2 мл 0% фактора VIII:C.
3. Поместите в инкубатор на 2 часа при температуре 37°C. Затем проведите исследование фактора VIII:C.

Пациенты, у которых ожидается наличие ингибитора:

1. Подготовьте растворы, используя буфер для исследований фактора VIII плазмы пациента. Лучше приготовить слишком много растворов, чем

недостаточное их количество. После двухчасового пребывания в инкубаторе их можно всегда поместить в лед для вторичных анализов. Если предыдущая информация об ожидаемых инкубационных титрах доступна, то растворы для тестирования должны находиться по каждую сторону от этого.

2. Стандартное количество фактора VIII в виде обычной собранной плазмы добавляется в каждый раствор разведенной плазмы – обычно эта смесь содержит около 100 Е/дл. Таким образом, у каждой инкубационной смеси начальная концентрация составляет примерно 50 Е/дл. Точная концентрация не так важна, так как тот же самый источник добавляется во все инкубационные смеси.
3. В исследовании фактора VIII, проводимом после двухчасового инкубационного периода, контрольная смесь обычной плазмы и плазма, обедненная фактором VIII, используются в качестве стандартного образца, и концентрация фактора VIII других смесей высчитывается по сравнению с этим. В исследовании этот материал используется как 100% эталон.

Важно буферизировать обычную плазму путем добавления 0.1М имидазола рН 7.4 в недавно описанной модификации Неймегена, или используя буферизированную собранную обычную плазму, как описано в Разделе 7. Это улучшит чувствительность и специфичность исследования. Для анти-свиных титров свиная плазма не всегда доступна для использования. Таким образом, приемлемо использование свиного концентрата, разведенного в 1Е/мл плазме, обедненной фактором VIII.

4. По окончании инкубационного периода измеряется оставшийся уровень фактора VIII и ингибитор рассчитывается по шкале сравнения оставшегося фактора VIII и единиц ингибитора. (Смотрите ниже рисунок 34.1.)

РЕАГЕНТЫ / ОБОРУДОВАНИЕ

- Буфер глиоксаля (смотри Раздел 9)
- Солевой буфер Оурена (смотри Раздел 9)
- Обычный пул с плазмой (смотри Раздел 7)
Примечание: он должен быть буферизирован для улучшения стабильности фактора VIII во время двухчасового инкубационного периода по ходу исследования.
- Свиной концентрат
- Плазма, обедненная фактором VIII
- Реагент АЧТВ
- Ванночка со льдом
- Пластиковые пробирки (75 × 12мм)

МЕТОД

Человеческий анти-фактор VIII

1. В пластиковых пробирках объемом 0.2 мл подготовьте дублирующие растворы тестовой плазмы, используя буфер глиоксаля в качестве растворителя. Растворы, необходимые для каждого пациента, будут варьироваться. Предполагаемой начальной точкой будут растворы в соотношении 1/2, 1/4 и т.д. к неразведенным растворам.

Примечание: если у пациента уже проводилось исследование ингибитора, конкретный его уровень может примерно определить какой раствор нужно использовать. Также полезно знать проводилось ли в недавнем времени какое-либо лечение фактором VIII, так как это может повысить либо понизить уровень ингибитора.

2. При помощи пипетки налейте 0.2 мл обедненной фактом VIII плазмы в другую пластиковую пробирку. Это послужит стандартом.
3. Добавьте по 0.2 мл вещества, взятого из пула с обычной плазмой, в обе пробирки: с раствором стандартной и тестовой плазмы. Уровень фактора VIII во всех пробирках будет примерно 50 Е/мл. По окончании инкубационного периода это будет приниматься за 100% в анализе фактора VIII.
4. Закройте крышкой, смешайте и поместите в инкубатор на 2 часа при температуре 37°C.
5. По истечению 2 часов переместите все пробирки в ванночку со льдом, если только анализ фактора VIII не проводится сразу же.
6. Проведите исследование фактора VIII во всех инкубационных смесях обычным методом исследования фактора VIII, но используя пробирки в качестве стандарта в 100%. Подходящим раствором для проведения исследования фактора VIII будут 1/5, 1/10, 1/20.
7. Считайте остаток фактора VIII каждой тестовой смеси, взяв контроль за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ / ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Для подсчета ингибитора был выбран раствор тестовой плазмы, остаток фактора VIII в котором около 50%, но может варьироваться от 30% до 60%. Или же, можно подсчитать результат каждого раствора и вывести средний показатель. Любые результаты фактора VIII <25% или >75% не должны использоваться для подсчета уровня ингибитора.

График может быть составлен на двойной логарифмической бумаге на основе % остаточного фактора VIII и единиц ингибитора, следуя определению единицам ингибитора (смотри Рисунок 34.1).

Считайте уровень ингибитора в соответствии с остатком фактора VIII для каждой тестируемой смеси и скорректируйте его для раствора. Например:

1/4 раствора + стандартный пул

Остаток фактора VIII = 50%

Уровень ингибитора (из таблицы) = 1 ЕБ

Умножить на фактор разведения (1/4) = 4 ЕБ

ПРИМЕЧАНИЯ

- Количественные анализы ингибиторов часто проводятся на тестовой плазме пациентов с тяжелой формой гемофилии, поэтому содержащих немного измеряемого фактора VIII:С или не содержащих его вообще. Если в тестовой плазме содержится более 5 Е/дл фактора VIII, то это нужно учитывать при расчете титров ингибитора.

Это может быть сделано тремя способами:

- Первое – это добавление дополнительного фактора в контрольную смесь, а не в тестовую, для компенсации фактора VIII в тестовой смеси. Например, если тестовая плазма содержит 20 Е/дл фактора VIII, то контрольная смесь будет сделана из 120 μ л обычной плазмы и 80 μ л 0% фактора VIII. (Обе тестовая и контрольная смеси тогда содержат примерно 60 Е/дл фактора VIII на начале инкубационной фазы.) Этот подход может быть использован только если плазма пациента тестируется в неразведенном виде, а не после того, как ее развели, что бы изменило первоначальную концентрацию фактора VIII.
- Альтернативно, во время расчета первоначальный уровень фактора VIII в тестируемой плазме может приниматься во внимание. В этом случае тестируемые смеси создаются обычным способом.
- Другим способом является нагревание плазмы до 58°C в течение 90 минут перед началом анализа, что разрушит все факторы свертываемости, включая фактор VIII. Так как иммуноглобулин теплоустойчив, то титры ингибитора не будут затронуты этой процедурой.
- Плазма, обедненная фактором VIII, используемая в создании контрольной смеси, довольно важна. Такая плазма должна содержать стандартные уровни фактора фон Виллебранда, так как было показано, что титры ингибитора на 30%–50% ниже, если плазма, обедненная фактором VIII, не содержит фактор фон Виллебранда.

Пример 1: пациент с 20 Е/дл фактора VIII

Обычная контрольная собранная плазма + 0% фактор VIII

- a. Обычная собранная плазма + неразведенная тестовая плазма – первоначальный фактор VIII = 120%
- b. Обычная собранная плазма + тестовая плазма, разведенная 1 к 2 – первоначальный фактор VIII = 110%

После 2-часового инкубационного периода производятся анализы фактора.

- a. Обычная собранная плазма + неразведенная тестовая плазма – фактор VIII = 120% контроля
Остаток фактора VIII: $120/120 = 100\%$; результат ингибитора – негативный.
- b. Обычная собранная плазма + тестовая плазма, разведенная 1 к 2 – фактор VIII = 110% контроля
Остаток фактора VIII: $110/110 = 100\%$; результат ингибитора – негативный.

Пример 2: пациент с 20 Е/дл фактора VIII (ингибитор присутствует)

Плазма пациента тестируется неразведенной

Обычная собранная плазма + неразведенная тестовая плазма – первоначальный фактор VIII – 120% контроля

После двухчасового инкубационного периода проводится анализ фактора VIII.

Обычная собранная плазма + неразведенная тестовая плазма – фактор VIII = 90% контроля

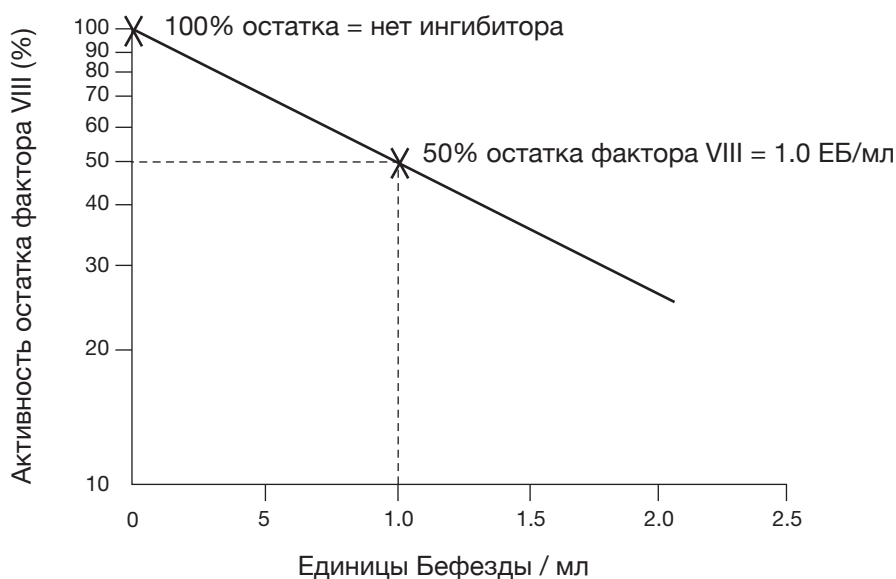
Остаток фактора VIII = $90/120 = 75\%$

Свиной анти-фактор VIII

Метод, используемый для свиных ингибиторов фактора VIII по сути тот же самый, что используется для человеческих ингибиторов, за исключением источника фактора VIII, который должен быть свиным. Однако на сегодняшний день надежные источники плазмы свиного фактора VIII не так легко доступны. Таким образом, используется свиной концентрат, разведенный в гемофилической плазме до концентрации 1 Е / мл.

Примечание: если остаток фактора VIII находится между 80% и 100% для образца, который содержался в инкубаторе неразведенным совместно со свиным концентратом, то это трактуется таким образом, что ингибитора в наличие не имеется. Хотя полученный из плазмы свиной фактор VIII в данный момент не используется, в момент написания данного материала разрабатывается концентрат рекомбинантного свиного фактора VIII.

Рисунок 34.1. Взаимосвязь между остатком фактора VIII и титром ингибитора



ССЫЛКИ

Kasper C, Aledort L, Counts R, Edron J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Laserson J, Levine P, MacMillan C, Pool J, Shapiro S, Shulman N, Eys J. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34:869–872.

Verbruggen B, Giles A, Samis J, Verbeek K, Meninsk E, Novakova I. The type of FVIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assays for factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2001; 86:1435–1439.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda Assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73:247–251. (for the Nijmegen modification)

ПРИНЦИП

Ингибиторы фактора IX показывают другую динамику, чем ингибиторы фактора VIII:C, в котором реакция антигена/антитела завершается гораздо быстрее. Исследование основывается на инкубации плазмы пациентов с равными частями источника фактора IX на протяжении 10 минут при температуре 37°C, затем происходит анализ фактора IX.

Одной единицей ингибитора считается та, что за 10 минут при температуре 37°C на 50% разрушает активность фактора IX.

РЕАГЕНТЫ

- Такие же, какие используются при исследовании фактора IX (смотри Раздел 23)
- Обычная собранная плазма как источник фактора IX (некоторая собранная плазма, какая используется для анализа ингибитора фактора VIII)

МЕТОД

Если есть подозрения на наличие ингибитора, то следует использовать подходящие растворы плазмы пациента. В противном случае для скрининга ингибитора следует использовать неразведенную плазму.

1. При помощи пластиковых пробирок размером 75 × 12 мм:
 - Тест: к 0.2 мл обычной собранной плазмы добавьте 0.2 мл плазмы пациента (или раствора).
 - Контроль: к 0.2 мл обычной собранной плазмы добавьте 0.2 мл 0% фактора IX.
2. Контроль: используя контрольную смесь в качестве образца, по истечении 10 минут проведите исследование фактора IX (как в исследовании ингибитора фактора VIII).

РАСЧЕТЫ

Определите результаты как процент остатка контроля. Единицы ингибитора рассчитываются так же как ингибитор фактора VIII:C в методе Бефезда, описанной в Разделе 34.

ПРИНЦИП

Поверхность микротитрового планшета покрывается фибриногеном. Специальный блокирующий агент предотвращает не специфичное соединение. Фактор XIII активируется в образце тромбином и ионами кальция. На стадии инкорпорирования фактор XIIIа тестовой плазмы объединяется с субстратом БАПА (5- биотинамидо-пептиламин) в субстрат фибриногена фактора XIII, который покрывает поверхность планшета при наличии кальция. Количество инкорпорированного БАПА пропорционально активности фактора XIII тестового образца. Следующим шагом, конъюгированная стрептавидин-щелочная фосфатаза скрепляется с БАПА. Щелочная фосфатаза трансформирует синтетический субстрат п-НФФ (п-нитрофенилфосфат) в фосфат и п-нитрофенол, который может измеряться при 405 нм.

Реагенты для описанного ниже метода коммерчески доступны в наборе (Набор Пефа для инкорпорированного исследования фактора XIII, Пентафарм, Швейцария). Следует заметить, что другие исследования активности доступны у других производителей, использующих различные принципы анализа, включая набор Берихром (Дадэ Беринг, Марбург, Германия).

РЕАГЕНТЫ

Все необходимые реагенты доступны в коммерческих наборах.

МЕТОД

День 1

1. Дайте всем компонентам набора достигнуть комнатной температуры в течение 30 минут.
2. Восстановите покрывающий реагент (P2) при помощи дистиллированной воды в соответствии с объемом, рекомендованным производителем.
3. В каждую ячейку добавьте по 100 μ л покрывающего реагента для того, чтобы опустошить полоски микротитрового планшета.
4. Заморозьте излишки покрывающего реагента для последующего использования. Он остается неизменным в течение 6 месяцев, если храниться при температуре -20°C .

-
5. Запечатайте полоски пластиковой запайкой из набора и поместите на ночь в инкубатор (14-16 часов) при температуре 20°C–25°C.
-

День 2

.....

6. При необходимости разведите 20 х концентрированного буферного солевого раствора Трис: 50 мл в 950 мл дистиллированной воды, или меньше.
-
7. Разведите 3 мл блокирующего реагента Р3 с 27 мл разведенного буферного солевого раствора Трис. Заморозьте излишки Р3.
-
8. Вылейте покрывающий реагент из микротитрового планшета, переверните и промокните бумажной салфеткой для того, чтобы удалить остатки.
-
9. В каждую ячейку добавьте 300 µл разведенного блокирующего реагента.
-
10. Поместите в инкубатор на 1-1.5 часа при температуре 37°C.
-
11. Восстановите калибратор Р10 в 0.5 мл дистиллированной воды и три контрольных вещества: Р11, Р12 и Р13, в 0.2 мл дистиллированной воды.
-
12. Перед исследованием дайте замороженной тестовой плазме растаять в течение 5 минут при температуре 37°C.
-
13. Подготовьте контейнер с несколькими сотнями мл смеси льда и воды в качестве ледяной ванночки.
-
14. Приготовьте растворы всех тестовых и контрольных плазм, 10 µл плазмы и 1 мл разведенного буферного солевого раствора Трис (соотношение 1:101). Хорошо перемешайте.
-

15. Приготовьте калибровочные растворы следующим образом:
- Cal 1: 30 µл Р10 + 970 µл буферного солевого раствора Трис
 - Cal 2: 20 µл Р10 + 980 µл буферного солевого раствора Трис
 - Cal 3: 75 µл Р10 + 25 µл буферного солевого раствора Трис
 - Cal 4: 25 µл Р10 + 75 µл буферного солевого раствора Трис
 - Cal 5: 10 µл Р10 + 90 µл буферного солевого раствора Трис

Примечание: растворы 1 и 2 готовы к использованию. Далее в 1 мл буферного солевого раствора разведите 10 µл растворов калибратора 3-5

.....

16. Промойте планшет 3 раза при помощи 300 µл буферного солевого раствора на каждую ячейку. Переверните и промокните салфеткой для удаления излишней влаги.
-

17. Восстановите каждую часть А и часть Б (Р4 и Р5) реагента активатора в 5 мл дистиллированной воды. Держите в ванночке со льдом/водой не дольше 30 минут.
18. В соответствующие ячейки добавьте по 25 μ л калибровочной, контрольной и тестовой плазмы. Оставьте пустую ячейку с буферным солевым раствором.
19. Смешайте А и часть Б (Р4 и Р5) реагента активатора для того, чтобы образовать окончательный инкорпорирующий реагент.
20. В каждую ячейку добавьте по 75 μ л конечного инкорпорирующего агента, включая пустую ячейку.
21. Поместите в инкубатор на 30 минут при температуре 37°C.
22. В каждую ячейку добавьте по 200 μ л инкорпорирующего останавливающего раствора Р6. Осторожно перемешивайте на планшетном шейкере в течение 10 минут.
23. Восстановите реагент-проявитель Р7 путем добавления 12 мл дистиллированной воды. Заморозьте оставшийся разведенный Р7.
24. Промойте планшет **4 раза**, добавив по 300 μ л буферного солевого раствора в каждую ячейку. Легонько постучите, чтобы удалить лишнюю влагу.
25. В каждую ячейку добавьте по 100 μ л реагента-проявителя Р7. Поместите в инкубатор на 15 минут при температуре 37°C.
26. Промойте планшет **4 раза**, добавив по 300 μ л буферного солевого раствора в каждую ячейку. Легонько постучите, чтобы удалить лишнюю влагу.
27. Приготовьте субстратный раствор только перед использованием:
- Для 96 ячеек (полный планшет), добавьте 9 таблеток Р8b к 22.5 мл буфера диэтаноламина Р8a
 - Для 64 ячеек (8 полосок), добавьте 6 таблеток к 15 мл диэтаноламина
 - Для 32 ячеек (4 полоски), добавьте 3 таблетки к 7.5 мл диэтаноламина
 - Для 24 ячеек (3 полоски), добавьте 2 таблетки к 5 мл диэтаноламина
28. В каждую ячейку добавьте по 180 μ л субстратного раствора. Поместите в инкубатор на 11 минут при температуре 37°C.
29. В каждую ячейку добавьте по 50 μ л останавливающего раствора Р9 (4М NaOH).

.....

30. Считайте оптическую насыщенность в течение 15 минут на микропланшетном ридере при 405 нм.

.....

Примечание: некоторые реагенты набора могут храниться в глубокой заморозке для использования позже, как описывалось позже. Однако, субстрат, части А и Б реагента активатора, калибраторы и контрольная плазма не должны замораживаться. Наборы с частичными реагентами, содержащие подобные материалы, могут быть приобретены для использования с любым уже частично использованным реагентом, хранящимся в глубокой заморозке. Это уменьшает стоимость теста, если проводится анализ образцов небольших партий.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растворы калибратора и величины контроля предоставляются в каждом наборе.

При помощи подходящего программного обеспечения, хранящего данные, или логарифмической бумаги постройте калибровочную кривую путем нанесения значений концентрации в сравнении с оптической насыщенностью калибровочных растворов после вычета оптической насыщенности из бланка. Используйте двойной линейный масштаб. Из оптической насыщенности тестового образца / контрольных растворов вычитите пустую оптическую насыщенность и, при помощи калибровочной кривой, конвертируйте оптическую насыщенность в активность фактора XIII.

ВВЕДЕНИЕ

Для лабораторий проводящих исследования пациентов с возможными заболеваниями крови важна возможность выявлять наличие антител, продлевающих лабораторные тесты, такие как АЧТВ.

Одна из групп антител, которая может вызвать значительную пролонгацию АЧТВ, - это гетерогенная группа в собирательном значении именуемая анти-фосфолипидными антителами (АФТ), иногда в литературе ее еще называют волчаночным антикоагулянтом (ВА). Сейчас ясно, что так называемые анти-фосфолипидные антитела являются гетерогенной семьей антител реагирующих эпитопами на протеины, которые сами являются комплексом негативно заряженных фосфолипидов. Большинству таких антител нужен бета-2-гликопротеин 1, протеин, соединяющий фосфолипиды. Другие же могут быть направлены на протромбин.

Важно заметить, что подобные антитела могут препятствовать реакциям коагуляции в лаборатории, продлевая тесты, зависящие от фосфолипидов, такие как АЧТВ и, в некоторых случаях, ПВ, однако они не ассоциируются с кровотечением за исключением некоторых редких случаев, где наблюдается значительная нехватка протромбина. Парадоксально, но подобные антитела очевидно объединяются с венозным и артериальным тромбозом не до конца понятными механизмами.

В центрах, диагностирующих заболевания крови, при исследовании пациентов с пролонгированным АЧТВ, необходимо суметь выявить такие антитела при помощи специальных тестов. Было опубликовано несколько методических документов и рецензий результатов использования различных методов, которые проверяли выявление лабораторией волчаночного антикоагулянта.

Важно осознавать, что у различных методов АЧТВ зачастую нет чувствительности для выявления присутствия подобных антител, и гетерогенная природа этой группы привела к такому выводу, что для подтверждения присутствия антикоагулянтов волчаночного типа необходимо проведение более чем одного теста.

Критерии для наличия волчаночного антикоагулянта следующие:

1. Пролонгация фосфолипидного теста, зависящего от фосфолипидов.
2. Подтверждение ингибитора, продемонстрированного смешанными изучениями.
3. Подтверждение зависящей от фосфолипидов природы ингибиторов.
4. Нехватка специального ингибитора одного коагуляционного фактора (таких как факторы VIII:C, IX:C, или XI).

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Важно убедиться, что количество оставшихся тромбоцитов в тестовой плазме находится на минимуме, особенно, если плазма заморожена и размораживается только перед анализом. Одним из способов минимизировать количество тромбоцитов является фильтрация центрифугированной плазмы (готовиться как для других тестов свертываемости) при помощи фильтра 0.22-м. Альтернативно, плазму можно центрифугировать дважды, так, как описано в Разделе 4. Цель – снизить количество тромбоцитов в анализируемой плазме до $<10 \times 10^9/\text{л}$. Так как фильтрация может повлиять на другие исследования коагуляции и может быть достаточно затратной, предпочтительным методом является удаление обедненной тромбоцитами плазмы из клеток после первого центрифугирования (минимум 1700г на протяжении минимум 10 минут), а затем центрифугировать вторичный контейнер с плазмой повторно при таких же условиях. После второго центрифугирования плазма осторожно удаляется, оставляя неповрежденным нижний слой, так как в нем содержится большинство тех добавочных тромбоцитов, которые не были удалены после первого центрифугирования. Плазма, подготовленная путем двойного центрифугирования, таким образом будет содержать оставшееся количество тромбоцитов ниже $10 \times 10^9/\text{л}$ и подходит для глубокой заморозки перед проведением анализа на наличие волчаночного антикоагулянта. Данные комментарии подходят для подготовки как контрольных так и тестовых плазм.

СМЕШАННЫЕ ИЗУЧЕНИЯ

Детали смешанного изучения, направленные на выявление возможного присутствия ингибитора, даны в Разделе 14.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФТ И ВА.

Имеется все увеличивающееся количество специальных тестов на наличие волчаночного антикоагулянта, включая тест на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела и тест на продолжительность свертывания каолина, который также называется тестом Экснера. Использовались и другие специальные тесты, основанные на яде змей, такие как время Текстарина и продолжительность свертывания крови с применением яда змеи тайпан, а также разведенное тромбопластиновое время.

Даже, когда применяются относительно специфические тесты, такие, как тест на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела и другие, важно подтвердить зависящую от фосфолипидов природу ингибитора при помощи повторного теста.

Метод приведен ниже для теста на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела, для которого аномальные результаты более специфичны, чем АЧТВ для наличия ати-фосфолипидных антител.

Недавняя публикация руководства Международного Сообщества Тромбоза и Гемофилии рекомендует использование двух зависящих от фосфолипидов тестов – это теста на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела и АЧТВ, и в случае обнаружения отклонений, тест нужно повторить при наличии повышенного количества фосфолипидов. В руководстве подчеркивается, что использование промытых тромбоцитов в качестве источника дополнительных фосфолипидов может быть проблематичным ввиду нехватки стандартизации и возможности межгруппового различия между приготовлениями. Для центров, желающих продолжать использовать этот подход, мы включили в это руководство метод подготовки промытых тромбоцитов. Документ Международного Сообщества Тромбоза и Гемофилии не рекомендует использование разведенного тромбопластинового времени или некоторые менее хорошо охарактеризованные исследования, основанные на применении яда змей.

ССЫЛКИ

Brandt JT, Triplett DA, Alung B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Anti-phospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1184–1190.

Lupus Anticoagulant Working Party. Guidelines on testing for the lupus anticoagulant. *J Clin Pathol* 1991; 44:885–889.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Thromb Haemost* 2009; 7:1737–40.

тест на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела

ПРИНЦИП

Яд гадюки Рассела (ЯГР) содержит фермент, который напрямую активизирует фактор X, который затем в присутствии фосфолипидов активизирует протромбин, ионы кальция и фактор V. Разведенный яд и фосфолипиды делают тест особенно чувствительным к наличию волчаночного антикоагулянта и антифосфолипидных антител. Пролонгация теста на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела может быть вызвана ингибиторами фосфолипидов, но также может быть вызвана нехваткой аномальности факторов II, V, X, или фибриногена. Если результаты пролонгированы по сравнению с локально установленным стандартным диапазоном, тест с применением яда гадюки Рассела следует повторить с использованием промытых замороженных / растаявших раздробленных тромбоцитов взамен фосфолипидов. Коррекция аномальных результатов, когда тромбоциты заменяют фосфолипиды, указывает на наличие анти-фосфолипидных антител.

РЕАГЕНТЫ

- Имидазол (буфер глиоксаля) - 0.05M pH 7.3
 - 3.4 г имидазола
 - 5.85 г хлорида натрия
- 1. Растворите в 800 мл дистиллированной воды.
- 2. Отрегулируйте pH до 7.3 при помощи 1M HCL.
- 3. Доведите объем до 1 литра при помощи дистиллированной воды.
- Яд гадюки Рассела (Диагностирующие реагенты, ул. Хиннор, Тэйм, Великобритания)
 - 1. В 2 мл дистиллированной воды добавьте 0.2 мг яда для получения 0.1 мг/мл.
 - 2. Заморозьте при температуре -35°C или ниже объемом по 20 μ л.
 - 3. Перед использованием дайте растаять а затем разведите в буфере имидазола в соотношении примерно 1 к 500 (10 μ л в 5мл) для того, чтобы получить разведенный яд.
- Фосфолипид (ФЛ; Диаген Бэлл и заменитель тромбоцитов Алтен Диагностирующие реагенты, ул. Хиннор, Тэйм, Великобритания)
Восстановите при помощи дистиллированной воды следуя инструкции производителя.

- 25 мМ раствора хлорида кальция
- Промытые замороженные/оттаявшие лизированные тромбоциты
Обычные человеческие тромбоциты промываются и лизируются путем заморозки/размораживания фосфолипида прокоагулянта. Полный метод описан в конце этого раздела (смотри «Подготовка промытых тромбоцитов для проведения теста на продолжительность свертывания крови с применением разбавленного яда гадюки Рассела»)
- Обычная собранная плазма
Плазма должна быть подготовлена с осторожностью для того, чтобы убедиться в том, что присутствует минимальное количество оставшихся тромбоцитов, как и описывалось выше в разделе о подготовке образцов. Возможно удобно использовать обычную собранную плазму, как описано в Разделе 7, при условии, что перед глубокой заморозкой она была центрифугирована **дважды**.

МЕТОД

1. В стеклянную пробирку для тестирования при температуре 37°C добавьте 0.1 мл обычной собранной плазмы.
2. Подогрейте до температуры 37°C в течение 1-2 минут.
3. Добавьте 0.1 мл разведенного яда гадюки Рассела (комнатной температуры). Перемешайте и оставьте ровно на 30 секунд при температуре 37°C.
4. Добавьте 0.1 мл подогретого 25 мМ хлорида кальция. Смешайте и засекайте секундомер.
5. Зафиксируйте образование сгустка. Повторите все тесты дважды.
Время сворачивания обычной собранной плазмы должно составлять 30-35 секунд. Если время <30 секунд, разводите яд далее добавляя буфер имидазола. Если время >35, добавьте еще раствор яда. Повторяйте тест на обычной собранной плазме, пока не достигните времени в 30-35 секунд.
6. Приготовьте смесь из 1/8 фосфолипида (ФЛ) и солевого раствора, например, смешав 0.1 мл ФЛ и 0.7 мл солевого раствора.
7. Повторите шаги 1-5, заменив чистый фосфолипид раствором из 1/8 тромбоцитов.
Если время сворачивания (до этого 30-35 секунд) увеличилось до 35-40 секунд, это указывает на то, что концентрации фосфолипидов разведены

достаточно для того, чтобы сделать тест чувствительным к антителам, в частности к фосфолипидам.

Если время сворачивания превышает 40 секунд, повторите шаги 1-5, разведя ФЛ в соотношении 1 к 4. Если время сворачивания остается 30-35 секунд, повторите шаги 1-5, разведя ФЛ в соотношении 1 к 16. Если время сворачивания 35-40 секунд, переходите к следующему шагу.

8. При помощи раствора яда гадюки Рассела (показатель свертываемости которого 30-35 секунд с чистым ФЛ и обычной собранной плазмой) и раствором фосфолипидов, показывающим время свертываемости в 35-40 секунд, повторите шаги 1-5, заменив плазму пациента обычной плазмой.
9. Подсчитайте диапазон времени теста на свертываемость с использованием яда гадюки Рассела для плазмы пациента в сравнении с тем же тестом обычной собранной плазмы для того, чтобы вычислить соотношение этого теста.
10. Повторите шаги 1-5 при помощи обычной плазмы и еще раз с использованием тестовой плазмы, но используя промытые замороженные/оттаявшие лизированные тромбоциты вместо ФЛ. Это процедура нейтрализации тромбоцитов (ПНТ). На шаге 2, смесь помещается в инкубатор на 10 минут. Коэффициент тестовой и обычной собранной плазмы высчитывается для ПНТ.

ТРАКТОВКА

Нормальный диапазон теста на продолжительность свертывания крови с применением яда гадюки Рассела должен устанавливаться локально при помощи плазмы обычных субъектов, так, как описано в Разделе 8. Нормальным диапазоном (нормальным считается стандартное отклонение ± 2) коэффициентов данного теста с ФЛ обычно считается 0.90–1.10. Пролонгированный коэффициент теста указывает на нехватку факторов II, V, X или фибриногена или же не возможное присутствие анти-фосфолипидных антител.

Коэффициент теста на свертываемость крови с применением яда гадюки Рассела, продленный фосфолипидами, но уменьшающийся или изменяющийся при коэффициенте ПНТ, указывает на анти-фосфолипидные антитела.

Следует заметить, что упомянутая выше нехватка факторов свертываемости будет ассоциироваться с пролонгированными коэффициентами как в тесте с фосфолипидами, так и в ПНТ.

Присутствие гепарина в образце может привести к результатам, похожи на те, где присутствует анти-фосфолипидное антитело.

КОРРЕКТИРОВКИ В ТЕСТЕ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ СВЕРТЫВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗБАВЛЕННОГО ЯДА ГАДЮКИ РАССЕЛА ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ ПНТ

Корректировки или уменьшение пролонгированного коэффициента теста до стандартного уровня является явным признаком наличия волчаночного антикоагулянта.

Часто коэффициент ПНТ не изменяется до стандартного диапазона. Степень корректировки, необходимой для того, чтобы указать на явное присутствие волчаночного антикоагулянта, еще точно не известна. Одним из подходов является подсчет процента корректировки следующим способом:

$$\frac{X - Y}{X} \times 100$$

X = коэффициент теста на измерение свертываемости с применением разбавленного яда гадюки Рассела с фосфолипидами

Y = коэффициент ПНТ

Считается, что результат, находящийся выше стандартного диапазона, изменяющийся более чем на >10% в ПНТ, указывает на наличие волчаночного антикоагулянта.

38.1 Подготовка Промытых Тромбоцитов Для Проведения Теста На Свертываемость Крови С Применением Разбавленного Яда Гадюки Рассела

РЕАГЕНТЫ

Буфер Тироде pH 6.5

- 8.0 г NaCl
- 0.2 г KCl
- 0.065 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.415 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 1.0 г NaHCO_3

Растворите в 900 мл дистиллированной воды и доведите pH до 6.5. При помощи дистиллированной воды доведите объем до 1 литра.

МЕТОД

1. Из свежей обычной крови приготовьте плазму, обогащенную тромбоцитами (ПОТ), путем центрифугирования 170 г крови (1200 о/м) на протяжении 10 минут при комнатной температуре.

ИЛИ

Используйте концентраты тромбоцитов, какие используются для лечения пациентов.

-
2. Разведите обогащенную тромбоцитами плазму в буфере Тироде в соотношении 1 к 2.
.....
3. Поместите разведенные тромбоциты в конусообразные пробирки для центрифугирования и центрифугируйте 850 г в течение 10 минут при комнатной температуре.
.....
4. При помощи пипетки Пастера достаньте супернатант и приостановите гранулы тромбоцитов в буфере Тироде. (Добавьте такое же количество буфера, какое в первоначальном объеме ПНТ.) Центрифугируйте 850 г, как делалось до этого. Этот процесс повторяется дважды.
.....
5. Отделите супернатант и приостановите буфер Тирода при помощи такого же количества буфера, как в 25% первоначального объема ПНТ.
.....
6. Поместите получившиеся промытые тромбоциты в пластиковые пробирки по 0.1 мл, дважды заморозьте и дайте растаять при температуре -20°C перед использованием.
.....

Тромбоциты вносят свой вклад в гемостаз двумя основными способами:

- Они прикрепляются к субэндотелиальным микрофибриллам и коллагеновым волокнам в стенке кровеносного сосуда, после чего они изменяют форму, с ними происходит специфическая реакция отсоединения, а затем группируются для формирования основной гемостатической пробки.
- В результате этих изменений, особенно во время релиза и формирования, генерируется активность прокоагулянтов, вовлекая в основном фосфолипиды тромбоцитов мембраны так, чтобы коагуляция крови инициировалась в зонах, где произошло скопление тромбоцитов.

Количественные или качественные дефекты тромбоцитов могут стать результатом значительной склонности к кровопотере, в основном из-за неспособности тромбоцитов формировать пробку, но в меньшей мере также из-за суб-оптимальной активации коагуляции крови.

Недостаточное функционирование тромбоцитов, или тромбоцитопения, может клинически присутствовать при различных симптомах, явно указывающих на нарушение гемостаза (например, синяки или кровоподтеки, носовое кровотечение, желудочно-кишечное кровотечение или меноррагия). Нарушения тромбоцитов обычно вызывают нарушения кровотечения средней степени тяжести. После операции или удаления зуба у пациента может только чрезмерно идти кровь.

Нарушения тромбоцитов включает болезнь недостаточного пула хранения, тромбастению Гланцманна и синдром Бернар-Сулье.

При исследовании пациентов с предполагаемым нарушением кровотечения важно собрать подробную историю болезни. Исследование фильма крови, определение подсчета кровяных тромбоцитов и определение времени кровотечения крови (описано в Разделе 11) – являются важными первоначальными тестами. Если показатели этих тестов находятся в пределах нормы, то клинически важные нарушения тромбоцитов в качестве причины исследуемого кровотечения маловероятны.

История употребления медикаментов также важна. Количество медикаментов может повлиять на результаты тестов функционирования тромбоцитов, включая время кровотечения. Например, недавний прием аспирина может влиять на результаты в течение 10 дней.

Для перечня медикаментов, влияющих на функционирование тромбоцитов, смотрите ниже руководство по тестированию функционирования тромбоцитов Британского сообщества Гематологии.

Еще один простой тест, который может указать на наличие аномалии - это метод сокращения сгустка. Они приводятся ниже.

39.1. Сокращение Сгустка

Сокращение сгустка в свернувшейся цельной крови может указать на количество тромбоцитов и их функционирование. Когда сгусток сокращается, выделяется сыворотка, и можно измерить степень сокращения сгустка.

МЕТОД

1. В стеклянную пробирку для тестирования (75 мм × 10 мм) добавьте 1 мл крови и поместите в помещение при температуре 37°C.
2. Рассмотрите пробирку, пока не образуется твердый сгусток. Оставьте еще на 1 час при температуре 37°C.
3. Измерьте расстояние от основания пробирки до мениска. Осторожно извлеките сгусток при помощи деревянной палочки (например, коктейльной палочки), оставив в пробирке сыворотку, выделившуюся от сгустка.
4. Измерьте расстояние от основания пробирки до мениска сыворотки.
5. Для вычисления процента разделите расстояние до сыворотки на общее расстояние и умножьте на 100.

ТРАКТОВКА

Обычно выделяется более 40% сыворотки. Выделение менее обильно при некоторых дефектах тромбоцитов, особенно при тромбастении Гланцмана.

ПРИМЕЧАНИЯ

- Пробирка и деревянная палочка должны быть абсолютно чистыми, чтобы предотвратить прилипание сгустка к пробирке.
- Сгусток нужно извлекать осторожно, не сжимая, чтобы не выделилось дополнительной сыворотки.

ССЫЛКИ

Chanarin I (ed.). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.

Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1322–1330.

39.2. Измерение Соединений Сгустка

ПРИНЦИП

Оптическая насыщенность обогащенной тромбоцитами плазмы снижается по мере формирования соединений тромбоцитов. Количество и в некоторой степени скорость снижения во многом зависит от реактивности тромбоцитов при условии, что другие переменные (например, количество тромбоцитов, скорость смешения и температура) находятся под контролем.

Изменения оптической насыщенности находятся под наблюдением, где оптическая насыщенность обогащенной тромбоцитами плазмы отражает степень соединения тромбоцитов, вызванную одним из ряда веществ.

За оптической насыщенностью ведется наблюдение при помощи агрегометра, соединенного с записывающим устройством таблиц таким образом, что результаты могут быть зафиксированы на графике.

Было опубликовано некоторое количество рецензий и руководств настоящей практики для различных центров.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ, НЕОБХОДИМЫЕ ПЕРЕД НАЧАЛОМ ИЗУЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ТРОМБОЦИТОВ

Аспирин содержащие смеси должны быть исключены из употребления за 10 дней до начала исследования, так как аспирин препятствует реакции релиза, если только специально не изучается их воздействие на соединение тромбоцитов.

Лучше воздержаться от употребления других медикаментов, которые известно, что влияют на функционирование тромбоцитов, по меньшей мере на время, необходимое для того, чтобы вывести их из циркуляции. Это включает в себя некоторые антигистамины, антибиотики и антидепрессанты. Перед тем как проводить тестирование функционирования тромбоцитов нужно проверить все предписываемые медикаменты.

Так как хиломикроны могут влиять на измерение соединения тромбоцитов, не стоит проводить изучение сразу же после приема жирной пищи.

Множество других «нормальных» компонентов, включая алкоголь, лук, чеснок, перец и имбирь могут также вызвать задержку соединения тромбоцитов. Помните об этом при оценке результатов.

ПОДГОТОВКА ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ, И ОБЕДНЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ

Венозная кровь собирается при минимальной венозной окклюзии в пропиленовую пробирку или пробирку, сделанную из силиконизированного стекла, содержащую 1/10 объема цитрата тринатрия (0.109М). Для полного изучения агрегации потребуется примерно 20 мл крови.

Тромбоциты активизируются при охлаждении, поэтому обработка крови происходит при температуре 20°C–25°C. Обогащенная тромбоцитами плазма готовится путем центрифугирования 200 г в течение 10-15 минут.

Обогащенную тромбоцитами плазму осторожно, избегая заражения эритроцитами или лейкоцитной пленкой, переливают в полипропиленовую пробирку, где она хранится до момента тестирования при температуре 20°C–25°C. Точная температура хранения не так важна, но она может повлиять на результаты тестирования, и такую же точно температуру нужно соблюдать для всех образцов обогащенной тромбоцитами плазмы.

Оставшуюся кровь, 2000 г, центрифугируют 20 минут, и обедненная тромбоцитами плазма вынимается и хранится при температуре at 4°C.

В обогащенной тромбоцитами плазме производится подсчет тромбоцитов: количество тромбоцитов повлияет на достигнутую реакцию агрегации, но в том диапазоне, под который попадают большинство подсчетов обогащенной тромбоцитами плазмы ($200-600 \times 10^9/\text{л}$), подобные результаты минимальны. Действительно, есть доказательство того, что разведение обогащенной тромбоцитами плазмы плазмой, обедненной тромбоцитами, может препятствовать получению результатов возможно потому, что обедненная тромбоцитами плазма может содержать вещества, выделяемые тромбоцитами как результат дополнительной травмы, вызванной центрифугированием на высокой скорости. По этой причине плазма, обогащенная тромбоцитами, у которой количество тромбоцитов выше стандартного диапазона, как правило, не должна корректироваться.

Для чрезмерно высокого количества обогащенной тромбоцитами плазмы ($>1000 \times 10^9/\text{л}$), может быть затронута реакция соединения. Поэтому может быть благоприятным подогнать подсчет тромбоцитов под более подходящий уровень. Это можно сделать путем разведения обогащенной тромбоцитами плазмы обедненной тромбоцитами плазмы пациента. Таким же образом, низкое количество тромбоцитов ($<200 \times 10^9/\text{л}$) уменьшающуюся реакцию агрегации. Концентрация тромбоцитов практически всегда стимулирует функциональные изменения, и проводить ее не рекомендуется. Однако, для сравнения можно развести обычный контрольный образец в таком же количестве обогащенной тромбоцитами плазмы.

Соединение тромбоцитов зависит от уровня pH, таким образом, диапазон уровня pH должен находиться в пределах 7.7–8.0. Следя за контролем качества нужно убедиться, что обогащенная тромбоцитами плазма хранится в полных, крепко закупоренных пробирках, и тесты должны быть завершены в течение 2 часов после забора крови.

СОЕДИНИТЕЛЬНЫХ АГЕНТОВ

Такие соединительные агенты как аденозин-5-дифосфат и коллаген привязываются к специальным рецепторам мембраны тромбоцита, активируя тромбоцит и вызывая серию реакций. Это ведет к изменению формы тромбоцита, сокращению, мобилизации, релизу гранулярных компонентов и, в конечном итоге, к соединению тромбоцитов.

В зависимости от типа и концентрации используемого вещества случаются несколько различных, но взаимосвязанных между собой путей активации тромбоцитов, которые ведут к их соединению. В пробирке для реакции изменение от равномерной суспензии тромбоцитов до их совокупности ведет к снижению светопоглощения и увеличению света, передаваемого через суспензию тромбоцитов. Это определяется специальным записывающим устройством в сочетании с планшетным агрегометром.

Приведенных ниже пяти соединительных агентов должно быть достаточно для того, чтобы установить различные нарушения функционирования тромбоцитов.

Аденозин-5-дифосфат

Основной раствор 1мМ/л динатрия соли готовится в солевом растворе Оурена и храниться в небольших количествах при температуре -40°C. Он остается неизменным как минимум в течение 3 месяцев. После разморозки его нужно использовать в течение 3 часов или вылить.

Для дальнейшего использования раствор готовится при помощи солевого раствора Оурена. Реакция на аденозин-5-дифосфат зависит от его окончательной концентрации.

- При 2 $\mu\text{мол/л}$ отчетливо видны определенные первичные и вторичные волны: первый предоставляет прямой вызванный веществом результат, а второй происходит в результате релиза эндогенного аденозин-5-дифосфата и создания тромбоксана A_2 (ТХА_2), который сам объединяет тромбоциты.
- При менее 2 $\mu\text{мол/л}$ прогрессивно меньше обычных субъектов выдают вторичную реакцию, и первичная волна обычно реверсирует по мере того как аденозин-5-дифосфат ферментативно уменьшается.
- При более 2 $\mu\text{мол/л}$ первичная фаза обычно такая интенсивная, что различие между ней и вторичной фазой скрыто.

Аденозин-5-дифосфат провоцирует изменение формы тромбоцитов с диска до остроконечной сферы. Это изначально вызывает небольшое увеличение оптической насыщенности суспензии тромбоцитов, что может случаться только если первичное соединение нарушено.

Адреналин (эпинефрин)

Основной раствор 1мМ/л битартрат соли готовится в солевом растворе Оурена. Его нужно хранить и использовать для аденозин-5-дифосфата. С адреналином используемые концентраты и характер ответной реакции похожи на те, что

происходят при аденозин-5-дифосфате. Однако в отсутствие вторичной волны первичная волна не реверсирует, также она не такая интенсивная, что скрывает за собой вторичную волну.

Коллаген

Широко используется очень стабильная суспензия уникальных коллагеновых фибрилл сухожилия (1 мг/мл), доступных у Гормон-Хеми, Мюнхен, Германия. Также подходят некоторые другие материалы. Она хранится при температуре 4°C и должна быть хорошо смешана непосредственно перед разведением в буфере, идущим с ней в наборе. Ее нужно использовать в окончательной концентрации плазмы, обогащенной тромбоцитами, 0.5–2.0 µг/мл, и разведенные суспензии остаются неизменными в течение 1 недели при температуре 4°C.

С коллагеном не происходит первичной волны. Обычно реакция определяется по продолжительности фазы задержки перед началом агрегации и по ее интенсивности. Небольшое увеличение оптической насыщенности, вызванное изменением формы, предшествует агрегации.

Используется коллаген из нескольких источников. Оба типа коллагена и образцы, из которых готовится препарат (например, лошадиный или коровий) могут сильно повлиять на достигнутые результаты. Действительно, в зависимости от исходного материала, необходим более чем стократный диапазон концентраций. Поэтому важно выбрать подходящий источник и локально установить стандартный диапазон для этого материала, который нужно устанавливать заново, если сменился источник.

Ристоцетин

При окончательной концентрации ристоцетина 1 мг/мл в обогащенной тромбоцитами плазме, обычно отчетливо различимы первичная и вторичная волны, но если концентрация превышает данную норму, то прямой эффект становится таким сильным, что две фазы сливаются в одну.

Первичная волна измеряет количество присутствующего в плазме фактора фон Виллебранда, в то время как вторичная волна – это отражение релиза эндогенных веществ.

Арахидоновая кислота

Арахидонат натрия (чистотой 99%) растворяют в буферном растворе Оурена до концентрации в 10мМ/л. Небольшими частями его помещают в затемненные стеклянные пробирки, предварительно сполоснув их водородом для предотвращения окисления, затем плотно закрывают крышкой и хранят в глубокой заморозке при температуре -20°C.

Соединение обычно монофазное, и за ним следует короткая фаза замедления.

РЕАГЕНТЫ

Примечание: эти концентрации подходят в том случае, если одна часть добавляется к 9 частям обогащенной тромбоцитами плазмы.

- Аденозин-5-дифосфат
Приготовьте раствор в соотношении 1 к 10 = 100 μ M (например, 0.1 мл 1000 μ M раствора + 0.9 мл буферного раствора Оурена)

Из этого приготовьте 2 рабочих концентрата:
 - 20 μ M (например, 0.2 мл 100 μ M + 0.8 мл буферного раствора Оурена)
 - 30 μ M (например, 0.3 мл 100 μ M + 0.7 мл буферного раствора Оурена)
В случае тестирования гиперспособности к агрегации, возможно, понадобятся более низкие концентрации (например, 10 μ M, 5 μ M).
- Адреналин (эпинефрин)
Разводите также как и для денозин-5-дифосфата
- Коллаген
Хорошо смешайте и разведите в солевом растворе Оурена:
 - 1 к 500 (например, 0.1 мл основного раствора + 4.9 мл солевого раствора Оурена) = 20 μ г/мл
 - 1 к 100 (например, 0.5 мл 1.50 раствора + 0.5 мл солевого раствора Оурена) = 10 μ г/мл
- Ристоцетин
В зависимости от достигнутых результатов используют до четырех концентратов ристоцетина: 15 мг/мл, 12.5 мг/мл, 7.5 мг/мл, и 5 мг/мл.
- Арахидоновая кислота
10mM/л

МЕТОД

Из-за устойчивости тромбоцитов к агрегации, вызванной центрифугированием, не следует начинать проводить исследования соединений в течение 30 минут после приготовления обогащенной тромбоцитами плазмы. В частности, реакция на денозин-5-дифосфат снижена в течение первых 20-30 минут после приготовления обогащенной тромбоцитами плазмы. Однако, тестирование должно быть завершено в течение двух часов.

1. Включите агрегометр и разогрейте его до 37°C, установите скорость вращения на 900 о/м. У некоторых агрегометров есть 2 канала, таким образом, для каждого канала удобно использовать половину ширины диаграммной бумаги. При отклонении в 10 мВ, используемые настройки обогащенной тромбоцитами плазмы составляют 0.5 и 5.5 мВ для каналов 1 и 2 соответственно (представляет агрегацию в 0%), и соответствующие пустые значения (которые устанавливаются при помощи обедненной тромбоцитами плазмы) будут 4.5 и 9.5 мВ (представляет агрегацию в 100%).

2. В стеклянную кюветку (после использования выбросить), содержащую силиконовый «файл» для смешения, поместите 0.45 мл обогащенной тромбоцитами плазмы.
3. Поместите в держатель канала 1 и установите трансмиссию на 0% (0.5 мВ). Замените кюветой, содержащей 0.5 мл обедненной тромбоцитами плазмы, и установите трансмиссию на 100% (4.5 мВ). Повторяйте эту процедуру до тех пор, пока не потребуются дальнейших изменений.
4. Повторите то же самое для канала 2, используя установки в 5.5 и 9.5 мВ.
5. Дайте обогащенной тромбоцитами плазме разогреться в течение 2 минут до температуры 37°C. На дно кювета добавьте 0.05 мл вещества и наблюдайте изменения в оптической насыщенности в течение 3 минут.

Повторите эту процедуру с каждым веществом.

ПРИМЕЧАНИЯ

- Для аденозин-5-дифосфата и адреналина начните с концентрата в 20 μM . Это будет окончательной концентрацией в обогащенной тромбоцитами плазме 2 μM .
- Для коллагена используйте концентрат 10 г/мл. Это будет окончательной концентрацией 1 $\mu\text{г/мл}$.
- Для риститоцена используйте концентрат 12.5 мг/мл. Для скрининга типа 2В болезни фон Виллебранда также протестируйте концентраты 7.5 мг/мл и 5 мг/мл. Это даст окончательную концентрацию обогащенной тромбоцитами плазмы 1.25 мг/мл, 0.75 мг/мл, и 0.5 мг/мл соответственно. Если нет ответной реакции на концентрацию 12.5 мг/мл, то используйте концентрат 15 мг/мл.

Если происходит гиперагрегация тромбоцитов с 0.5 мг/мл риститоцена (включая возможный тип 2В болезни фон Виллебранда или тип тромбоцитов болезни фон Виллебранда):

- На агрегометре проверьте спонтанную агрегацию путем мониторинга обогащенной тромбоцитами плазмы при тех же условиях смешения без добавления каких-либо веществ, вызывающих стимуляцию агрегации.
- Промойте отмеренный объем обогащенной тромбоцитами плазмы (например, 1 мл плазмы пациента и обычной плазмы x 3) в цитрате солевого буфера для промывания ЭДТА. Осторожно отстраните тромбоциты пациента в обычной плазме и обычные тромбоциты в плазме пациента. Еще раз протестируйте при помощи 0.5 мг/мл риститоцена.

Реакции должны развиваться по одному из приведенных ниже образцов.

Рисунок 39.1. Образцы реакции

Плазма пациента, обогащенная тромбоцитами Плазма пациента, обедненная тромбоцитами	Тромбоциты пациента Обычная плазма, обедненная тромбоцитами	Обычные тромбоциты Плазма пациента, обедненная тромбоцитами
Агрегация	Нет реакции	Агрегация = Тип 2В болезни фон Виллебранда
Агрегация	Спонтанная агрегация	Нет реакции = Тромбоцитов типа болезни фон Виллебранда*

*Для обзора тромбоцитов типа болезни фон Виллебранда, смотрите Франчини (2008).

ТРАКТОВКА ОБРАЗЦОВ АГРЕГАЦИИ

- Если тестируемые образцы не выдают нормальных реакций - например, 2 фазы агрегаций покрывают более 50% шкалы, где уже упомянутые концентрации покрывают более 50% шкалы упомянутых концентраций реагентов – тогда концентрация вещества повышается (в пределах разумного) до тех пор, пока не получится удовлетворительной реакции.
- В случаях, когда нет очевидного нарушения релиза, нужно следить за реакцией на арахидоновую кислоту.
- Если нет никакой реакции на арахидоновую кислоту, протестируйте тромбоксана A2 и/или кальций ионофор.
- При изучении агрегаций тромбоцитов как части исследования гиперагрегации, для получения кривой, отображающей реакцию на дозу препарата, используют аденозин-5-дифосфат и адреналин в слабых концентрациях. Используемые концентрации, 2 μM , 1 μM , 0.5 μM , 0.1 μM – это окончательные реакции в обогащенной тромбоцитами плазме. Спонтанная агрегация также происходит перед тестированием оставшихся веществ:
 1. Поместите в кювету 0.5 мл обогащенной тромбоцитами плазмы и поместите в агрегометр.
 2. Следите за любыми изменениями оптической насыщенности в течение 15 минут.

Если недостаточно объема обогащенной тромбоцитами плазмы, то минимальный объем, который может быть использован в стандартных кюветках – это 0.36 мл обогащенной тромбоцитами плазмы + 40 $\mu\text{л}$ вещества.

- Обогащенная тромбоцитами плазма, взятая у обычного здорового донора и приготовленная тем же способом, должна быть обработана так же, как и контроль реагентов. Это особенно важно, если получены аномальные

результаты пациентов, так как некоторые вещества неустойчивы, особенно разведенные рабочими концентратами. Результаты обычных здоровых субъектов, тестируемые подобным способом, могут использоваться для получения стандартных диапазонов, которые помогают трактовать результаты пациентов.

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обычно результаты выражаются тремя способами:

1. Процент оптической насыщенности измеряется в течение 3 минут после добавления вещества. Это самый удобный способ, хотя он не предоставляет информации по форме соединительных кривых.
2. Первоначальный наклон чертежа агрегации. Он указывает скорость агрегации, но не указывает на то, произошла ли вторичная агрегация.
3. Определение предела концентрации вещества, например, количество соединяющихся веществ, необходимых для индукции реакции второй фазы. (Это обычно расточает обогащенную тромбоцитами плазму).

ТРАКТОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Нужно соблюдать особую осторожность при трактовке образцов соединения тромбоцитов. Некоторые технические факторы могут повлиять на результаты. Следует помнить, что существует определенное количество важных различий между агрегацией, определяемой нефелометрией и той, что происходит в организме.

Тем не менее, полезная диагностическая информация может быть получена, и некоторые примеры агрегации образцов показаны на Рисунке 39.2.

Рисунок 39.2. Результаты агрегации тромбоцитов при различных нарушениях

Нарушение	Аденозин-5-дифосфата	Коллаген	Ристоцетин 1.25 мг/ мл	Ристоцетин 0.5 мг/ мл	Арахидоновая кислота	Адреналин
Тип 1 и Тип 2А БФВ	Н	Н	О/С**	О	Н	Н
Тип 2В БФВ	Н	Н	Н	Н	Н	Н
Синдром Бернара-Сулье	Н	Н	О	О	Н	Н
Тромбостения Гланцмана	О	О	Н	О	О	О
Болезнь недостаточного пула хранения	ОВ/Н	С/Н	ОВ/Н	О	С/Н	ОВ/Н
Дефект циклооксигеназы*	С/Н	С	Н	О	С	С/Н

Н = Нормальный; О = Отсутствует; С = Снижено; П = Повышенная реакция;

ОВ = Основная волна только

*Или эффект аспирина **Может быть нормальным при Типе 1 болезни фон Виллебранда

ДАЛЬНЕЙШЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ

Если у конкретного человека наблюдается аномальный образец агрегации, то советуют повторить оценку, по крайней мере, одного случая для того, чтобы установить аномалию.

При наличии аномальной агрегации, возможно понадобится дальнейшее исследование. Это включает в себя измерение нуклеотидного содержания тромбоцитов и их выделение во время агрегации тромбоцитов.

Подсчет гликопротеинов мембраны может быть сделан для однозначного диагноза синдрома Бернара-Сулье и тромбостении Гланцмана.

Механизм релиза тромбоцитов может быть оценен по измерению общего содержания тромбоцитов аденозин-5-дифосфата и аденозинтрифосфата и релиза аденозинтрифосфата или 5-гидрокситриптамина (или обоих) из плотных гранул.

Рисунок 39.3. Технические факторы, влияющие на функционирование тромбоцитов

Антикоагулянты	1/10 объема цитрата три-натрия
Время	Начните тест в течение 30 минут после приготовления обогащенной тромбоцитами плазмы. Завершите исследования в течение 2 часов после забора крови.
Центрифугирование	Должно быть достаточно для того, чтобы извлечь эритроциты и лейкоциты, но оставить крупные тромбоциты. Должно проводиться при комнатной температуре, но не при 4°C.
Подсчет тромбоцитов	Низкое количество $< 100 \times 10^9/\text{л}$ вызывает медленные, слабые реакции. Высокое количество $> 1000 \times 10^9/\text{л}$ может показать заниженную реакцию.
pH	$< \text{pH } 7.7$ задерживает агрегацию. $> \text{pH } 8.0$ увеличивает агрегацию.
Скорость смешения	$< 800 \text{ о/м}$ показывает сниженную агрегацию. $> 1200 \text{ о/м}$ разрывает комки тромбоцитов.
Гематокрит	$> 55\%$ демонстрирует прогрессивное снижение агрегации, в особенности замедление второй фазы из-за повышенной концентрации цитрата.
Температура	$< 35^\circ\text{C}$ происходит снижение агрегации при регулярных дозах всех веществ, но повышение реакции на низкие дозы аденозин-5-дифосфата.
Липемия	Повышенные хиломикроны вызывают снижение агрегации.
Грязная кюветта	Может вызвать очевидную спонтанную агрегацию.
Отсутствие палочки для смешения	Нет реакции при добавлении агрегационного агента.
Воздушные пузырьки	Частые крупные колебания пера перед агрегацией. Также вызвано низким количеством тромбоцитов.

РАЗНИЦА МЕЖДУ УСЛОВИЯМИ *IN VIVO* И *IN VITRO* ПРИ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Для тестов крови *in vitro*:

- Кровь подвергается антикоагуляции
- Удаляются лейкоциты и эритроциты
- Сосудистые компоненты не вовлечены
- Коагуляция не вовлечена
- Выбирается количество тромбоцитов
- Удерживаются продукты активации тромбоцитов и релиза
- Используемые реагенты не физиологичны по своему составу и дозировке
- Тромбоциты не стабильны вне тела
- Медикаменты могут показать больше или меньше маркированных воздействий, чем *in vivo*

ССЫЛКИ

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, Minford A, Mumford AD, Parapia LA, Perry DJ, Watson SP, Wilde JT, Williams MD; UKHCDO. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UK HCDO. *Br J Haematol* 2006; 135:603–33.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 2009; 7:1029.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: Autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92:694–7.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30:91–4.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61:950–4.
- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *Thromb Haemost* 2008; 6:677–83.

ВСТУПЛЕНИЕ

Лиофилизация, или лиофильная сушка, может использоваться для приготовления плазмы, которая может оставаться неизменной в течение продолжительного периода времени. Это удобно, например, для приготовления лиофилизированной плазмы, обедненной фактором VIII, которая остается неизменной от 3 до 5 лет, если храниться при температуре -20°C или ниже, и которая достаточно стабильна при более коротких сроках (до семи дней), если храниться при температуре 20°C – 25°C .

ПОДХОДЯЩАЯ ПЛАЗМА

Венозная кровь смешивается с 0.105–0.109М цитрата натрия в соотношении 9 частей крови к 1 части антикоагулянта. Центрифугируйте 1700г в течение 10 минут, соберите в пул соответственно, и храните при температуре -55°C ожидая результаты тестирования на вирусы. Подтвердите негативные результаты тестов на ВИЧ 1 и 2, антитела к антигенам вируса гепатита С и гепатита В.

МАТЕРИАЛЫ

- Прозрачные нейтральные стеклянные пробирки объемом 2 мл с силиконовым внутри 13 мм горлышком
- Пробки лиофилизации 13 мм, серые
- 13 мм полностью отрываемые клапаны

(Все материалы доступны у Diagnostik Reagents, Тэйм, Оксфордшир, Великобритания)

- Аппарат для лиофилизации (аппарат Supermodulyo и останавливающий аппарат у Лайф Сайнс Интернэшнал, Отдел 5, Рингуэй центр, Эдисон Род, Бэйсингсток, Хэмпшир, RG21 6YH, Великобритания)
- N-2-Гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES; BDH Лабораторис Супплайс, Пул, BD15 1TD, Великобритания)

МЕТОД

1. Быстро растопите плазму при температуре 37°C .

2. Хорошо смешайте.

3. Добавьте 0.8 г HEPES на 100 мл плазмы.
4. Перемешайте и дайте HEPES раствориться (15-20 минут).
5. Заполните подносы для лиофилизации из нержавеющей стали пустыми пробирками.
6. Распределите в каждую пробирку по 0.5 мл смеси.
7. Закройте каждую пробирку резиновой затычкой, углубив узкий выступ в затычку. Убедитесь, что воздух выпущен из пробирки.
8. Заморозьте при температуре -70°C минимум на 3 часа.
9. Включите аппарат для лиофилизации. Включите холодильник.
10. Поместите подносы в аппарат с полками (до 8 полок).
11. Поместите аппарат с полками в прозрачную пластиковую камеру над портом выхода воздуха поверх лиофилизатора.
12. Активизируйте насос. Убедитесь, что два вышеперечисленных этапа и этот этап выполнены 3-4 минут, пока не растаяла плазма. Если она частично оттаяла, вещество будет образовывать пену и плохо лиофилизироваться, поэтому его нужно вылить.
13. Убедитесь, что вакуум проявляется по движению в шкале давления (видимое движение в течение нескольких минут) и по неподвижности полости с плазмой при легком латеральном давлении вручную.
14. Оставьте в вакууме в течение 5 дней.
15. Запечатйте пробирки в вакууме закрутив ручки прибора с полками.
16. Произведите подачу воздуха через входной порт.
17. Разморозьте и высушите лиофилизатор.
18. Храните лиофилизированную плазму при температуре -20°C и закройте колпачком как можно быстрее.
19. Для подтверждения равномерной лиофилизации плазмы, протестируйте 4-6 пробирок, взятых из разных мест стальных подносов. Определите ЧВ и АЧТВ, оно не должно превышать 6%– 8%.

ВСТУПЛЕНИЕ

Почти во всех частях мира сейчас широко используется автоматизация в коагуляционных лабораториях. Она внесла свой вклад в усовершенствование стандартизации и облегчающих тестов, требующих специального обучения и специальных рабочих условий так, чтобы лаборатории смогли улучшить эффективность своего труда и свою систему.

Автоматизация в гемостазе – довольно новое явление. Методы проведения исследования вручную, основанные на визуальном определении сгустка фибрина и использующие инкубаторы температурой 37°C, когда то были единственными методами коагуляционных исследований. Затем, в 1970х годах, появилось полу-автоматизированное оборудование, основанное на фотометрических или механических принципах определения фибрина. Не так давно полностью автоматизированное оборудование стало все чаще встречаться в современных лабораториях. На сегодняшний день новое оборудование, подключенное к специальным системам обработки данных, может брать на себя проведение исследований свертываемости крови, хромогенных и иммунологических исследований.

Новые методы, доступные в наше время:

1. Механический
2. Оптический
 - 2.1. Фото-оптический
 - 2.2. Нефелометрический
 - 2.3. Хромогенный
 - 2.4. Иммунологический

МЕХАНИЧЕСКИЙ ПРИНЦИП

Электромагнитные методы основаны на определении увеличения вязкости плазмы при формировании фибрина. К лабораторному оборудованию применимы на сегодняшний день две вариации этого принципа.

Первая использует электромагнитное поле применимо к тестируемым кюветам, которое определяет движение внутри сферы из нержавеющей стали, помещенной в образец с плазмой. Стальная сфера следит за движением маятника, качаясь из стороны в сторону в растворе реагента плазмы при постоянном движении. Как только фибрин начинает формироваться,

повышается вязкость и движения сферы замедляются. Когда колебательные движения сферы достигают заранее заданного уровня, хронометр останавливается, указывая на время коагуляции плазмы.

Во втором механическом методе определения также используется сфера из нержавеющей стали, установленная в этот раз в одном месте. Магнитный сенсор определяет позицию сферы, и по мере того как она вращается, сфера остается в наклонном положении пока образец не затвердеет. Во время формирования фибрина, сгусток захватывает сферу, отодвигаясь от ее первоначальной позиции. По мере того как она отодвигается за радиус действия сенсора, кругооборот нарушается и хронометр останавливается.

ОПТИЧЕСКИЙ ИЛИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ ПРИНЦИПЫ

Фото-оптический принцип

Оптически системы основаны на понятии, что формирование сгустка включает изменения в оптической насыщенности плазмы. По мере формирования сгустка существуют изменения оптической характеристики от первоначальных показателей плазмы/реагента. За этими изменениями ведется наблюдение, и они используются для выведения времени, понадобившегося для того, чтобы произошли определенные изменения.

Нефелометрический принцип

Нефелометрический принцип используется некоторыми системами. При коагуляционных исследованиях источник монохроматического лазерного света передается, например, при помощи волоконной оптики. Считывание световой дисперсии возможно при помощи сенсора, установленного на 90 или 180 градусах от траектории подачи света, в зависимости от определенной системы, который затем под углом измеряет рассеянный свет или записывает изменения в трансмиссии света. Когда свет достигает нерастворимых комплексов, таких как волокна фибрина, он распределяется на разбрасываемые вперед лучи (180 градусов) и поперечно разбрасываемые лучи (90 градусов). Хронометр останавливается, когда количество разбросанного или переданного света достигает специального предустановленного уровня. Разница между разбросанным или рассеянным светом перед или после формирования сгустка обычно пропорциональна количеству сформированного фибрина.

Хромогенный принцип

Это принцип основан на использовании определенного цветового генерирующего вещества, известного как хромофор, где пара-нитроанилин считается самым распространенным веществом. Его максимальная впитываемая способность составляет 405 нм. Принцип хромогенного тестирования основывается на плотном соединении пара-нитроанилина с синтетическими

субстратами. Пара-нитроанилин прикрепляется к серии аминокислот, которые стимулируют последовательность активированного коагуляционного фактора, который хотят определить. Коагуляционный протеин расщепляет хромогенный субстрат в специальном месте между определенной последовательностью аминокислоты и выделяет пара-нитроанилин.

Насыщенность желтого цвета пропорциональна количеству выделенного пара-нитроанилина. Это измеряется при помощи фотографии при длине волны 405 нм. Чем больше расщепляется и освобождается пара-нитроанилина, тем все больше повышается впитывающая способность образца, что ведет к все большим изменениям оптической насыщенности раствора.

Первое оборудование для коагуляции могло выявить только один параметр, например, механический или фотооптический. Фотооптические инструменты первоначально были сконструированы для считывания результатов при одной длине волны (например, 500 нм или 600 нм), которые могли быть использованы для определения формирования сгустка. С недавних пор некоторые коагулометры могут считывать результаты при двух или более длин волн, зачастую включая 405 нм, увеличивая возможности для все более новых реакций (хромогенные субстратные методы). В 1990х годах ряд производителей успешно включил различные методы выявления, которые предоставляют любой лаборатории возможность применения различных методик при помощи одного и того же оборудования.

Иммунологический принцип

Для измерения аналита (антигена) обычно используют латексные микрочастицы, покрытые специальным антителом. Луч монохроматического света проникает сквозь латексную суспензию микрочастиц. Когда длина волны больше, чем диаметр суспензии частиц, то частицы поглощают небольшое количество света. Кроме того, когда специальные латексные покрытые антителами микрочастицы контактируют с присутствующим в растворе антигеном, они склеиваются с антителом, формируя звенья между частицами, производящими агглютинацию. Когда диаметр частиц приближается к длине волны монохроматического светового луча, то поглощается все большее количество света. Это увеличение поглощаемости света пропорционально агглютинации, которая, в свою очередь, пропорциональна количеству антигена, присутствующего в образце. Данный тип технологии доступен в более передовых коагуляционных анализаторах, представленных на рынок в 1990х годах. Обычно, используя любой из этих автоматизированных инструментов, можно провести экономящие время стандартные иммунологические исследования.

Рисунок 41.1. Преимущества и недостатки методов выявления в определяющих параметрах

Метод	Преимущества	Недостатки
Механический	- Нарушение отсутствует из-за физических характеристик, таких как липемия или гемолиз - Возможно использование небольших объемов образца - Некоторые могут анализировать цельную кровь для некоторых тестов, не используя необходимость в центрифугировании	- Невозможно следить за графиками образования сгустка - Могут предоставлять проблемы конечного определения некоторых образцов с низким содержанием фибриногена
Фото-оптический	- Возможность построения графиков по формированию сгустка - Оптические проверки для гемолиза/липемии/желтухи некоторых оптических системах	- Вмешательство из-за липемии, гемолиза, гипербилирубемии, или повышение протеина некоторых систем. - Некоторые системы могут испытывать сложности определения сгустка при использовании некоторых совершенно прозрачных реагентов - Очень короткие коагуляционные периоды могут остаться незафиксированными из-за задержки перед началом мониторинга
Нефелометрический	Может измерить реакцию антиген-антитело в протеинах, которые присутствуют в очень маленьких дозах	- Лимитирует количество доступных тестов - Стоимость реагентов
Хромогенный	- Полностью характерные тесты могут быть более легкими - Возможно использование дополнительных параметров, не подходящих для измерения путем выявления - Набор возможных тестов увеличивается - Возможные улучшения в погрешностях по сравнению с анализами, основанными на изучении сгустка	- Ограничен длиной волны приборов - Необходимы крупные объемы тестирования для положительного коэффициента цена-качество - Стоимость инструментов и реагентов
Иммунологический	- Возможность автоматизировать затратные по времени ручные методы - Повышает количество возможных тестов	- Доступно ограниченное количество тестов - Стоимость инструментов - Стоимость реагентов

ПРЕИМУЩЕСТВО АВТОМАТИЗИРОВАНИЯ В КОАГУЛЯЦИОННОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Улучшает производительность и гибкость профессионально проведенного времени.
2. Улучшает репродуктивность теста. В прошлом ручные коагуляционные тесты были не точными, с коэффициентом вариации более 20%; полу-автоматическое оборудование обеспечило большую точность тестирования коагуляции. Однако, при ручной расфасовке образцов и реагентов тестирование должно проводиться дважды. С применением полностью автоматизированного оборудования точность улучшилась, достигнув коэффициента вариации менее 5%, а для некоторых тестов и менее 1%. Это привело авторов к идее о проведении одного тестирования и возможности снижения стоимости реагентов и кюветт вдвое.
3. Снижает стоимость образцов и реагентов.
4. Облегчает хранение данных и восстановительных систем посредством компьютерных программ.
5. Позволяет автоматически повторно воспроизводить результаты, если были допущены ошибки при первом разе.
6. Предоставляет возможность проведения различных тестов с использованием одного образца.
7. Позволяет брать образцы из закрытой пробирки, что улучшает безопасность и эффективность коагуляционных тестов. Это в значительной степени снижает возможность попадания струи или пролитых образцов пациента на оператора, или же ошибок при наклеивании этикеток. Один производитель предлагает запатентованную скрининговую систему, которая автоматически отделяет плазму от эритроцитов перед проведением теста без предварительного центрифугирования.
8. Предоставляет возможность разведения образцов, калибраторов и контрольных образцов. Оборудование может быть запрограммировано на дополнительные растворы, если первоначальные результаты избегают линейности метода. Они также могут автоматически проводить другие тесты без вмешательства оператора, если это предписано клинически или из-за первоначально полученных результатов.
9. Большинство анализаторов имеют систему оповещения, которая предупреждает оператора о превышении предустановленных параметров, что может указать на проблему в оборудовании (например, недостаточное количество реагента, неправильная температура, нехватка образца или ошибки контроля качества).

У различных доступных методологических типов есть преимущества и недостатки, которые должны быть известны и понимаемы для того, чтобы гарантировать точность и достоверность результатов. Важно учитывать, что

лаборатории несут ответственность за достоверность результатов. Основной заботой лабораторий, несмотря на ограниченный бюджет, является выбор оборудования для проведения коагуляции, которое, будет выдавать подходящие результаты. Подобные инструменты требуют регулярного технического обслуживания, постоянных знаний и контроля системы, так как ошибка или небрежности в результатах могут в значительной степени повлиять на результаты исследования. Поэтому контрольные системы, гарантирующие уверенность аналитических результатов, являются обязательными.

У многих лабораторий есть счастливая возможность оценить оборудование перед тем как покупать его. Если такой возможности нет, то очень важно собрать достаточно информации и совета от лаборатории, рекомендующей оборудование.

При оценке нового оборудования перед его покупкой, для начала нужно сравнить анализаторы в соответствии со следующими критериями:

- Стоимость оборудования
- Период неактивности и его надежность
- Время, необходимое для ремонта
- Легкость в обращении
- Доступность адекватного обслуживания в течение соответствующего времени
- Процесс утверждения и производительность
- Стоимость одноразовых элементов
- Гибкость при использовании реагентов других производителей
- Возможность добавления новых тестовых протоколов
- Обучающие курсы и продолжительная обучающая поддержка

Чувствительность различных типов оборудования к различным параметрам будет отличаться в зависимости от того, как аппарат градуирован и как определяются конечные пункты. У каждой лаборатории свои нужды, и хорошим советом было бы расставить приоритеты. Для примера смотри Рисунок 41.2.

Рисунок 41.2. Характеристики специализированного оборудования

Источник: Родак, 1995

Характеристика	Описание
Произвольный доступ	С плазмой пациента различные тестирования возможны в любом порядке и в одно и то же время.
Первичная пробирка с образцом	Образец плазмы берется напрямую путем аспирации в открытой пробирке для сбора, помещенной в анализатор.

Характеристика	Описание
Проникающая пробка и закрытая пробирка для взятия образцов	Анализатор создает вакуумное пространство для образца с плазмой внутри пробирки для сбора при помощи резиновой затычки.
Штрихкод	Позволяет идентифицировать реагент, образцы пациента или и то, и другое при помощи возможностей штрихкода. Это снижает ввод данных вручную.
Двунаправленная интрфаза	Анализатор посылает запрос в централизованный компьютер для того, чтобы определить запрашиваемое количество тестов. Оператору не нужно вручную программировать информацию для оборудования.
Индикатор образцов	Предупреждает оператора о проблемах, возникающих с целостностью образца.
Жидкий сенсор уровня	Предупреждает оператора о недостаточном объеме образца или реагента для проведения достоверного тестирования, или же если оборудование не создало достаточно вакуумного пространства для образца для проведения необходимого теста.
Интегрированные программы контроля качества	Компьютерная программа прибора хранит и упорядочивает данные контроля качества. Это может включать в себя применение правил Вэстгарда для указания на результаты, находящиеся за пределами допустимости.
Вместимость СТАТ	Позволяет оператору отменить последовательность проверки теста для того, чтобы поместить новый образец СТАТ в отсек для проверки.
Охлаждающая способность целостных образцов	Сохраняет целостность образцов, реагентов, или и тех и других во время процесса проверки.
Хранительная способность целостных образцов	Указывает на количество образца пациента, который может быть загружен в анализатор в любое время.
Способность рефлекторного тестирования	Предоставляет возможность программирования оборудования для повторения или добавления тестирования при специфических параметрах, установленных оператором.
Хранение данных пациента	Способность анализатора хранить результаты теста, которые можно воспроизвести в любой момент. Возможность хранения кривых формирования сгустка.
Мониторинг объема реагента	Предупреждает оператора о недостаточности реагента для проведения запрограммированного тестирования.
Обработка	Количество тестов, которые могут быть обработаны в течение заданного времени (обычно классифицируют как количество тестов проведенных в 1 час).
Кривая образования сгустка	Позволяет оператору видеть формирование сгустка в кювете. Помогает определить конкретные неуправляемые условия или патологические состояния, или обнаружение и решение ошибок аномальных результатов тестирования.

Технология находится на подъеме, и растущие с каждым днем требования порождают необходимость в лабораторных инструментах подобного рода. Они сделают огромный шаг вперед в области лабораторного оборудования, предоставляя возможность проводить надежные, точные и достоверные исследования в течение более короткого времени и при лучшем контроле.

Существует большое количество преимуществ автоматизации. Технология постоянно развивается для того, чтобы предоставлять новые разработки в данной области и снижать оборотное время, позволяя тестам быть надежными, точными и достоверными, сохраняя их качество.

ССЫЛКИ

Rodak BF (ed): *Diagnostic Hematology*. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 626–631.

Thomas LC, Sochynsky CL. Multiple measuring modes of coagulation instruments. *Clin Hemost Rev* 1999; 13:8.

ДРУГИЕ ЗНАЧИМЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Robotic automation analysis. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:269–279.

Sasaki M, Kageoka T, Ogura K et al. Total laboratory automation in Japan: Past, present and the future. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:217–227.

Молекулярный Генетический Анализ

42

Лабораторные методы, касающиеся всех аспектов молекулярного генетического исследования в отношении гемофилии и других подобных заболеваний, охвачены в отдельной публикации Комитета Лабораторных Изучений Всемирной Организации Гемофилии, написанной профессором Ампайван Чансамрит и доктором Анной Гудив. Это лабораторное руководство, касающееся фенотипического анализа можно будет загрузить бесплатно с сайта Всемирной Организации Гемофилии, www.wfh.org.

ВСЕМИРНАЯ ФЕДЕРАЦИЯ ГЕМОФИЛИИ

1425 Рене Левеск Бульвар Вэст, Кв. 1010

Монреаль, Квебек H3G 1T7

CANADA

Тел.: (514) 875-7944

Факс: (514) 875-8916

Эл.почта: wfh@wfh.org

Интернет: www.wfh.org

