

**ПАРАМЕТРЫ ГЕМОСТАЗА (КОАГУЛЯЦИЯ)**

**ПРИНЦИП МЕТОДА**

Набор реагентов предназначен для исследования «плазменного звена» свертывающей системы крови методом моделирования процесса свертывания крови in vitro и позволяет получить данные об основных звеньях и этапах свертывания крови.

- Протромбиновое время (ПВ): время свертывания бедной тромбоцитами плазмы в присутствии оптимального количества кальция и избытка тканевого тромбопластина, 100 **тестов**.

- Активированное парциальное/частичное тромбопластиновое время (АПТВ/АЧТВ): время свертывания бедной тромбоцитами плазмы при добавлении оптимального количества кальция в условиях стандартизации контактной (каолином) и фосфолипидной (эритрофосфатидом) активации процесса свертывания, 60 **тестов**.

- Фибриноген: количество фибрина, образованного при свертывании плазмы избытком кальция, 100 **тестов**.

- Тромбиновое время (ТВ)/Тромбиновое время (ТВ) с протаминсульфатом: время свертывания бедной тромбоцитами плазмы тромбином стандартной активности/время свертывания бедной тромбоцитами плазмы тромбином стандартной активности в присутствии протаминсульфата для выявления гипергепаиремии, 30 **тестов**/10 **тестов**.

- Активированное время рекальцификации (АВР): время свертывания богатой тромбоцитами плазмы при добавлении оптимального количества кальция в условиях стандартизации каолином контактной фазы процесса свертывания, 60 **тестов**.

**СОСТАВ НАБОРА**

Thromboplastin lyophilized	<b>2x5,0 ml</b>
Тромбопластин лиофилизированный с определенным Международным Индексом Чувствительности (МИЧ), активность при растворении от 11 до 16 сек	
Solvent	<b>2x5,0 ml</b>
Буферный раствор с азидом натрия в качестве консерванта	
Erythrophosphatid reagent	<b>2x0,3 ml</b>
Эритрофосфатид, с активностью при разбавлении от 38 до 50 сек	
Kaolin suspension	<b>2 x 1,375 ml</b>
Суспензия каолина	
Calcium Chloride 5 %	<b>1x10,0 ml</b>
Кальция хлорид 5 %	
Thrombin lyophilized	<b>1x3,0 ml</b>
Тромбин лиофилизированный	
Protamine Sulfate	<b>1x1,2 ml</b>
Протаминсульфат 0,01 %	
Calcium Chloride 0,025 mol/l	<b>1x35,0 ml</b>
Зубуферный хлорид кальция, 0,025 mol/l	
Sodium Citrate	<b>1x18,0 ml</b>
После разбавления цитрат натрия 3,8 %	

**ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ**

Реагенты набора при хранении в оригинальной упаковке при 2-8°C стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке.

**ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Цитратная кровь:** кровь отобрать утром, натощак, из локтевой вены, силиконированной иглой с широким просветом, без шприца и наложения жгута. Первые капли отбросить, так как в них содержится тромбопластин. Кровь смешать в пластиковой пробирке с предварительно налитым в нее раствором цитрата натрия (3,8%) в соотношении 9:1.

**Плазма, богатая тромбоцитами:** цитратную кровь отцентрифугировать 5 мин при 1000 об/мин. Плазму перенести в пластиковую пробирку. Плазма стабильна 4 часа при 18-20°C.

**Плазма, бедная тромбоцитами:** цитратную кровь отцентрифугировать 20 мин при 4000 об/мин. Полученную плазму перенести в пластиковую пробирку. Плазма стабильна 4 часа при 18-20°C.

Допускается однократное замораживание на 3 недели при минус 20-40°C или в морозильных камерах холодильников при минус 4-12°C на 4-5 суток.

**Внимание!** Исключить повторное замораживание и размораживание бедной тромбоцитами плазмы.

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Набор предназначен только для диагностики in vitro.

Во избежание возможного инфицирования, необходимо соблюдать стандартную практику работы с потенциально опасными образцами, и обрабатывать их как инфекционные.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ**

Водяной термостат на 37°C, таймер или коагулометр.

Дозатор переменного объема до 5 ml. Дозатор на 100 µl.

Нормальная и патологическая плазма для контроля качества исследования (Control Plasma L1+L2).

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РЕАГЕНТОВ**

1. **Цитрат натрия:** 1 объем Sodium Citrate + 2 объема H<sub>2</sub>O.

2. Calcium Chloride 0,025 mol/l: готов к использованию.

Хранить при 2-8°C до появления хлопьев. **Исключить повторное использование ранее подогретого раствора.**

3. **Суспензия каолина:** во флакон Kaolin suspension добавить 5,5 ml H<sub>2</sub>O. Стабилен при 2-8°C 7 дней.

4. **Эритрофосфатид-каолиновый реактив:** во флакон с Erythrophosphatid reagent добавить 3,0 ml **суспензии каолина** (рабочий реагент п. 3), активность по пулированной плазме от 38 до 50 сек. Стабилен при 2-8°C 5 дней.

5. **Тромбин:** во флакон с Thrombin lyophilized добавить 3,0 ml дистиллированной воды. Инкубировать реагент 30 минут при температуре 18-25°C, затем осторожно перемешать содержимое флакона, не встряхивая, используя палочку для перемешивания. Предотвращать контакт жидкости с крышкой. Стабилен 7 дней при 2-8°C.

6. **Рабочий раствор тромбопластина:** во флакон с Thromboplastin lyophilized добавить 5,0 ml Solvent. Стабилен при 2-8°C 5 дней. **Замораживание недопустимо!**

7. **Тромбопластин-кальциевая смесь:** смешать равные объемы рабочих растворов тромбопластина и 0,025 mol/l CaCl<sub>2</sub>. Готовить перед употреблением и прогреть 15 мин при 37°C.

**РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ**

**Плазма крови:**

Активированное время рекальцификации (АВР): 50-70 сек.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ): 38-50 сек.

Протромбиновый индекс (ПИ): 90-105 %.

Протромбиновое отношение (ПО): 0,9 – 1,1.

Протромбин по Квику в % (по графику) – 70-125 %.

Тромбиновое время (ТВ): менее 30 сек.

Тромбиновое время с протаминсульфатом: менее 30 сек.

Фибриноген: 2 – 4 g/l.

Данные величины ориентировочны, рекомендуется определение собственных нормальных величин в каждой лаборатории.

**ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

НАИМЕНОВАНИЕ ТЕСТА	ПЕРВЫЙ ЭТАП	ВРЕМЯ ИНКУБАЦИИ	ВТОРОЙ ЭТАП
Активированное время рекальцификации (АВР)	0,1 ml плазмы, богатой тромбоцитами + 0,1 ml суспензии каолина	5 мин при 37°C	0,2 ml 0,025 mol/l р-ра CaCl <sub>2</sub>
Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)	0,1 ml плазмы, бедной тромбоцитами + 0,1 ml эритрофосфатидкаолинового реактива	5 мин при 37°C	0,1 ml 0,025 mol/l р-ра CaCl <sub>2</sub>
Протромбиновое время (ПВ)	0,1 ml плазмы, бедной тромбоцитами	1 мин при 37°C	0,2 ml тромбопластин-кальциевой смеси
Тромбиновое время (ТВ)	0,1 ml плазмы, бедной тромбоцитами	1 мин при 37°C	0,1 ml тромбина
Тромбиновое время с протаминсульфатом	0,1 ml плазмы, бедной тромбоцитами + 0,1 ml раствора протаминсульфата	1 мин при 37°C	0,1 ml тромбина
Фибриноген	1,0 ml плазмы, бедной тромбоцитами + 0,1 ml 5 % CaCl <sub>2</sub>		Взвешивание фибрина

Для определения каждого показателя, кроме фибриногена, включить секундомер и отметить время образования сгустка фибрина.

Результат протромбинового времени (ПВ) выражают по одному из следующих вариантов:

1. Отмечают Протромбиновое Время (ПВ) в секундах образца с указанием значений, полученных при исследовании контрольной плазмы.

2. Рассчитывают Протромбиновое отношение (ПО) по формуле:

$$ПО = \frac{ПВ \text{ больного}}{ПВ \text{ контрольной плазмы}}$$

ПВ контрольной плазмы - время образования сгустка в нормальной плазме (специфично для каждой серии наборов, определяется каждой лабораторией и зависит от используемого оборудования).

3. Определяют активность протромбинового комплекса по Квику (% от нормы).

Для определения активности протромбинового комплекса по Квику (%) постройте калибровочный график зависимости ПВ (сек) от активности факторов протромбинового комплекса нормальной плазмы (%). Бланк калибровочного графика представлен в приложении к каждому набору.

Подготовить разведение нормальной плазмы:

№ пробы	Плазма и ее разведения +	Физиологический раствор	Разведение	Протромбин нормальной плазмы, %
1	0,25 мл	+ 0,0 мл	-	100
2	0,25 мл	+ 0,25 мл	1+1	50
3	0,25 мл пробы 2 +	0,25 мл	1+3	25

ПВ каждого разведения плазмы (сек) отложить на оси абсцисс (X), % протромбина по Квику на оси ординат (Y).

ПВ каждого разведения плазмы (сек) отложить на оси абсцисс (X), % протромбина по Квику на оси ординат (Y).

4. Для больных, получающих пероральные антикоагулянты, рассчитывают Международное нормализованное отношение (МНО), International Normalized Ratio (INR)

Для расчета МНО используется следующая формула:

**МНО** =  $ПО^{МИЧ}$ , или по таблице расчета МНО, приведенной в приложении для каждого набора.

**МИЧ** = международный индекс чувствительности тромбопластина, специфичный для каждого лота.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

- ✓ Для предотвращения ложных результатов гарантируйте соотношение крови и антикоагулянта 9:1.
- ✓ Образцы не должны контактировать со стеклом.
- ✓ Не инкубируйте образцы при 37°С дольше, чем 5 минут для предотвращения потери V и VII фактора. Потеря V фактора может вести к удлинению ПВ.
- ✓ Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолиз, избыток цитрата натрия и полученной более 2 часов назад.
- ✓ ПВ может быть удлинено рядом веществ, включая кортикостероиды, ЭДТА, оральные контрацептивы, аспарагиназа, клофибрат, эритромицин, этанол, тетрациклин и антикоагулянты, такие как гепарин и кумарин.
- ✓ Укорочение ПВ вызывают антигистамины, фенобарбитал, кофеин и витамин К.

#### Диапазон МНО при лечении пероральными антикоагулянтами

Показания	МНО	Протромбин по Квику, %
Профилактика и лечение венозных тромбозов, ТЭЛА, инфарктов миокарда, тканевые протезы клапанов сердца	2,0-3,0	36-23
Больные высокого риска (повторные тромбозы, механические клапаны сердца)	2,5-3,5	28 - 19

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля хода реакции и процедуры измерения рекомендуется использовать нормальную и патологическую плазмы с известными значениями (Control Plasma L1+L2).

Каждая лаборатория должна установить собственную внутреннюю систему контроля качества.

#### ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Сокращение АВР указывает на повышение свертываемости крови (гиперкоагуляцию), удлинение – на замедление (гипокоагуляцию). Удлинение АВР наблюдается при выраженных тромбоцитопениях, некоторых видах тромбоцитопатий, при дефиците плазменных факторов (кроме факторов VII и XIII), при избытке в крови гепарина и других ингибиторах свертывания. При нормальном АЧТВ, удлиненное АВР свидетельствует о нарушении в тромбоцитарном звене гемостаза.

- АЧТВ устанавливает плазменные дефекты «внутреннего пути» образования тромбопластина. Оно удлиняется при значительном дефиците плазменных факторов (кроме факторов VII и XIII), а также при избытке в крови антикоагулянтов. Сокращение АЧТВ указывает на активацию свертывания крови.

- ПИ является коагуляционной пробой, позволяющей обнаружить плазменные дефекты «внешнего пути» образования тромбопластина. ПИ снижается при дефиците факторов VII, X, V, II, при дефиците фибриногена (< 1,0 г/л), а также при избытке антикоагулянтов – антипротромбинов. Снижение ПИ наблюдается при заболеваниях печени, дефиците витамина К, механической желтухе, при избытке в крови антикоагулянтов. Повышение ПИ наблюдается при передозировке витамина К, в поздние сроки беременности и других состояниях.

- ТВ – коагуляционная проба, выявляющая нарушения фибринообразования вследствие количественного или качественного нарушения фибриногена (гипо- и дисфибриногемия), наличие ингибиторов тромбина (гепарина, продуктов деградации фибриногена) и патологических циркулирующих антикоагулянтов.

При удлинении ТВ и нормальном количестве фибриногена рекомендуется провести определение ТВ с протаминсульфатом.

- Сокращение удлиненного ТВ протаминсульфатом до нормы (определяемой по донорской плазме) и увеличение разницы между удлиненным ТВ и ТВ, определенным с протаминсульфатом, более чем на 10 секунд по сравнению с нормой расценивается как повышение уровня гепарина в крови. Если удлиненное ТВ не сокращается до нормы протаминсульфатом, это говорит о накоплении продуктов деградации фибрина (фибриногена) в крови.

- Количество фибриногена увеличивается при воспалительных процессах, нарушении белкового обмена, в послеоперационный период и др. Количество фибриногена снижается при врожденных гипо- и дисфибриногемиях, заболеваниях печени и синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Балуда, З. С. Баркаган, Е. Д. Гольдберг "Лабораторные методы исследования системы гемостаза", Томск, 1980 г.
2. Инструкция по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования", М., 1986 г.
3. У.П. Иванов "Руководство по гемостазиологии", Минск, 1991 г.
4. Barrow D/A; Maynard J.R, Standardization of the protrombin time for monitoring oral anticoagulant therapy; the international normalized ratio. Dade Technical Bulletin # 19; 1986. Available from Dade international inc, Miami, FL.
5. Hirsh J., Dalen J. E., Deykin D. Oral Anticoagulants: Mechanisms of Action, Clinical Effectiveness and Optimal Therapeutic Range, 1992, Chest 102 (Suppl): 312S-326S.