

ПРЕАНАЛИТИКА В ГЕМОСТАЗИОЛОГИИ: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ

Гильманов А.Ж.

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра лабораторной диагностики ИПО

Преаналитический этап - важнейшая составная часть любого клинико-лабораторного исследования; от соблюдения его условий в значительной степени зависит результат анализа и, следовательно, его качество. Главными процедурами преаналитического этапа являются: назначение исследования и выбор информативных лабораторных параметров, подготовка пациента к исследованию с учетом факторов, способных повлиять на его результат, взятие биоматериала, его транспортировка в лабораторию, первичная обработка (пробоподготовка) и хранение перед исследованием. Значительная часть этих процедур протекает вне лаборатории и является зоной ответственности сотрудников лечебных и диагностических отделений, участвующих во взятии биоматериала. Однако основную ответственность за результаты исследований несет персонал КДЛ, который проводит внутрिलाбораторные преаналитические процедуры и собственно анализ.

Обеспечению качества исследований на преаналитическом этапе была посвящена уже вторая специализированная конференция (2nd EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase), которая прошла в этом году в Загребе (Хорватия) под эгидой Европейской федерации клинической химии и лабораторной медицины и при поддержке фирмы BD, и собрала более 450 делегатов. В ней приняли участие специалисты в области лабораторной медицины из многих стран, в том числе такие видные ученые, как М. Плебани, Дж. Липпи, В. Гудер, И. Ватсон, С. Сандберг, В. Паличка, М. Наук, А.-М. Симундич, М. Нибо и др. На конференции были всесторонне рассмотрены проблемы преаналитического этапа и факторы, способные влиять на результаты различных видов лабораторных исследований как у взрослых пациентов, так и в педиатрии. Значительное внимание уделялось индикаторам качества преаналитического этапа, по которым можно оценить его организацию в конкретной лаборатории, и даже вопросам преаналитического аудита. Указанные аспекты особенно важны для европейских лабораторий в связи со значительным расширением их сертификации по международному стандарту ISO 15189-2007 (уже появилась модификация 2012 г., несколько усложняющая и без того очень серьезную процедуру).

Кроме пленарной, сессии конференции были посвящены практическим аспектам взятия крови на исследование, имеющимся рекомендациям по преаналитическим процедурам и реальности их выполнения на практике, особенностям преаналитики для специальных тестов (молекулярно-биологических, гемостазиологических) и оценке качества преаналитического этапа. Кроме того, проводилось электронное голосование (опрос) в реальном времени, разбирались интересные клинические случаи и т.д. Нужно отметить значительный интерес аудитории, в основном состоящей из практических специалистов лабораторной медицины, к темам выступлений: зал практически всегда был полон. Следующая EFLM-BD конференция по преаналитическому этапу планируется в марте-апреле 2015 г. в Порту, Португалия.

С презентациями основных лекций конференции можно ознакомиться на сайте <http://www.preanalytical-phase.org/programme>, тезисы постерных сообщений напечатаны в специальном выпуске журнала Biochemia Medica и представлены на сайте журнала http://www.biochemia-medica.com/system/files/Abstracts-2nd%20EFLM-UEMS%20Congress-Posters_P01-corr.pdf. В рамках конференции прошло заседание Рабочей группы EFLM по преаналитическим вопросам, посвященное практике венепункции (флеботомии) в разных странах региона и выработке универсальных рекомендаций. Представляется важным, что в состав Рабочей группы входит и представитель России – д-р С. Ковалевская (С.-Петербург).

Весьма важным видом лабораторных исследований, в обеспечении качества которых решающая роль принадлежит преаналитическому этапу, являются *исследования системы гемостаза*. Обеспечению качества тестов плазменного гемостаза и функции тромбоцитов на

преаналитическом этапе было посвящено выступление на конференции известного специалиста С. Китчена (Англия). Многие анализы этого типа относятся к срочным, поскольку расстройства гемостаза часто несут угрозу жизни пациентов. От результатов исследований зависит своевременность и правильность назначения сильнодействующих лекарственных препаратов, и ошибки анализов способны стать прямой причиной ухудшения состояния больных. Однако тщательное выполнение самого анализа в КДЛ может ничего не дать, если не были соблюдены правила подготовки пациента и взятия биоматериала.

В связи с этим предотвращение возможных ошибок на преаналитическом и аналитическом этапах является важнейшим аспектом деятельности лабораторий, проводящих гемостазиологические исследования. Для обеспечения их качества и корректности результатов приходится учитывать множество *факторов, прямо или косвенно влияющих* на результаты тестов:

- возраст и пол пациента, физиологические состояния организма (беременность), характер питания, физическая нагрузка, эмоциональное возбуждение, курение, употребление спиртных напитков и т. д.;
- время взятия биоматериала (циркадные ритмы, фазы менструального цикла, время последнего приема пищи и т. д.);
- проведение диагностических и лечебных процедур и введение лекарственных препаратов, особенно инфузионных и трансфузионных форм;
- способ взятия и количество крови, вид пробирок и антикоагулянтов, техника заполнения и маркировка пробирок;
- время, температура и механические воздействия во время транспортировки образцов от места взятия до лаборатории;
- условия обработки (пробоподготовки) и хранения проб в лаборатории.

Эффективной мерой снижения влияния части этих факторов, предсказать действие которых бывает трудно или невозможно, служит соблюдение ряда правил: правильная идентификация пациента (как минимум, по двум признакам), взятие крови путем минимально-травматичной пункции вены с использованием специальных систем, натошак, утром, в положении пациента лежа или сидя, до введения лекарств и проведения диагностических и лечебных процедур. К сожалению, некоторые из условий иногда бывают невыполнимыми ввиду срочности исследований, и врачу приходится специально учитывать действие интерферирующих факторов.

Особенно ответственной процедурой при определении параметров гемостаза является *взятие крови из вены* (в редких случаях – капиллярной крови). Кровь, выходящая из кровеносного сосуда, контактирует со стенками пункционной иглы, катетера, пробирки и с воздухом; при этом происходит активация тромбоцитов и факторов свертывания, что может сильно исказить полученные данные. Поэтому очень важно, чтобы процедура взятия, хранения и обработки крови при исследовании гемостаза была наименее «травматичной» для всех звеньев свертывания крови, чего достигнуть достаточно сложно.

Одно из общих требований при венепункции – создание минимального венозного стаза (жгут / турникет может быть наложен не более чем на 1 мин). Более длительный венозный застой может вести к сдвигам гематокрита, ряда биохимических и гематологических показателей, излишней активации системы фибринолиза и изменениям параметров тромбоцитов.

Необходимо, чтобы в процессе взятия для анализа кровь попадала *напрямую в пробирку с антикоагулянтом*, быстро и хорошо перемешиваясь с ним, и не контактировала с поврежденными тканями и металлом иглы. Это важно, поскольку даже минимальное количество тромбина, который образуется при активации свертывания, за счет ленных положительных обратных связей резко ускоряет ферментные реакции гемостаза, что ведет к ложному укорочению времени основных скрининговых тестов – АЧТВ и ПВ и искажению других параметров. В настоящее время прак-



тически во всем мире стандартом для клинических лабораторий, в частности, для тех, в которых исследуются показатели гемостаза, является использование специальных *одноразовых пластиковых вакуумных систем* (вакутейнеров и др.), состоящих из контейнера-держателя с присоединяющейся к нему силиконированной иглой специальной заточки и пробирки с плотной резиновой пробкой и вакуумом внутри. Благодаря этому удается в значительной степени стандартизировать процедуру, исключить влияние ряда искажающих факторов и сократить время взятия крови.

Вакуумные пробирки для исследования плазменных факторов гемостаза содержат раствор цитрата натрия, который связывает ионы кальция и останавливает реакции свертывания, предотвращая образование тромбина. Другие антикоагулянты (гепарин, ЭДТА) в данном случае непригодны; ЭДТА допускается использовать лишь при иммунохимическом определении в плазме уровня индивидуальных белков – участников гемостаза. По сложившейся традиции, колпачки «цитратных» пробирок делают голубыми. Раствор цитрата в пробирке может быть в концентрации 3,2 % (0,109 моль/л) или 3,8 % (0,129 моль/л). Можно использовать оба типа пробирок, но лучше придерживаться какого-либо одного из них, так как результаты базовых тестов АЧТВ и ПВ между пробирками с разной концентрацией цитрата могут несколько различаться (до 10%).



Очень важно выдержать соотношение объема крови с антикоагулянтом 9:1. *Весьма частая ошибка - неполное заполнение пробирки кровью* - ведет к относительному избытку цитрата и замедлению свертывания (увеличению АЧТВ и ПВ); такие пробирки не должны приниматься к обработке и исследованию. В то же время излишнее количество крови в пробирке (выше метки) затрудняет перемешивание и может вызвать ускорение коагуляции; однако есть данные, что это происходит лишь при более чем 20%-ном избытке крови.

Поскольку большинство факторов свертывающей системы содержится в плазме, но не в эритроцитах, *необходимое количество антикоагулянта зависит от показателя гематокрита* у пациента. Указанное соотношение 9:1 справедливо для относительно нормальных показателей гематокрита (30 - 55 %). *При выраженном сгущении крови* (полициемия новорожденных, дегидратация и др.) стандартное количество цитрата оказывается избыточным для уменьшенного объема плазмы, и во избежание ложного завышения АЧТВ и ПВ нужна коррекция количества цитрата в сторону уменьшения. Например, при значении гематокрита 60 % и объеме пробирки 2,7 мл нужное количество раствора цитрата составляет 0,2 мл, в то время как в пробирку стандартно внесено 0,3 мл. Излишек раствора можно предварительно отсосать шприцем с тонкой иглой, но инструкции производителей вакуумных систем такой процедуры не предусматривают ввиду неизбежного нарушения стерильности и вакуума. Напротив, *при выраженной анемии* или эритропении стандартное количество цитрата может оказаться недостаточным для того же объема крови с увеличенной долей плазмы, что приведет к более быстрой коагуляции. Однако конкретные рекомендации о необходимом количестве цитрата при значении гематокрита менее 20-25% на сегодняшний день не разработаны.

Как исключение, при выраженных сдвигах гематокритного показателя допустима венепункция и сбор вытекающей крови в открытую пробирку (лучше пластиковую), в которую *заранее* добавляют 3,2% раствор двухводного или 3,8% раствор пятиводного тринатрий-цитрата, изготовленный в заводских условиях либо самостоятельно (но не более 5-7 дней назад) и хранившийся в холодильнике. Нужно количество раствора цитрата можно вычислить по формуле $X = (100 - \text{HCT}) \times \text{Vol} / (595 - \text{HCT})$, где X – количество раствора цитрата в мл; HCT – показатель гематокрита в %; Vol – итоговый объем крови для исследования в мл. Игла не должна быть тонкой (подкожной), поскольку через нее кровь вытекает слишком медленно, и в результате будут возможны гемолиз, активация тромбоцитов и образование сгустков; лучше использовать иглу от вакуумных систем. Первые капли крови, содержащие кусочки поврежденных тканей и стенки вены, необходимо отбросить (выпустить на марлевую салфетку). Правда, при использовании открытых пробирок в лю-

бом случае неизбежен контакт персонала с кровью пациента (опасность заражения!), а точный объем крови набрать довольно трудно.

Нужно отметить еще одну достаточно частую преаналитическую ошибку – взятие крови для исследования гемостаза *в условиях гемодилуции*, например, во время или вскоре после внутривенного вливания кристаллоидных или коллоидных растворов. В этих условиях стандартное количество цитрата оказывается избыточным по отношению к факторам свертывания, содержащимся в забираемом объеме «разбавленной» крови, что ведет к *непрогнозируемым сдвигам результатов в сторону гипокоагуляции*. Для предотвращения этого рекомендуется брать кровь на анализ не ранее чем через час после окончания внутривенной инфузии, после установления относительного равновесия между объемами введенной и ранее содержавшейся в организме жидкости. Если же это обеспечить невозможно из-за срочности анализа, то факт разведения и возможных гипокоагуляционных сдвигов придется просто учитывать (конечно, при этом информативность анализа снизится), и, по крайней мере, не брать кровь из вен той же конечности, куда вводится раствор.

Нередко кровь для исследования гемостаза берется через установленные ранее *внутрисосудистые катетеры* или *системы с катетером и иглой-бабочкой*. Если катетер



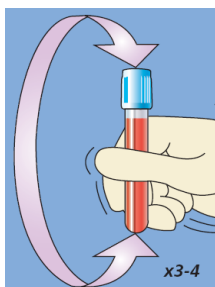
или система ранее использовались для введения лекарственных препаратов, то их необходимо промыть (то есть ввести через них) 5 мл физраствора и затем выпустить и отбросить не менее 3-5 мл крови, чтобы избежать ее разведения. Но даже при этом полностью смыть следы введившегося гепарина, как правило, не удастся, поэтому, если через катетер ранее вводился гепарин, кровь на исследование гемостаза через него лучше не брать.

В любом случае необходимо, чтобы была обеспечена полная герметичность системы, и кровь предварительно заполнила все «мертвые объемы» - просвет самого катетера, иглы и переходника, иначе возможно снижение вакуума и неполное заполнение пробирки.



В связи с этим, а также для предотвращения попадания в пробирку кусочков поврежденных тканей и возможной активации свертывания, *кровь для исследования гемостаза рекомендуется не брать в первую пробирку* – лучше вначале взять ее для тех видов анализа, где точная дозировка и возможное ускорение свертывания не являются критичными (например, на гемокультуру или для получения сыворотки). Если же требуется только исследование гемостаза, то первую небольшую порцию крови рекомендуется набрать в любую вакуумную пробирку (необязательно полный объем) и отбросить, а уже затем заполнить вторую пробирку для исследования коагуляции. Правда, в некоторых публикациях было показано, что исследование плазмы как из первой пробирки, так и с отбрасыванием начальных порций крови дает примерно

одинаковые результаты ПВ (МНО) и АЧТВ, но для других коагуляционных тестов, например, исследования отдельных факторов гемостаза, последняя процедура может быть желательной.



После взятия крови в «цитратную» пробирку ее *обязательно нужно перемешать* путем 3-4-кратного переворачивания. Для хорошего перемешивания важно, чтобы в пробирку попало именно требуемое количество крови (до метки, $\pm 10\%$), и над жидкостью оставалось 15-30 % свободного объема. Однократное переворачивание не обеспечивает полного смешивания, а чересчур длительное или слишком активное перемешивание (взбалтывание) может привести к частичному гемолизу и/или к активации тромбоцитов, что исказит результаты анализа.



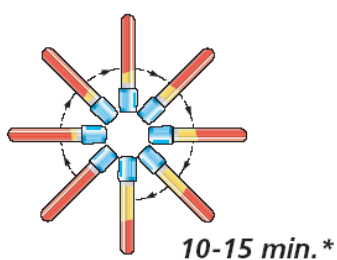
По мере накопления опыта исследований выяснилось, что показатели АЧТВ зависят от степени активации тромбоцитов в пробе, а она, в свою очередь, определяется как скоростью поступления крови в вакуумную пробирку, так и количеством крови - остаточным свободным про-

странством над пробой. В наибольшей степени этот фактор сказывался на результатах АЧТВ у тех пациентов, которым вводился гепарин, поскольку при активации тромбоцитов из их гранул высвобождается антигепариновый фактор 4, связывающий часть гепарина в пробе; при этом АЧТВ несколько укорачивается. Для предотвращения ложного занижения показателей при взятии малых объемов крови были разработаны пробирки с двойными стенками, состоящие из внешней оболочки стандартного размера и внутреннего пластикового «вкладыша» с уменьшенной емкостью – 2,7 или 1,8 мл. При их использовании степень заполнения и объем свободного пространства над кровью соответствуют стандартным 4,5 мл-пробиркам, и результаты исследований практически не различаются.

Транспортировка образцов крови в лабораторию должна быть бережной, проводиться в первичной пробирке при комнатной температуре и занимать возможно короткое время (не более 1-2 час). Если заранее известно, что в течение 4 час завершить транспортировку образцов, их обработку и исследование не удастся, то необходимо «на месте» произвести центрифугирование проб, отделение плазмы, ее перенос в промаркированные вторичные пластиковые пробирки и их быстрое замораживание (см. ниже). Вместе с тем, анализ функции тромбоцитов (агрегация) рекомендуется проводить в ближайшей лаборатории, избегая длительной транспортировки, вследствие легкой травматизации клеток и возможного искажения результатов тестов.

В лаборатории при получении пробирок с кровью их необходимо тщательно осмотреть и проверить путем осторожного переворачивания. Пробы, содержащие микросгустки, взятые не с тем антикоагулянтом, недозаполненные или имеющие видимые следы гемолиза, должны отбраковываться во избежание серьезных аналитических ошибок: средний и выраженный гемолиз ведет к некоторому укорочению АЧТВ и росту уровня D-димера, недозаполнение пробирки сопровождается значимым удлинением ПВ и АЧТВ (см. выше). Если проба иктерична или липемична, об этом нужно сделать отметку; такие пробы бывает трудно или невозможно исследовать на оптических приборах (в отличие от механических коагулометров).

Дальнейшая обработка крови для исследования плазменных факторов гемостаза сводится к получению богатой или бедной тромбоцитами плазмы. *Центрифугирование* крови должно проводиться при комнатной температуре; в первом случае - при ускорении



150 g в течение 5-7 мин, во втором – при ускорении 1500-2000 g в течение 10-15 мин, желательнее в центрифуге с горизонтальным ротором для уменьшения риска последующего «взмучивания» осадка тромбоцитов. Рекомендуется регулярно проверять адекватность режима центрифугирования путем подсчета тромбоцитов в надосадочной бедной тромбоцитами плазме; их количество не должно превышать $10 \times 10^9/\text{л}$. Замораживать для отсроченного исследования можно только бестромбоцитарную

плазму. Вместе с тем в литературе имеются данные о том, что при исследовании свежей плазмы на показатели АЧТВ, ПВ (МНО) и ТВ не влияет присутствие тромбоцитов вплоть до $200 \times 10^9/\text{л}$, но оно может сказаться на других тестах гемостаза.

Стабильность крови, смешанной с цитратом натрия в закрытой пробирке, различна для разных видов исследований системы гемостаза:

- *ПВ (МНО)* в неоткрытых пробирках с кровью, после центрифугирования или без него, при температуре 18-24 °С остается стабильным до 24 часов после взятия. Длительное охлаждение пробы до 2-4 °С может вести к холодной активации фактора VII и укорочению ПВ (быстрое замораживание этим не сопровождается). В то же время пробы пациентов, которые принимают оральные антикоагулянты или гепарин, менее стабильны; их ПВ может варьировать, особенно если в составе ПВ-реагента нет нейтрализующих гепарин веществ.
- *АЧТВ* в плазме крови пациентов, которым не вводился гепарин, стабильно в течение 4 часов при хранении центрифугированной или нецентрифугированной крови в закры-

тых пробирках при температуре 2-4 °С или 18-24 °С. Если пациенту вводился нефракционированный гепарин, то пробы крови должны быть отцентрифугированы и плазма отделена от клеток в течение одного часа после взятия, и исследована – как можно скорее, но не позднее 4 час.

- для других тестов плазменного гемостаза (ТВ, протеин С, фактор VIII и др.) пробы крови в закрытых пробирках могут храниться при температуре 2-4 °С или 18-24 °С, но должны быть отцентрифугированы в течение одного часа, а плазма исследована в течение 4 часов после взятия.
- исследование агрегационной функции тромбоцитов производится не позднее 4 час после взятия крови (лучше в течение 2 час). Богатая тромбоцитами плазма должна храниться при комнатной температуре; ее охлаждение нежелательно, поскольку ведет к активации тромбоцитов и изменению их свойств. Замораживание такой плазмы недопустимо.
- для определения биохимических маркеров активации тромбоцитов (тромбоцитарный фактор 4, β-тромбоглобулин, тромбоксан) взятие крови производится в специальную цитратную пробирку с дополнительными добавками (СТАД), после центрифугирования плазма быстро переносится во вторичную пробирку и замораживается до исследования.

При невозможности исследования параметров гемостаза в течение 24 часов (для ПВ) или в течение 4 часов (для остальных тестов) пробы бестромбоцитарной плазмы можно однократно заморозить и хранить до 2 недель при -20 °С или до 6 месяцев при -70 °С. Размораживать плазму перед анализом нужно быстро, в теплой воде, тщательно перемешивать и немедленно исследовать; если это невозможно, то допустимо ее хранение при +4 °С не более 2 часов. Нужно помнить, что после замораживания-оттаивания в некоторых пробах возможно удлинение АЧТВ.

При исследовании гемостаза, как и для других лабораторных тестов, желательно взятие двукратного объема крови для возможного повторного (дублированного) исследования. Ограничиться меньшим объемом крови можно при исследовании в стандартных условиях, с использованием автоматических систем. Если же у пациента получен неожиданный патологический результат теста, то часто бывает необходимо повторное взятие крови и повторение исследования.

=====

Таким образом, соблюдение условий преаналитического этапа лабораторных исследований (его стандартизация), в том числе использование вакуумных систем, является важнейшим элементом современной клинико-лабораторной «культуры». Несоблюдение правил подготовки пациента и сбора биоматериала для исследования, в лучшем случае, приведет к необходимости повторения анализа, в худшем – к неправильному диагнозу со всеми вытекающими отсюда последствиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline – fifth edition. Clinical Laboratory and Standards Institute Document H21-A5. Volume 28, No. 5. Wayne, PA: CLSI, 2008.
2. Coagulation Testing. Quick Guide to Coagulation Testing // Marques MB, Fritsma GA. AABB Press, 2006.
3. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза (третье издание). –М.: «Ньюдиамед», 2008. -292 с.
4. Вавилова Т.В., Гильманов А.Ж., Мамаев А.Н. Коагулологические исследования. - Клиническая лабораторная диагностика. Национальное Руководство: в 2 т. -Том 1 / под ред. В.В.Долгова, В.В.Меньшикова. –М., ГЭОТАР-Медиа, 2012. –С.749-815.

5. Воробьев П.А., Гончаров Н.Г., Сусин С.В. и др. Стандартные Операционные Процедуры Больницы. Исследование гемостаза: преаналитический этап и трактовка. -М.: «Ньюдиамед», 2010. -52 с.
6. Гильманов А.Ж. О преаналитических требованиях к исследованию гемостаза при централизации лабораторий // Клин. лаб. диагностика. -2012. -№8. -С.52-53.
7. ГОСТ 53079.4-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.
8. Козлов А.А., Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В. Преаналитический этап в гемостазиологии. Методическое руководство.
9. Мамаев А.Н., Вавилова Т.В., Гильманов А.Ж., Момот А.П. Преаналитический этап исследования системы гемостаза // Клин. лаб. диагностика. -2011. -№4. -С.35-38.
10. Сайты <http://www.preanalytical-phase.org>, <http://www.biochemia-medica.com>,
www.hemostas.ru, www.coagulometers.ru, www.renam.ru, www.aruplab.com,
www.labtestsonline.com, www.specimencare.com.