

НПО «Ренам»

**Лабораторное сопровождение
антикоагулянтной терапии. Важные
аспекты постоянной уверенности в
качестве коагулологических
исследований.**

**С.В. Бабенко, А.Л. Берковский,
К.В. Тихомирова**



Антикоагулянтная терапия

1) Прямые антикоагулянты (гепарин и другие)

Контроль с помощью АЧТВ и ТВ, хромогенные и коагулологические методы определения анти-Ха и анти-IIa активности гепарина и др.

2) Непрямые антикоагулянты – антагонисты витамина К (производные кумарина (варфарин, маркумар, синкумар, дикумарин, тромексан) и индандиона (фенилин, дипаксин)).

Основной метод лабораторного контроля – определение протромбинового времени.

Прямые антикоагулянты

- Нефракционированный гепарин (НФГ– Ср.15 кД)
- низкомолекулярные гепарины (НМГ):

Международное наименование НМГ	Примеры препаратов	Молекулярная масса	Анти-Ха/ анти-IIa
Дальтепарин	Фрагмин	2-9 кД	2,7:1
Эноксапарин	Клексан	3-8 кД	3,8:1
Тинзапарин	Инногеп	3-6 кД	1,9:1
Ревипарин	Кливарин	Средняя масса 4 кД	3,5:1
Надропарин	Фраксипарин	Средн. масса 4,5 кД	3,6:1
Ардепарин	Нормифло	Средняя масса 6 кД	1,9:1

Прямые антикоагулянты

- Новые препараты избирательного действия, блокирующие тромбин или фактор Ха:

Принцип действия	Примеры
прямые ингибиторы тромбина (антитромботическое действие не зависит от присутствия в плазме крови антитромбина III)	гирудин, бивалирудин (гирулог), аргатробан, ксимелогран, дабигатран
непрямые или селективные ингибиторы фактора Ха (антитромботическая активность является результатом селективного угнетения фактора Ха, опосредованного антитромбином III)	Фондапаринукс (Арикстра – “идеальный” гепарин), идрапаринукс, идрабиотапаринукс
прямые ингибиторы фактора Ха (прямые, специфичные, конкурентные ингибиторы ф. Ха)	ривароксабан, апиксабан, эдоксабан

Терапия дабигатраном

J. van Ryn, J. Stangier, S. Haertter, K.-H. Liesenfeld, W. Wienen, M. Feuring, A. Clemens. Thromb Haemost 2010; 103; 1116-1127



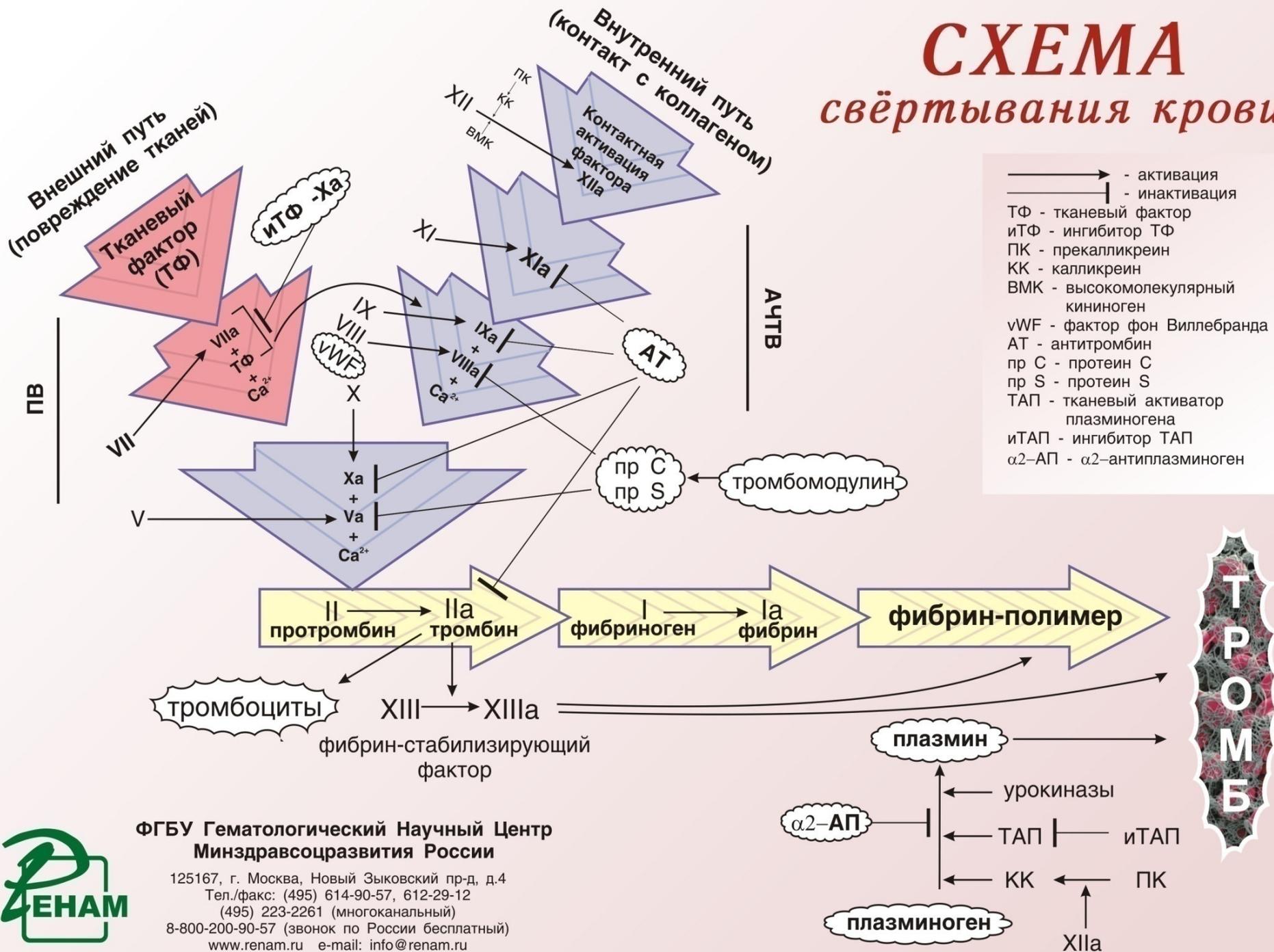
Сравнение новых антикоагулянтов с варфарином

Свойства	Варфарин	Новые антикоагулянты
Действие	Медленное	Быстрое
Доза	Вариабельная	Фиксированная
Влияние приема пищи	Есть	Нет
Побочные эффекты	Много	Несколько
Мониторинг	Есть	Есть-?
Время полужизни	Длинное	Короткое
Наличие прямого антидота	Есть (Витамин К)	Нет

Методы контроля антикоагулянтных препаратов

Препарат	Метод контроля
НФГ	ТВ, АЧТВ, АСТ (activated clotting time), анти-Ха- и анти-IIa-активность
НМГ	анти-Ха- и анти-IIa-активность
Бивалирудин и лепирудин	экариновый хромогенный метод (Ecarin chromogenic assay) - экариновое время (ЕСТ) и анти-IIa-активность
Дабигатран	тромбинспецифическое ТВ и экариновое время (ЕСТ), разбавленное время образования тромбина, анти-IIa активность?
Фондапаринукс	анти-Ха активность
Ривароксабан	анти-Ха активность, АЧТВ, ПВ
Апиксабан	анти-Ха активность, АЧТВ, ПВ

СХЕМА свёртывания крови



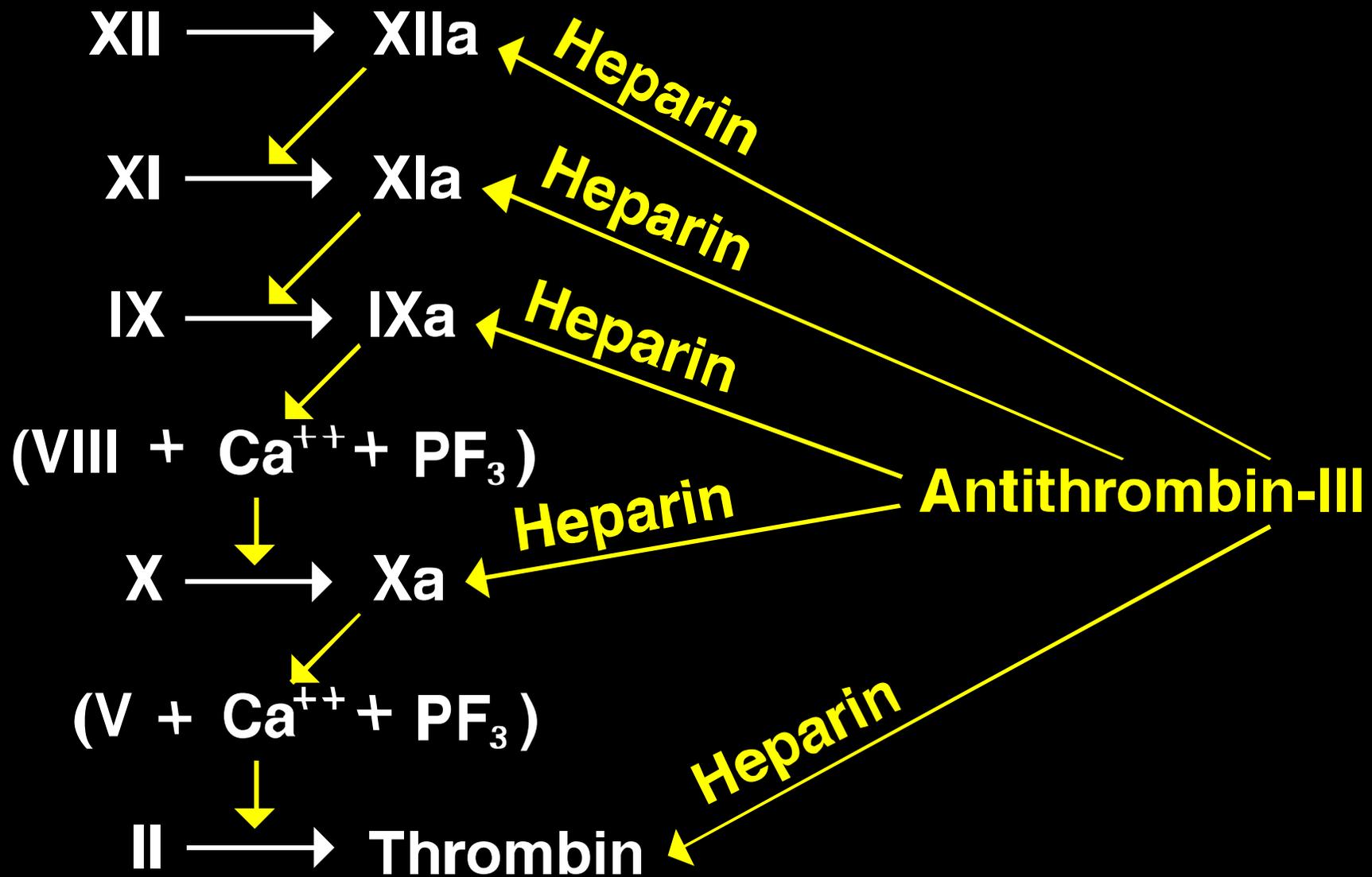
**ФГБУ Гематологический Научный Центр
 Минздравсоцразвития России**

125167, г. Москва, Новый Зыковский пр-д, д.4
 Тел./факс: (495) 614-90-57, 612-29-12
 (495) 223-2261 (многоканальный)
 8-800-200-90-57 (звонок по России бесплатный)
 www.renam.ru e-mail: info@renam.ru

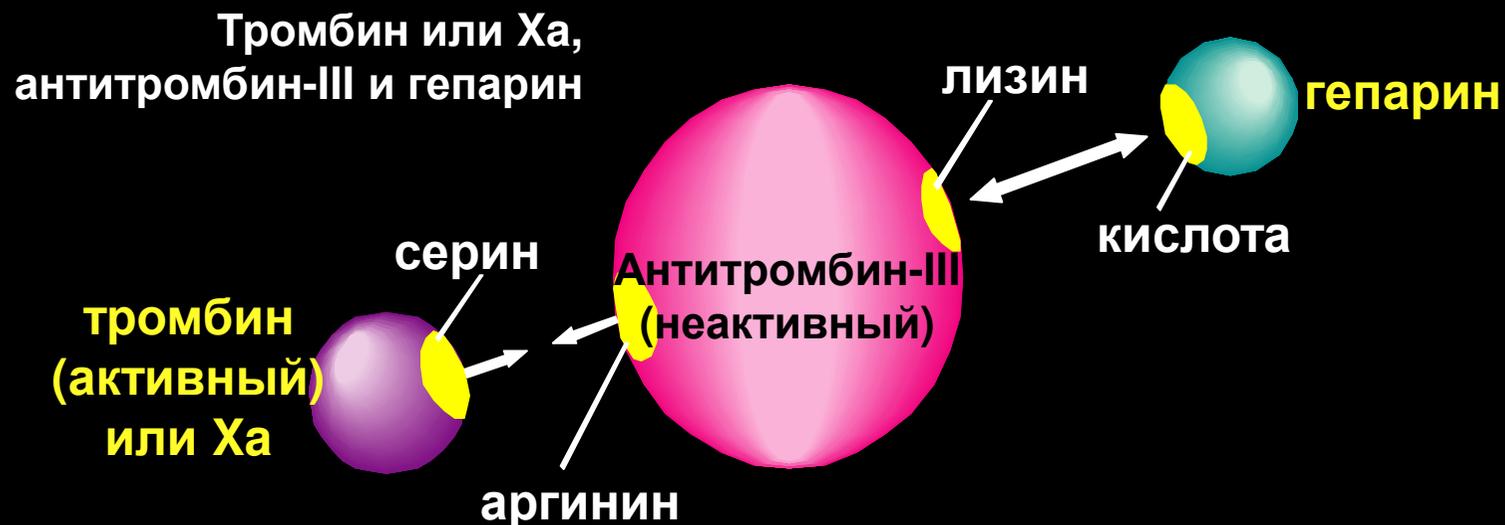
Основные Факторы свертывания

- **Factor I** фибриноген
- **Factor II** протромбин
- **Factor III** тканевой тромбопластин
- **Factor IV** ионы кальция
- **Factor V** лабильный фактор, проакселерин
- **Factor VII** стабильный фактор, проконвертин
- **Factor VIII** антигемофильный фактор
- **Factor IX** фактор Кристмаса
- **Factor X** фактор Стюарта-Пауэра
- **Factor XI** предшественник плазменного
тромбопластина
- **Factor XII** фактор Хагемана
- **Factor XIII** фибрин стабилизирующий фактор

Комплекс АТIII-гепарин



Антитромбин-III ингибирует сериновые протеазы



Инактивация тромбина или фактора Ха



Антитромбин-III

Причины снижения активности

Врожденная

Приобретенная

- угнетен синтез
- ускоренное потребление

Побочное действие лекарств

Реагенты НПО РЕНАМ для диагностики физиологических антикоагулянтов (ингибиторов).

- **Антитромбин III:**
 - ✓ Клоттинговый тест по
Абильгаард
 - ✓ Реахром-АТIII
 - ✓ Реаклот-АТIII тест
 - ✓ Реахром-АТIII (А)

Мониторинг гепаринотерапии

Косвенные методы

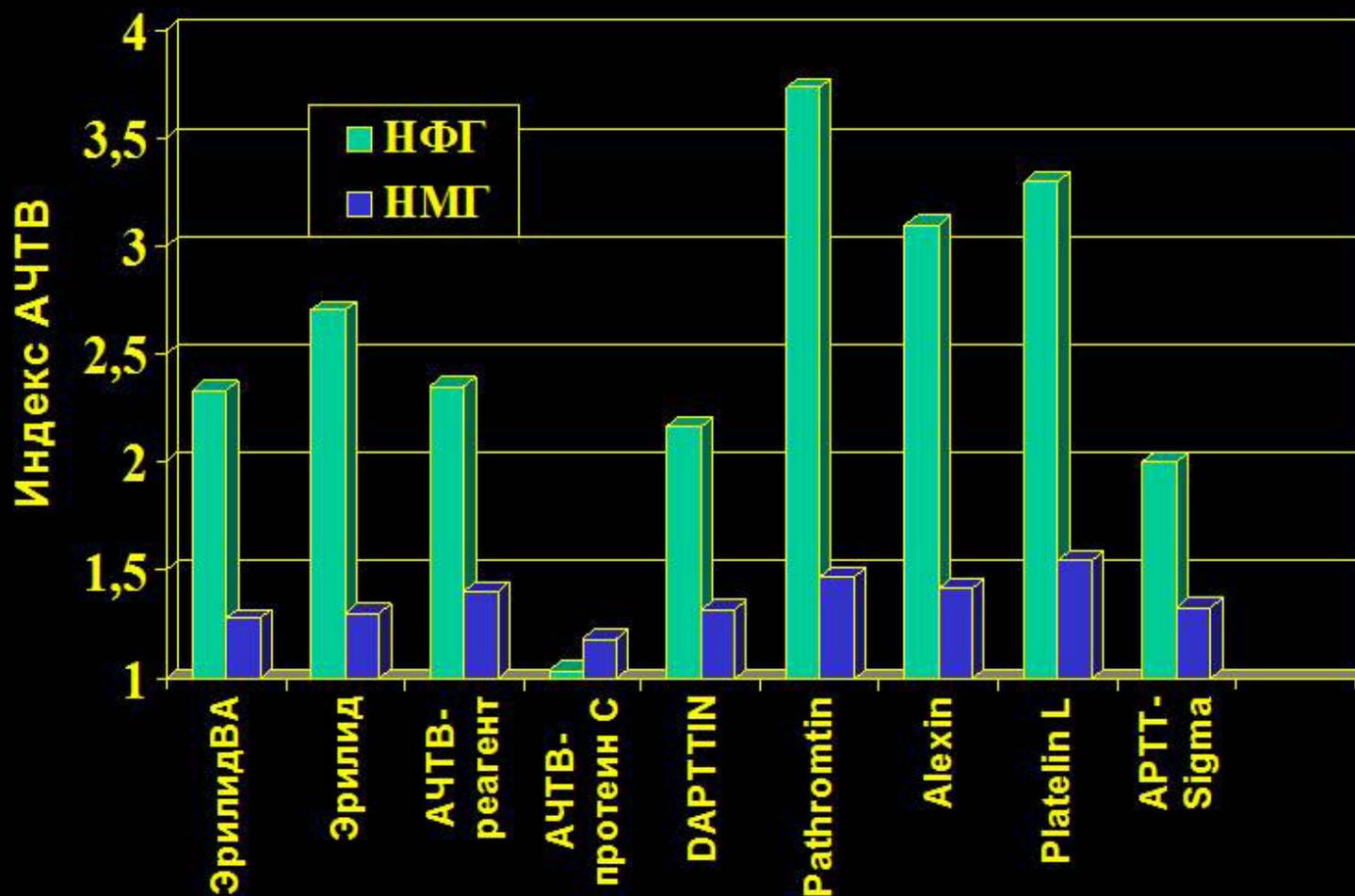
- ✧ Определение АЧТВ
- ✧ Определение тромбинового времени

Прямые методы определения активности гепарина

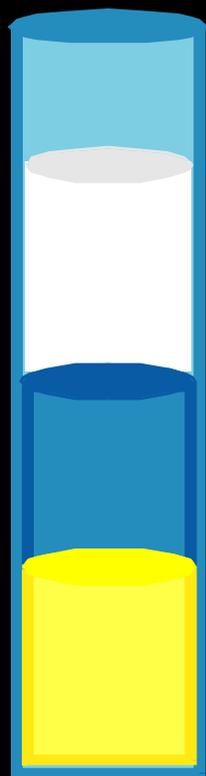
- ✧ Титрование с протамин сульфатом
- ✧ Определение анти Ха активности.

Чувствительность АЧТВ-реагентов к гепарину

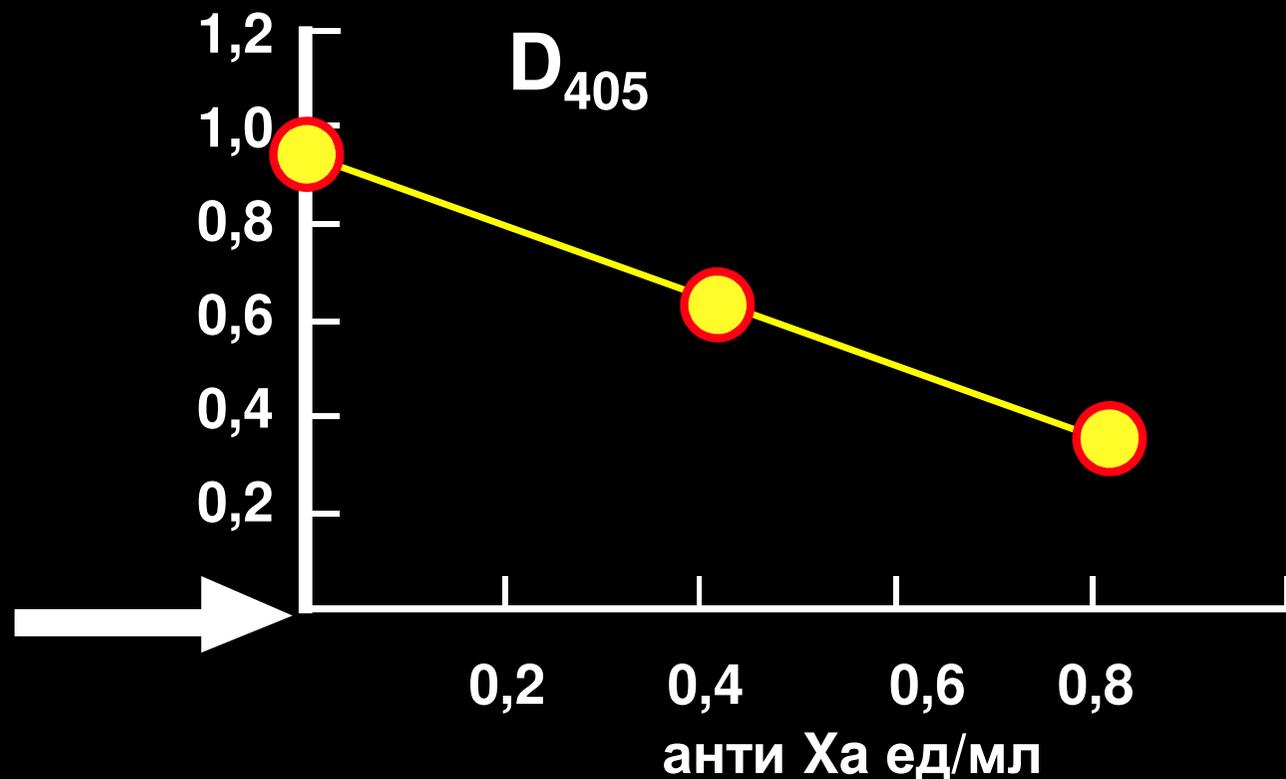
Содержание гепарина в плазме - 0.5 антиХа ед/мл



Анализ НМ гепарина амидолитическим методом



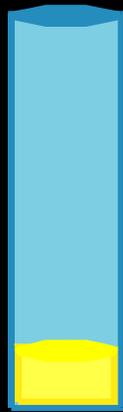
Хромогенный субстрат
АТIII и ф.Ха
(избыток)
Плазма пациента с гепарином



Анализ гепарина клоттинговым методом

Степень удлинения
времени свертывания
пропорциональна
концентрации гепарина

Плазма с
гепарином

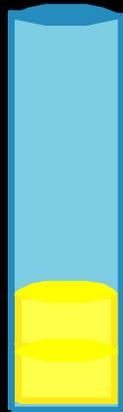


25 µL плазмы
пациента



+
50 µL ф.Ха и
фосфолипиды

Нормальная
плазма -
источник
ATIII

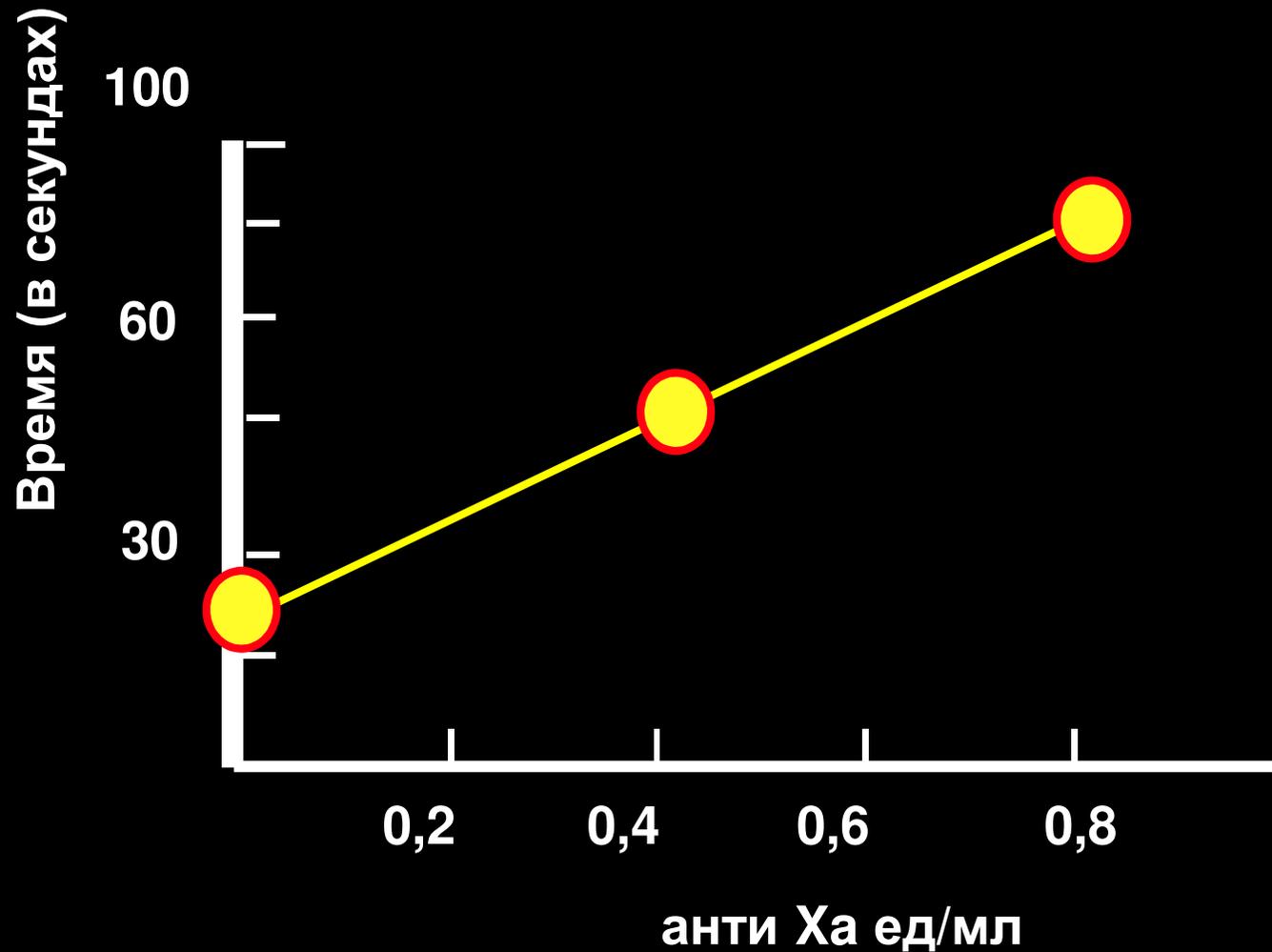


+
100 µL
нормальной
плазмы

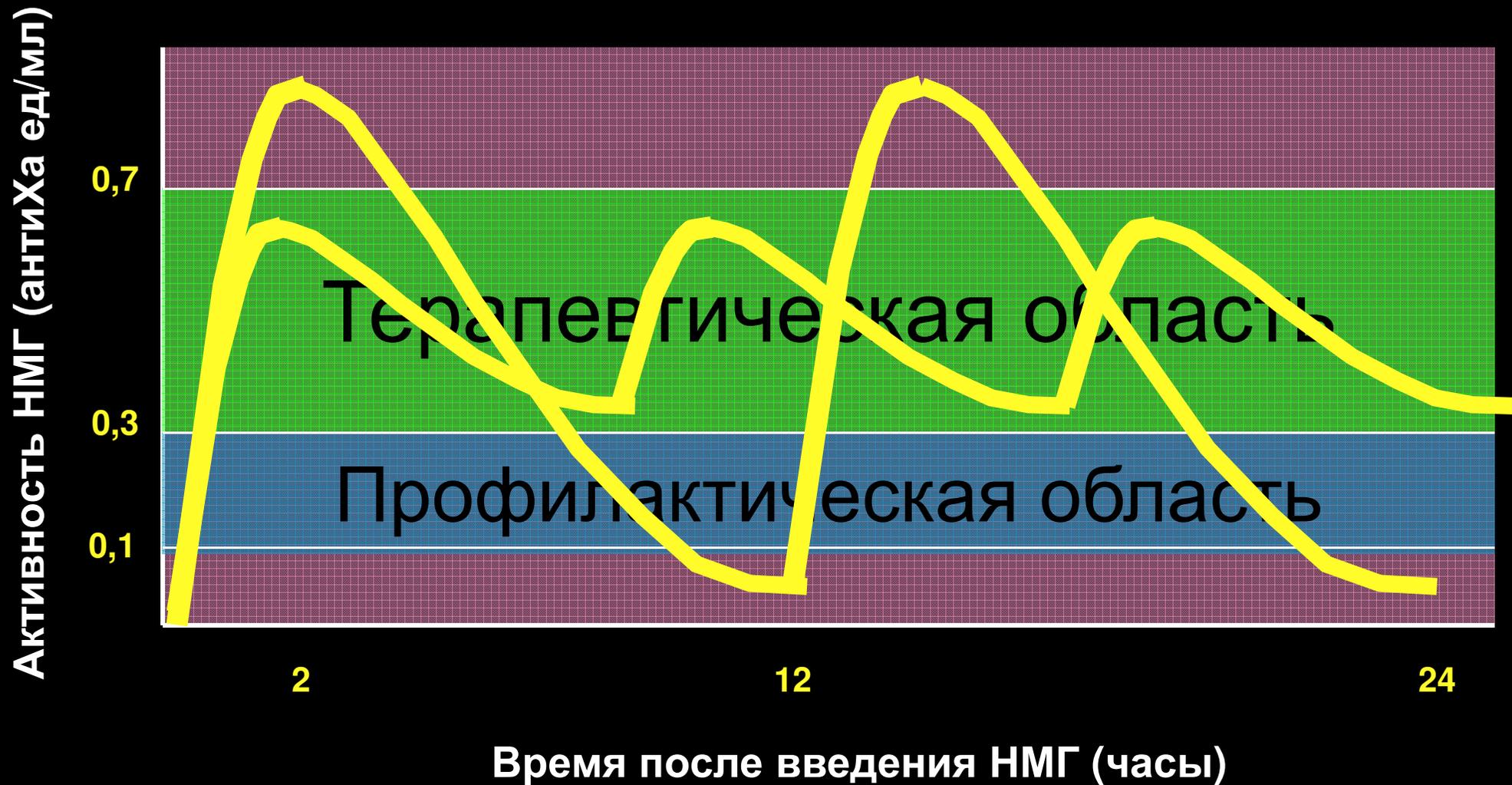


+
50 µL
кальция
хлорида

Анализ гепарина клоттинговым методом



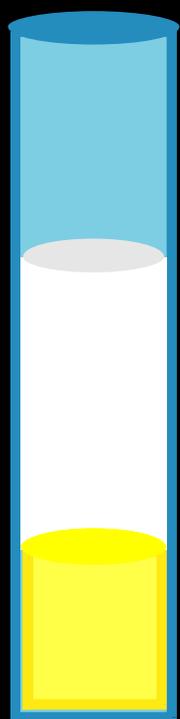
Клинический случай



Реагенты НПО Ренам для контроля гепаринотерапии

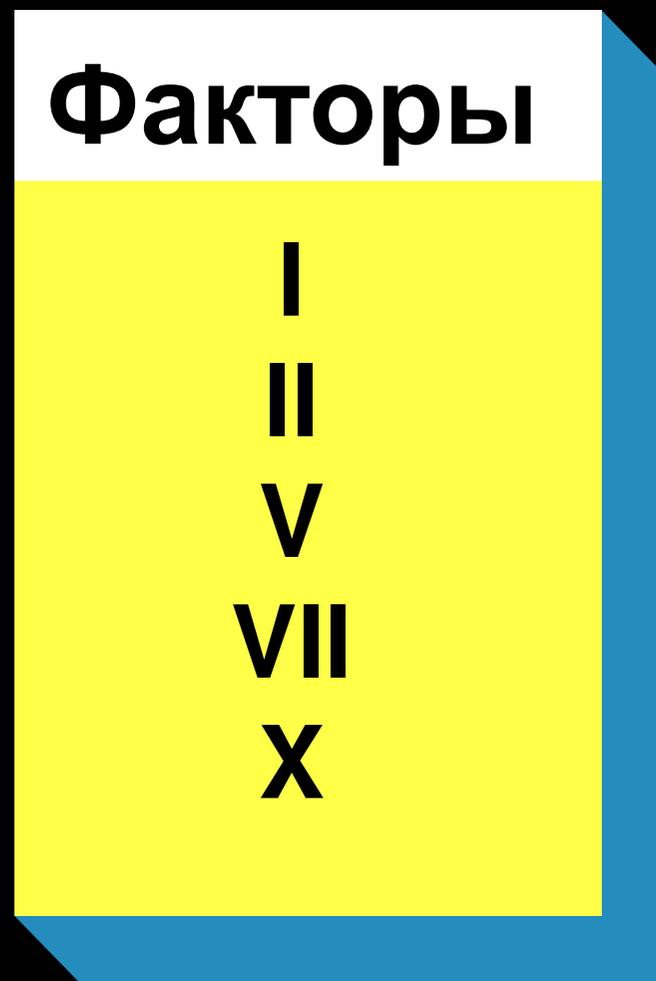
Код	Наименование, краткое описание и состав наборов и отдельных реагентов.	Кол-во опред
ГП-1	Реахром-Гепарин - набор реагентов для определения анти-Ха активности гепарина оптическим методом в плазме крови для мониторинга гепаринотерапии. Состав набора: антитромбин III (1мл) - 2 фл., фактор Ха (2 мл) – 2 фл., хромогенный субстрат (2 мл) – 2 фл., концентрат буфера (5 мл) – 1 фл.	20-100
ГП-2	Реаклот-Гепарин – набор реагентов для определения анти-Ха активности гепарина коагулологическим методом в плазме крови для мониторинга гепаринотерапии. Состав набора: смесь фактора Ха с фосфолипидами (2мл) – 2 фл., субстратная плазма (2 мл) – 2 фл., раствор CaCl₂ (5 мл) – 1 фл.	40-80
ГП- 3	Набор плазм-калибраторов для определения анти-Ха активности гепарина. Состав набора: плазмы-калибраторы (3 уровня активности гепарина)	6x1 мл
ГП- 4	Набор контрольных плазм для определения анти-Ха активности гепарина. Состав набора: контрольная плазма (2 уровня активности гепарина)	6x1 мл
ГП- 5	Набор плазм для контроля гепаринотерапии с помощью АЧТВ и ТВ. Состав набора: контрольная плазма (2 уровня активности гепарина)	6x1 мл
ГП- 6	Ренапарин-Тест. Набор реагентов для определения анти-Ха и анти-IIa активности низкомолекулярного гепарина (в препаратах и субстанциях).	100

Протромбиновое время – тест для исследования патологии внешнего пути



Тромбопластин
и кальций

Плазма
пациента



Факторы

I

II

V

VII

X

Способы выражения результатов определения ПВ

- продолжительность протромбинового времени в секундах;
- ПО – отношение ПВ плазмы пациента к ПВ нормальной 100% плазмы;
- ПИ - процентное отношение ПВ нормальной плазмы к ПВ плазмы пациента;
- процент протромбиновой активности (по Квику);
- МНО - единый показатель результата определения ПВ для контроля уровня гипокоагуляции, $MNO = (ПО)^{MIC}$, где МИЧ – международный индекс чувствительности, характеристика тромбопластина.

Стандартизация определения протромбинового времени

- В тесте протромбиновое время по Квику (Quick, 1935 г.) строится калибровочный график с использованием разведений плазмы-калибратора
- Для вычислений вручную используют линелизацию графика в координатах «1/% протромбина – время свертывания»

Определяют ПВ в исследуемых образцах и по графику рассчитывают процент протромбина по Квику.



Стандартизация определения протромбинового времени

- Метод определения МНО принят ВОЗ в 1983 г. и введен в клиническую практику, чтобы стандартизовать результаты ПВ.
- Введение принципа калибровки тромбопластинов по МИЧ позволяет учитывать чувствительность тромбопластина.
- Всемирная организация здравоохранения рекомендует использовать определение МНО при контроле терапии оральными антикоагулянтами*.

* WHO Expert Committee on Biological Standardization Guidelines for Thromboplastins and Plasma Used to Control Oral Anticoagulant Therapy. WHO Technical Report Series no. 889. Geneva: WHO, 1999: 64-93



Метрологическая прослеживаемость

Обязательное требование к калибровочным и
ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ лабораториям!

Первичные Международные Стандарты (WHO International Standart), используемые НПО «Ренам» для подготовки вторичных (опорных и рабочих) производственных эталонов - как начало работы над выпуском Национальных стандартов Российской Федерации

**2 International Standart Thrombin Human NIBSC code
01/580**

**Thromboplastin, rabbit, plain, lyophilized. International
Sensitivity Index: 1.0.HO/BS/95.1796**

**WHO International Standart:
2 IS for Fibrinogen Plasma**

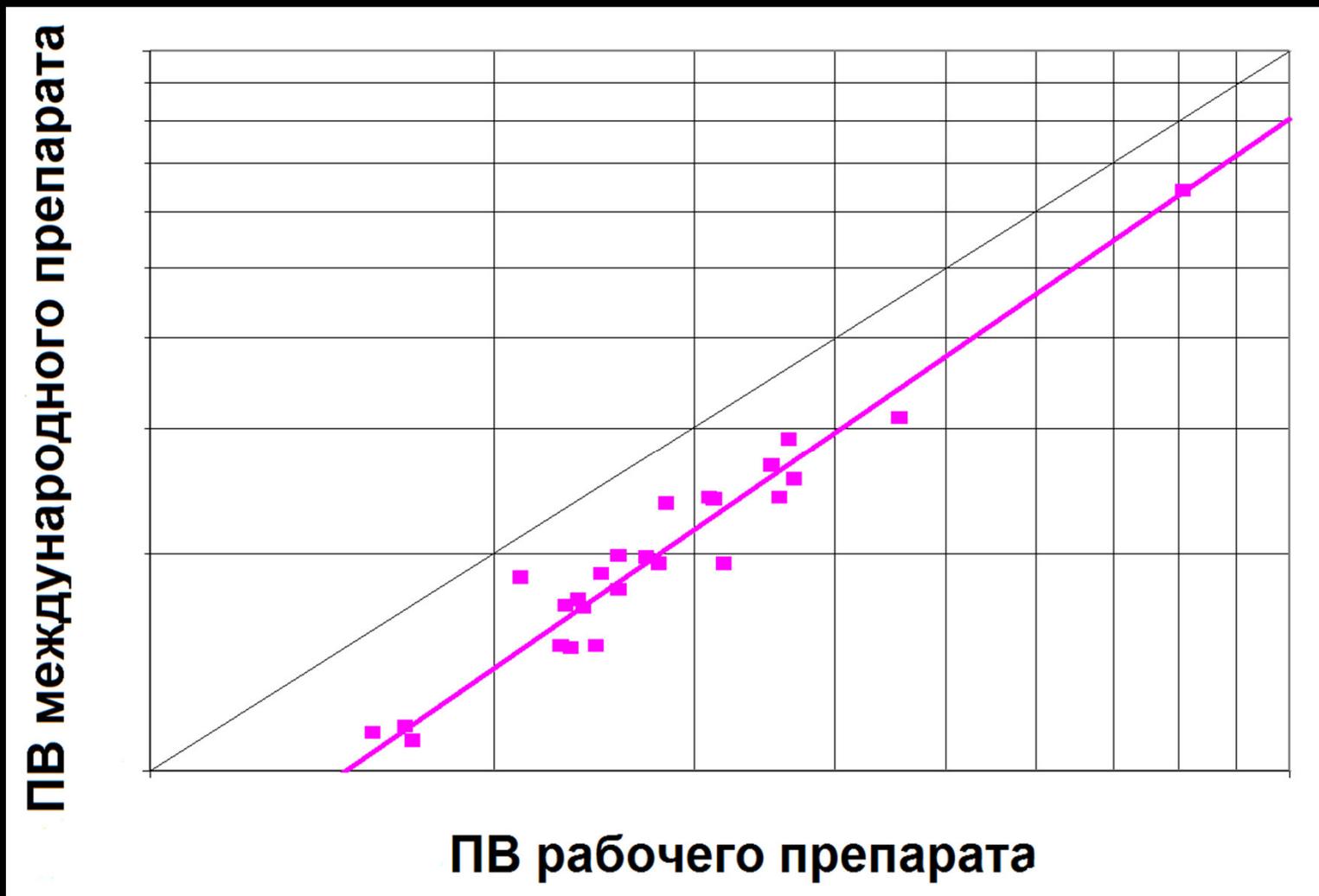
**2 International Standart Antithrombin plasma
NIBSC code 93/768**

Источники ошибок при определении МНО

$$МНО = (ПВ / ПВ_{100\%})^{МИЧ}$$

- Погрешность определения МИЧ производителями тромбопластинов.
- Неточность определения ПВ плазмы пациентов (преаналитический и аналитический этапы).
- Ошибки при определении $ПВ_{100\%}$.
- Зависимость МИЧ от используемого прибора.

Определение МИЧ



ВОЗ рекомендует использование тромбопластинов с МИЧ 0.9-1.7, однако более низкие значения МИЧ из этого диапазона предпочтительнее.

Преаналитический этап

- Подготовка проб для анализа:
 - Взятие крови
 - Получение плазмы
- Доставка и хранение образцов.
- Выбор тест-систем для анализа.
- Строгое соблюдение инструкции, прилагаемой к тест-системе.

ВОЗ, ISTH, CLSI/NCCLS рекомендуют использовать в роли антикоагулянта 0,105-0,109 М раствор Na_3Cit

Концентрации цитрата натрия

- Национальным Комитетом Клинических Лабораторных стандартов (NCCLS) рекомендовано применение $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ с конц. 0,109 или 0,129 М (3,2% и 3,8% соответственно)
- Европейский Комитет Клинических Лабораторных Стандартов (ECCLS) считает целесообразным использование цитрата натрия в диапазоне концентраций 0,100-0,120 М.
- По мнению Института Клинических Лабораторных Стандартов (CLSI) предпочтительно применение 3,2% (0,109 М) цитрата натрия.

Аналитический этап

- Наличие калибраторов и контрольных образцов.
- Строгое соблюдение температуры проведения анализа.
- Правильность разведения калибраторов, контрольных и исследуемых образцов.
 - Предварительная калибровка пипеток
 - Использование только пластиковой посуды.

Определение $PV_{100\%}$

- По ВОЗ: среднее геометрическое PV плазм не менее 20 взрослых здоровых доноров обоих полов.

$$PV_{100\%} = \sqrt[n]{PV_1 \cdot PV_2 \cdot \dots \cdot PV_n}, n \geq 20$$

- Для конкретных измерительных систем «прибор-реагент» можно использовать $PV_{100\%}$, указанное производителем.

Определение $PV_{100\%}$

Клинико-диагностическим лабораториям рекомендуется использовать для определения значения $PV_{100\%}$ плазму-калибратор.

При этом значение $PV_{100\%}$ рассчитывают по формуле

$PV_{100\%} = PV_K / PO_K$, где PV_K – протромбиновое время плазмы-калибратора (определяется одновременно с исследуемым образцом); PO_K – протромбиновое отношение плазмы-калибратора (указано в паспорте на плазму).

Пример: PV плазмы-калибратора – 15,4 сек; аттестованное PO плазмы-калибратора по паспорту – 0,98.

В этом случае $PV_{100\%} = 15,4 / 0,98 = 15,71$.

Калибровка измерительной системы

Доказано, что значение МИЧ одного и того же тромбопластина может различаться не только для разных типов коагулометров, но даже для одной модели прибора в разных лабораториях.



С целью контроля правильности определения МНО в лабораториях ISTH* рекомендует проводить собственную калибровку измерительной системы «прибор-реагент» с использованием аттестованных плазм!

* Van den Besselaar, A.M.H.P., T.W. Barrowcliff, L.L. Houbouyan-Reveillard, J. Jespersen, M. Johnston, L. Poller and A. Tripodi: On Behalf of the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH: Guidelines on Preparation, Certification, and use of Certified Plasmas for ISI Calibration and INR Determination, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2: 1946 – 1953, 2004.

Способы внутрилабораторной калибровки измерительной системы

1) Определение МИЧ тромбопластина для конкретной измерительной системы «прибор-реагент».

Основано на методике определения МИЧ тромбопластина, предложенной ВОЗ, или с помощью аттестованных плазм-калибраторов (трудоемкий метод)

2) «Прямое» определение МНО по калибровочному графику ПВ/МНО.

Контроль правильности определения МНО*

- Контроль определения МНО должен проводиться в каждой лаборатории. Для его проведения необходим набор аттестованных плазм (не менее 3, МНО=1,5-4,5).
- Для всех трех плазм определяют МНО по стандартной схеме. Каждое определение МНО повторяют как минимум дважды в каждый из дней (не менее 2). Разница определения МНО в течение одного дня и в разные дни не должна превышать 10%.

* Procedures for Validation of INR and Local Calibration of PT/INR Systems: Approved Guideline; CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) Document H54-A, Vol 25, No. 23, Replaces H54-P, Vol 24, No. 30 (formerly NCCLS), 2005

Контроль правильности определения МНО

- Если полученные значения МНО не укладываются в диапазон **МНО (указанное производителем) ± 15% (CLSI)**, результаты измерений не могут считаться достоверными!
Например, для плазмы с МНО=1,75 (по паспорту) результат измерения МНО должен укладываться в диапазон $1,75 \pm 1,75 \times 0,15 = 1,75 \pm 0,26$, т.е. 1,49-2,01
- Процедура проверки должна проводиться для всех приборов, используемых в лаборатории для теста ПВ.
- Контроль необходим каждый раз при смене реагента, партии реагента, прибора или после его ремонта (или не реже 1 раза в год).



НПО «Ренам»

предлагает также все необходимые реагенты, контрольные и калибровочные материалы для проведения коагулологических исследований при антикоагулянтной терапии

- Протромбин – контроль: плазма контрольная для контроля правильности определения МНО при терапии оральными антикоагулянтами (3 уровня: выше-, ниже- и терапевтический уровень) (кат.№ КМ-17, КМ-3 (МНО))
- Протромбин – калибратор: плазма-калибратор для определения МНО, протромбина по Квику (КМ-18)
- Плазмы контрольные, аттестованы по 6 или 20 параметрам (нормальные и патологические) и специфические плазмы.
- Мультикалибратор (кат.№ КМ-16) и специфические калибраторы.



НПО Ренам

- **Постоянный участник Федеральной Системы Внешней Оценки Качества**
- **Поставщик контрольных материалов для ФСВОК**
- **Первая российская фирма, вошедшая в Международную систему внешней оценки качества (программа UK NEQAS for blood coagulation и ECAT Foundation)**
- **Наличие регистрационных удостоверений Росздравнадзора**

НПО «Ренам» - соответствие европейским стандартам



- Продукция Общества больных гемофилией (НПО Ренам): Реагенты для гемостаза зарегистрирована как изделия для лабораторной диагностики *in vitro* под номером NL-CA002-2013-26466.
- Данные медицинские изделия полностью соответствуют требованиям директивы 98/79 - ЕС

Новая продукция НПО

«Ренам»



- Плазма контрольная для контроля правильности определения МНО при терапии оральными антикоагулянтами (3 уровня: выше-, ниже- и терапевтический уровень) (КМ-17)
- Протромбин-калибратор для определения МНО, протромбина по Квику, и ПИ (КМ-18)
- Плазма-мультикалибратор, аттестованная по 16 параметрам системы гемостаза: МНО, фибриноген, АТ III, протеин С, плазминоген, $\alpha 2$ -антиплазмин, фактор Виллебранда, факторы: II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII (КМ-16)

Совместимость с большинством автоматических коагулометров

Instrumentation Laboratory

ACL 200, 7000, 9000/10000,
Top, Elite Pro



Sysmex CA 560, 1500,
CS-2100i



Roche STA Compact
Helena AC 4



Совместимость с полуавтоматическими коагулометрами

- Behnk Elektronik Thrombotimer
- Cormay KG-4
- Dade Behring Fibrintimer II
- Helena CoaDATA 4001
- Tcoag (Roche Diagnostics) Start 4
- Sysmex CA 50
- Tcoag (Trinity Biotech) Amelung KC4 Delta
- Астра АСК-02
- АПГ 2-02 (Минилаб 701,704)
- Biomerieux Option 4 Plus
- TS 4000



Проведение анализа

- ◆ Все анализы должны проводиться как можно быстрее для сведения к минимуму эффекта временного дрейфа
- ◆ Рекомендуемая схема проведения анализа:

S-A-B-C-C-B-A-S

где

A, B и C – тестируемые образцы

S - контрольный образец



НПО «Ренам»

Послепродажная поддержка пользователей



- ✓Обеспечение методической литературой
- ✓Выдача тест-систем для апробации
- ✓Обучение на базе НПО «РЕНАМ»
- ✓Консультации по интерпретации результатов
- ✓Выезд инженера в лабораторию
- ✓Простая подготовка тех.задания – прайс – лист – описание наборов!



НПО РЕНАМ
более 20 лет
успешной
работы