

НПО «Ренам»

Внутрилабораторный контроль качества коагулологических исследований при антикоагулянтной терапии

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



07.07.2014

г. Петрозаводск

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),
- 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	Средняя 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 (<i>антитромботическое действие не зависит от присутствия в плазме крови антитромбина III</i>)	гирудин, бивалирудин (гирулог), аргатробан, ксимелогран, дабигатран
непрямые или селективные ингибиторы фактора Ха (<i>антитромботическая активность является результатом селективного угнетения фактора Ха, опосредованного антитромбином III</i>)	Фондапаринукс (Арикстра – “идеальный” гепарин), идрапаринукс, идрабиотапаринукс
прямые ингибиторы фактора Ха (<i>прямые, специфичные, конкурентные ингибиторы ф. Ха</i>)	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



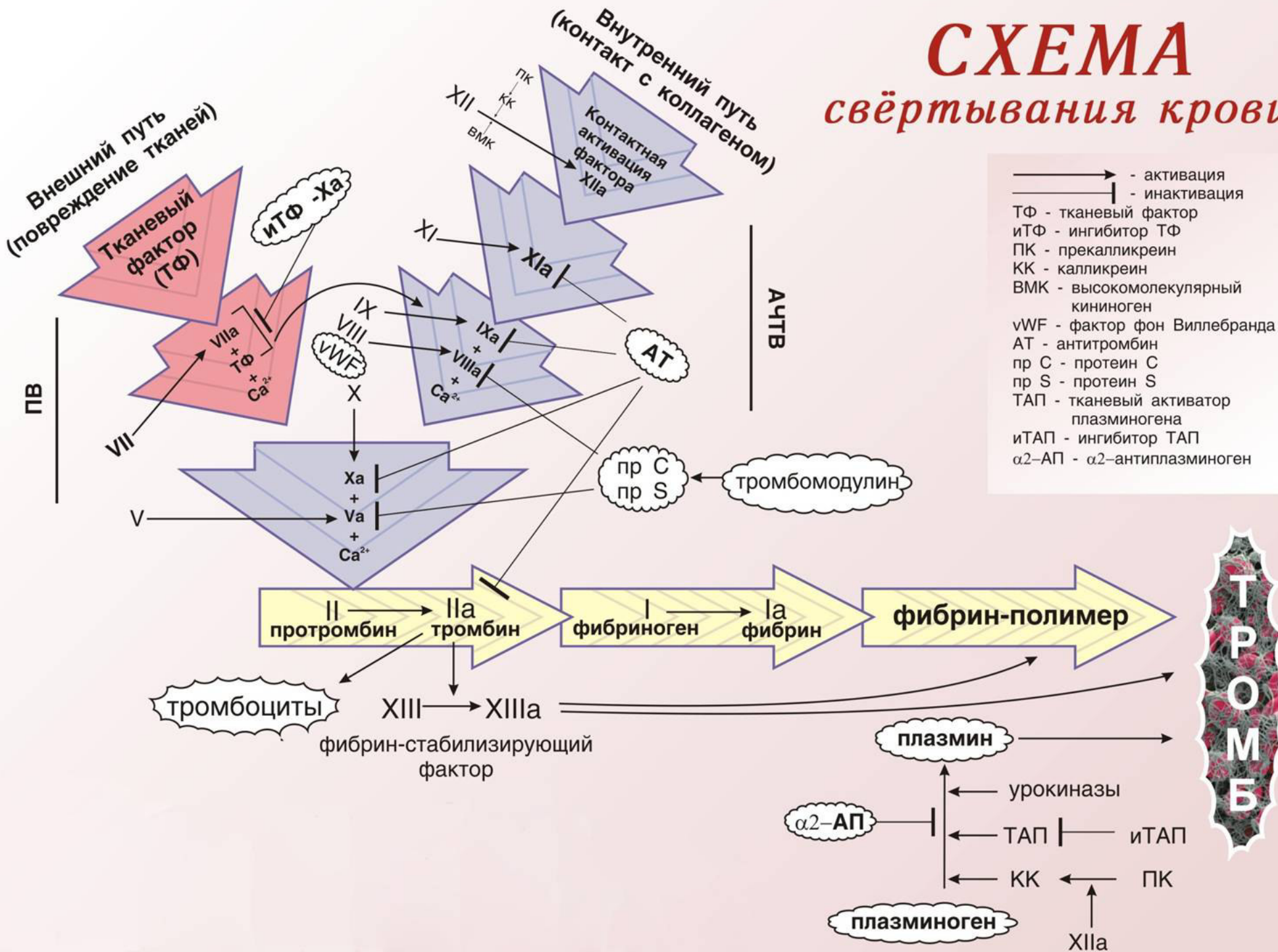
Сравнение новых антикоагулянтов с варфарином

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
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

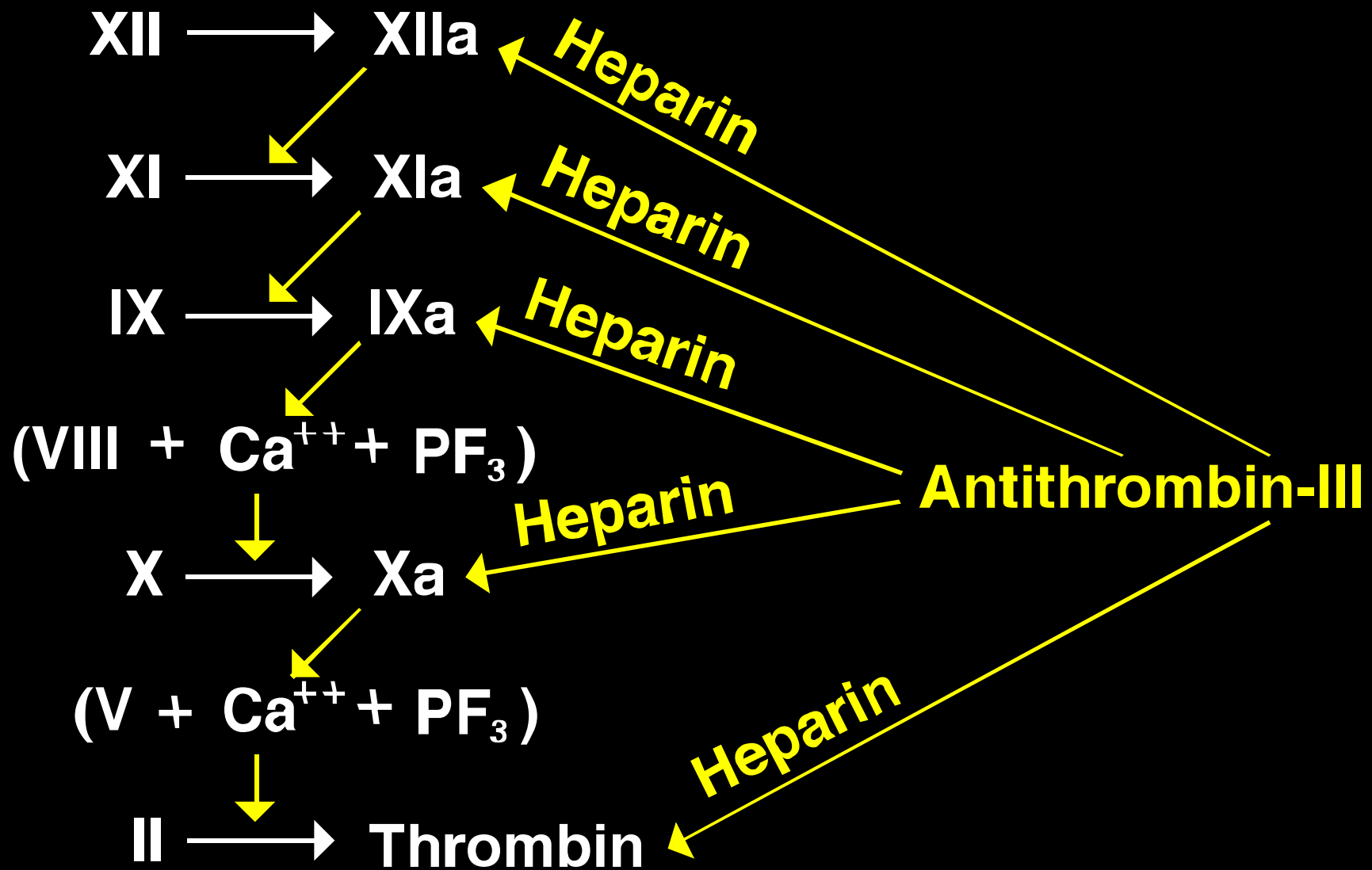
СХЕМА свёртывания крови



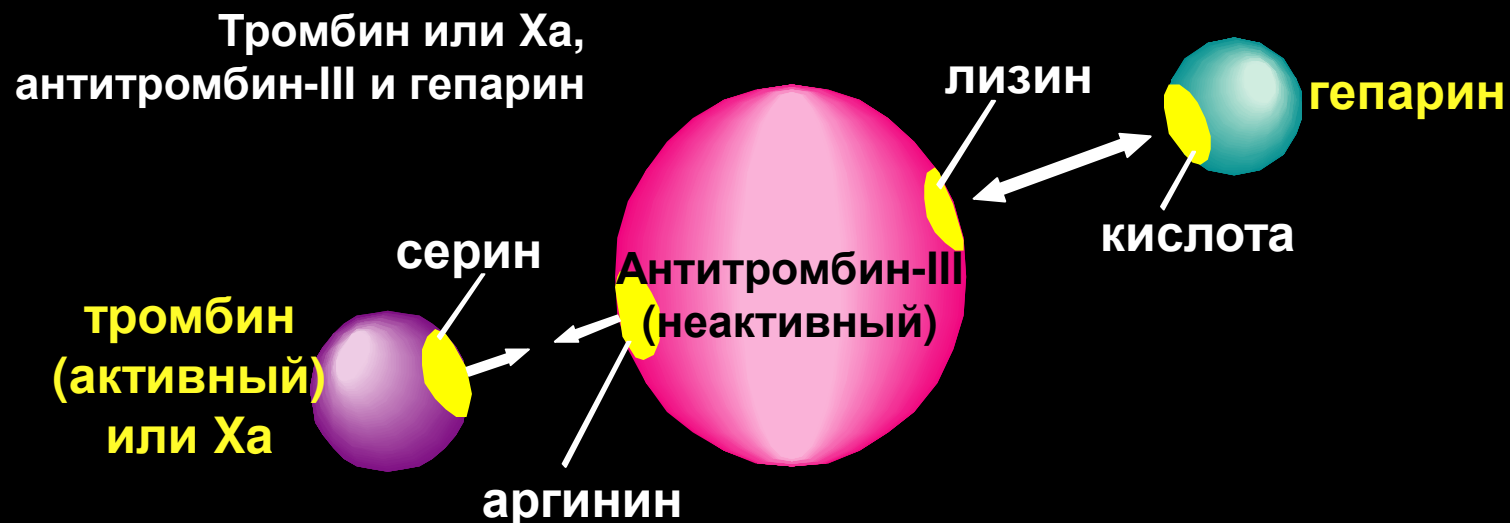
Основные Факторы свертывания

- **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:**
 - ✓ Реахром-АТIII
 - ✓ Реаклот-АТIII тест (клоттинговый тест по Абельгаард)
 - ✓ 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

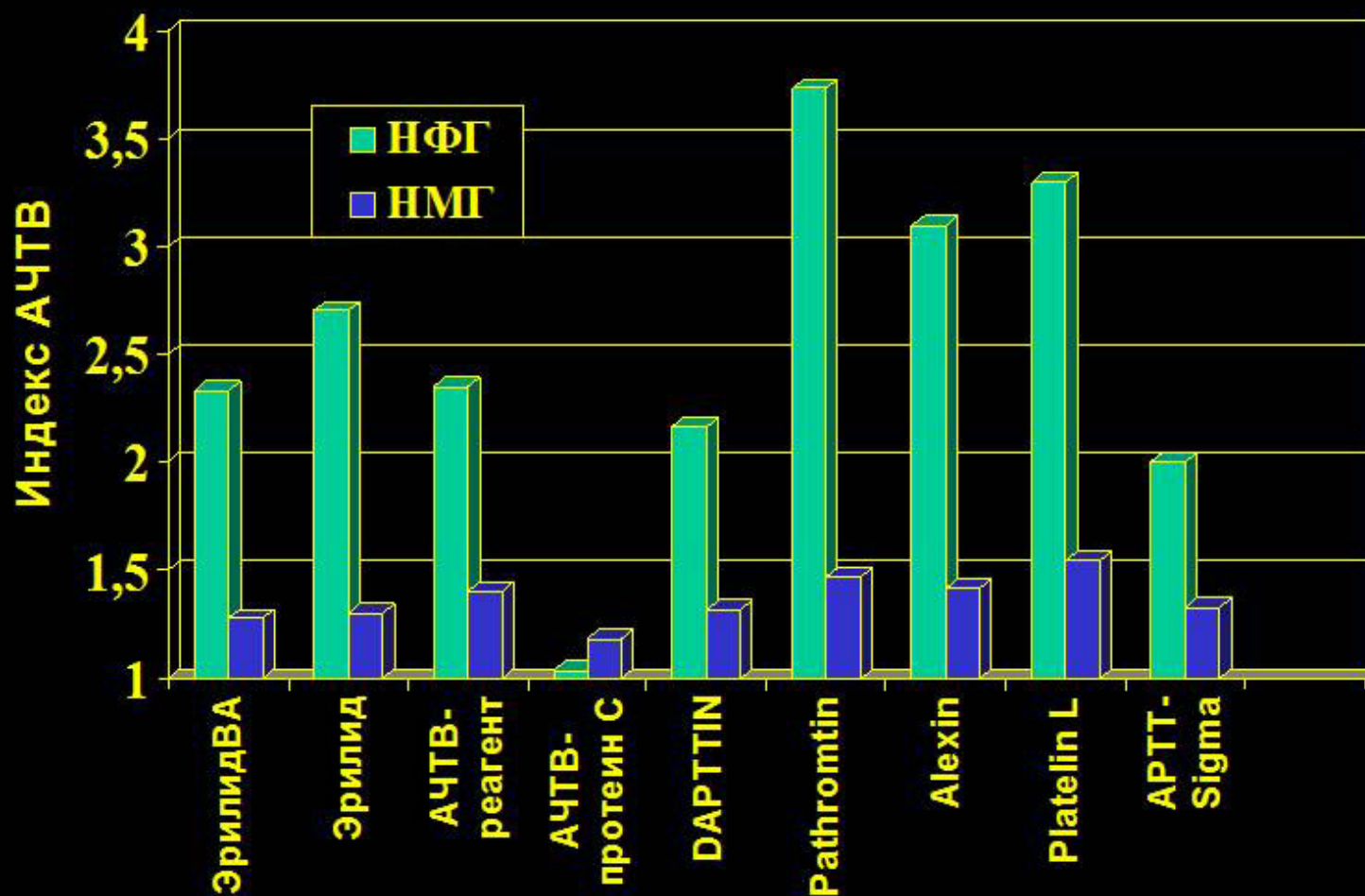
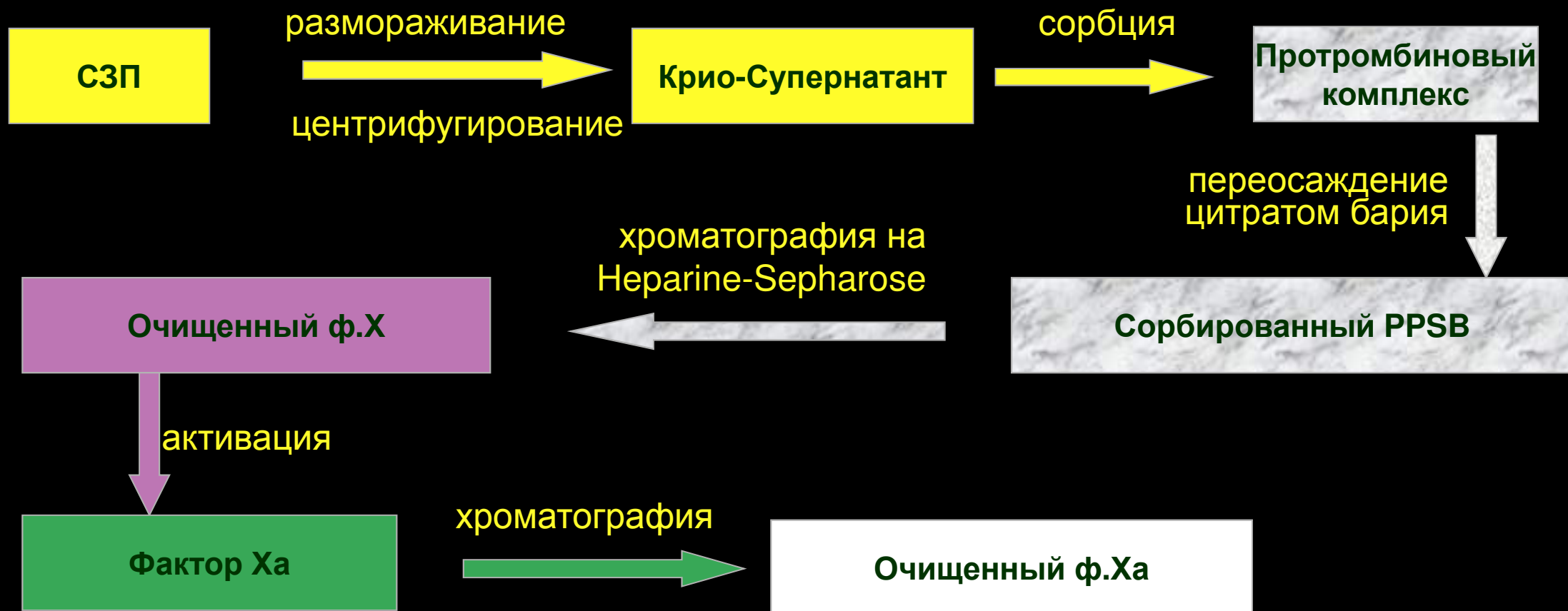


Схема получения фактора Ха



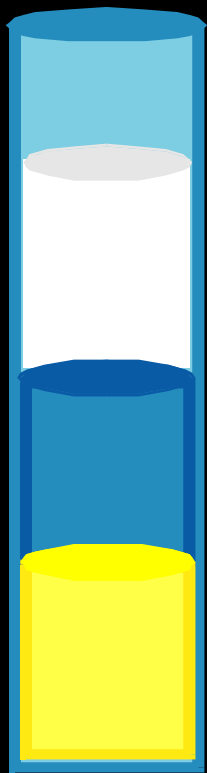
Фактор очистки - 2500

розлив
лиофилизация

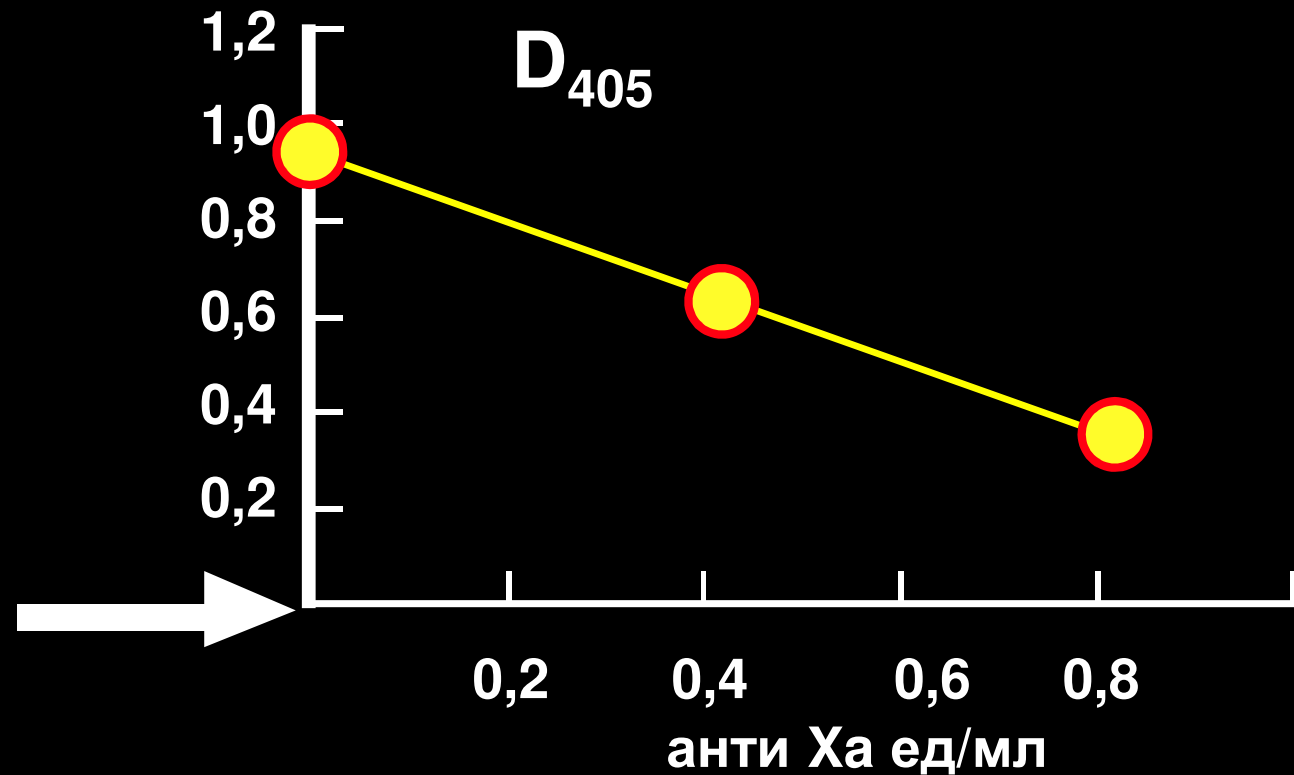
Схема получения антитромбина III



Анализ НМ гепарина амидолитическим методом



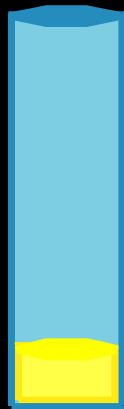
Хромогенный субстрат
АТIII и ф.Ха
(избыток)
Плазма пациента с гепарином



Анализ гепарина КЛОТТИНГОВЫМ МЕТОДОМ

Степень удлинения
времени свертывания
пропорциональна
концентрации гепарина

Плазма с
гепарином

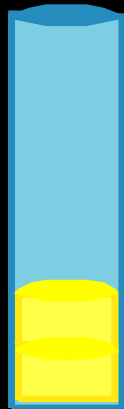


25 µL плазмы
пациента



+
50 µL ф.Ха и
фосфолипиды

Нормальная
плазма -
источник
ATIII

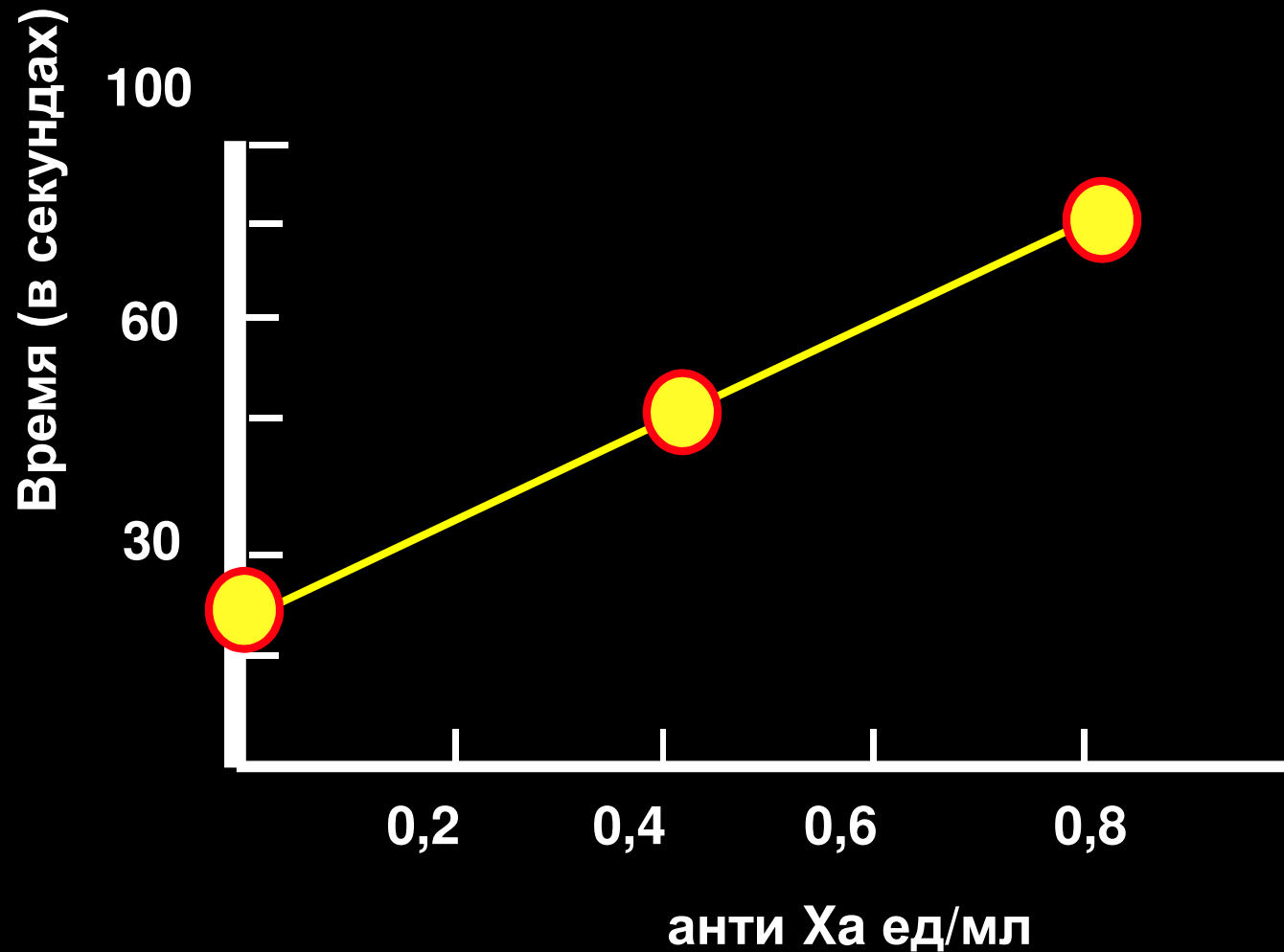


+
100 µL
нормальной
плазмы

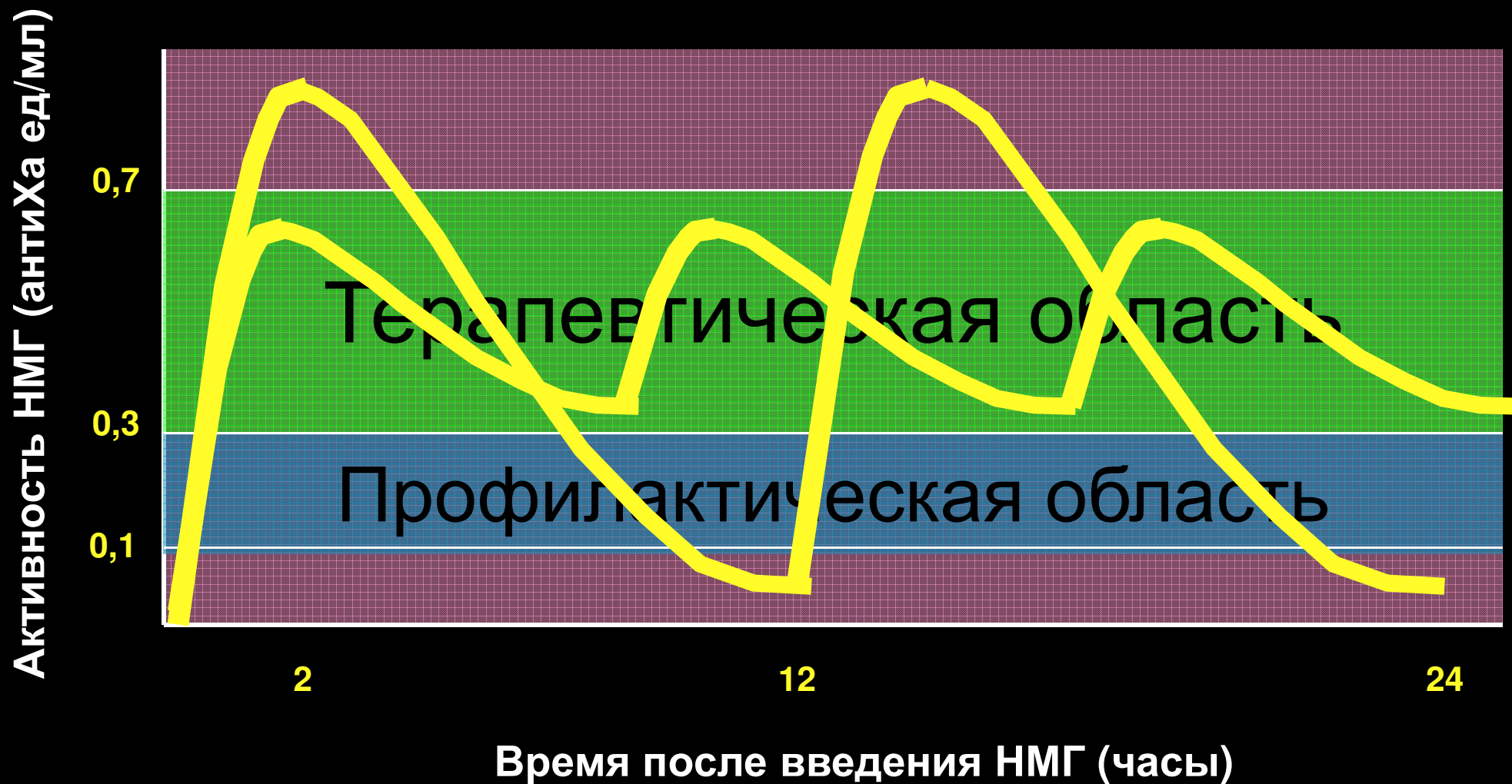


+
50 µL
кальция
хлорида

Анализ гепарина клоттинговым методом



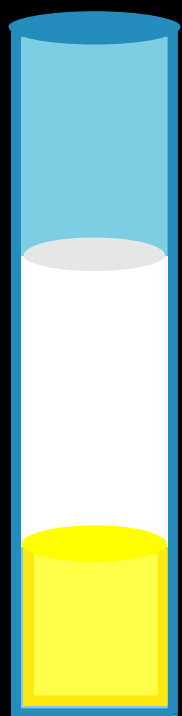
Клиническое наблюдение



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

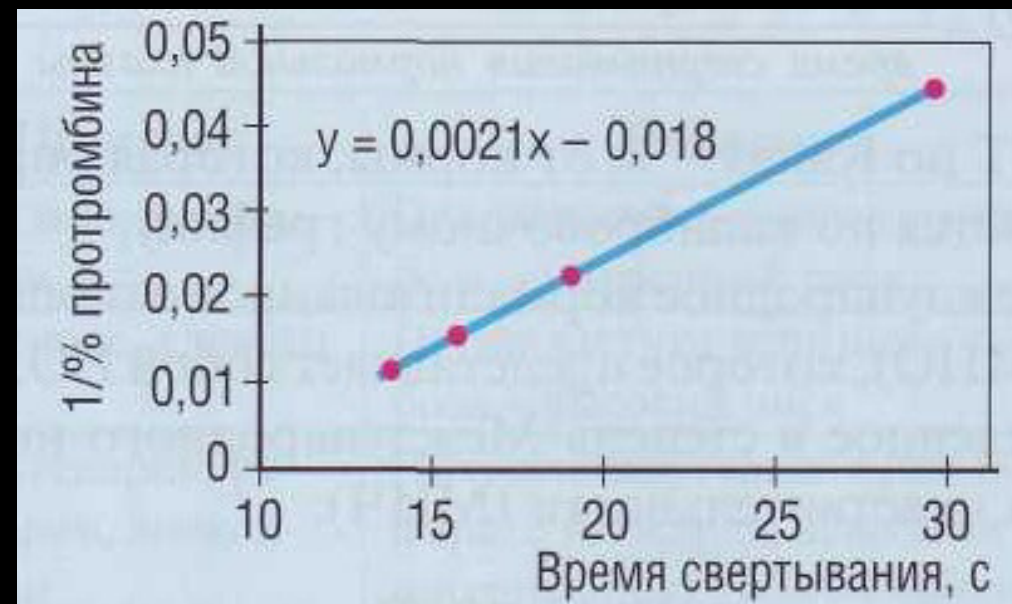
Способы выражения результатов определения ПВ

- 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

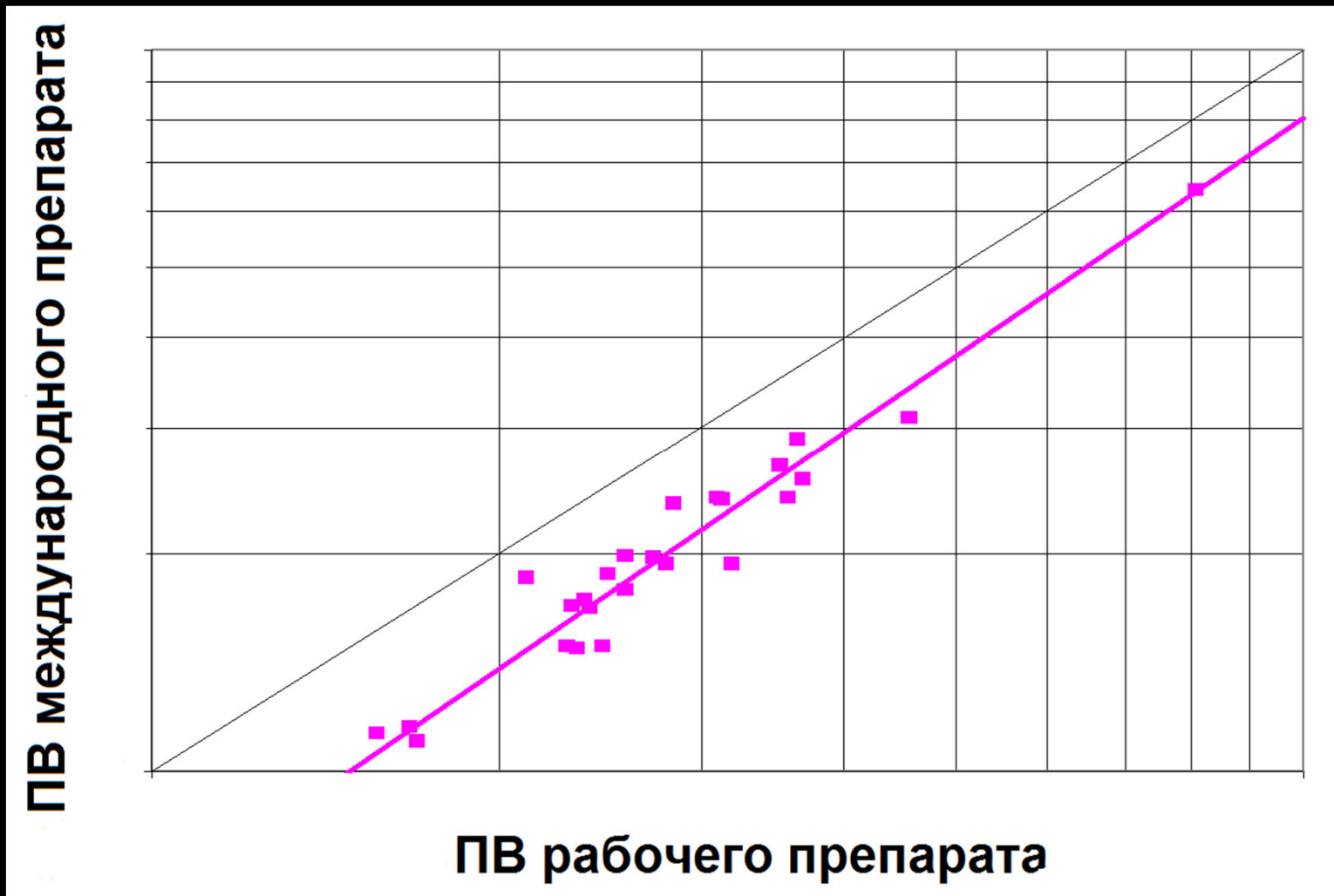


Источники ошибок при определении МНО

$$MHO = (PV/PV_{100\%})^{MIЧ}$$

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

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.

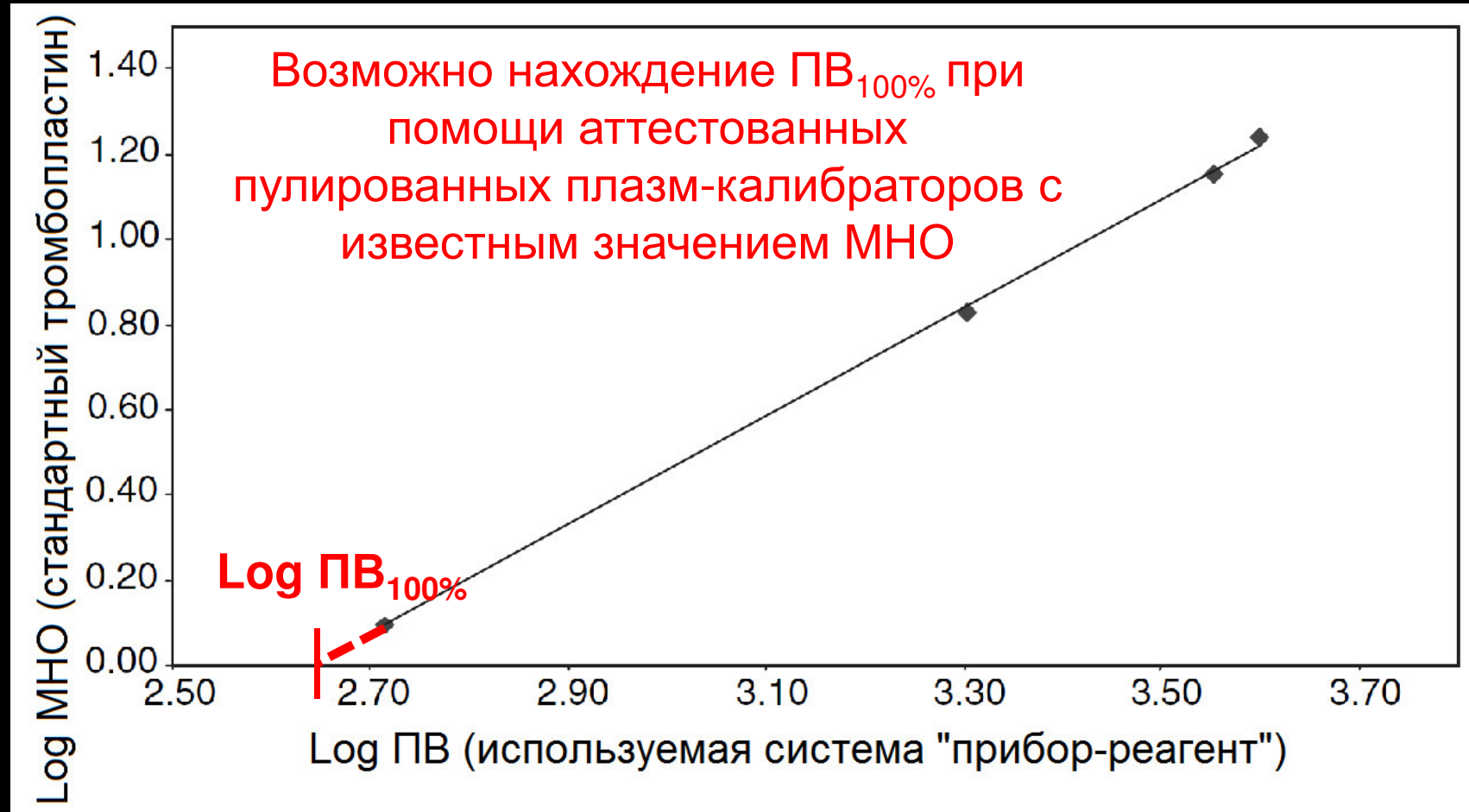
Определение $PV_{100\%}$

- 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 $PV_{100\%}$



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

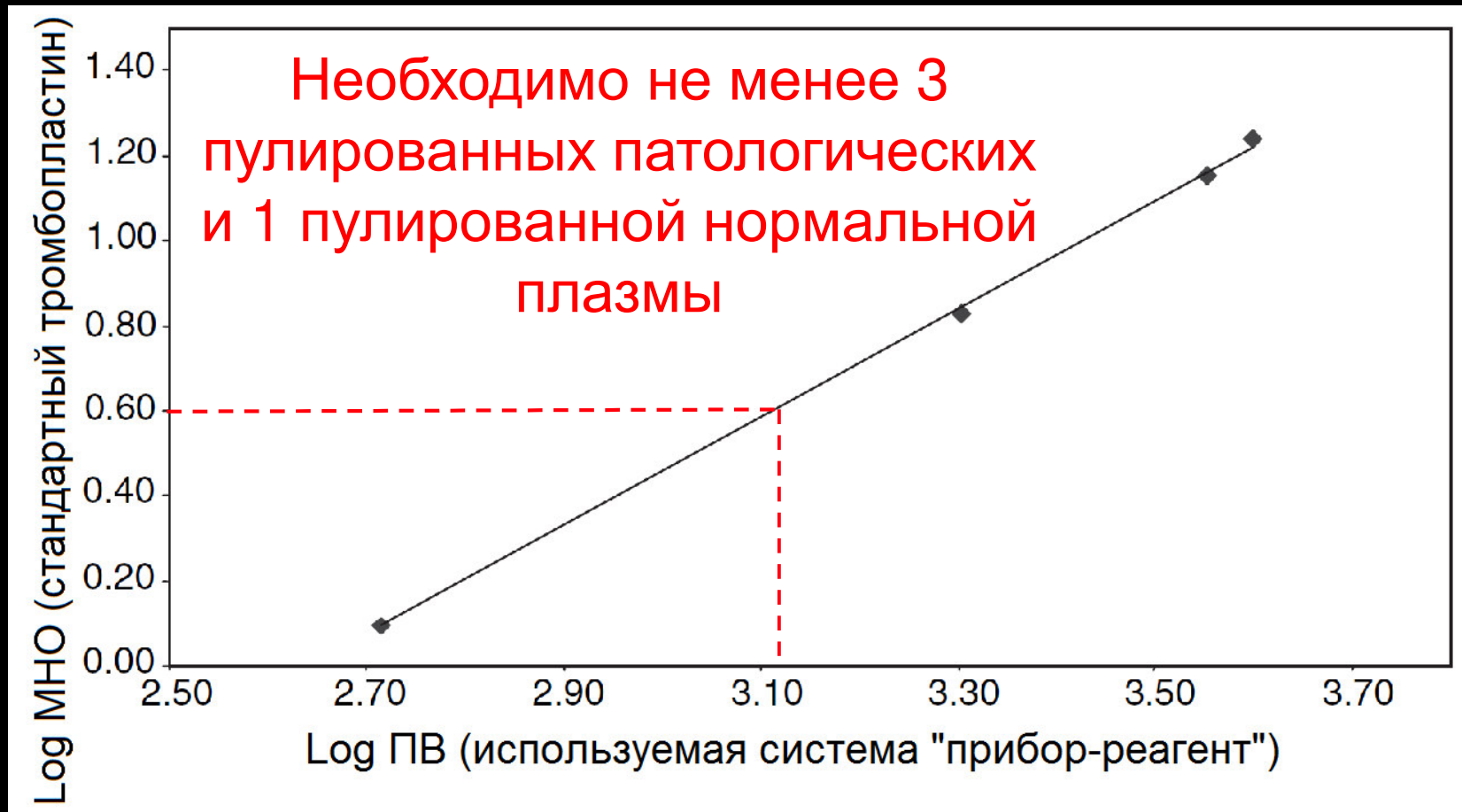
1) Определение МИЧ тромбопластина для конкретной измерительной системы «прибор-реагент».

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.

«Прямое» определение МНО

- Калибровочная кривая \ln (МНО, указанное производителем) - \ln (ПВ измеренное).
- Значение МНО исследуемой плазмы находят напрямую по калибровочной линии.



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)
- 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**

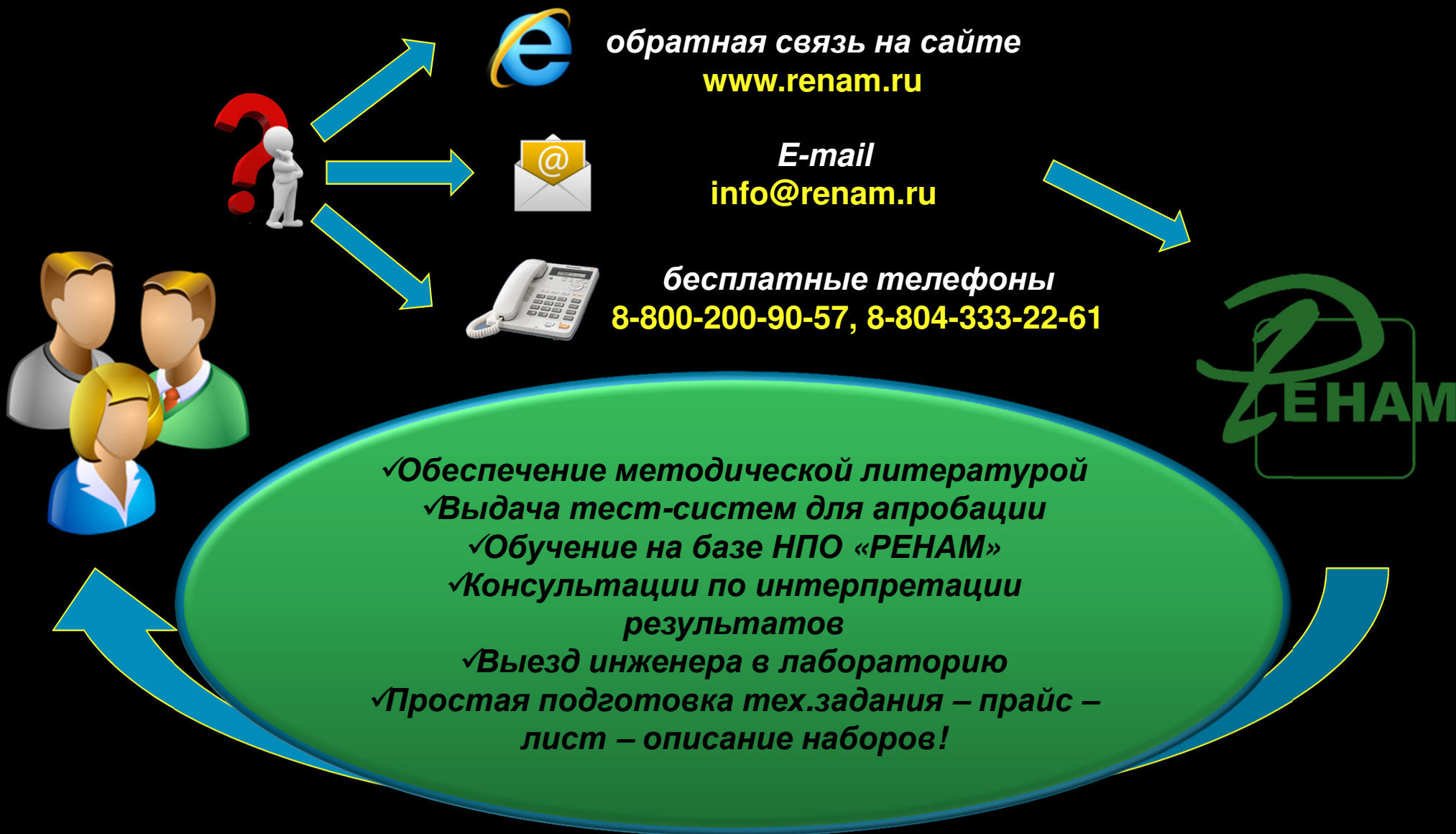
НПО «Ренам» - соответствие европейским стандартам



- 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

НПО «Ренам»

Послепродажная поддержка пользователей





НПО РЕНАМ
более 20 лет
успешной
работы