

Міністерство охорони здоров'я України
Національна академія медичних наук України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи

«Узгоджено»
Начальник Державного
організаційного управління
НАМН, професор
В.В. Лазаренко

«Узгоджено»
В. о. директора Медичного
Департаменту МОЗ України
В.В. Кравченко

« 19 » 10 2015

« » _____ 2015

**ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФАКТОРІВ
VIII ТА IX ПРИ ОБСТЕЖЕННІ ПАЦІЄНТІВ
ЗІ СПАДКОВИМИ КОАГУЛОПАТІЯМИ**

(методичні рекомендації)

(118.15/239.15)

Установи-розробники:

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»
КЗОЗ «Харківський обласний центр служби крові» МОЗ України

Установа-співрозробник:

Харківський національний медичний університет МОЗ України

Автори:

Тимченко А.С.	д. мед. н., професор	(044) 440-27-44
Семеняка В.І.	к. біол. н.	(044) 440-75-66
Юценко П.В.	к. мед. н.	(044) 440-75-66
Яворський В.В.	к. мед. н.	(057) 337-85-01
Малигон О.І.	к. мед. н.	(057) 337-33-96
Гончаренко В.І.		(057) 337-85-55
Новікова І.В.	к. мед. н.	(057) 705-02-62
Гавриш Л.О.		(057) 337-85-55
Богданчикова О.А.	к. біол. н.	(057) 337-33-96

Рецензент:

д. біол. н., професор Ж.М. Мінченко

Голова Експертної проблемної комісії

«Гематологія та трансфузіологія» МОЗ та НАМН України:

член-кореспондент НАМН України, д. мед. н., професор В.Г. Бебешко

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	4
Вступ.....	5
1. Особливості визначення активності факторів згортання крові VIII та IX.....	7
1.1. Принципи визначення активності факторів згортання крові VIII та IX.....	7
1.2. Забезпечення якості на переданалітичному етапі.....	8
1.2.1. Підготовка пацієнта.....	8
1.2.2. Підбір осіб до референтної групи.....	8
1.2.3. Правила взяття венозної крові для аналізу та підготовки зразків плазми.....	10
1.2.4. Вимоги до заповнення супровідної документації.....	13
1.2.5. Забезпечення якості досліджень на аналітичному етапі.....	13
1.2.6. Подолання типових помилок дослідження.....	14
2. Матеріали і методи.....	15
2.1. Обладнання, яке використовується для визначення активності факторів одностадійним методом.....	15
2.2. Реагенти для визначення активності факторів VIII та IX.....	16
3. Процедура визначення активності факторів VIII та IX у пацієнтів із гемостазіопатіями.....	17
3.1. Визначення активності факторів VIII та IX за допомогою аналізатора показників гемостазу «АПГ4-02П».....	17
3.2. Визначення активності факторів VIII та IX за допомогою аналізатора згортання крові 2-канального АСКА 2-01-«Астра».....	19
3.3. Інтерпретація отриманих даних.....	20
4. Приклади визначення АЧТЧ та активності факторів згортання.....	21
Висновки.....	22
Перелік рекомендованої літератури.....	23
Додаток.....	24

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФ VIII/IX	— активність факторів VIII та IX
АЧТЧ	— активований частковий тромбопластиновий час
БТП	— безтромбоцитна плазма
ЗГТ	— замісна гемостатична терапія
ЗОЗ	— заклади охорони здоров'я
КДЛ	— клініко-діагностична лабораторія
АПТЧ	— активований протромбіновий час
СЯ	— система якості
СОП	— стандартна операційна процедура
ТП	— тромбоцитна плазма
ЄС	— Європейський Союз
CV	— коефіцієнт варіації
σ	— середньоквадратичне відхилення
ЛЗ	— лікарські засоби

ВСТУП

Гемофілія — захворювання, яке при неналежному лікуванні спричиняє значні ускладнення, що знижують якість життя хворих, обмежують їх дієздатність та навіть призводять до інвалідизації або смерті.

Основним і адекватним аспектом медичної допомоги є своєчасне та терапевтично ефективно застосування лікарських засобів (ЛЗ) дефіцитних факторів згортання крові — замісна гемостатична терапія (ЗГТ), яка здійснюється в режимі профілактики, або «за вимогою».

Проведення ЗГТ дозволяє значно покращити якість життя хворих на гемофілію та зменшити частоту ускладнень.

Для досягнення достатнього ефекту необхідними є діагностика та моніторинг системи гемостазу у пацієнтів, хворих на гемофілію, за допомогою стандартизованих методів дослідження системи гемостазу, у тому числі визначення активності факторів згортання крові VIII та IX.

Гемофілія належить до геморагічних коагулопатій, що виникають внаслідок зниження активності факторів VIII або IX (АФ VIII/IX). Дефіцит фактора VIII викликає гемофілію А, фактора IX — гемофілію В. Клінічно ці захворювання характеризуються спонтанними, часто смертельними кровотечами, крововиливами в суглоби, призводять до ранньої інвалідизації.

Більш поширеною є гемофілія А, гемофілія В — рідкісніша. Гемофілія А зустрічається з частотою від 3-х до 20-ти випадків на 10 тис. чоловічого населення.

Половина випадків — це тяжка форма захворювання. Частота поширення гемофілії В складає приблизно один випадок на 30 тис. хлопчиків.

Класифікація по тяжкості захворювання на гемофілію А і В базується на визначенні активності факторів згортання відповідно VIII та IX (табл. 1).

Таблиця 1

Класифікація тяжкості захворювання на гемофілію А і В

Форма перебігу захворювання	Активність Ф VIII	Активність Ф IX
Тяжка	< 1 %	< 1 %
Середня	1–5 %	1–5 %
Легка	5–30 %	5–30 %

За даними різних авторів, АФ VIII/ IX у плазмі крові в нормі становить 50–200 % та 50–130 % [3, 4, 9, 10]. Кожна лабораторія має встановлювати референтні інтервали, застосовуючи вибірку здорових чоловіків,

максимально наближену до обстежуваних пацієнтів, які використовують при трактуванні отриманих результатів.

Мінімальний рівень АФ VIII/ IX становить 30–40 %. При зниженні факторів згортання крові до рівня 30 % хвороба перебуває в прихованій формі і виявляється після значних травм, оперативних втручань у вигляді післяопераційних геморагічних ускладнень.

Різні порушення системи згортання крові можуть мати дуже схожі симптоми. Встановлення правильного діагнозу можливо тільки за допомогою комплексної і достовірної лабораторної діагностики, що має важливе значення для забезпечення відповідного адекватного лікування пацієнта.

Для діагностики гемофілії А і В необхідне проведення скринінгових та уточнюючих тестів. Принциповим під час проведення клініко-лабораторної діагностики уражень системи гемостазу є встановлення причини подовження активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ), визначення АФ VIII/ IX і, таким чином, у більшості випадків здійснення діагностики типу гемофілії.

У методичних рекомендаціях викладені вимоги стосовно проведення клініко-лабораторних обстежень пацієнтів на спадковій коагулопатії, а також містяться стандартизовані підходи до виконання переданалітичного етапу (правила підготовки пацієнтів, взяття крові, підготовки і транспортування плазми, заповнення супровідної документації, формування референтної групи) та аналітичного етапу (визначення активності факторів VIII і IX у плазмі крові пацієнтів).

Вимоги методичних рекомендацій є обов'язковими для лікарів закладів охорони здоров'я (ЗОЗ), діяльність яких спрямована на проведення обстеження і лікування пацієнтів хворих на гемофілію А і В при застосуванні відкритих типів коагулометрів та аналізаторів згортання крові («Аналізатор показників гемостазу 4–02П», АСКa 2–01-«Астра»), що наведені в цих методичних рекомендаціях.

При використанні інших типів коагулометрів аналітичний етап дослідження необхідно проводити у відповідності до інструкції виробника. Вимоги цих методичних рекомендацій не поширюються на визначення специфічної активності факторів згортання крові VIII або IX у лікарських засобах (ЛЗ), отриманих з донорської крові.

Методичні рекомендації призначені для лікарів-гематологів та лікарів-трансфузіологів.

1. ОСОБЛИВОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФАКТОРІВ ЗГОРТАННЯ КРОВІ VIII ТА IX

1.1. Принципи визначення активності факторів згортання крові VIII та IX

Існує декілька методів визначення активності факторів згортання крові VIII та IX. Це метод із використанням хромогенних субстратів та фотометричний метод — одностадійне або двостадійне коагулометричне визначення.

Визначення з допомогою хромогенних субстратів базується на тому, що більшість білкових факторів крові є ферментами — сериновими протеїназами. Спеціальний синтетичний субстрат, який є специфічним для досліджуваного фактора згортання крові, розщеплюється останнім з вивільненням хромогенної частки, концентрація якої реєструється фотометрично і є пропорційною стосовно активності досліджуваного фермента. У випадку встановлення активності неферментного фактора згортання VIII, власне його здатності до формування теназного комплексу, визначають активність залежного від теназного комплексу фактора X, за якою визначають активність фактора VIII.

Двостадійний метод визначення активності фактора VIII базується на визначенні часу генерації тромбoplastину. Метод відрізняється від хромогенного методологією визначення активності аналіту.

Найпоширенішим на території України є метод одностадійного визначення. В його основі лежить заміщення активності факторів згортання в дефіцитній плазмі крові за фактором, що визначається. Швидкість утворення фібринового згустка при змішуванні досліджуваної плазми з невідомою активністю фактора і плазми, в якій цей фактор відсутній, визначається виключно його вмістом у досліджуваній плазмі. Утворення фібринового згустка базується на моделюванні *in vitro* реакцій внутрішнього шляху протромбіназоутворення та наступних тромбіно- і фібриноутворення за допомогою плазми, активованих мембранних фосфоліпідів та іонів кальцію.

Визначення активності факторів VIII та IX має значення під час діагностики уражень системи гемостазу, дозволяє діагностувати тип коагулопатії. Активність фактора VIII визначають у плазмі пацієнтів із гемофілією А, інгібіторною формою гемофілії А, тромбофілічними станами, що зумовлені високою активністю фактора VIII, при моніторингу лікування антигемофілії лікарськими засобами (ЛЗ), визначенні специфічної активності в лікарських засобах (ЛЗ) концентрату фактора VIII. Активність

фактора IX визначають при діагностиці гемофілії В і тромбофілії, зумовленої підвищенням рівня фактора IX, наявності імунних інгібіторів фактора IX, моніторингу лікування антигемофілії лікарськими засобами (ЛЗ), при визначенні специфічної активності фактора IX у лікарських засобах концентрату фактора IX.

Необхідно зауважити, що визначення активності факторів згортання крові в ЛЗ з донорської крові одностадійним методом потребує використання спеціальних стандартів та спеціальної методології підготовки проб. У цих методичних рекомендаціях відображена методологія дослідження АФ VIII/ IX у плазмі крові пацієнтів.

Різні порушення системи гемостазу мають ідентичний клінічний перебіг. Домінуючим для диференційного діагнозу коагулопатій є якісне і достовірне проведення скринінгових та уточнюючих лабораторних тестів. Точний діагноз може бути встановлений тільки при дотриманні фахівцями лабораторії необхідних протоколів і стандартних операційних процедур (СОП), які вимагають:

- знань і досвіду при проведенні лабораторного аналізу параметрів системи згортання крові;
- використання необхідного обладнання та реактивів, сертифікованих у відповідності до вимог ЄС;
- дотримання вимог системи якості (СЯ) на переданалітичному і аналітичному етапах.

1.2. Забезпечення якості на переданалітичному етапі

1.2.1. Підготовка пацієнта

З урахуванням добового біоритму людини для досліджень активності факторів згортання крові необхідно забирати вранці з 8 до 9 години, бажано натще або після прийому легкої їжі. Пацієнтів необхідно попередити, що за три дні до обстеження необхідно виключити важкі фізичні навантаження, прийом алкогольних напоїв протягом 18–24 годин, а також обмежити паління, вживання жирної їжі. У разі необхідності термінового обстеження і неможливості дотримання наведених умов, при оцінці результатів тестування необхідно враховувати вірогідність збільшення варіабельності отриманих результатів, а дослідження необхідно повторити в стандартизованих умовах за першої ж нагоди.

1.2.2. Підбір осіб до референтної групи

Визначення референтних інтервалів для АЧТЧ та при верифікації активності факторів згортання крові VIII та IX має деякі особливості.

По-перше, виявляється не істинний вміст аналіту, а його функціональна спроможність стосовно субстрату. По-друге, активність реагентів різних

виробників, що використовуються для тестування, відрізняється за своїми показниками і може коливатися від серії до серії. Крім того, на показники коагуляційного гемостазу можуть впливати такі фактори, як інтенсивність фізичних навантажень, характер харчування, циркадні ритми і т. ін. Випадкові і систематичні помилки, викликані цими факторами, частково нівелюються при стандартизації забору крові за рахунок добору осіб за віком, фізіологічним статусом, етнічними і соціокультурними особливостями популяції, використання референтних матеріалів, методів математичного моделювання.

Первинний добір мікродонорів для встановлення референтних інтервалів клотингових тестів проводять виходячи із визначення статусу «здоров'я». Відповідно до Статуту ВООЗ, «здоров'я — це ... стан повного фізичного, духовного і соціального благополуччя...». З огляду на дані про вплив термінів отримання крові, стресу, підвищеного (або зниженого) фізичного навантаження, деяких інших факторів на реологічні властивості крові і функціональний стан компонентів системи гемостазу, для наступного добору мікродонорів використовувалися обмежуючі критерії (табл. 2).

Таблиця 2

Фактори, що обмежували включення осіб до референтної групи¹

Обмежувальний фактор	Причина обмеження	Спосіб подолання проблеми
1	2	3
1. Наявність тромботичних або геморагічних проявів в анамнезі	Зміни показників активності компонентів системи гемостазу	Виключення з групи
2. Харчування	Вплив харчування, незбалансованого за тваринними і рослинними компонентами, на реологію крові, біосинтез білків, вміст ліпідів та їх склад	Збалансування харчування або виключення з групи
3. Руховий режим	Зміна реологічних властивостей крові при порушеннях рухового режиму	Виключення осіб з ненормованим фізичним навантаженням
4. Стать	Дисбаланс активності компонентів гемостазу в жінок під час менструації	Забір проб у жінок тільки в середині менструального циклу
5. Шкідливі звички	Вплив на реологію крові і функціональну активність окремих елементів системи гемостазу	Обмеження тютюнопаління і вживання алкоголю за 10 днів до забору проб
6. Расова приналежність	Розходження за окремими класами імуноглобулінів, концентрацією аполіпопротеїнів	Включення представників тієї раси, що обстежується в даній лабораторії

Закінчення таблиці 2

1	2	3
7. Вік	Приховані гемостазіопатії, вікова гіперкоагуляція	Виключення осіб до 25 і старше 45 років

¹ Особи, що включаються до референтної групи повинні максимально відповідати досліджуваному контингенту. Наприклад, якщо у лабораторії обстежуються чоловіки, хворі на гемофілію, то референтна група має складатися із чоловіків. При цьому розподіли за віком, індексом маси тіла тощо мають бути максимально близькими.

1.2.3. Правила взяття венозної крові для аналізу та підготовки зразків плазми

1. Кров набирається шляхом венепункції бажано із вени ліктьового згину. При накладанні манжети тривалість венозного стазу не повинна перевищувати 1 хв (збільшення цього терміну може спричинити похибки при визначенні рівня коагуляційних показників). Рекомендована сила здавлювання має бути на 10 мм ртутного стовпчика нижче від діастолічного тиску крові.

2. Поверхня використовуваних матеріалів не повинна викликати активації тромбоцитів та факторів згортання крові.

Для проведення коагуляційних тестів рекомендовано заготовляти зразок крові з використанням спеціальних систем — вакутейнерів і вакуетів, що забезпечують надходження крові до пробірки з антикоагулянтом під впливом вакууму. При відсутності таких систем допускається забір крові в спеціальні пластикові пробірки з водовідштовхуючого пластику самоплином. Кров для досліджень АЧТЧ та факторів згортання крові необхідно заготовлювати в окрему пробірку.

Застосування звичайних шприців при отриманні зразків крові призводить до руйнування формених елементів крові та активації системи гемостазу, а тому їх використання забороняється.

3. При заборі крові потрібно запобігти спіненню матеріалу та його передчасному згортанню. Тому кров потрібно набирати обережно і відразу після закінчення забору змішувати із антикоагулянтом шляхом трьохчотирьохразового перевертання (НЕ ТРЯСТИ!). У разі, якщо відбувається забір крові на інші дослідження, бажано першу порцію крові не використовувати для досліджень гемостазу.

4. Термін взяття крові не має перевищувати 1 хв.

5. Для дослідження активності факторів згортання крові використовують антикоагулянти, які зв'язують іони кальцію. У переважній більшості випадків це цитрат натрію. При отриманні зразків крові для визначення коагуляційних факторів вміст антикоагулянта у забуференому або незабуференому розчині знаходиться в межах від 105 до 109 ммоль/л цитрату

натрію, що відповідає 3,2 % розчину. Неприпустимо для зразків крові, призначених для дослідження факторів згортання, застосовувати як антикоагулянти оксалати, гепарин або ЕДТА. При виготовленні розчинів самостійно в лабораторних умовах їх слід використовувати протягом 7 діб та зберігати при температурі від 2 до 8 °С.

6. При заготівлі зразків для коагуляційних досліджень слід чітко дотримуватися співвідношення крові з антикоагулянтом та враховувати показник гематокриту (табл. 3).

7. Після отримання зразка крові у допустимі терміни проводять центрифугування крові. Перерахунок швидкості обертання, виражений в об/хв, в RCF (relative centrifugal force) можна здійснити за формулою $g = 0,00001118 \times r \times n^2$, де g — сила центрифугування, r — радіус центрифуги (мм), n — швидкість центрифугування (об./хв). Використання рефрижераторних центрифуг для можливого охолодження плазми при центрифугуванні не бажане.

Таблиця 3

Співвідношення об'єму антикоагулянта і венозної крові залежно від показника гематокриту

Показник гематокриту, %	Об'єм антикоагулянта, мл (3,82 % цитрат Na)	Об'єм крові, мл	Об'єм крові з антикоагулянтом, мл
20–21	1,4	8,6	10,0
22–27	1,3	8,7	10,0
28–33	1,2	8,8	10,0
34–39	1,1	8,9	10,0
40–45	1,0	9,0	10,0
46–51	0,9	9,1	10,0
52–57	0,8	9,2	10,0
58–61	0,7	9,3	10,0
62–65	0,5	9,5	10,0

8. Щодо режимів центрифугування крові для отримання плазми існують різні рекомендації. При проведенні визначення активності факторів згортання крові метою є отримання безтромбоцитної плазми (БТП), що мінімізує вплив тромбоцитарних факторів на результати дослідження та зменшує коефіцієнт варіації отриманих даних. Тому рекомендовано виконувати такі правила:

- центрифугування проводити у два етапи: етап I — отримання збагаченої тромбоцитами плазми (ТП); етап II — отримання БТП;
- на першому етапі — час центрифугування 10 хв; RCF — 500 g, температура 20–25 °С;

– шар ТП обережно зняти з шару еритроцитів та лейкоцитів і перенести в іншу пластикову або силіконову пробірку (над еритроцитарно-лейкоцитарним шаром необхідно залишити близько 5 мм плазми);

– на другому етапі — час центрифугування 20 хв; RCF — 2000 g; температура 18–22 °С;

– БТП перенести у іншу пластикову або силіконову пробірку та використовувати для дослідження (у пробірці, яка центрифугувалася, має залишитися над тромбоцитарним осадом не менше 5 мм плазми);

– не допускати використання центрифуг з ротором, схильним до перегріву.

9. Для проведення досліджень із визначення АФ згортання крові VIII/IX у пацієнта достатньо 0,5 мл БТП, а для визначення АПТЧ — 0,3 мл.

10. Зразки плазми, що містять ознаки гемолізу, жовтого кольору (з підвищеним рівнем білірубину), ліпідних або інших включень/домішок не підлягають дослідженню.

11. Процедура центрифугування зразків має контролюватися та періодично перевірятися на якість розділення крові один раз на 6 місяців, а центрифуга проходити щорічний контроль вихідних параметрів.

12. Допустимий термін між отриманням та дослідженням зразка визначається умовами зберігання, серед яких найважливішим чинником є температура зберігання зразка плазми та термін доставки її до лабораторії:

– кров, стабілізовану розчином цитрату натрію, потрібно доставляти в лабораторію не пізніше 1 год після її забору;

– відразу після доставки крові до лабораторії проводиться її центрифугування та відділення БТП;

– цільна кров та ТП не підлягають охолодженню нижче 10 °С та замороженню;

– при зберіганні БТП при температурі 18–20 °С термін між отриманням крові та проведенням дослідження АЧТЧ, факторів VIII та IX не має перевищувати 2 год;

– при зберіганні БТП при температурі 2–4 °С час між отриманням крові та проведенням дослідження АЧТЧ, факторів VIII та IX не повинен перевищувати 4 год.

– можливе зберігання зразків БТП у замороженому стані у пластикових герметизованих кріопробірках при температурі від мінус 40 до мінус 70 °С протягом 12 місяців (мінімальний об'єм плазми у кріопробірці визначають виходячи із потреб подальшого дослідження, найчастіше це 1–1,5 мл);

– транспортування заморожених зразків БТП до лабораторії, яка знаходиться поза межами лікувальної установи, де отримувався біоматеріал,

здійснюють в ізотермічних контейнерах з холодоагентами при температурі, що не перевищує мінус 40 °С або на сухому льоді;

– транспортування зразків крові або тромбоцитарної плазми здійснюється при температурі 10–25 °С; замороження не допускається.

1.2.4. Вимоги до заповнення супровідної документації

Документація, що супроводжує зразок крові або плазми для проведення коагуляційного обстеження, повинна містити таку інформацію:

– П.І.Б., стать і вік пацієнта;

– діагноз з обов'язковим переліком гемостазіологічних порушень;

– фізичний статус (вагітність, взяття крові в умовах стресового стану, порушення харчового режиму тощо (табл. 2);

– перелік використаних лікарських засобів для лікування;

– час взяття крові для дослідження;

– кількість біоматеріалу, що транспортується (при транспортуванні крові не заповнюється).

Зразок оформлення супровідної документації до обстежуваного зразка наведено у додатку.

1.2.5. Забезпечення якості досліджень на аналітичному етапі

При визначенні факторів згортання одностадійним коагулометричним методом слід дотримуватися таких вимог аналітичного етапу:

1. Порядок виконання дослідження:

– побудова калібрувальної кривої та перевірка її лінійності;

– проведення дослідження;

– аналіз контрольних зразків у нормальних і патологічних областях.

Такий порядок тестування дозволяє зафіксувати можливі небажані зміни використовуваної тест-системи протягом робочого часу.

2. Побудований калібрувальний графік можна використовувати протягом всього терміну придатності реагентів тих серій, за допомогою яких він був побудований за умови проведення обов'язкової повірки контрольними матеріалами в день тестування.

3. Правильність та відтворюваність дослідження перевіряється відповідними статистичними методами [2].

4. При проведенні досліджень вагоме значення має точний кількісний відбір і розведення досліджуваних зразків. Адекватний відбір проб може бути забезпечений прямим і непрямим методами піпетування. Більш доцільним при визначенні факторів згортання, враховуючи в'язкість плазми, є непрямий (зворотний) метод піпетування. Піпетку з натисненою операційною кнопкою до другої зупинки слід занурити на глибину приблизно

1 см у розчин і плавно відпустити кнопку, вилучити наконечник і зняти залишки розчину. У пробірку випустити розчин, натискаючи кнопку до першої зупинки. Розчин, що залишився в наконечнику, не повинен включатися в дозуємий об'єм. Для правильного піпетування білкових розчинів при змішуванні їх з реагентами (наприклад, при процедурі розведення плазми) слід відбирати розчин за правилами прямого методу, потім занурити наконечник в реагент (буфер для розведення) і натиснути кнопку до першої зупинки. При зануреному наконечнику плавно відпустити кнопку в початкове положення з наступним натисненням операційної кнопки до першої зупинки. Процедуру слід повторювати до того часу, поки внутрішня поверхня наконечника не стане чистою. Потім слід натиснути кнопку до другої зупинки з повним спустошенням наконечника.

5. При проведенні аналізу необхідно суворо дотримуватися вимог інструкції стосовно нагріву реакційних систем для кожного реагенту (залежно від типу коагулометра ця величина варіює від 2 до 6 хв).

6. Для покращення якості дослідження необхідно використовувати такі принципи: використання стандартних зразків плазми; контроль лінійності калібрувального графіка; контроль часу дослідження; контроль правильності та відтворюваності результатів, заданих норм точності вимірювань.

7. Перед дослідженням заморожену плазму необхідно помістити у водяну баню при температурі 37 °С і прогріти протягом 4–5 хв. Повільне відтаювання при більш низькій температурі може призвести до утворення криопреципітату і отримання помилкових результатів аналізу.

1.2.6. Подолання типових помилок дослідження

1. Для отримання зразка крові не допускати використання катетерів, окрім спеціального катетера-«метелика» при використанні деяких систем вакуумного забору крові.

2. Не допускати використання для аналізів крові з мікрозгустками та частково гемолізованої крові.

3. При отриманні крові не можна допускати значного травмування прилеглих тканин і судин, оскільки при цьому виділяються тканинні фактори, які активують згортання крові і скорочують АЧТЧ; першу порцію крові (до 2 мл) зібрати в іншу пробірку і не використовувати для досліджень показників гемостазу. Збирання крові в другу пробірку з цитратом дозволить виключити вплив тканевих факторів на дослідження.

5. При дослідженнях системи гемостазу не допускати використання хильозної та жовтушної плазми.

6. Плазму не можна інкубувати при температурі 37 °С понад 5 хв для уникнення інактивації лабільних факторів V та VIII.

7. Дослідження слід проводити в лабораторному посуді, який не містить активаторів чи інгібіторів згортання.

8. Для аналізів необхідно використовувати пластиковий або силіконований лабораторний посуд (пробірки, піпетки). Оптимальним є використання пластикового одноразового посуду.

9. Необхідно дотримуватися співвідношення кров:цитрат залежно від рівня гематокриту.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Обладнання, яке використовується для визначення активності факторів одностадійним методом

Центральним моментом дослідження є фіксація часу утворення фібринового згустка в пробірці. Фіксація може здійснюватися в автоматичному режимі за допомогою коагулометра або візуально лаборантом при використанні термостату водяного типу ТПС.

Виділяють чотири основні типи реєстрації фібринового згустка коагулометрами для одностадійного визначення активності факторів: турбодиметричні, нефелометричні, оптико-механічні, механічні.

1. Турбодиметричні коагулометри визначають час між внесенням реагенту, який активує процес згортання і моментом реєстрації зміни світлопропускання при утворенні фібринового згустка чи ниток фібрину.

2. Нефелометричні коагулометри визначають час утворення згустка за зміною світлопропускання, наприклад бокового розсіювання світла, що забезпечує високу специфічність і чутливість методу.

3. Дія оптико-механічних коагулометрів базується на використанні схеми, яка відслідковує зміни напруги, що подається на лампу для забезпечення певного світлового потоку, що проходить через ємкість із досліджуванним зразком. При випадінні фібрину реєструється зміна напруги.

4. Механічні коагулометри реєструють момент захвату металевої кульки, яка знаходиться в реакційній суміші, фібриновим згустком. Цей момент фіксується магнітним датчиком. Такі прилади, зазвичай, прості в обслуговуванні та в роботі, можуть працювати як із безтромбоцитною плазмою, так і тромбоцитарною, а також із цільною кров'ю. Їх недоліком є низька чутливість у випадках зниження кількості фібриногену або порушеного фібриноутворення.

За виробничою потужністю коагулометри поділяють на одно-, дво-, три-, чотири-, шести- та восьмиканальні. Не виключена можливість використання автоматичних коагулометрів, але автори цих рекомендацій не володіють такою інформацією.

Кожен тип коагулометра має свої особливості. Більш того, коагулометри одного і того ж типу за комплектацією та особливостями використання різняться залежно від виробника. Тому перед початком експлуатації рекомендовано уважно ознайомитися з інструкцією виробника та використовувати комплектуючі, виготовлені виключно для даного коагулометра.

На прикладі 4-канального оптико-механічного програмованого коагулометра відкритого типу із вмонтованим термопринтером «Аналізатор показників гемостазу 4-02П» та аналізатора згортання крові 2-канального АСКа 2-01-«Астра» розглянемо перелік комплектуючих:

- кювети вимірювальні одноразові об'ємом 250 мкл ДГВІ 36.000.050;
- металеві кульки силіконізовані ДГВІ 36.000.050;
- диспансер кульок ДГВІ 36.300.000;
- штатив для кювет поліпропіленовий ДГВІ 36.000.031;

Крім того, при проведенні дослідження АЧТЧ та АФ VIII/ IX необхідне таке обладнання:

- центрифуга лабораторна рефрижераторна;
- холодильник (2-10 °С);
- дозатори піпеточні (20-200 мкл);
- дозатори піпеточні (100-1000 мкл);
- одноразові наконечники;
- мірний посуд;
- пластикові або силіконізовані пробірки;
- пластиковий, скляний, або металевий контейнер для відходів та об'єктів, забруднених кров'ю або її компонентами.

Бажаним обладнанням, яке може полегшити проведення досліджень і сприяє економії реагентів та раціональному плануванню робочого часу, є:

- морозильна камера з температурою від мінус 40 до мінус 70 °С;
- системи вакуумного взяття крові;
- ізотермічні контейнери з холодоагентами для транспортування плазми;
- термостат водяний ТПС.

2.2. Реагенти для визначення активності факторів VIII та IX

Для визначення АЧТЧ та АФ VIII/ IX згортання крові одностадійним методом в Україні допускаються реагенти, сертифіковані відповідно до вимог ЄС. Для проведення дослідження необхідні:

- плазма субстратна, дефіцитна за фактором VIII;
- плазма субстратна, дефіцитна за фактором IX;
- контрольна плазма з нормальним рівнем активності показників системи гемостазу;

- контрольна плазма з патологічним рівнем системи гемостазу (глибока патологія, помірна патологія);
- АЧТЧ-реагент (реагент на основі фосфоліпідів і активатора);
- буфер імідазоловий, або ТРИС-НСІ буфер, чи буфер Овренса;
- вода очищена;
- розчин кальцію хлориду 0,025 М;
- досліджувана плазма.

Реагенти готують відповідно до вимог інструкції виробника.

3. ПРОЦЕДУРА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФАКТОРІВ VIII та IX У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ГЕМОСТАЗІОПАТІЯМИ

3.1. Визначення активності факторів VIII та IX за допомогою аналізатора показників гемостазу «АПГ4-02П»

Приготування робочих розчинів реагентів. Реагенти готують відповідно до вимог інструкції виробника.

Приготування розведень контрольної плазми для побудови калібрувального графіка (табл. 4).

Таблиця 4

Приготування розведень контрольної плазми для побудови калібрувального графіка¹

Ступінь розведення ²	Об'єм реактивів	Активність факторів, %
1:5	200 мкл контрольної плазми + 800 мкл буфера	100,0
1:10	500 мкл контрольної плазми розведенням 1:5 + 500 мкл буфера	50,0
1:20	500 мкл контрольної плазми розведенням 1:10 + 500 мкл буфера	25,0
1:40	500 мкл контрольної плазми розведенням 1:20 + 500 мкл буфера	12,5

¹ Активність факторів у стандартній калібрувальній плазмі може бути різною залежно від виробника і найчастіше становить 100-130 %. Тому при приготуванні розведень для побудови калібрувальної кривої необхідно врахувати дані сертифікатів виробника щодо калібрувальної плазми.

² У даній таблиці калібрувальна крива будується починаючи з розведення 1:5, яке приймається за 100 %. Якщо немає прямих вказань в інструкції до коагулометра чи реагентів, то можна будувати калібрувальну криву виходячи з розведення 1:10 (100 %) і обирати той тип кривої, де краща лінійність. При цьому розведення досліджуваної плазми має бути ідентичним першому розведенню калібрувальної плазми.

Калібрування коагулометра слід проводити відповідно до вимог інструкції виробника з використанням нормальної плазми.

Особливістю побудови калібрувальної кривої за допомогою аналізатора показників гемостазу «АПГ4–02П» є те, що дані точок калібрувальної кривої програмуються. У разі, коли серія реагентів від дослідження до дослідження не змінюється, приступати до визначення активності факторів згортання можна відразу, але в разі зміни хоча б одного реагента, необхідною є побудова нової калібрувальної кривої.

Визначення активності факторів VIII та IX у досліджуваній плазмі за допомогою аналізатора показників гемостазу «АПГ4–02П»

1. Для попереднього прогрівання порожні кювети розмістити в термостатуючій вічка, які не обладнані таймером.

2. Приготувати реактиви згідно з інструкцією виробника та відкалібрувати прилад.

3. Номери зразків із плазмою, прізвища та ініціали пацієнтів зареєструвати у журналі надходження зразків на дослідження. Заморожену плазму розморозити відповідно до вимог п.7 р.1.2.5.

4. З кожної пробірки автоматичним дозатором відібрати по 200 мкл плазми і помістити її у відповідно пронумеровані пробірки, у кожен пробірник додати по 800 мкл буферного розчину, обережно перемішати, отримуючи розведення дослідної плазми у 5 разів.

5. До кювети коагулометра додати 50 мкл розведеної в п'ять разів дослідної плазми, 50 мкл плазми дефіцитної по факторах VIII чи IX, 50 мкл АЧТЧ-реагенту, за допомогою диспансера внести металеву кульку, розмістити кювету для термостатування у вічко аналізатора «прогрів», обладнану таймером одного із вимірювальних каналів, натиснути (обережно) на кювету в напрямку вертикально донизу, щоб загорівся світлодіодний індикатор «прогрів». Після закінчення термостатування та прогрівання дослідного зразка індикатор гасне, що супроводжується двома короткими звуковими сигналами.

6. Кювету перенести у вимірювальне вічко аналізатора. Активувати канал натисканням кнопки «старт». Світлодіод «вимірювання» починає мигтати, а на дисплеї замість напису «0 0 с» з'являється напис «старт».

7. Обережно, але максимально швидко внести автоматичною піпеткою 50 мкл розчину кальцію хлориду 0,025 М. Автоматично починається відлік часу. При утворенні в пробі згустка відлік часу зупиняється, з'являється трьохкратний звуковий сигнал. Світлодіод «вимірювання» гасне. Результати відображаються на дисплеї і зберігаються до нових вимірювань та друкуються за допомогою вмонтованого принтера. Плазма досліджується у двох паралельних пробах.

3.2. Визначення активності факторів VIII та IX за допомогою аналізатора згортання крові 2-канального АСКА 2–01-«Астра»

Приготування робочих розчинів реагентів. Реагенти готують у відповідно до вимог інструкції виробника.

Приготування розведень контрольної плазми для побудови калібрувального графіка (табл. 5).

Таблиця 5

Приготування розведень контрольної плазми для побудови калібрувального графіка

Ступінь розведення ¹	Об'єм реактивів	Активність факторів, %
1:5	200 мкл контрольної плазми + 800 мкл буфера	100,0
1:10	500 мкл контрольної плазми розведенням 1:5 + 500 мкл буфера	50,0
1:20	500 мкл контрольної плазми розведенням 1:10 + 500 мкл буфера	25,0
1:40	500 мкл контрольної плазми розведенням 1:20 + 500 мкл буфера	12,5
1:80	500 мкл контрольної плазми розведенням 1:40 + 500 мкл буфера	6,25
1:500	100 мкл контрольної плазми розведенням 1:80 + 500 мкл буфера	≈1

¹ У даній таблиці калібрувальна крива будується починаючи з розведення 1:5, яке приймається за 100 %. Якщо немає прямих вказань в інструкції до коагулометра чи реагентів, то можна будувати калібрувальну криву виходячи з розведення 1:10 (100 %) і обирати той тип кривої, де краща лінійність. При цьому розведення досліджуваної плазми має бути ідентичним першому розведенню калібрувальної плазми.

Побудова калібрувальної кривої. Для кожного розведення калібрувальної плазми проводити визначення показника швидкості утворення згустка. Результати відмічати на калібрувальній кривій та з'єднати нанесені точки.

Визначення активності фактора VIII та IX у досліджуваній плазмі

1. Номери зразків із плазмою, прізвища та ініціали пацієнтів, зареєструвати у журналі надходження зразків на дослідження. Заморожену плазму розморозити відповідно до вимог п.7 р.1.2.5.

2. З кожної пробірки автоматичним дозатором відібрати по 200 мкл плазми і помістити її у відповідно пронумеровані пробірки, у кожен пробірник додати по 800 мкл буферного розчину, обережно перемішати, отримуючи розведення дослідної плазми у 5 разів.

3. За допомогою кнопки «інкубування» встановити час, необхідний для інкубування проби перед вимірюванням — 240 с.

4. У обидві вічка (найближчі до оператора) встановити одноразові вимірювальні кювети і внести в кожну по 100 мкл розведеної досліджуваної проби і дефіцитної плазми за факторами VIII чи IX. У ту ж мить натиснути кнопку для початку відліку часу інкубування. Вносити реагент потрібно по стінці кювети так, щоб не відбувалося виникнення бульбашок — це може призвести до отримання помилкових результатів.

5. При наближенні часу на таймері до цифри 180 приготувати до внесення АЧТЧ-реагент. При появі на таймері цифри 180 швидко внести у пробірку з пробами по 100 мкл АЧТЧ-реагенту.

6. При наближенні часу до «0000» приготуватися до внесення хлористого кальцію. При появі на таймері «0000», що супроводжується коротким звуковим сигналом, швидко внести до проби 100 мкл прогрітого розчину хлористого кальцію і натиснути кнопку із зображенням секундоміра для відліку часу до моменту утворення згустка.

7. Зупинка таймера і звуковий сигнал свідчать про утворення згустка. Час виникнення згустка лишається на індикаторі, внести його показник до робочого журналу.

8. Визначення активності VIII чи IX фактора проводять за калібрувальним графіком.

3.3. Інтерпретація отриманих даних

Гемофілія:

Тяжка форма. Активність факторів згортання VIII чи IX менше 1 %. Крововиливи в суглоби, м'язи та інші органи виникають при мінімальних і навіть непомітних ушкодженнях.

Середня форма. Активність факторів згортання VIII чи IX від 1 % до 5 %. Крововиливи виникають при наявних незначних ушкодженнях, також після операцій та екстракції зубів.

Легка форма. Активність факторів згортання VIII чи IX від 6 % до 30 %. Така форма може бути не діагностована до дорослого віку або до проявлення крововиливів після хірургічних операцій або екстракції зубів.

Тромбофілія: схильність до тромботичних ускладнень діагностується при підвищенні активності факторів VIII та IX понад верхній референтний інтервал.

4. ПРИКЛАДИ ВИЗНАЧЕННЯ АЧТЧ та АКТИВНОСТІ ФАКТОРІВ ЗГОРТАННЯ

У таблиці 6 подано порівняльне дослідження впливу на якість виконання АЧТЧ порушень переданалітичного етапу.

Таблиця 6

Показники якості у тесті визначення АЧТЧ

Показник якості	Без дотримання даних рекомендацій	Із дотриманням даних рекомендацій
σ , с	3,8	2,0
CV, %	9,6	4,8

Таким чином, дотримання вимог щодо стандартизації переданалітичного етапу дозволяє значно покращити якість дослідження.

У таблиці 7 наведено результати дослідження активності фактора VIII та IX за допомогою аналізатора показників гемостазу «АПГ4-02П» та аналізатора згортання крові АСКa 2-01-«АСТРА» у хворих на гемофілію А до початку курсу замісної гемостатичної терапії «за вимогою».

Таблиця 7

Показники АФ VIII/ IX у хворих на гемофілію при використанні різних типів коагулометрів, n = 15

Показники	АПГ4-02П	АСКa 2-01-«АСТРА»
АФ VIII, %	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1
АФ IX, %	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1

Примітка. Різниця між аналогічними показниками на різних типах коагулометрів була недостовірною (P>0,05).

Таким чином, за умови впровадження елементів СЯ, розробки та дотримання стандартизації забезпечення якості на переданалітичному і аналітичному етапах визначення активності факторів згортання з використанням різних типів коагулометрів дозволяє адекватно оцінювати стан системи гемостазу та подальшого призначення ЗГТ.

ВИСНОВКИ

Постановка правильного діагнозу та лікування пацієнтів зі спадковими коагулопатіями вимагають суворого дотримання вимог СЯ в діяльності клініко-діагностичних лабораторій (КДЛ) на переданалітичному періоді: підготовки та інформованості пацієнта, виконання техніки забору зразків крові, їх транспортування та зберігання до обстеження, а також при виконанні аналітичних операцій.

Стандартизовані методи визначення АФ VIII/ IX у плазмі крові людини дозволяють правильно і достовірно вимірювати коагулогічну активність при високій варіабельності активності факторів згортання крові, що визначаються.

Проведена апробація стандартизованих коагулогічних методів клініко-лабораторних досліджень плазми крові людей з різною АФ VIII та АФ IX демонструє високу діагностичну значимість, точність і відтворення отриманих результатів.

Визначення об'єктивного вмісту АФ VIII та АФ IX при встановленні діагнозу гемофілія А та В вимагають чіткого дотримання фахівцями КДЛ вимог інструкції відповідно до методу вимірювання, сертифікованих діагностичних реагентів та виконання вимог фірми-виробника стосовно експлуатації обладнання.

Взаємодія і кваліфікація спеціалістів клінічної та лабораторної служб ЗОЗ сприяють зменшенню ймовірності помилок при обстеженні зразків крові пацієнтів зі спадковими коагулопатіями та знижують ризик встановлення помилкового діагнозу.

Дотримання вимог методичних рекомендацій щодо виконання методик визначення АФ VIII та АФ IX надасть можливість адекватно трактувати отримані результати фахівцям різних напрямків та скерувати свою діяльність у подальшому:

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Козлов А.А. Преаналитический этап в гемостазиологии / метод. рекомендации / А.А. Козлов, А.Л. Берковский, Е.В. Сергеева, А.В. Суворов. — М. : Изд-во «Принт», 2013. — 48 с.
2. Ланг Т.А. Как описывать статистику в медицине : руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т.А. Ланг, М. Сесик ; пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. — М. : Практ. медицина, 2011. — 477 с.
3. Малигон О.І. Розподіл коагуляційних показників у плазмі крові донорів з урахуванням їх гендерної приналежності, віку та виду діяльності / О.І. Малигон, В.Л. Новак // Харків. хірург. школа. — 2013. — Т. 63, №6. — С. 61–65.
4. Малигон О.І. Природна варіабельність коагуляційних факторів VIII та IX у плазмі крові донорів з урахуванням їх групи крові, статі, віку та роду діяльності / О.І. Малигон // Міжнародна науково-практична конференція «Забезпечення здоров'я нації та здоров'я особистості як пріоритетна функція держави», 21–22 лют. 2014 р. : тези доп. — Одеса, 2014. — С. 58–61.
5. Функція плазмових факторів VIII та IX в системі гемостазу. Основні принципи замісної терапії / О.І. Малигон, В.Л. Новак, П.В. Гриза та ін. // Укр. журн. гематології та трансфузіології. — 2012. — Т. 15, №4. — С. 274–277.
6. Brummel-Ziedins K.E., Wolberg A.S. Global assays of hemostasis / K.E. Brummel-Ziedins, A.S. Wolberg // Cur. op. hematology. — 2014. — Vol. 21. — P. 395–403.
7. Fody M., Schoeff L.E. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations / M. Fody, L.E. Schoeff ; ed. by Michael L. Bishop, Edward. — 6th ed. — 2010. — 706 p.
8. Giuseppe L. Technological Advances in the Hemostasis Laboratory / L. Giuseppe // Seminars in Thrombosis & Hemostasis. — 2014. — Vol. 40, N 2. — P. 178–185.
9. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis / Mackie I., Cooper P., Lawrie A. et al. // International Journal of Laboratory Hematology. — Blackwell Publishing Ltd, 2012. — P. 13.
10. Guidelines for the management of hemophilia 2nd edition // Prepared by the Treatment Guidelines Working Group, on behalf of the World Federation of Hemophilia (WFH), 2012. — 76 p.
11. Patel I.J. Consensus guidelines for periprocedural management of coagulation status and hemostasis risk in percutaneous image-guided interventions / I.J. Patel // Standards of practice committee, with cardiovascular and interventional radiological society of Europe (CIRSE) Endorsement. — 2012. — Vol. 23, N 6. — P. 727–736.

Додаток

Назва закладу охорони здоров'я _____
 Лабораторія _____

АНАЛІЗ КРОВІ № _____
 « _____ » _____ 20 _____ р.

Дата та час забору крові _____
 Назва закладу охорони здоров'я, що направив _____
 Відділення _____
 Назва дослідження _____
 П.І.Б., стать і вік пацієнта _____
 № медичної карти _____
 Діагноз з обов'язковим переліком гемостазіологічних порушень _____

фізичний статус (вагітність, взяття крові в умовах стресового стану, порушення харчового режиму тощо) _____
 Перелік лікарських засобів, що використовувалися нещодавно, чи використовуються на час отримання матеріалу _____

Кількість біоматеріалу, яка транспортується

Назва біоматеріалу	Об'єм зразка

Дата та час доставки на дослідження _____

Найменування показників	Результат	Норма
АЧТЧ		
Активність фактора VIII		
Активність імунного інгібітора фактора VIII		
Активність фактора IX		
Активність імунного інгібітора фактора IX		

Дата _____
 Виконавець _____ Підпис _____