

*Работа на полуавтоматических
коагулометрах*

*с использованием реагентов
отечественного производства*

Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Кишинец Р.С., Хурдин В.В., Фунт В.А.

Методическое руководство

Оглавление

Введение	3
Виды коагулометров и принцип их действия	4
Основные принципы работы на полуавтоматических коагулометрах.....	6
Приготовление и хранение реагентов и контрольных материалов	6
Получение и хранение исследуемой плазмы для анализа	7
Внешний вид полуавтоматических коагулометров.....	8
Технические характеристики полуавтоматических коагулометров	10
Особенности применения реактивов на полуавтоматических коагулометрах.....	11
Таблица соответствия полуавтоматических коагулометров и применяемых реактивов.....	12
Наиболее распространенные технические ошибки и рекомендации как их избежать	13
Получение плазмы для анализов	13
Обработка лабораторной посуды.....	14
Силиконирование стеклянной посуды	14
Требования к приборам.....	14
Проверка температурного режима коагулометра	15
Калибровка полуавтоматических пипеток.....	15
Протромбиновое время.....	16
Активированное частичное тромбластиновое время (АЧТВ).....	16
Тромбиновое время	17
Количественный анализ фибриногена методом Клаусса.....	17
ЛИТЕРАТУРА.....	20



Введение

Высокое качество лабораторных исследований достигается стандартизацией лабораторных исследований на всех этапах, а именно: преаналитический, аналитический и постаналитический. Наибольшее число ошибок в диагностике системы гемостаза совершается на преаналитическом этапе, однако достаточно часто ошибки происходят и на аналитическом этапе. Ведь не секрет, что при работе на полуавтоматическом коагулометре результат во многом зависит от техники выполнения теста лаборантом. Исследования на этом этапе в максимальной степени стандартизуются применением автоматических коагулометров. Неудивительно, что в последнее время наблюдается тенденция автоматизации лабораторий, поскольку автоматический коагулометр обеспечивает отличную точность и воспроизводимость результатов (стандартизация аналитического этапа), увеличение скорости обработки исследуемого материала, безопасность персонала, возможность предоставления расширенной коагулограммы, возможность проведения тестов с использованием хромогенного субстрата, а также иммунологических тестов. Ниже можно привести основные показатели для установки автоматического коагулометра:

1. Количество пациентов 50 и более в день
2. Необходимость предоставления развернутой коагулограммы
3. Необходимость улучшения качества результатов в Федеральной программе внешней оценки качества (ФСВОК)

Нами выпущены пособия по работе на различных видах автоматических коагулометров. Но зачастую лаборатории финансируются недостаточно, чтобы приобрести автоматический коагулометр, поэтому данное методическое пособие будет посвящено принципам работы на наиболее распространенных типах полуавтоматических коагулометров, а также их некоторым особенностям.



Виды коагулометров и принцип их действия

Коагулометры подразделяются на полуавтоматические и автоматические.



Рис.1 Различные виды полуавтоматических коагулометров.

Полуавтоматические коагулометры различают по методу регистрации сгустка: механические, оптические и совмещенные. При механическом методе регистрации сгустка используется шарик, который при добавлении в кювету начинает движение относительно кюветы. При образовании сгустка шарик прекращает движение относительно кюветы, что и регистрируют датчики прибора.

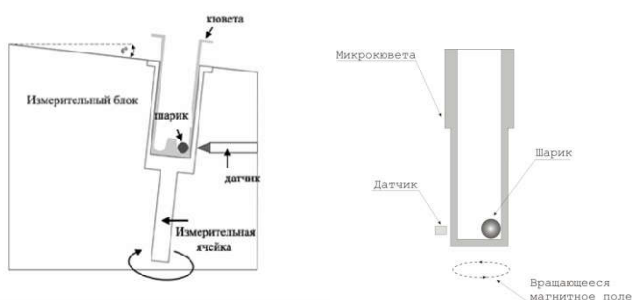


Рис.2 Различные варианты механической регистрации сгустка

При использовании оптического метода регистрации сгустка прибор фиксирует конечный результат по изменению оптических свойств реакционной смеси

Существуют также оптико-механические коагулометры, однако по нашему мнению, не стоит их выделять в отдельную группу, поскольку регистрация образования сгустка осуществляется оптическим методом, а механическим способом (шариком или др.) происходит лишь перемешивание тестируемой смеси.

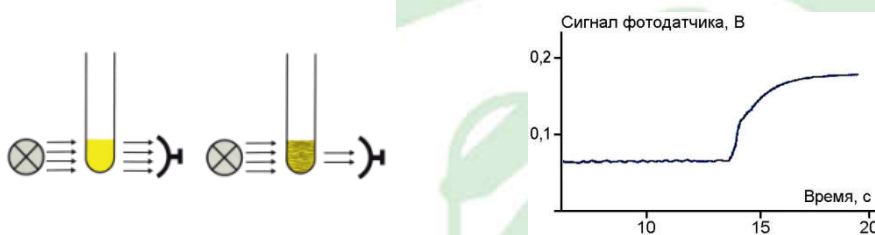


Рис. 3 Пример оптической регистрации сгустка

К совмещенным относят редкие виды коагулометров, где существует возможность выбора способа регистрации сгустка.



Рис. 4 Коагулометры совмещенного типа Минилаб 701 и АПГ-02-П

При работе на большинстве полуавтоматических коагулометров не требуется специальных адаптаций при использовании реагентов различных производителей. Однако, следует помнить, что для работы на некоторых видах коагулометров должны использоваться специфические виды реагентов. Например, при работе на

[Полуавтоматические коагулометры]

одном из самых распространенных полуавтоматических коагулометров АПГ-02 (Эмко, Техномедика, Москва), а также Миналаб 701,704 (Юнимед, Москва) при исследовании в оптическом режиме необходимо использование реагентов с содержанием каолина. В ассортименте реагентов торговой марки Ренам представлены реагенты с каолином для исследования активированного частичного тромбoplastинового времени (АЧТВ) (Коагуло-тест, Коагуло-экспресс) и для исследования фибриногена по Клауссу (ОптиФибриноген-тест). При работе на реагентах без каолина является обязательным условие перевода вышеуказанных приборов на механический метод детекции сгустка. Следует отметить, что применение оптического метода регистрации сгустка, который реализован во многих полуавтоматических приборах не является обязательным условием применения реагентов с содержанием каолина. Информацию по необходимости применения реагентов с каолином можно получить, изучив инструкцию по использованию полуавтоматического коагулометра в разделе Проведение исследований: Фибриноген по Клауссу.

Коагулометры с различными методами регистрации (оптические и механические), за некоторым исключением, не сильно отличаются друг от друга по точности и воспроизводимости регистрации образования сгустка в бедной тромбоцитами плазме, но значительно превосходят мануальные варианты (термобаня) исследования системы гемостаза.

Существуют также различные принципы измерений полученных результатов: клоттинговый, (процентный, по конечной точке и кинетический), хромогенный (колориметрический), иммунологический (основанный на регистрации реакции антиген-антитело).

В большинстве автоматических коагулометров применяется оптический метод регистрации сгустка.



Рис.5 Примеры автоматических коагулометров

Работе на данных коагулометрах посвящены отдельные методические пособия, поэтому, мы более подробно рассмотрим особенности работы на разных моделях полуавтоматических коагулометров.



Основные принципы работы на полуавтоматических коагулометрах

Для получения адекватных и воспроизводимых результатов при работе на полуавтоматических коагулометрах должны быть выполнены следующие требования:

- Необходимо правильно подготовить анализируемый образец
- Необходимо четко соблюдать инструкцию по использованию реагента и инструкцию по эксплуатации коагулометра (время инкубации реагентов, вносимые объемы реагентов, прогрев рабочих реагентов и т.д.)
- Необходимо соблюдать требование по одномоментному и быстрому внесению стартового реагента в кювету коагулометра (данное требование является одним из самых важных, поскольку именно от действий врача-лаборанта на этом этапе очень сильно зависит конечный результат исследований)
- После каждой смены серии реагента необходимо заново строить калибровочные кривые (при проведении исследований, для которых необходимо построение калибровочных кривых)
- Необходима ежедневная постановка контрольных материалов в нормальной и патологической областях (внутренний контроль качества)
- Необходимо участие во внешнем контроле качества

Приготовление и хранение реагентов и контрольных материалов

1. Приготовление реагентов

Лиофильно высушенные реагенты необходимо реконструировать строго в соответствии с инструкцией, осторожно внося требуемое количество дистиллированной воды или растворителя автоматической пипеткой, растворить при покачивании (не встряхивать, избегать образования пены). При необходимости прогреть в закрытом виде при 37°C в течение времени, указанного в инструкции.

Во избежание ошибок на преаналитическом этапе исследования необходимо проводить своевременную периодическую поверку термостатов и подогреваемых ячеек коагулометров, используемых для прогрева реагентов. Если температура отличается от (37±0,5)°C, следует обратиться в техническую службу для ремонта прибора.

2. Приготовление контрольных и калибровочных плазм

Перед использованием внести во флакон с плазмой 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании (избегать образования пены!). Раствор плазмы выдержать при температуре 18-25°C в течение 20 минут.

Для исключения возможности «приборной» погрешности на этапе лабораторного анализа необходимо проводить калибровку всех используемых автоматических пипеток.

Большое влияние на стабильность реагентов и контрольных материалов оказывает качество используемой дистиллированной воды, которое должно подвергаться обязательному контролю. Рекомендуется использовать бидистиллированную воду или подвергать ее очистке методом обратного осмоса.

3. Хранение и стабильность реагентов и контрольных материалов

Хранение разведенных реагентов и плазм должно осуществляться не более времени, указанного в инструкции, в плотно закрытом виде. Все контрольные и калибровочные плазмы производства НПО «Ренам» после разведения стабильны во флаконе изготовителя при комнатной температуре (18-25°C) до 4

часов. Допускается хранение готовых растворов плазм при 2-8°C от 4 до 8 часов или в замороженном виде от 14 дней до 2 месяцев (согласно инструкции).

Для увеличения срока хранения реагенты «Ренам» можно замораживать, при этом в случае соблюдения условий замораживания и оттаивания свойства реагентов и контрольных материалов полностью сохраняются. Для замораживания следует разлить раствор по аликвотам в пластиковые пробирки (до 1 мл), плотно закрыть, быстро заморозить при самой низкой возможной температуре в низкотемпературном холодильнике (морозильнике) и хранить при температуре не выше -18°C. Для сохранения свойств материалов важно правильно замораживать и размораживать реагенты: замораживание должно проводиться как можно быстрее, для этого пластиковую пробирку с аликвотой кладут горизонтально на охлаждаемую металлическую часть морозильной камеры. Температура хранения замороженного образца должна быть не выше -18°C. Размораживание следует проводить быстро (в течение максимум 5 минут) при температуре, не превышающей 37°C (при необходимости использовать водяную баню для полного размораживания за указанное выше время).

Перед проведением теста нужно убедиться, что во флаконе с реагентом не произошло осаждения вещества (при работе с тромбопластинами это возможно) и в случае необходимости следует осторожно перемешать содержимое флакона при покачивании или поместить во флакон магнитную мешалку (если конструкцией коагулометра предусмотрено перемешивание реагентов). В процессе работы необходимо использовать одноразовые наконечники для автоматических пипеток, чтобы исключить занос материала в реагент или плазму. Отсутствие перекрестного заноса особенно важно при длительном хранении и замораживании реагентов и плазм.

Запрещается использовать реагенты с истекшим сроком годности, хранящиеся дольше времени, указанного производителем, или если наблюдается визуальное изменение свойств готового раствора (помутнение, изменение окраски и т.п.).

Получение и хранение исследуемой плазмы для анализа

1. Антикоагулянты для проб крови

Для взятия проб крови широко используются такие антикоагулянты, как растворы цитрата натрия и этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). В гемостазиологии цитрат натрия преимущественно применяют для тестирования плазменного гемостаза, а ЭДТА – для определения функциональной активности тромбоцитов.

Для приготовления растворов цитрата используются два типа соли: двухводный трехзамещенный цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и 5,5-водный трехзамещенный цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 5,5\text{H}_2\text{O}$). В вакуумных системах для взятия крови применяют 0,109 М или 0,129 М раствор этого консерванта, что соответствует 3,2% и 3,8% двухводного трехзамещенного цитрата натрия. Во избежание возможного несоответствия между молярной и процентной концентрацией при приготовлении консерванта следует учитывать содержание воды в применяемом реагенте, то есть молекулярную массу гидратированных форм цитрата натрия.

В настоящее время по рекомендациям Института Клинических Лабораторных Стандартов (CLSI) предпочтительным является применение 3,2% (0,109 М) цитрата натрия. Эта концентрация цитрата натрия вызывает меньшую частоту преаналитических ошибок. Исследования показали, что использование 3,8% (0,129 М) приводит к удлинению протромбинового времени (ПВ) и АЧТВ и занижению содержания

фибриногена в нормальном диапазоне. «Правильная» молярность цитрата натрия принципиально важна в тестах, где критичным является содержание несвязанного Ca^{2+} . Так, согласно требованиям Всемирной Организации Здравоохранения, во избежание существенных диагностических ошибок при определении Международного Нормализованного Отношения (МНО), для теста ПВ следует использовать 0,109 М раствор трехзамещенного цитрата натрия в соотношении кровь:антикоагулянт = 9:1. Раствор цитрата натрия с концентрацией 0,129 М (3,8%) не должен быть использован в данном тесте .

Следует помнить, что ошибки, допущенные на преаналитическом этапе исследования, нельзя скорректировать проведением процедур верификации и внутрилабораторного контроля качества коагулологических тестов.

Таким образом, в случае использования вакуумных систем забора крови для коагулологических исследований следует применять только вакуумные пробирки с концентрацией цитрата натрия 3,2%.

Другим принципиально важным положением обеспечения правильности проведения анализа является стандартизация соотношения объемов плазмы и цитрата натрия, которое должно составлять трого 9:1 для пациентов с нормальным гематокритом.

2. Получение и хранение плазмы пациентов

Для получения бедной тромбоцитами плазмы для стандартных коагулологических исследований венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,11 моль/л) цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,11 моль/л) цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Время хранения исследуемой плазмы до анализа – не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре 2-8°C. Так как после взятия крови происходит быстрое ухудшение состояния образца, проба должна быть как можно скорее поступить в лаборatoria для исследования. Транспортируемые пробирки следует держать в вертикальном положении для обеспечения меньшей степени вспенивания, а следовательно, гемолиза.

Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес. При этом необходимо учитывать влияние скорости замораживания-оттаивания на показатели гемостаза и проводить эти процедуры быстро для снижения вероятной активации системы свертывания крови (см выше)

Внешний вид полуавтоматических коагулометров

Behnk Elektronik
Trombotimer 4



Behnk Elektronik
Trombostat 2



Cormay
Coatron 4



[Полуавтоматические коагулометры]

Dade Behring
Fibrintimer II



Human
Humaclot Duo Plus

Helena Coadata 400



Roche
Start 4

Helena C 4



Sysmex
CA 50



Tcoag
Amelung KC 4



www.oborudunion.ru

Астра АСК-02



АПГ 4-02



Минилаб 701



Минилаб 704



BioMerieux
Option 4 Plus



TS 4000



Солар СТ 2410



Merlin MC 1 (4, 10)



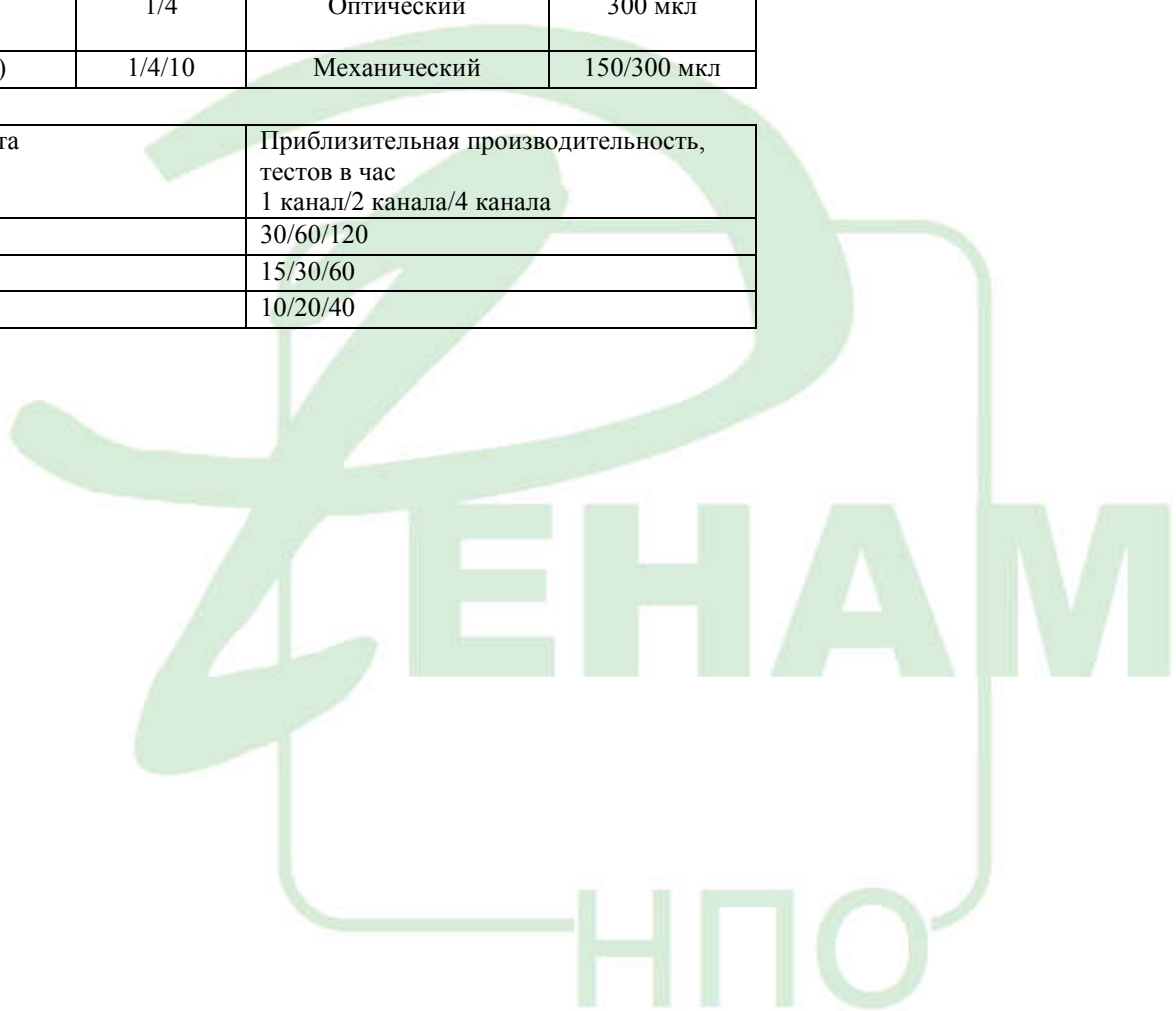
НПО

[Полуавтоматические коагулометры]

Технические характеристики полуавтоматических коагулометров

Наименование коагулометра	Количество каналов	Принцип детекции сгустка	Объём реакционной смеси
Behnk Elektronik Trombotimer 1/2/4	1/2/4	Оптико-механический	300 мкл
Behnk Elektronik Trombostat 1/2	1/2	Механический	150 мкл
Cormay Coatron M1/2/4	1/2/4	Оптический	150 мкл
Dade Behring Fibrintimer II	2	Оптико-механический	300 мкл
Helena Coadata 2001/4001	2/4	Оптико-механический	150-300 мкл
Helena C 1/2/4	1/2/4	Оптический	от 75 мкл
Human Humacloot Duo Plus	2	Оптический	75 мкл
Roche Start 4	4	Механический	300 мкл
Sysmex CA 50	4	Оптический	150 мкл
Tcoag Amelung KC 4	4	Механический	150 мкл
Астра АСК-02	2	Оптический	300 мкл
АПГ 2-02/4-02	2/4	Механический/ оптический	150 мкл
Минилаб 701 (704)	2/4	Механический/ оптический	150 мкл
BioMerieux Option 4 Plus	4	Оптический	150 мкл
TS 4000	4	Механический	300 мкл
Солар CGL2110/ СТ 2410	1/4	Оптический	300 мкл
Merlin MC 1 (4, 10)	1/4/10	Механический	150/300 мкл

Наименование теста	Приблизительная производительность, тестов в час 1 канал/2 канала/4 канала
ПВ, ТВ	30/60/120
АЧТВ	15/30/60
Фибриноген	10/20/40



Особенности применения реактивов на полуавтоматических коагулометрах

В основном, на полуавтоматических коагулометрах, не требуется внесение каких-либо изменений в методику проведения теста. Но иногда возникает необходимость применения определенных реагентов в силу конструктивной особенности коагулометра и его измерительной системы.

Для всех видов полуавтоматических коагулометров в качестве реагента для определения протромбинового времени рекомендуется использовать реагент Ренампластин (кат № ПГ-5/1, 5/2). Для определения АЧТВ можно использовать АЧТВ-тест (кат № ПГ-7/1). Для определения тромбинового времени лучше применять тромбин-реагент (кат № ПГ-9А). Также, хотелось бы отметить, что все вышеперечисленные параметры необходимо контролировать с помощью контрольных плазм, аттестованных в нормальной и патологической области системы гемостаза (Плазма Н (кат № КМ-1), Плазма контрольная патологическая (кат. № КМ-3)).

Для построения калибровочной прямой при определении активности протромбина в процентах от нормы рекомендуется использовать Протромбин-калибратор (кат № КМ-18).

Для контроля правильности определения МНО желателен использовать Протромбин-контроль (кат № КМ-17).

При определении уровня фибриногена на различных полуавтоматических коагулометрах требуются различные тест-системы (с содержанием каолина в смеси и без него). Реагент, не содержащий каолин, называется Фибриноген-тест (кат № ПГ-10/1). Он используется, обычно, в коагулометрах с механическим методом регистрации сгустка и в некоторых оптических системах. Реагент с каолином - Оптифибриноген-тест (кат № ПГ-11/1) используется в некоторых коагулометрах с оптическим методом регистрации сгустка. Обычно, рекомендации по применению реагентов с каолином прописаны в инструкции по эксплуатации коагулометра, в разделе «Определение уровня фибриногена».

При построении калибровочной кривой для определения содержания фибриногена чаще всего используют рекомендации, приведенные в инструкции к реагенту (рекомендуемые разведения плазмы-калибратора: 1/5, 1/10, 1/20, 1/40). Однако, в некоторых случаях, также необходимо учитывать технические особенности и рекомендации для конкретных моделей коагулометров.

Для того, чтобы было проще подобрать правильные тест-системы к конкретной модели коагулометра мы приводим таблицу соответствия реактивов и коагулометров при определении фибриногена по Клауссу:



Таблица соответствия полуавтоматических коагулометров и применяемых реактивов

Наименование коагулометра	Используемые реактивы для определения фибриногена и особенности измерений
Behnk Elektronik Trombotimer 1/2/4	Оптифибриноген-тест
Behnk Elektronik Trombostat 1/2	Фибриноген-тест
Cormay Coatron M1/2/4	Фибриноген-тест
Dade Behring Fibrintimer II	Оптифибриноген-тест
Helena Coadata 2001/4001	Оптифибриноген-тест
Helena C 1/2/4	Фибриноген-тест
Human Humacot Duo Plus	Фибриноген-тест
Roche Start 4	Фибриноген-тест
Sysmex CA 50	Фибриноген-тест Рекомендуемые разведения плазмы-калибратора: 1/7,5; 1/15; 1/20; 1/30
Tcoag Amelung KC 4	Фибриноген-тест
Астра АСК-02	Фибриноген-тест
АПГ 2-02/4-02	Оптифибриноген-тест
Минилаб 701 (704)	Оптифибриноген-тест При определении содержания фибриногена объем реакционной смеси должен составлять 300 мкл
BioMerieux Option 4 Plus	Оптифибриноген-тест
TS 4000	Фибриноген-тест
Солар CGL2110/ СТ 2410	Оптифибриноген-тест
Merlin MC 1 (4, 10)	Фибриноген-тест



Наиболее распространенные технические ошибки и рекомендации как их избежать

Наиболее распространенные технические ошибки, возникающие при исследовании гемостаза, связаны со следующим:

- неправильное взятие проб крови, при котором уже произошла активация процесса свертывания;
- неправильное соотношение объемов крови и антикоагулянта;
- попадание гепарина в пробу (выраженное удлинение АЧТВ);
- неправильная температура термостатирования при проведении тестов;
- использование несиликонизированной стеклянной посуды (активация свертывания);
- многократное использование пластиковой одноразовой посуды (активация свертывания);
- использование для мытья посуды детергентов, влияющих на свертывание.

Получение плазмы для анализов

Кровь следует брать утром, натощак, из локтевой вены, иглой, как можно большего диаметра, без шприца и без наложения жгута. Первые капли крови отбрасывают, т.к. в них может содержаться тканевой активатор системы гемостаза.

Кровь сразу после забора смешивают (в силиконизированной стеклянной или в пластиковой пробирке) с раствором натрия лимоннокислого (цитрата) в соотношении 9:1 до получения конечной концентрации цитрата натрия

Для исследования плазменного звена гемостаза используют плазму крови, обедненную по тромбоцитам. Данную плазму получают путем центрифугирования цитратной крови в течение 15 мин при 3000-об/мин (*ускорение 1200 g*).

Плазму рекомендуется хранить при комнатной температуре (18-25° С), если ее используют для определения протромбинового времени, анализа активности фактора VII или для исследования функций тромбоцитов, т.к. при 2-8° С происходит активация фактора VII. Для проведения всех прочих тестов плазму хранят при температуре 2-8 °С.

Обязательным условием является проведение всех анализов не позднее, чем в течение 2 часов после взятия крови. Допускается однократное замораживание проб бедной тромбоцитами плазмы при температуре — 20 — 40 °С на срок до нескольких недель. Не рекомендуется замораживание исследуемой плазмы на срок, более чем 2 недели при проведении исследований на определение активности фактора VIII.

Обработка лабораторной посуды

Для обеспечения точности и воспроизводимости результатов анализа системы гемостаза большое внимание необходимо уделять подготовке лабораторной посуды: пробирок, кювет, пипеток. Наиболее целесообразней использовать для этого одноразовую пластиковую посуду, что и практикуется за рубежом. При необходимости повторного использования лабораторной посуды, в том числе стеклянной, ее нужно правильно очищать. Недопустимо применение хромпика, различных стиральных порошков, т.к. даже в минимальном количестве хромовые смеси ингибируют факторы свертывания крови, а детергенты снижают воспроизводимость результатов.

Мы рекомендуем пластиковую и стеклянную посуду (кюветы, пробирки, наконечники пипеток) после использования обрабатывать в течение 2-3 час в 6% растворе перекиси водорода в ультразвуковой мойке.

Затем посуду необходимо тщательно промыть в проточной воде, сполоснуть в дистиллированной воде и высушить. Пластиковую посуду сушат на воздухе, стеклянную — в сушильном шкафу при температуре 180 — 200 °С в течение 1-2 часов.

После промывания и высушивания стеклянную посуду необходимо силиконировать.

Силиконирование стеклянной посуды

Для исследования системы гемостаза рекомендуется использовать одноразовую пластиковую посуду. При невозможности использования пластиковой посуды стеклянную посуду перед работой силиконировать — покрывают тонким слоем силана. Вся процедура силиконирования проводится только в вытяжном шкафу.

Чаще всего применяют диметилдихлорсилан. 5 % раствором этого силана в толуоле заполняют чистые сухие стеклянные пробирки, затем раствор сливают для повторного использования. Стеклянные пипетки наполняют из резиновых груш. Затем посуду высушивают на воздухе в вытяжном шкафу в течение 10-12 часов и досушивают при температуре 100-150 °С в сушильном шкафу. После 4-5 кратного использования силиконирование посуды повторяют.

Требования к приборам

Все коагулометры перед использованием требуют проверки и сопоставления данных анализа с результатами, полученными ручным методом. Необходимо убедиться также в правильности показаний температуры и в правильности регистрации конечной точки реакции. Следует постоянно проверять работу всех коагулометров. При сравнении результатов тестирования, полученных при работе с разными коагулометрами, нужно помнить, что приборы по-разному регистрируют конечную точку реакции, что сказывается на полученных данных. У водяных бань температура не должна варьировать в пределах, превышающих $\pm 0,5^\circ \text{C}$.

Проверка температурного режима коагулометра

При пользовании коагулометрами необходимо периодически проверять температурный режим термостата прибора, учитывая, что температура существенно влияет на результаты анализа. Рекомендуется следующая процедура проверки:

1. Включить коагулометр и выдержать время, достаточное для выхода термостата на рабочий режим, согласно инструкции, прилагаемой к прибору.
2. В ячейку термостата поместить стеклянную пробирку с 5,0 мл дистиллированной воды и выдержать 15 мин.
3. Зафиксировать температуру воды термометром.
4. В случае если температура отличается от значения $37\pm 0,5^\circ$, необходимо обратиться в техническую службу для ремонта прибора.

Калибровка полуавтоматических пипеток

Анализы проводят с использованием полуавтоматических пипеток, производства различных фирм (фирма Ленпипет, Россия; пипетки Biohit, фирма Biohit, Финляндия; пипетки Pipetman, фирма Gilson, Франция и др.).

При работе с полуавтоматическими пипетками в раствор следует погружать только кончик пипетки на глубину не более 0,4 см.

Калибровка полуавтоматических пипеток проводится с целью обеспечения точности исследований.

Принято проводить 2 калибровки:

- раз в неделю проводится полная калибровка, когда все измерения повторяют по 10 раз и рассчитывают среднее арифметическое значение;
- непосредственно перед работой осуществляют рабочую калибровку, когда измерение проводят 1 раз.

Процедура калибровки:

1. В стеклянную колбу вместимостью 50-100 мл налить 20-30 мл дистиллированной воды, поместить в воду термометр и измерить температуру воды.
2. На аналитических весах взвесить стеклянный стаканчик (или пенициллиновый флакон) вместимостью 5,0-10,0 мл.
3. Набрать в калибруемую пипетку дистиллированную воду, перенести воду из пипетки в стеклянный стаканчик и взвесить стаканчик вместе с водой на аналитических весах.
4. Определить вес воды как разность между весом стаканчика с водой и без воды.
5. Повторить операции 1-3 не менее 10 раз.

6. Вычислить среднее арифметическое значение всех измерений веса воды по формуле (1):

$$E = \frac{\sum E_i}{n} \quad (1),$$

где: E - среднее арифметическое значение веса воды в пипетке,

$\sum E_i$ - суммарный вес воды от всех измерений,

n - число измерений веса воды.

1) Вычислить объем пипетки (V, мкл) по формуле (2):

$$V = E/\rho \quad (2),$$

Где: ρ - плотность воды при температуре измерения.

Протромбиновое время

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок при определении протромбинового времени:

1. При приготовлении растворов цитрата натрия необходимо помнить, что эта соль может содержать разное количество кристаллизационной воды, и рекомендуется использовать точно приготовленные и проверенные растворы фирмы НПО «РЕНАМ» (см. раздел «Получение плазмы для анализов»).
2. При использовании вакуумных систем для забора крови необходимо обращать внимание на концентрацию цитрата натрия, указанную на пробирке – 3,2 % или 0,105-0,109 М. При использовании пробирок с концентрацией цитрата натрия 3,8 % (0,129 М) возможно удлинение времени свертывания в тестах ПВ и АЧТВ.
3. Плазму, приготовленную для анализа протромбинового времени, следует хранить не более 2 часов при комнатной температуре, поскольку охлаждение плазмы до температуры 2 - 7 градусов может вызвать холодовую активацию фактора VII и может оказывать влияние на время реакции, в сторону укорочения.
4. Необходимо понимать различия в способах выражения результатов теста протромбинового времени (протромбиновое отношение (ПО), протромбиновый индекс (ПИ), активность протромбина в процентах от нормы (% по Квику), международное нормализованное отношение (МНО)).

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок при определении (АЧТВ):

1. Кровь нельзя брать через катетер, которым пользовались для инъекций гепарина. Происходит значительное увеличение АЧТВ из-за контаминации следами гепарина.

2. Нельзя использовать для анализов кровь с микросгустками, т.к. в такой крови уже начался процесс свертывания и АЧТВ будет укорочено.
3. Нельзя использовать для анализов частично гемолизованную кровь, т.к. при этом происходит изменение нормальной длительности АЧТВ более чем на 10%, т.к. продукты гемолиза эритроцитов обладают выраженным прокоагулянтным действием.
4. При взятии крови нельзя допускать травмирования прилежащих тканей и сосудов, т.к. при этом выделяются тканевые факторы, активизирующие свертывание крови и укорачивающие АЧТВ.
5. Плазму крови нельзя инкубировать при температуре 37 °С более 5 мин, чтобы не допустить инактивации лабильных V и VIII факторов свертывания крови.
6. Не рекомендуется использовать для приготовления 0,025 М раствора кальция хлористого аптечный раствор в ампулах, т.к. концентрация этого раствора в ампулах, как показали наши исследования, зачастую определена неточно.
7. Анализы проводить в посуде, не содержащей активаторов или ингибиторов свертывания (хорошо промытая дистиллированной водой, без применения моющих средств).

Тромбиновое время

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок при определении тромбинового времени.

1. Кровь нельзя брать через катетер, которым пользовались для инъекций гепарина. Происходит значительное увеличение тромбинового времени из-за контаминации следами гепарина.
2. Стабилизированный раствор тромбина рекомендуется хранить в исходных флаконах, не переливать.
3. В случае длительного использования стабилизированного раствора тромбина допускается разделить его на аликвоты с учетом разовой используемой дозы и хранить в пластиковых пробирках (желательно, новых).
4. Рабочий раствор тромбина следует готовить непосредственно перед использованием и только в пластиковой посуде, учитывая, что тромбин сорбируется стеклом.
5. Рабочий раствор тромбина нельзя использовать для анализов сразу после приготовления, его следует выдержать в течение 15-20 мин при комнатной температуре (18-25° С).

Количественный анализ фибриногена методом Клаусса

Рекомендации, позволяющие избежать наиболее типичных ошибок:

1. Набор предназначен для определения фибриногена по Клауссу только с помощью коагулометров, ручной метод использовать нельзя.
2. Следует внимательно читать инструкцию по применению набора по разделу построения

калибровочного графика. Необходимо помнить, что время свертывания фибриногена под действием тромбина обратно пропорционально содержанию фибриногена только при низких концентрациях последнего, поэтому все исследуемые образцы плазмы необходимо разводить в 10 раз буфером для разведения образцов плазмы.

Наборы реагентов НПО Ренам и полуавтоматические коагулометры

НПО «РЕНАМ» с момента своего создания (1990 г.) и по настоящее время является наиболее авторитетным производителем диагностических тест-систем и отдельных реагентов для исследования системы гемостаза в России и странах СНГ. Ассортимент производимых компанией тест-систем, включающий реагенты для четырех базовых коагуляционных тестов: протромбиновое время, АЧТВ, тромбиновое время и фибриноген, а также для тестов для дифференциальной диагностики нарушений в системе свертывания: анализ факторов свертывания, диагностика тромбофилических состояний, гемофилии, системной красной волчанки, мониторинг антикоагулянтной терапии, исследования фибринолиза и функций тромбоцитов, является самым широким среди отечественных производителей.

Преимуществом реагентов НПО «РЕНАМ» является также их готовность к применению, поскольку реагенты требуют минимальной предварительной подготовки. Например, титрованные 0,025 М растворы кальция хлористого НПО «РЕНАМ» полностью готовы к применению, что, безусловно, исключает ошибки при разведении концентрированных растворов кальция хлористого, которыми комплектуются наборы других отечественных производителей.

Все тромбопластины НПО «РЕНАМ» изготавливаются из ацетонового порошка мозговой ткани кроликов, что обеспечивает гарантию в отсутствии вирусной контаминации гепатитом В, С, ВИЧ и др. вирусами, длительно сохраняющимися в тканях.

Рабочие растворы реагентов имеют высокую стабильность при хранении как при комнатной температуре, так и в холодильнике. Кроме того, их можно замораживать при -20°C на длительный срок без потери активности.

Неоспоримым достоинством продукции НПО «РЕНАМ» является ее высокое качество, поскольку каждая партия производимых реагентов и контрольных материалов подлежит обязательной аттестации с помощью международных стандартов. Компания НПО «РЕНАМ» участвует на постоянной основе в программе Международного контроля качества ВОЗ (UK NEQAS, ECAT) и является поставщиком Федеральной Службы Внешней Оценки Качества лабораторных исследований РФ.

Высокая технологичность и соответствие внутренним и международным стандартам обеспечивают продукции НПО «РЕНАМ» универсальность в отношении к уровню автоматизации

[Полуавтоматические коагулометры]

процесса исследования гемостаза (ручной, полуавтоматический или полностью автоматизированный метод регистрации). Также ее использование не зависит от принципа регистрации сгустка при работе на коагулометрах.

Компания НПО «РЕНАМ» производит наборы реагентов как для клоттинговых измерений, так и включающие хромогенные субстраты, необходимые для оптических измерений.

Наиболее распространенными в России из отечественных коагулометров: «Минилаб 701, 704» (ЗАО «Юнимед», Москва), АПГ (ЗАО «НПП «Техномедика», Москва), «Астра» (Уфа), из зарубежных: марки Behnk Elektronik (Германия), Heinrich Amelung GmbH (Германия), Helena (Англия), Sysmex (Япония), Dade Behring (Германия) и других производителей.

Опыт применения реагентов НПО «РЕНАМ» в лечебно-диагностических учреждениях РФ показывает, что наша продукция абсолютно совместима с любыми полуавтоматическими коагулометрами независимо от производителя, а также отлично заменяет реагенты иностранных производителей полных автоматов открытого типа, не снижая уровень точности и воспроизводимости получаемых результатов. Перевод автоматических анализаторов на реагенты НПО «РЕНАМ» практически не требует вмешательства в настройки программы выполнения тестов.



ЛИТЕРАТУРА

1. Берковский А.Л., Васильев С.А., Козлов А.А., Сергеева Е.В. Влияние состава АЧТВ-реагентов на их чувствительность при определении факторов свертывания. Клиническая лабораторная диагностики, 2000, № 4, с. 34-38.
2. Добровольский А.Б., Косырев А.Б. Протромбиновый тест: методика выполнения и клиническое значение. II. Информационный бюлл. Ассоциации медицинской Лабораторной Диагностики, М., 1995, 34-38.
3. Дугина Т.Н., Косырев А.Б. Стандартизация протромбинового теста: проблема контрольной плазмы. Лабораторная медицина 2003, № 6.
4. Качалова Н.Д. Стандартизация определения протромбинового времени и активности фактора VIII в плазме крови. Автореферат канд. дисс., 33 стр., Москва, 2002.
5. Качалова Н.Д., Климович Л.Г., Берковский А.Л., Простакова Т.М., Козлов А.А. Опыт применения отечественных тромбопластинов с аттестованным международным индексом чувствительности при лечении тромбофилий. Клиническая лабораторная диагностика, 2002, № 6, с.13-16.
6. А.А.Козлов, Н.Д.Качалова, Т.М. Простакова. Определение фибриногена по Клауссу. Производственная трансфузиология на рубеже XXI века. Научно-практ. конф. 1999 г., с .63-64.
7. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. – Изд. ООО «Триада». – 2005.- 227 стр.
8. Инструкция пользователя анализаторов показателей гемостаза АПГ-02, АПГ-02П, АПГ4-02П. – Изд. ЗАО «НПП Техномедика».
9. Материалы сайта www.coagulometers.ru.
10. Berkovsky A. L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Uljavova I.S., Kachalova N.D., Klimovich L.G., Samsonova N.N. and Kozlov A.A. A modified method of prothrombin time/International Normalised Ratio determination in capillary blood and monitoring oral anticoagulant therapy. Clin. Chem. Lab. Med. 2006; v.44, N10: p. 1114–1117.
11. Biggs R. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis. 1976.
12. Carr M.E., Martin E. J. Evolving Techniques for Monitoring Clotting in Plasma and Whole Blood Samples. Review. Clin. Lab. 2004, v. 50, p. 539-549.
13. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haemat., 1957, 17, 237-246.
14. Dacie J.V., Lewis S.M. Investigation of haemostasis. Activated partial thromboplastin time. In: Practical Haematology, 1995, 308-309.
15. Dacie J.V., Lewis S.M. Investigation of haemostasis. Prothrombin time. In: Practical Haematology, 1995, 307-308.

16. Kirkwood T.V.L., Lewis S.M. Требования к тромбопластинам и плазме, используемым для контроля над пероральным применением антикоагулянтов (пересмотр 1982). Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. 33 доклад, серия технических докладов 687, 1985, с. 77-99.
17. Quik A.J. Hemorrhagic diseases and thrombosis. Philadelphia: Lea and Fabigar; 1966.

