Актуальные вопросы преаналитического этапа коагулологических исследований

В.А. Крюкова

ведущий эксперт отдела преаналитики и клинической биохимии

Медицинская компания "ОМБ", г. Москва

С каждым годом в практику клинико-диагностических лабораторий (КДЛ) внедряется все больше коагулологических тестов и растет число данного вида анализов. Вопросы качества преаналитического этапа исследований гемостаза недостаточно отражены в справочной и методической литературе. Трудности в создании методических рекомендаций по организации преаналитического этапа коагулологических исследований связаны с разнообразием факторов, влияющих на результат, и со сложной организацией исследуемой системы, включающей как клеточные, так и молекулярные компоненты. В данной статье рассматриваются факторы преаналитического этапа, влияющие на результаты коагулологических исследований.

Пример из практики

При переходе КДЛ городской многопрофильной больницы на вакуумные системы для взятия крови средние значения скрининговых тестов протромбинового индекса (ПИ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) существенно снизились.

В группах пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, проходящих лечение в стационаре, после перехода на вакуумные пробирки выявилось снижение среднего значения протромбинового индекса на 20%, а у проходящих лечение в амбулаторных условиях – на 30%. Среднее значение АЧТВ оказалось удлинено в первой группе на 15%, а во второй на 20%.

Ретроспективная оценка преаналитического этапа коагулологических исследований

До внедрения вакуумных систем (1-й вариант) для взятия крови лаборатория предоставляла в процедурные кабинеты пробирки из полистерола объемом 15 мл с внесенным за день до использования антикоагулянтом – 1 мл 3,8%-го цитрата натрия. Объем крови, необходимый для анализа, отмечался сотрудниками лаборатории на пробирке маркером. Пробирки с цитратом натрия закрывались внутренними крышками без фиксаторов и резьбы. В процедурном кабинете пробирки хранились при комнатной температуре.

Кровь пациента, для взятия которой использовали шприц объемом 20 мл, переносили в пробирку, при этом первую порцию крови после прокола вены не удаляли. Объем крови в пробирке зачастую не соответствовал необходимому на 300–500 мкл, чаще в сторону снижения объема. По причине неполной герметичности крышек пробирок, перемешивание проб крови с цитратом проводили не переворачиванием на 180°, а встряхиванием. В зимнее время пробирки в штативах просто переносили в лабораторной укладке в другой корпус. Летом, со слов сотрудников, для транспортировки проб использовали сумку с охлаждающим

элементом. В лаборатории пробы центрифугировали на центрифуге ОПН с подвесным ротором радиусом 40 см при 3000 об./мин. В среднем исследования выполняли через 1,5–3 ч после взятия крови, но время взятия крови на бланках направлений не фиксировалось.

При взятии крови при помощи **вакуумных систем** (2-й вариант) использовали пробирки из полиэтилентерефталата объемом 9 мл, содержащие 0,9 мл буферного раствора цитрата натрия с концентрацией 3,2%, и стандартные двухсторонние иглы среднего размера. Перемешивание проб также проводилось при помощи встряхивания. Транспортировка проб и все остальные операции преаналитического этапа осуществлялись аналогично первому варианту.

Комментарий

При организации преаналитического этапа коагулологических исследований в лаборатории был допущен ряд ошибок, которые могли привести к **уменьшению времени коагуляции** для скрининговых тестов – как в первом, так и во втором случае (рис. 1).

1. Взятие и выдавливание крови шприцем (1-й вариант), интенсивное перемешивание, относительно жесткие условия центрифугирования при 2000 g (ОЦС) могли привести к повреждению клеток и активации тромбоцитов (оба варианта).

2. При проколе вены имелась значительная вероятность попадания в пробу тканевого тромбопластина, т. к. не было осуществлено удаление первой порции крови (1-й вариант).

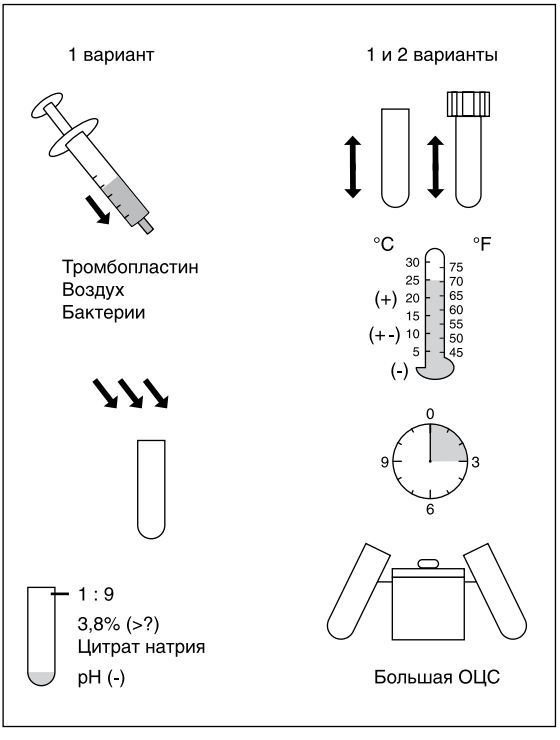

Рис. 1. *Факторы, отрицательно влияющие на результаты исследований*

3. За счет контакта крови с атмосферным воздухом повышается вероятность активации свертывания in vitro (1-й вариант).

4. Длительное хранение раствора цитрата натрия и его бактериальное загрязнение могло привести к изменению pH пробы крови, которое усиливается при контакте стабилизированной крови с атмосферным воздухом (1-й вариант).

5. При приготовлении раствора цитрата натрия, его хранении в холодильнике, испарении жидкости из негерметично закрытых пробирок при хранении могло произойти превышение его концентрации. Также могло иметь место уменьшение объема крови в пробирке и нарушение соотношения 1 : 9 "раствор цитрата натрия – кровь". Увеличение концентрации цитрата натрия в стабилизированной крови может приводить к **удлинению времени** скрининговых тестов (1-й вариант).

6. По современным данным, охлаждение проб крови приводит к холодовой активации в них ряда факторов гемостаза (VII, XI, XII) и к соответствующему укорочению времени скрининговых тестов (оба варианта).

7. Время от момента взятия крови до начала выполнения анализа в среднем было больше, чем допускается для коагулологических проб (оба варианта).

В результате исследования лаборатории даны рекомендации по устранению ошибок на преаналитическом этапе и проведено обучение процедурных медицинских сестер правилам работы с образцами крови для коагулологических исследований.

Особенности действия различных факторов на качество клинических коагулологических исследований

Помимо вышеперечисленных факторов, влияющих на качество лабораторных исследований, следует упомянуть фактор контаминации проб. Физическая (пылевые частицы) и биологическая контаминация возможна при использовании открытых систем взятия крови. Химическая контаминация (в первую очередь гепарин или другие антикоагулянты) может произойти при взятии крови в несколько пробирок или при других, помимо венопункции, способах взятия крови.

Важным фактором является также контактная активация тромбоцитов на искусственной поверхности системы для взятия крови. Оптимальным выбором является совместимый с кровью пластик, а не силиконизированное стекло, которое еще продолжают использовать в некоторых лабораториях. Пластиковые материалы должны быть химически нейтральными и не иметь заряда поверхности. Из используемых в медицине и лабораторной диагностике материалов наиболее оптимальны полипропилен и полиэтилен высокого давления. В новейших вакуумных системах для коагулологических проб используется конструкция с двойной стенкой, в которой наружный слой из полиэтилентерефталата обладает оптимальными свойствами для сохранения вакуума в пробирке, а внутренний слой из полипропилена препятствует испарению жидкости при хранении систем, обладая при этом и антитромботическими свойствами (рис. 2). Контактной активации тромбоцитов также способствует увеличение соотношения "внутренняя поверхность пробирки – объем стабилизированной крови".

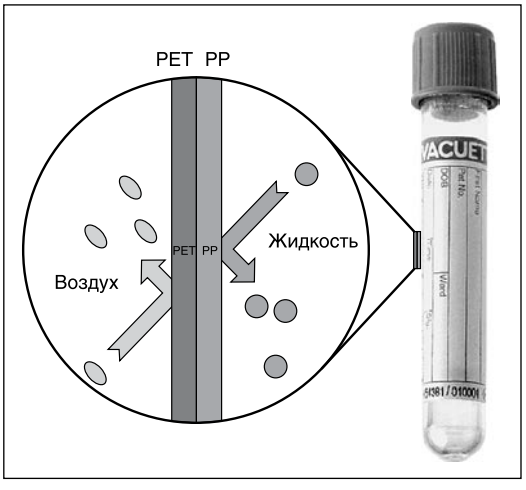

Рис. 2. *Строение двойной стенки пробирки*

Отдельного обсуждения требует вопрос об антикоагулянтах. Основным антикоагулянтом коагулологических проб является цитрат натрия. До сих пор для пользователей является актуальным вопрос о том, какая концентрация цитрата натрия должна быть использована для коагулологического исследования – 3,8% (129 ммоль/л) или 3,2% (109 ммоль/л). В сравнительных исследованиях было показано, что избыток цитрата натрия может вызывать изменения в резуль-

татах скрининговых тестов на определение протромбинового индекса (ПИ или МНО) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) при использовании чувствительных реагентов (тромбопластина, актина, инновина) с удлинением времени теста. Причем этот эффект усиливается при хранении пробы. В национальных стандартах США для скрининговых тестов рекомендовано использовать концентрацию цитрата натрия 3,2%, но в лабораториях других стран используется концентрация 3,8%. Поэтому производители пробирок предлагают разные концентрации цитрата натрия на усмотрение пользователей.

Способы оптимизации преаналитического этапа современных коагулологических исследований

При коагулологических исследованиях следует учитывать ряд основных моментов: вид и объем биоматериала, тип и концентрацию антикоагулянта, материал и конструкцию пробирки, время, температуру хранения и транспортировки пробы, условия центрифугирования, необходимость адаптации к автоматическим анализаторам.

При разработке алгоритма преаналитического этапа коагулологических исследований следует учитывать, что для одного пациента может потребоваться несколько разных типов тестов и, соответственно, несколько вариантов подготовки проб.

Это существенно отличает данный вид лабораторных исследований от других.

Для развернутого коагулологического исследования, как правило, необходимо взятие крови в несколько пробирок. Важно соблюдать правильную последовательность взятия крови в пробирки с разными антикоагулянтами. Чтобы избежать контаминации проб другими антикоагулянтами, первыми в серии должны быть пробирки с цитратом натрия. В отдельные пробирки необходимо брать следующие пробы:

- чувствительные к внешним условиям;
- на исследование функциональной активности тромбоцитов;
- требующие охлаждения;
- предназначенные для хранения и транспортировки.

Для ряда тестов должно быть использовано взятие крови со специальными антикоагулянтами, в т. ч. и не входящими в коммерческие системы для коагулологических исследований.

Внимание! Система для взятия коагулологических проб должна обеспечивать точное соотношение крови и раствора цитрата натрия (1 : 9).

Оптимальным вариантом является закрытая вакуумная система, позволяющая провести точное дозирование порции крови. Контакт пробы крови с атмосферным воздухом в системе должен быть минимальным. Желательно использовать систему для взятия крови, содержащую буферные добавки в цитрат натрия, стабилизирующие pH. По возможности нужно также выбирать пробирку такого объема, при котором свободное пространство для воздуха под крышкой пробирки будет минимальным. Оптимальным является использование цитрата натрия более низкой концентрации (3,2%), что способствует лучшей сохранности проб для исследования протромбинового времени и АЧТВ. Время хранения проб

в первичной пробирке с низкой концентрацией цитрата натрия может быть продлено до 2 ч. Использование в пробирках для взятия крови стабилизаторов типа "CTAD" продлевает срок хранения коагулологических проб в первичной пробирке до 3–6 ч.

Буферная стабилизационная система "CTAD" является новой разработкой для улучшения исследований плазменного звена гемостаза.

к сведению

Она предназначена для чувствительных тестов, нестабильных аналитов, удлиненных сроков транспортировки проб, получения замороженной плазмы, выполнения анализов у пациентов, получающих антикоагулянтную терапию. В дополнение к 3,2% буферному раствору цитрата натрия, пробирка содержит смесь из теофиллина, аденозина, дипиридамола. Данные вещества предотвращают выброс тромбоцитарных факторов свертывания после активации тромбоцитов на искусственных поверхностях системы взятия крови, при контакте с воздухом и в результате механических воздействий.

Самым оптимальным вариантом системы для коагулологических исследований в настоящее время является пластиковая вакуумная система для взятия венозной крови, сочетающая в себе следующие свойства: стабилизатор пробы "CTAD", конструкция пробирки с двойной стенкой (с внутренним слоем из полипропилена), антиаэрозольная крышка, сочетание размеров (13 × 75 мм) и объема (2 мл).

Международный комитет по стандартизации в гематологии (ICSH) рекомендует практически полностью **исключить использование капиллярной крови** для проведения коагулологического исследования из-за невозможности получения стандартизованных результатов. Исключение может быть сделано только для некоторых тестов (например, время свертывания крови на часовом стекле и т. д.) и при экспресс-диагностике на автоматических анализаторах.

Взятие венозной крови должно минимально травмировать клетки крови и ткани. Система должна иметь особую заточку иглы для венепункции. Время наложения жгута на руку пациента должно быть менее 1 мин. После взятия крови следует провести медленное и осторожное ее перемешивание в пробирке переворачиванием на 180° не более 4–5 раз. Категорически нельзя взбалтывать пробу. Сразу после взятия крови следует поместить ее в штатив термоконтейнера или провести центрифугирование. **Нельзя открывать пробирки до начала аналитической стадии исследования.**

Необходимо соблюдать правильный температурный режим хранения, транспортировки и обработки проб. Пробы крови для коагулологических исследований следует хранить с использованием термоконтейнеров при постоянной температуре в пределах 22–24 °С. Исключение составляют отдельные тесты для определения очень нестабильных аналитов (например фактор VIII), для которых преаналитический этап следует проводить в условиях низких температур.

Время доставки пробы для исследования в лабораторию не должно превышать 45 мин. При необходимости более длительной транспортировки и хранения следует использовать специальную систему стабилизаторов ("CTAD" до 3–4 ч) или получить свободную от тромбоцитов плазму и провести ее замораживание во вторичной пробирке для более длительного хранения.

На всех стадиях преаналитического этапа следует избегать резкого изменения температуры, длительного контакта с атмосферным воздухом, прямого воздействия солнечного света, механических воздействий и вибрации.

внимание!

При поступлении образцов крови в лабораторию необходимо проводить контроль качества поступившего биоматериала. При наличии сгустков и следов гемолиза пробы не следует исследовать, т. к. in vitro уже произошли изменения параметров свертывающей системы.

Центрифугировать пробы крови для коагулологических исследований следует максимально осторожно, используя мягкие условия разгона и торможения.

Для разных типов исследований используется один из трех стандартных режимов, соответствующих разным типам необходимого для тестов биоматериала.

РЕЖИМ 1. Плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP), – 5 мин при ОЦС – 150 g.

Эта плазма используется только для выполнения функциональных тестов тромбоцитов (агрегации, адгезии, трансформации). Оптимальным вариантом является отдельная пробирка с цитратом натрия для этих исследований. Одна часть обогащенной плазмы отбирается для выполнения тестов, а вторая повторно центрифугируется для получения бедной тромбоцитами плазмы (PPP), которая является контролем для данных исследований.

РЕЖИМ 2. Плазма, бедная тромбоцитами (PPP), – 10 мин при ОЦС – 1500–2000 g.

Эта плазма является основным материалом для скрининговых тестов коагуляции и фибринолиза, а также для определения факторов, маркеров и ингибиторов различных звеньев свертывающей системы при помощи тестов разного типа.

РЕЖИМ 3. Плазма, свободная от тромбоцитов (PFP), – 20 мин при ОЦС – 2000–3000 g.

Эта плазма содержит менее 5000 тромбоцитов в мкл. Она предназначена для замораживания материала при невозможности его быстрого исследования. Этот вид материала также оптимален для высокочувствительных тестов, таких как ингибиторы факторов и факторы тромбоцитов. Она может быть получена из пробирок со стабилизатором "CTAD".

Использование охлаждения при центрифугировании должно проводиться строго в тех случаях, когда это необходимо (фактор VIII).

При замораживании пробы свободной от тромбоцитов плазмы (PFP) следует использовать вторичную пробирку с герметичной пробкой из нейтральных материалов (типа полипропилена). Замораживание следует проводить при температуре не выше -20 °С (срок хранения до 4 недель) или -70 °С (срок хранения 6 месяцев). Размораживать пробы перед исследованием следует быстро при 37 °С на водяной бане с постоянным осторожным перемешиванием, чтобы все криопреципитаты могли раствориться. Пробы, содержащие продукты деградации фибриногена или гепарин, должны быть обработаны особым способом, чтобы избежать влияния криопреципитатов на результаты исследований.