

## СТАНДАРТИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКУМОВ И УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА АПТВ

*Л.Н. Тарасова, Е.Ю. Савиных, Г.К. Платонова, Л.Н. Гонин, О.И. Речкин*

*Кировский научно-исследовательский институт гематологии  
и переливания крови (директор — С.Л. Шарыгин), г. Киров*

Для распознавания многих коагуляционных дефектов необходима постановка двух основополагающих тестов: определения активности противотромбинового комплекса (по Квику с полным тромбопластином) и активированного парциального (частичного) тромбопластинового времени (АПТВ, АЧТВ). При наличии отклонений в результатах, полученных этими методами, можно воспользоваться дополнительной схемой обследования, которая при сопоставлении с клиническими проявлениями заболевания и анамнезом помогает выбрать необходимые тесты и уточнить диагноз [15].

Основанный на измерении времени свертывания стабилизированной плазмы после ее рекальцификации тест АПТВ имеет неоспоримые преимущества: стандартизацию по фосфолипидному составу и контактной активации. В таких условиях образование сгустка в тест-системе зависит лишь от активности протромбина, факторов, принимающих участие во “внутреннем” пути свертывания, и концентрации фибриногена. Тест широко используется как скрининговый при оценке нарушений коагуляции в первой фазе, то есть при диагностике гемофилий и болезни Виллебранда. На его основе разработаны одностадийные методы определения активности факторов VIII (VIII:K) и IX (IX:K) [7]. Поскольку тест чувствителен к гепарину, с его помощью проводят контроль гепаринотерапии. Во многих странах он широко применяется как обязательный при госпитализации больных и перед хирургическими вмешательствами наряду с определением активности протромбинового комплекса, времени свертывания крови и количества тромбоцитов [18, 25, 33].

Необходимость осуществления внешнего контроля качества диагностикумов для исследования гемостаза, в том числе теста АПТВ, не нуждается в обсуждении. Несмотря на длительное и широкое использование его за рубежом, вопросы стандартизации до сих пор не решены, что связано с разнообразием методов и реагентов. Основным биологическим диагностикумом, применяемым в методе АПТВ, является фосфолипидный экстракт (ФЭ), иначе называемый парциальным (частичным) тромбопластином, кефалин — заместитель фактора 3 тромбоцитов. Существующее разнообразие фосфолипидных компонентов, изготовленных из разных источников сырья, обладающих различной активностью, стабильностью, а также чувствительностью к нарушениям коагуляционного гемостаза, затрудняет стандартизацию методов АПТВ и получение сравнимых результатов [10, 11, 22]. Коммерческие или лабораторные ФЭ, применяемые в тесте АПТВ, отличаются по способности выявлять коагуляционные дефекты или присутствие ингибиторов свертывания [29]. Совершенно очевидно, что реагенты, дающие в тест-системе АПТВ объективные результаты при выявлении нарушений “внутреннего” механизма коагуляции (у больных гемофилией), могут быть неприемлемы при контроле гепаринотерапии [21].

Различие их чувствительности объясняется рядом причин, наиболее важной из которых является источник фосфолипидов: кадаверное сырье, материал животного или растительного происхождения [8]. В практике клинических лабораторий широко применяются реагенты, изготовленные из серого вещества кадаверного мозга [11, 34]. Как сырье используются также головной мозг жи-

вотных (фирма "Organon teknika"), ткань плаценты [20], эритроциты крови доноров [1, 2], продукты растительного происхождения, в частности бобы сои [8, 9].

Чувствительность ФЭ к определенным нарушениям в системе коагуляции зависит не только от источника получения, но и от их физико-химических свойств [31]. Однако этот аспект проблемы разработан недостаточно; мало известно об оценке физико-химических свойств фосфолипидов, обладающих высокой прокоагулянтной активностью [9]. Важным требованием к ФЭ является также стабильность. Поэтому необходим не только подбор сырья [8], но и лиофилизация продукта [11].

Наиболее чувствительными к нарушениям "внутреннего" механизма коагуляции считают фосфолипидные компоненты из серого вещества кадаверного мозга [34] и бобов сои [8]. Сравнение отечественного ФЭ, полученного из бобов сои Н.Н. Старицкой [11], с реагентом фирмы "Реанал" (Венгрия) из кадаверного мозга в тесте АПТВ показало более высокую чувствительность первого к выявлению нарушений в первой фазе коагуляции, что важно при распознавании гемофилии, особенно ее скрытых форм.

На чувствительность метода АПТВ оказывает влияние также активатор, входящий в тест-систему (его качество и количество), и концентрация хлорида кальция [26]. В качестве активатора наиболее часто используют каолин [6, 12]. Он должен быть очищенным от механических примесей и иметь мелкодисперсную структуру, оптимально обеспечивающую стандартность контактной активации. Некоторые исследователи и фирмы предлагают эллаговую кислоту [13], кремнезем [27].

В стандартизации результатов АПТВ немаловажная роль принадлежит условиям проведения метода — последовательности добавления реагентов, продолжительности инкубации смеси, контактной активации, а также преаналитическим условиям выполнения исследований — взятию крови, продолжительности при этом венозного стаза,

условиям и длительности хранения образца [14]. Требованиям стандартизации, по мнению Dieter [28], отвечает проведение теста в кюветах из плотного полилена.

Существуют значительные различия в показателях чувствительности теста АПТВ к гепарину. До сих пор терапевтический уровень при проведении гепаринотерапии устанавливают по результатам теста обычно без проверки чувствительности входящих в набор реагентов [21]. Чтобы использовать тест АПТВ для контроля гепаринотерапии, Haushofer и соавт. [21] рекомендуют использовать для калибровки лиофилизированную плазму с содержанием гепарина, наиболее часто применяемого в клинике; подобное предлагают исследователи США и Англии [5]. Без этого терапевтические уровни гепарина при использовании различных реагентов в тесте АПТВ в лабораториях не совпадали по чувствительности до такой степени, что исследование одного и того же образца плазмы показывало недостаточность дозы гепарина в одной системе и опасную передозировку — в другой. Верхние пределы терапевтических уровней одних реагентов для этого теста могут быть ниже, чем нижние — других [23]. Следует также учитывать, что выраженное удлинение АПТВ зависит от сочетанного применения с гепарином других лекарств [19]. Оценивая зависимость величины АПТВ от дозы введенного большим гирудином или гирулолом, Lefkovits и Topol [24] установили, что результаты теста не являются адекватным показателем антитромботического действия этих препаратов.

В связи с многоплановостью применения метода в практике клинических лабораторий, значительным числом ФЭ, различием качества активаторов, а также вариациями воспроизведения возникают затруднения в оценке полученных результатов. Это побудило ряд стран провести исследования в большом числе лабораторий с использованием ряда контрольных плазм с нормальными и патологическими диапазонами коагуляции [32] и разработать собственные национальные программы стандартизации.

теста АПТВ и оценки биологических реактивов и активаторов, используемых в тест-системах. Такие мероприятия позволяют также ограничить или исключить применение ФЭ с низкой стабильностью или активностью [5].

Сравнительное изучение 4 коммерческих кефалинов, проведенное в большом числе лабораторий, показало наибольшую чувствительность к дефектам свертывания, характерную для набора "Цефотест", и наименьшую — для "Актин ФС" [22]. Исследование 9 коммерческих кефалинов [17] выявило удовлетворительную стабильность и воспроизводимость всех реагентов. Haushofer A. и соавт. [21] изучили чувствительность к гепарину ряда наборов для выполнения метода АПТВ на разных автоматических коагулографах: Liquid Silica (SIL; Instrumentation Laboratory, Italy), Actin FSL and FS (FSL, FS; Dade, USA), Pathromtin (БЕН; Behringwerke, Germany), Cephalin Kaolin АРТТ (BOE, Boehringer Mannheim, Germany) и аппараты ACL 300 (ACL), Sysmex CA 5000 (CA) и STA. Они рекомендуют гепариновые калибровки с использованием коммерческих плазм, имеющих определенную концентрацию гепарина (0,3, 0,5 и 0,7 МЕ в 1 мл). При этом обеспечивается тестирование чувствительности разных наборов.

Метод АПТВ, как и Квика, может быть осуществлен не только ручным, но и аппаратным способом, на полу- и автоматических коагулометрах [3, 4, 16]; предпочтительно пользоваться коммерческими тестированными ФЭ [30]. Исследования АПТВ, проведенные у здоровых лиц Craig и соавт. [16] с использованием двух реагентов парциального тромбопластина фирмы "Manchester low-opacity", показало хорошую корреляцию результатов — у больных, получавших большие дозы гепарина, корреляция была слабой.

В нашей стране тест АПТВ, в отличие от метода Квика, внедрен в клинико-диагностические лаборатории недостаточно широко. Тем не менее количество ФЭ, предназначенных для его выполнения, значительно больше, нежели полных тромбопластинов для теста Квика.

В лаборатории биохимии крови Кировского НИИГПК созданы лиофилизированные диагностикумы из кадаверного тромбопластина — кефалины [11, 12] на основе разработок Ленинградского НИИГПК [6]. Отечественный аналог кефалина — эрилид, разработанный в лаборатории комплексной переработки крови ГНЦ РАМН, изготовлен из стромы эритроцитов крови человека [1, 2]. Он высокочувствителен к дефектам коагуляции; длительность АПТВ в тест-системе с эрилидом при легкой форме гемофилии составила 66 с, при средней — 75—97 с (норма — 35—45 с). На основе эрилида сформирован коммерческий набор для определения АПТВ, в качестве активатора включающий каолин. Из сырья растительного происхождения (бобов сои) в Ленинградском НИИГПК создан стабильный фосфолипидный экстракт, высоко чувствительный к нарушениям "внутреннего" механизма коагуляции и выявлению гемофилии, в том числе скрытой [8]; активатор в наборе — каолин.

Для изготовления стабильного ФЭ из кадаверного тромбопластина нами разработан способ лиофилизации эмульсии, полученной по методу Л.П. Папаян и П.В. Хроловой [6]. Лиофилизированный реагент, названный парциальным (частичным) тромбопластином, представляет собой порошок белого цвета, растворимый в дистиллированной воде и изотоническом растворе натрия хлорида (до 1 мин). Первоначальная форма диагностикума была представлена в пенициллиновых флаконах, более поздняя — в инсулиновых. Перед проведением исследований реагент разводили в 0,2 мл дистиллированной воды ("восстанавливали" исходный объем, из которого высушивали), затем в 100 раз — изотоническим раствором хлорида натрия. Активность контролировали в тесте АПТВ [6] по отношению к пулу свежей донорской плазмы. Исходные показатели активности реагента 6 серий составляли 48—53 с и сохранялись не менее одного года при 4—8°C. Изготовленный позднее диагностикум других серий имел более высокую активность, достигающую 30 с, что связано с качеством исходного сырья.

Отечественный реагент сравнивали в тесте АПТВ с парциальным тромбопластином фирмы "Reanal" (Венгрия), проводя исследования в соответствии с инструкцией "Reanal АРТТ", прилагаемой к набору. Тестировали диагностикумы по отношению к свежему донорскому пулу. Исследовали венгерский реагент двух поставок за 5—6 месяцев до истечения срока годности. Активность парциального тромбопластина отдельных флаконов первой поставки в разные дни исследования колебалась от 28,2 до 97,5 с ( $65,6 \pm 8,5$  с), второй — 33,5—51,0 с ( $42,2 \pm 1,1$  с). Изученная параллельно активность отечественного кефалина 2 серий составила соответственно 49—76 с ( $59,5 \pm 5,2$  с) и 30,0—38,8 с ( $33,4 \pm 1,4$  с). Низкая активность реагента фирмы "Reanal", особенно первой поставки, и большой ее "разброс" могут быть связаны с нарушениями транспортирования и последующего хранения (границы для разных поставок, указанные фирмой, находятся в пределах 28—45 с).

Специфичность отечественного лиофилизированного ФЭ подтверждена результатами исследования АПТВ и антигемофильных факторов 36 больных гемофилией А и 6 — гемофилией В, а также лиц, получавших гепарин (более 30 человек).

Изготовленная форма парциального тромбопластина имела существенный недостаток: после разведения реагент необходимо было использовать в течение 2 суток (хранение при 4—8°C), проведя не менее 100 исследований. Такая потребность в обследовании больных возможна лишь в крупных специализированных отделениях сосудистой хирургии, где проводят гепаринотерпию. Следовательно, изготовленная форма была мало экономичной и не могла пользоваться широким спросом. Кроме того, активность, равная в основном 48—53 с, достаточно низка. С целью повышения активности и стабильности, а также для возможно более широкого внедрения метода АПТВ в практику отечественных клинических лабораторий мы создали другую форму парциального тромбопластина, также используя кадаверное сырье. Изменение способа его обработки позволило сократить про-

должительность изготовления нативной эмульсии примерно в 1,5 раза; эмульсия стала более гомогенной; модификации, внесенные в технологию, позволили повысить активность и стабильность реагента. Изменили также разведение лиофилизированного продукта перед проведением исследований. Его растворяли в 0,2 мл дистиллированной воды (исходный объем, из которого был высушен диагностикум), затем прибавляли 4,8 мл изотонического раствора хлорида натрия. Разведенный парциальный тромбопластин использовали в тесте АПТВ через 30 минут. Неиспользованный реагент оставляли в холодильнике при 4—8°C до следующего рабочего дня. Активность реагента разных серий колебалась от 35 до 48 с и сохранялась не менее одного года, то есть приближалась к международным требованиям.

Разработанный нами фосфолипидный экстракт явился основой набора для теста АПТВ. Помимо двух флаконов парциального тромбопластина набор включает мелкодисперсную суспензию каолина и 0,277% раствор хлорида кальция. Он рассчитан на 40—50 анализов с учетом того, что каждый образец плазмы должен проверяться не менее 2 раз.

Параллельные исследования активности реагента проводили пробирочным методом и на 2 аппаратах фирмы "Organon teknika" (полуавтоматическом "Coag-A-mate XM" и автоматическом "Coag-A-mate RA4"). В качестве контроля использовали диагностикум "Плазма донорская (реактив)" нашего производства и референт плазмы "Organon teknika". При проведении исследований с отечественным реагентом время образования сгустка составило в среднем  $45,2 \pm 0,3$  с (пробирочный способ),  $37,9 \pm 3,4$  с (полуавтомат) и  $32,1 \pm 1,4$  с (автомат), со стандартом "Organon teknika" — соответственно 44,5 — 45,5 с, 36,6—42,7 с и 35,7—40,4 с, то есть время свертывания в тесте АПТВ, выполненном на аппаратах, было меньшим. Однако индекс АПТВ (отношение времени образования сгустка в исследуемом образце ко времени образования его в контроле) во всех исследованиях был сопоставим с достаточной точностью

### Индекс АПТВ (M±m)

Методы	Пул свежей донорской плазмы	Плазма донорская (реактив)	Референтная плазмы фирменная
Пробирочный	0,097±0,026	0,98±0,06	0,98±0,03
Полуавтомат	1,00±0,04	0,96±0,1	0,96±0,1
Автомат	1,10±0,15	1,09±0,094	1,01±0,09

(P > 0,05). Результаты представлены в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о том, что отечественный реагент парциального тромбопластина может быть использован в наборе, предназначенном для выполнения теста АПТВ, при его воспроизведении не только пробирочным, но и аппаратным способом, на полу- и автоматическом приборах. Набор может быть рекомендован для использования в специализированных и клинико-диагностических лабораториях страны.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов А.А. Новое в трансфузиологии: Информ. бюлл. — М., 1993. — № 3. — С. 44—45.
2. Козлов А.А., Простакова Т.М., Берковский А.Л., Качалова Н.Д. Клин. лаб. диагностика. — Состояние и перспективы: Мат-лы науч.-практич. конф. — СПб, 1996.
3. Лабинская Т.А., Пешков А.В., Добровольский Н.А. и др. // Патол. гемокоагул. — М., 1995.
4. Лукичева Т.И. Клин. лаб. диагностика. — Состояние и перспективы: Мат-лы науч.-практич. конф. — СПб, 1996.
5. Нарушения реакций образования тромбина/ Под ред. Р.У. Колмена. — М., 1988.
6. Папаян Л.П., Хролова П.В. // Лаб. дело. — 1980. — № 11. — С. 666—669.
7. Папаян Л.П., Хролова П.В. // Лаб. дело. — 1983. — № 4. — С. 45—48.
8. Старицына Н.Н., Шанская А.И., Хролова П.В., Папаян Л.П. // IV научный съезд специалистов по клинической лабораторной диагностике Республики Беларусь. — Тез. докл. — Минск, 1992.
9. Старицына Н.Н., Шанская А.И., Хролова П.В., Папаян Л.П. // Клин. лаб. диагност. — 1993. — № 6. — С. 43.
10. Старицына Н.Н., Шанская А.И., Пучкова С.М., Недачина Н.А. // Гематол. и трансфузиол. — 1995. — № 4. — С. 36—38.
11. Тарасова Л.Н., Платонова Г.К., Савиных Е.Ю., Старкова Е.В. // Лаб. дело. — 1990. — № 6. — С. 29—32.
12. Тарасова Л.Н., Платонова Г.К., Савиных Е.Ю. // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: Тез. докл. III Всерос. съезда гематологов и трансфузиологов. — М., 1996.
13. Babson A.L., Babson S.K. // Amer. J. Clin. Pathol. — 1974. — Vol. 8. — P. 856—860.
14. Becker B., Denzler B., Kodle H.—J. et al. // MTA. — 1994. — Vol. 9. — P. 888—892.
15. Boutiere B., Arnoux D. // Rev. franc. lab. — 1995. — Vol. 23. — P. 31—35.

16. Craig S., Stevenson K.J., Taberner D.A. // Brit. J. Biomed. Sci. — 1994. — Vol. 51. — P. 321—327.
17. De Geldre I., Kocharzewski C., Houdijk W., Capel P. // Brit. J. Haematol. — 1994. — Vol. 87. — P. 179.
18. Erban St. B., Kinman J.L., Schwartz J.S. // Amer. J. Med. Ass. — 1989. — Vol. 262. — P. 2428—2432.
19. Francis J.L., Howard C., Roath O.S. // Blood. — 1991. — Vol. 78. — P. 483a.
20. Girolami A., Sartori M., Santarossa A. et al. // Gital. Chem. clin. — 1991. — Vol. 16. — P. 369—375.
21. Haushofer A., Halbmayer W.M., Moritz B., Fischer M. // Immuno Scienc 97. Abstract book XVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis Florence, June 6—12, 1997.
22. Hoffman J.J.M., Meulendijk P.N. // Thromb. a. Haemost. — 1978. — Vol. 39. — P. 640—645.
23. Koepke J.A., Triplett D.A., Banez G. // The Chemistry and Biology of Heparin. — North Holland: Elsevier, 1980.
24. Lefkovits J., Topol E.J. // Austral. and N.Z.J. Med. — 1994. — Vol. 24. — P. 669.
25. Mannucci P.M. // Ric. clin. e lab. — 1989. — Vol. 19. — P. 339—343.
26. Naghibi P., Han Yangsook, Dodds W.J., Lawrence Ch. E. // Thromb. a. Haemost. — 1988. — Vol. 59. — P. 455—463.
27. Pat. 2283440 France. Reactif pour diagnostic notamment des deficts en facteurs de coagulation du sang [Warner-Lambert Co] // Физиол. чел. и жив.: P.Ж.04Н. — 1977. — № 5. — С. 15.
28. Pat. 93110471.5 Germany. Messung des aktivierten partiellen Tromboplastinzeit (APTT) in einer Einstufen Reaktion/Dieter J. // Физиол. чел. и жив.: P.Ж.04М2. — 1996. — № 6. — С. 11.
29. Poller L., Thomson J.M., Yee K.F. // Brit. J. Haematol. — 1980. — Vol. 44. — P. 161—165.
30. Pounthey J.A., Browne J.R. // N.L.I. Med. Lab. Technol. — 1990. — Vol. 44. — P. 100—102.
31. Slater P.J., Stevenson K.J., Poller L. // Thromb. Res. — 1980. — Vol. 18. — P. 831—838.
32. Spanuth E., Breyer J. // Folia Haematol (DDR). — 1988. — Bd. 115. — S. 539—545.
33. Suchman A., Griner P. // Ann. Intern. Med. — 1986. — Vol. 104. — P. 810—816.
34. Turi D.C., Peerchke E.J. // Amer. J. Clin. Pathol. — 1986. — Vol. 85. — P. 43—49.

Поступила 19.11.97.

### STANDARDIZATION OF DIAGNOSTICUMS AND CONDITIONS OF PERFORMING THE ACTIVATED PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME TEST

L.N. Tarasova, E.Yu. Savinykh, G.K. Platonova,  
L.N. Gonin, O.I. Rechkin

### Summary

The data on standardization of the activated partial thromboplastin time test all over the world and in Russia are given. The method is used as a screening one and it is of importance for revealing disorders in the first coagulation phase (hemophilia diagnosis) and heparinotherapy control. Two lyophilized forms of partial thromboplastin made of cadaverine raw materials are developed. Their specificity in revealing hemophilia, therapy control by heparin fit for a year is confirmed. The diagnosticum of one of them is a basis of the kit for determining the activated partial thromboplastin time. The possibility of its use not only in performing the test by test tube methods but as well by semiautomatic and automatic machines.