

ВОЗМОЖНЫЕ ИСТОЧНИКИ ОШИБОК ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МНО И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Е.В. ТИТАЕВА, А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ

ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва

Несмотря на появление новых оральных антикоагулянтов, антагонисты витамина К (АВК) продолжают широко использоваться для лечения и профилактики тромбозомболических осложнений, а у больных с искусственными клапанами сердца им пока нет альтернативы. При приеме АВК у больных синтезируются измененные факторы протромбинового комплекса (протромбин, фактор X, IX и VII, а также два компонента противосвертывающей системы — протеин С и протеин S), утратившие способность связываться с поверхностью фосфолипидов. В результате существенно снижается вероятность внутрисосудистого тромбообразования, но степень антикоагуляции индивидуальна и требует контроля для каждого пациента. Для контроля используется протромбиновый тест (ПТ-тест), в основе которого лежит определение времени свертывания плазмы пациента после добавления к ней тромбопластина и хлорида кальция (протромбинового времени). Тромбопластин — это экстракт тканей животных, содержащий тканевой фактор и фосфолипиды. Как показала практика, определение степени антикоагуляции по протромбиновому времени — непростая задача. Дело в том, что разные препараты тромбопластина обладают разной чувствительностью к снижению содержания факторов протромбинового комплекса, время свертывания нормальной и патологической плазмы зависит от используемого препарата тромбопластина и отличается даже для разных серий тромбопластина одного и того же производителя. Кроме того, протромбиновое время зависит от используемого метода (коагулометра). Специально для оценки степени антикоагуляции у больных, находящихся на терапии оральными антикоагулянтами, ВОЗ была принята система представления результатов ПТ-теста в виде МНО (международного нормализованного отношения).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антагонисты витамина К, протромбиновый комплекс, тромбопластин, степень коагуляции, коагулометр

КАЛИБРОВКА ПРОТРОМБИНОВОГО ТЕСТА

В зависимости от источника получения различают тромбопластины из тканей человека, кроликов или крупного рогатого скота. Созданы также препараты тромбопластинов, содержащие рекомбинантный тканевый фактор человека. Тромбопластин, состоящий только из экстракта тканей, с добавлением хлорида каль-

ция, называют «простым». Существуют также «комбинированные» тромбопластины, которые помимо тканевого экстракта содержат адсорбированную бычью плазму в качестве источника дополнительного фактора V и фибриногена. В соответствии с рекомендациями ВОЗ очень важно корректно прокалибровать каждый используемый тромбопластин. Это необходимо для того, чтобы результаты определе-

ния МНО были воспроизводимы и сопоставимы независимо от источника происхождения и серии тромбопластина. ВОЗ была принята методика калибровки тромбопластина, основанная на линейной зависимости между логарифмами протромбинового времени, полученного на плазме больных, находящихся на терапии оральными антикоагулянтами, и определенного с разными тромбопластинами. Методика подробно описана в технических сообщениях ВОЗ [1], а также в русскоязычной литературе [2]. В соответствии с требованиями ВОЗ для калибровки тромбопластина необходимо использовать свежую плазму, полученную не менее чем от 20 здоровых доноров, и патологическую, полученную не менее чем от 60 больных, находящихся в стабильной фазе терапии антагонистами витамина К [1]. Позднее было показано, что количество патологических плазм можно уменьшить до 20. С помощью этого метода определяется важный калибровочный параметр тромбопластина — международный индекс чувствительности (МИЧ), который характеризует чувствительность тромбопластина к содержанию активируемых факторов протромбинового комплекса. Чем выше значение МИЧ, тем менее чувствительным является тромбопластин. При использовании в работе тромбопластина с известным МИЧ результаты определения протромбинового времени можно выражать в единой шкале, а именно в виде МНО. Однако в дальнейшем было показано, что МИЧ тромбопластина зависит также и от особенностей применяемых в разных коагулометрах методов определения времени образования сгустков. Поэтому величина МНО, определенная с использованием одного тромбопластина, но на разных коагулометрах, может заметно отличаться. Для преодоления этой проблемы был предложен метод локальной калибровки пары «прибор — тромбопластин», заключающийся в использо-

вании четырех калибровочных плазм: одной нормальной и трех, полученных от больных, находящихся на терапии оральными антикоагулянтами, с высокой, средней и низкой степенью антикоагуляции [3]. Другой особенностью этого метода калибровки является то, что он позволяет преодолеть проблему вычисления «среднего нормального протромбинового времени» (СНПВ).

Вычисление МНО заключается в возведении в степень МИЧ протромбинового отношения (ПО), которое определяется путем деления протромбинового времени (ПВ) плазмы больного на СНПВ:

$$\text{МНО} = \left[\frac{\text{ПВ больного}}{\text{СНПВ}} \right]^{\text{МИЧ}}$$

По рекомендованной ВОЗ методике для определения СНПВ необходимо измерить ПВ плазм 20 доноров и вычислить среднее геометрическое для полученного массива данных. Выполнение этой рекомендации в лаборатории клиники сопряжено с определенными трудностями, особенно если учесть, что это придется повторять при переходе к новой серии тромбопластина. Упрощенными, но тем не менее позволяющими в ряде случаев получать удовлетворительное качество определения, являются замена показателя СНПВ на ПВ пула плазм доноров, содержание факторов протромбинового комплекса в котором принимается за 100%, или вычисление соответствующего значения из калибровочного графика по Квику. Последнее представляется более реальным, т. к. для качественного приготовления пула плазм доноров необходимы условия для мгновенной заморозки аликвот и их хранения при температуре ≤ -70 °С.

Для построения калибровки по Квику необходима плазма-калибратор с известным значением %-ПТ. Универсальных, т. е. приемлемых для любой пары «реактив — прибор», калибра-

торов для протромбинового теста не существует. Проблема в том, что консерванты и стабилизаторы, добавляемые к плазме перед лиофилизацией, могут по-разному влиять на ПВ, определяемое с разными тромбопластинами и на разных приборах [4–7]. Поэтому этот подход к вычислению знаменателя формулы МНО, а также и %-ПТ по Квику приемлем только для указанных в паспорте калибратора реактивов и приборов.

К сожалению, некоторые отечественные производители тромбопластинов проигнорировали эту особенность ПТ-теста и в инструкциях по его выполнению предлагают очень простой способ вычисления эквивалента СМПВ, заключающийся в умножении измеренного в лаборатории ПВ контрольной (нормальной) плазмы на некий коэффициент (k , ПОпк). В действительности такой способ коррекции был бы возможен, если бы: 1) зависимость времени свертывания от содержания факторов описывалась бы линейным уравнением $y = ax$, т. е. графически выглядела бы как прямая, выходящая из начала координат; 2) понятия «контрольная плазма» и «калибратор» были бы синонимами.

ПРИМЕР ИЗ ПРАКТИКИ

Приведем пример проблемы, возникшей при построении калибровки ПТ-теста на импортном коагулометре с использованием отечественного тромбопластина (МИЧ = 1,2) и контрольной плазмы (рис.). По рекомендуемой производителем методике в лаборатории определили в дублях ПВ контрольной плазмы и трех ее разведений. Как видно из таблицы, параллельные измерения показали хорошее совпадение. Прибор выдал уравнение: $y = 0,0006x + 0,0061$, $R^2 = 0,973$ и калибровку принял, хотя линейность графика оставляла желать лучшего (рис.). Действительно, из уравне-

ния следует, что $PВ_{100\%}$ равно 6,5 сек, что много ниже, чем фактически измеренное на контрольной нормальной плазме в процессе калибровки, и 14,9 сек, рассчитанных по предложенному производителем k для определения МНО. По полученной калибровке 14,9 сек соответствует 66,5% ПТ по Квику. Естественно, что с контролем качества у лаборатории возникли проблемы.

На наш взгляд, одним из источников проблемы было использование 8-кратного разведения контрольной плазмы. Судя по видимому загибу калибровочного графика для данной пары «прибор — реактив», оно было явно избыточным. Действительно, при построении графика только по трем первым парам цифр его линейность повышается, и значение $PВ_{100\%} = 12,7$ сек, вычисленное по новой формуле, выглядит уже более правдоподобно. Тем не менее оно остается значительно ниже, чем «скорректированное» по предложенному производителем тромбопластина k , которому соответствует 82,6% ПТ по новой калибровке. Другой причиной расхождения $PВ_{100\%}$, рассчитанных из калибровки по Квику и по «поправочным» коэффициентам, является то, что в первом случае расчет основан на хорошо известной зависимости времени свертывания от содержания факторов ПТ-комплекса, а в другом — на линейной.

Нам могут возразить, что описан уникальный случай. Насколько это так, могут определить лаборатории, использующие столь оригинальный метод вычисления СМПВ ($PВ_{100\%}$). Данные циклов ФСВОК, в которых анализировались результаты определения в патологических плазмах ($МНО > 2$), свидетельствуют о том, что этот случай вряд ли является уникальным.

Косвенным признаком ошибки в определении $PВ_{100\%}$ (СМПВ) может служить характер распределения результатов ПТ-теста. У доноров, сотрудников, проходящих профосмотр, и

даже у большинства нетяжелых больных значения %-ПТ и МНО должны не просто попадать в диапазон нормальных значений, а распределяться примерно пополам выше и ниже 100% и 1 соответственно. Значительное смещение в одну или другую сторону является серьезным основанием для проверки правильности определения ПВ_{100%} (СНПВ), даже если результаты контроля качества в области нормы являются удовлетворительными.

Особенностью ПТ-теста является то, что вероятность выявления ошибки в определении СНПВ или МИЧ возрастает с увеличением МНО. Поэтому контроль качества теста должен обязательно включать образцы со значениями вблизи верхней и нижней границ терапевтической области (40—20%-ПТ, МНО 2—3,5).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТРОМБИНА В КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ

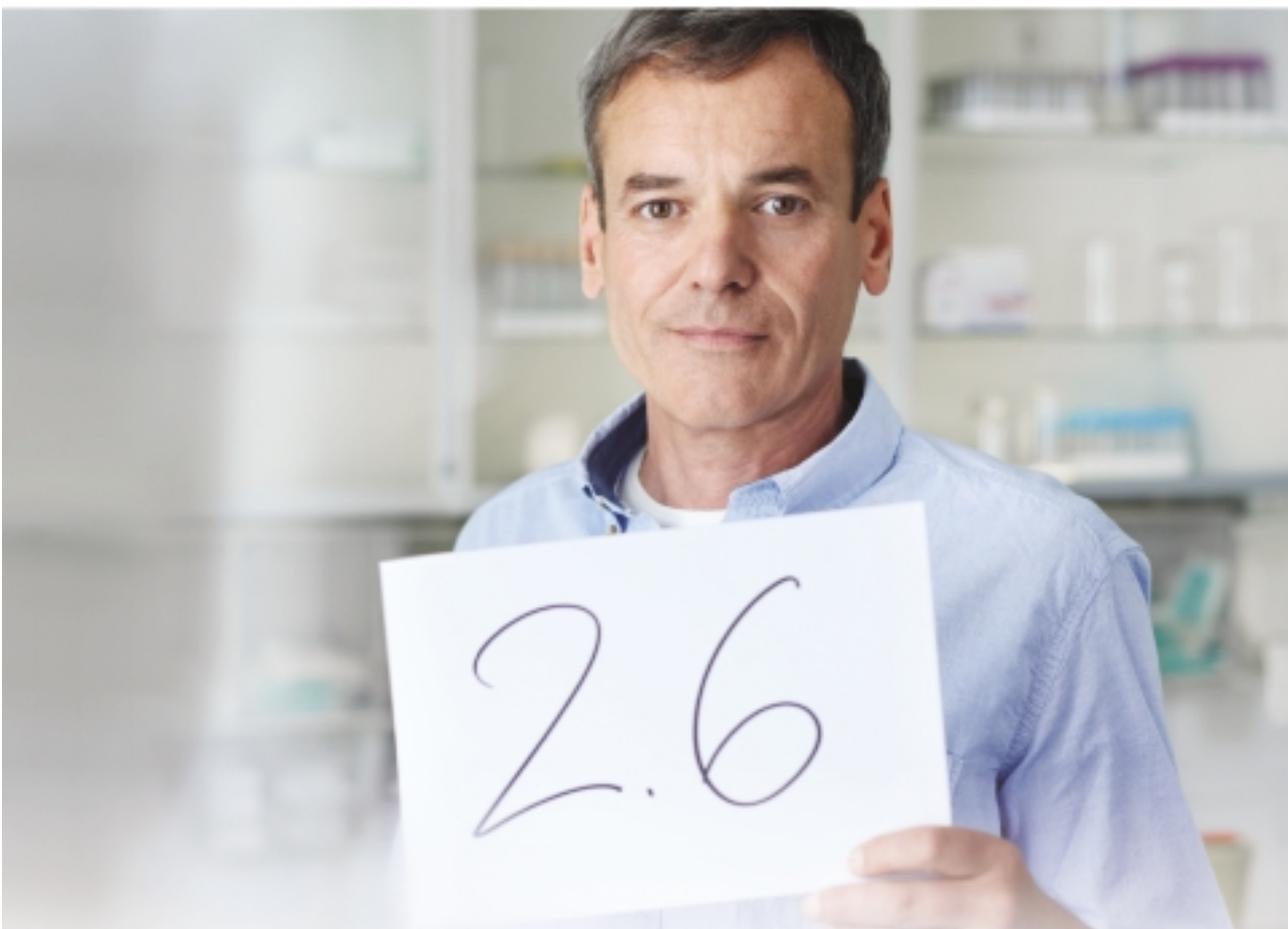
Использование капиллярной крови для анализа представляется привлекательным, т. к. не требует пункции вены и центрифугирования крови, однако при кажущейся простоте в действительности сопряжено с рядом проблем.

Первая и главная заключается в большей вероятности активации свертывания при заборе капиллярной крови. Кровь, проходя через поврежденную ткань, контактирует с тромбогенной поверхностью и может активироваться. Это увеличивает вероятность преаналитической ошибки. Быстро и аккуратно собрать даже 50 мкл крови — минимум, который необходим для одного определения с обычным тромбопластином при рабочем объеме кюветы коагулометра 150 мкл, — удается не всегда. В капилляре кровь с антикоагулянтом практически не перемешивается, поэтому предварительный забор цитрата в капилляр проблему не решает, а только усложняет процедуру определения, т. к. требует использования стерильного цитрата.

Вторая проблема связана со сложностью калибровки и отсутствием адекватной системы контроля качества для предлагаемых отечественными производителями тромбопластинов методик выполнения ПТ-теста, предполагающих использование цельной крови и обычного тромбопластина. Более высокая вязкость и плотность крови по сравнению с плазмой снижает эффективность перемешивания реакционной смеси в кювете коагулометра, что может отразиться на результате анализа быстро протекающих реакций, к которым относится ПТ-тест.

Определение протромбина в капиллярной крови возможно с применением комбинированных реактивов, в состав которых кроме тромбопластина входят фибриноген и фактор V. Наличие этих добавок позволяет выполнять определение с использованием всего 10—20 мкл капиллярной крови, что составляет 1/20 от конечного объема среды реакции. Тест может выполняться вручную или на механических коагулометрах. Высокое разведение крови реактивом позволяет использовать для контроля качества лиофилизированные плазмы, которые вносятся в объеме 1/2 от объема крови. Влиянием клеток крови (<3% от объема реакционной среды) в этом случае можно пренебречь. Однако на ПВ цельной крови величина гематокрита оказывает значительное влияние. Поэтому калибровка реактива для определения ПВ цельной крови должна включать также и построение номограммы, позволяющей скорректировать влияние гематокрита.

Многие из перечисленных выше проблем были решены разработкой экспресс-анализаторов МНО, в которых применяются прекалиброванные тест-полоски, содержащие рекомбинантный тромбопластин. Такая технология обеспечивает возможность определения МНО в течение ~1 мин с использованием малых объемов (~8 мкл) капиллярной крови. Это



«Одна минута, одна капля крови!»



*Система CoaguChek® XS Plus –
портативный прибор для кабинета врача.
Быстрый и точный анализ МНО.**

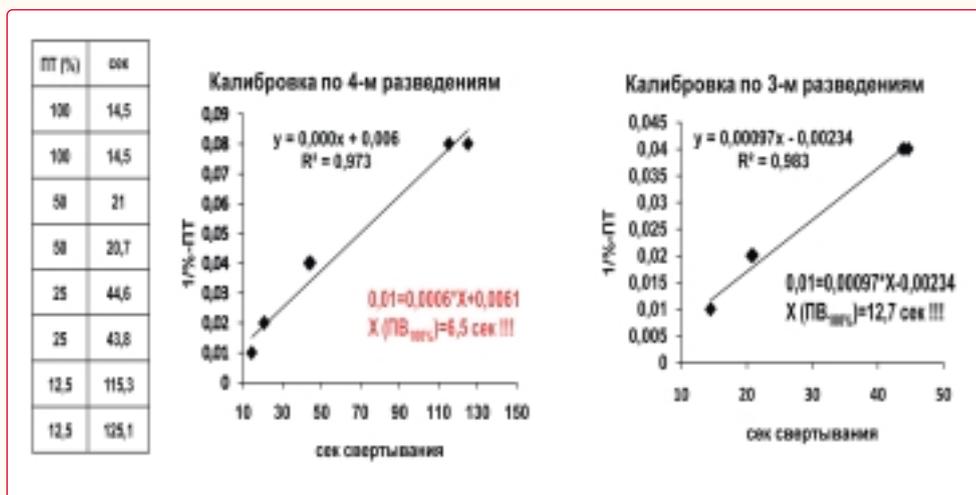
РФ/10000

КоагуЧек®

Потому что это моя жизнь

* Международное стандартизованное соотношение.
CoaguChek® и Потому что это моя жизнь являются товарными знаками Roche. © Roche 2012.
ООО «Рош Дистрибуция Рус», 115114, Россия, г. Москва, ул. Петликовского, 2, с. 2, БЦ «Безельда Плаза»
Центр Обслуживания Клиентов CoaguChek®: +7 800 100 19 88, www.coagu.chek.ru
Контактный центр: РФ, МР ФСС 2021030000 от 24.12.07

РИСУНОК. Влияние разведения
контрольной плазмы на измеряемое протромбиновое время



представляется особенно важным при необходимости выполнения анализов у новорожденных, в экстренных ситуациях, а также непосредственно в кабинете врача, который наблюдает больных, принимающих антагонисты витамина К [9-11]. Согласно Приказу МЗ РФ от 15 ноября 2012 г. №918н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи больным с сердечно-сосудистыми заболеваниями», в стандарт оснащения кардиологического кабинета входит портативный аппарат для экспресс-определения МНО.

САМОКОНТРОЛЬ МНО

Основной проблемой лечения АВК является необходимость регулярного контроля уровня антикоагуляции. Особую проблему это создает для пожилых, проживающих вдали от крупных городов, а также тех, чья работа связана с длительными командировками. Преодолеть эти трудности можно с помощью портативных ко-

агулометров для самостоятельного определения МНО. Кроме того, по данным ряда исследований, самостоятельное мониторирование МНО уменьшает риск осложнений терапии и существенно облегчает подбор, а при необходимости и коррекцию дозы антикоагулянта.

Для оценки качества терапии АВК обычно учитывают продолжительность времени, при котором значение МНО находится в терапевтической области (ВТО), и частоту критических значений МНО, т. е. значений меньше 1,5 или больше 5, при которых существенно возрастает вероятность развития осложнений. Результаты мета-анализа 53 исследований больных ТГВ/ТЭЛА, находящихся на терапии АВК, показали, что 58% от всех случаев тромбозов пришлось на период (25% времени), когда уровень антикоагуляции был ниже, а 48% больших кровотечений — соответственно на период (15% времени), когда уровень антикоагуляции был выше терапевтического [8]. По данным этого анализа, среднее ВТО составило ~61%, а в больших тща-

тельно контролируемых исследованиях, в которых сравнивалась эффективность варфарина с новыми оральными антикоагулянтами, ВТО варьировало в пределах 55–68% [11].

Результаты большого ретроспективного исследования STABLE, в котором был проведен анализ более 29 000 больных из рутинной клинической практики, показали, что при самоконтроле МНО с помощью портативных коагулометров ВТО составило 69,7%. Анализ разных возрастных групп показал, что даже у пациентов старше 75 лет самоконтроль позволяет достичь такого уровня стабильности антикоагуляции [12]. В другом исследовании, в котором сравнивали результаты самоконтроля МНО с использованием двух портативных коагулометров CoaguChek XS и INRatio2, ВТО составило 68,9% для стандартного диапазона МНО 2–3 и 87,9% для расширенного диапазона МНО 2–3,5. Частота выявления критических значений МНО (<1,5 или >5) составила всего 2,4% [13].

Обеспечение более высокой эффективности и безопасности терапии АВК при самоконтроле уровня антикоагуляции подтверждают

данные мета-анализов о снижении риска смерти на 26–42%, тромбоемболических осложнений на 50%, а больших кровотечений на 35% [14].

В целом можно сделать заключение, что определение МНО с помощью портативных коагулометров значительно облегчает больным процедуру контроля терапии АВК. При налаженной системе обучения пациентов и контроля со стороны специалистов этот метод позволяет также снизить количество неблагоприятных исходов терапии.

Сравнение результатов определения МНО на двух портативных мониторах CoaguChek XS (для самоконтроля МНО пациентом дома) и CoaguChek XS Plus (профессиональная версия для врача или экспресс-лаборатории) с полученными при параллельном определении лабораторным эталонным методом показало хорошее совпадение данных. В терапевтическом диапазоне коэффициенты вариации (CV) были <4,5% для капиллярной и <3,5% для венозной крови [15–17].



ИСТОЧНИКИ

1. Guidelines for thromboplastin and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Report Series, 889, 1999.
2. Панченко Е.П., Добровольский А.Б. Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии. М., 1999, с. 217–243.
3. Houbouyan LL, Goguel AF. Long-term French experience in INR standardization by a procedure using plasma calibrants. *Am J Clin Pathol*, 1997. 108: 83–9.
4. Poller L, Barrowcliffe TW, Van Den Besselaar AMHP, Jespersen J, Tripodi A, Houghton D. The European Concerted Action on Anticoagulation (ECAA) Evaluation of a Set of Lyophilized Normal Plasmas to Establish the Normal Prothrombin Time for Coagulometer Systems. *Thromb Haemost*, 1998: 122–128.
5. Van Den Besselaar AMHP, Barrowcliffe TW, Houbouyan-Reveillard LL, Jespersen J, Johnston M, Poller L, Tripodi A. On behalf of the subcommittee on control of anticoagulation of the scientific and standardization committee of the ISTH. Guidelines on preparation, certification, and use of certified plasmas for ISI calibration and INR determination. *J Thromb Haemost*, 2004. 2: 1946–53.

6. Poller L, Ibrahim S, Keown M, Pattison A, Jespersen J. The prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR) Line: derivation of local INR with commercial thromboplastins and coagulometers — two independent studies. *J Thromb Haemost*, 2011. 9: 140–8.
7. Tripodi A, Chantarangkul V, Legnani C, Frontoni R, Testa S. Discrepancy of the international normalized ratio observed in the external quality assessment survey: a cause for concern. *J Thromb Haemost*, 2012. 10: 714–6.
8. Mearns ES, Kohn CG, Song J-S et al. Meta-Analysis to Assess the Quality of International Normalized Ratio Control and Associated Outcomes in Venous Thromboembolism Patients. *Thrombosis Research*, 2014. 134: 310–319.
9. Iijima S, Baba T, Ueno D, Ohishi A. International normalized ratio testing with point-of-care coagulometer in healthy term neonates. *BMC Pediatr*, 2014. 14: 179. doi: 10.1186/1471-2431-14-179.
10. Ebner M, Peter A, Spencer C, Hartig F, Birschmann I, Kuhn J, Wolf M, Winter N, Russo F, Zuern CS, Blumenstock G, Ziemann U, Poli S. Point-of-Care testing of coagulation in patients treated with non-vitamin K oral anticoagulants. *Stroke*, 2015. 46(10): 2741-7. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.010148.
11. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 2013. published online Dec 4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62343-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62343-0).
12. DeSantis G, Hogan-Schlientz J, Liska G et al. STABLE Results: Warfarin Home Monitoring Achieves Excellent INR Control. *Am J Manag Care*, 2014. 20 (3): 202–209.
13. Brouwer JLP, Stoevelaar H, Sucker C. The Clinical Impact of Different Coagulometers on Patients Outcomes. *Adv Ther*, 2014. 31: 639–656.
14. Heneghan C, Ward A, Perera R et al. Self-monitoring of oral anticoagulation: systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet*, 2012. 379: 322–34.
15. Plesch W, Wolf T, Breitenbeck N et al. Results of the performance verification of the CoaguChek XS System. *Thromb Res*, 2008. 123: 381–389.
16. Deom A, Reber G, Tsakiris DA et al. Evaluation of the CoaguChek XS Plus system in a Swiss community setting. *Thromb Haemost*, 2009. 101: 988–990.
17. Van den Besselaar AMHP, Pequeriaux NCV, Ebben M, et al. Point-of-care monitoring of vitamin K-antagonists: validation of CoaguChek XS test strips with international standard thromboplastin. *J Clin Pathol*, 2012. 65: 1031–1035.