

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Определение активности факторов
свертывания крови**

ОФС.1.8.2.0003.15
Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на методы определения активности факторов системы свертывания крови человека I, II, VII, VIII, IX, X, XI, фактора Виллебранда, антитромбина III в плазме и препаратах крови.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Определение активности факторов свертывания базируется на 2 подходах:

1. Одностадийный метод. Восстановление процесса свертывания крови в дефицитной по фактору плазме после добавления препарата этого фактора (клоттинговый метод).

2. Двухстадийный метод. На первой стадии с использованием специфического кофактора активируется протеолитическая активность фактора II или фактора X с образованием соответственно активированного фактора IIa или Xa. На второй стадии количество образовавшегося активированного фактора определяют по реакции расщепления им специфического хромогенного пептида (хромогенный метод).

Возможно проведение хромогенного метода 2 способами: по кинетике образования хромогена под действием активированного фактора или по конечной точке накопления хромогена за определенное время инкубации.

Для проведения обоих методов возможно использование пластиковых пробирок, планшетов, оптико-механических, механических полуавтоматических и полностью автоматизированных коагулометров.

Во всех методах расчет активности производят при сравнении активности тестируемого образца с активностью Международного стандарта

NIBSC или вторичного стандартного образца фактора свертывания, откалиброванного относительно международного стандарта в международных единицах активности (МЕ). Эквивалентность международного стандарта в МЕ устанавливается ВОЗ. За 1 МЕ (100%) принимают активность фактора свертывания в 1,0 мл свежей нормальной пулированной плазме крови от 300 доноров. Активность может быть выражена в МЕ/мл, МЕ/флакон, МЕ/мг белка и в % от заявленного производителем количества.

ФАКТОРЫ

Фактор I (фибриноген)

Клоттинговый метод

Определение активности фибриногена проводят методом Клаусса.

Принцип метода

При добавлении тромбина к образцу, содержащему фибриноген, наблюдается образование сгустка фибрина. При использовании тромбина с высокой активностью (~10 МЕ/мл) и образцов с низкой концентрацией фибриногена (ниже 100 мг/дцл) можно получить линейную зависимость.

Для определения фибриногена используют коммерческие тестовые системы, в состав которых входит реагент тромбина, содержащий ингибитор гепарина, и буфер для разведения образцов или коммерческий тромбин-реагент.

Концентрация фибриногена выражается в мг/дцл. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец фибриногена или аттестованную по международному стандарту плазму-калибратор. Стандартный образец или образец плазмы-калибратора растворяют в дистиллированной воде согласно инструкции. Готовят 5 последовательных разведений стандартного образца, начиная с концентрации ~ 100 мг/дцл, с помощью буфера для разведения образцов $pH = 7,3 \pm 0,1$. Анализ проводят при температуре 37°C согласно инструкции к набору. Для каждого разведения трижды определяют время образования сгустка. По полученным

результатам в логарифмических координатах строят калибровочный график зависимости времени образования сгустка от концентрации фибриногена.

Готовят 2 разведения испытуемого образца с концентрацией ниже 100 мг/дцл. Для каждого разведения время образования сгустка определяют трижды. Количество фибриногена в каждом разведении определяют по калибровочному графику.

Фактор II (тромбин)

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора II проводят с использованием в качестве субстрата человеческой плазмы, дефицитной по фактору II. Процесс свертывания активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буфер рН $7,3 \pm 0,1$ с добавлением 0,1% бычьего или человеческого альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта фактора II в интервале активности от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору II, и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно нагретого до температуры $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора II, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора II для каждого разведения испытуемого

образца находят по калибровочному графику. Активность ФП (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

k – разведение исследуемого образца.

2. Хромогенный метод

Метод основан на сравнении ферментативной активности фактора Па, образованного после специфической активации фактора П, в отношении специфического хромогенного пептидного субстрата с такой же активностью стандартного образца (международного или аналогичного).

Фактор П активируется с помощью активатора экарина, выделенного из яда гадюки. Активированный фактор П (тромбин) селективно расщепляет хромогенный субстрат (Н-D-фенилаланин-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид, 4-толуолсульфонилглицил-пролил-L-аргинин-4-нитроанилид, Н-D-циклогексилглицил- α -аминобутирил-L-аргинин-4-нитроанилид, D-циклогексилглицил-L-аланил-L-аргинин-4-нитроанилида диацетат) с образованием *n*-нитроанилина. Кинетику реакции исследуют фотометрическим методом при 405 нм. При этом значение оптической плотности пропорционально активности фактора П.

Определение фактора П хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору П, до концентрации ~ 1 МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят 3 разведения стандартного образца и 3 разведения препарата трис-солевым буферным раствором рН 8,4. Каждое разведение стандартного образца определяют двукратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием микропланшет и спектрофотометра, поддерживающего температуру в диапазоне $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 25 мкл каждого разведения испытуемого препарата или стандартного образца. В каждую лунку прибавляют по 125 мкл буфера для разведения, по 25 мкл экарина и инкубируют при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 2 мин. По истечении времени инкубации в каждую лунку вносят по 25 мкл хромогенного субстрата фактора IIa.

Определяют скорость изменения оптической плотности при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и рассчитывают среднюю скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$).

Если непрерывное измерение оптической плотности невозможно, определяют оптическую плотность при длине волны 405 нм через последовательные интервалы времени (например, через 40 с) и строят график зависимости оптической плотности от времени и рассчитывают $\Delta A/\text{мин}$ как угол наклона прямой. Из значений $\Delta A/\text{мин}$ каждого индивидуального разведения стандартного образца и испытуемого препарата рассчитывают активность испытуемого препарата.

3. *Тест на отсутствие тромбина*

Определение проводят коагулометрическим методом.

Для испытаний готовят восстановленный в соответствии с инструкцией раствор препарата. При наличии в препарате гепарина его нейтрализуют добавлением протамина сульфата из расчета 10 мкг протамина сульфата на 1 МЕ гепарина.

Приготовление раствора фибриногена

0,3 г фибриногена растворяют в 100 мл, перемешивают и выдерживают 15 – 20 мин при комнатной температуре.

Срок хранения раствора 1 мес при температуре от 2 до 8°C .

Приготовление раствора тромбина

Лиофилизат растворяют в соответствии с инструкцией производителя, выдерживают 15 – 20 мин при комнатной температуре и разводят 0,9% раствором натрия хлорида до содержания тромбина 1 МЕ/мл.

Срок хранения раствора 6 мес при температуре минус 20°C. Раствор после оттаивания повторному замораживанию не подлежит.

Ход определения

В 2 пробирки вносят равные объемы восстановленного препарата и раствора фибриногена. В третью пробирку (контрольная проба) вносят равные объемы раствора тромбина и раствора фибриногена, перемешивают содержимое пробирок вращательными движениями. Одну пробирку с восстановленным препаратом инкубируют на водяной бане с температурой 37°C в течение 6 ч, другую пробирку с восстановленным препаратом – при комнатной температуре в течение 24 ч. Отмечают наличие или отсутствие коагуляции (сгустка).

Контрольную пробу инкубируют на водяной бане при температуре 37°C и отмечают время образования сгустка.

Критерием приемлемости результатов является коагуляция в контрольной пробе через 30 с.

Фактор VII

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора VII проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору VII. Процесс свертывания активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буфер pH 7,3 с добавлением 0,1% раствора альбумина человеческого или бычьего. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта образца фактора VII в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца

измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят непосредственно после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору VII и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно прогретого до температуры $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора VII, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора VII для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FVII (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

k – разведение исследуемого образца.

2. Хромогенный метод

В присутствии тканевого фактора (TF) и ионов Ca^{2+} происходит активация фактора VII (образование FVIIa). Комплекс FVIIa, TF, Ca^{2+} и фосфолипида активирован фактор X. Активированный фактор X (FXa) селективно расщепляет хромогенный субстрат FXa-1 метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-*n*-нитроанилид-ацетат с образованием *n*-нитроанилина. Исследование образца проводят фотометрическим методом при 405 нм. Значение оптической плотности (или увеличение поглощения) пропорционально количеству фактора VII.

Определение фактора VII хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в

соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору VII, до концентрации ~ 1 МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят с помощью буферного раствора 3 разведения стандартного образца и 3 разведения препарата трис-солевым буфером pH 7,3 – 8,0 с добавлением 0,1% человеческого или бычьего альбумина. Каждое разведение стандартного образца определяют двукратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок или микропланшет при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

В лунки микропланшет вносят разведения испытуемого препарата или стандартного образца, добавляют кальций-тромбопластиновую смесь, раствор фактора X и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ от 2 до 5 мин, после чего вносят раствор хромогенного субстрата фактора Xa.

Измеряют изменение оптической плотности при длине волны 405 нм либо в кинетическом режиме, либо прерывают реакцию гидролиза через 3 – 15 мин добавлением 20% (об/об) раствора уксусной кислоты ледяной и измеряют оптическую плотность.

Фактор VIII

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора VIII проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору VIII. Источником фосфолипидов, необходимых для осуществления свертывания, является АЧТВ-реагент.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный раствор pH $(7,3 \pm 0,1)$, с добавлением 0,1% раствора человеческого или бычьего альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта, начиная от

концентрации 2 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации ~ 0,5 – 2 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В пластиковую пробирку вносят 100 мкл плазмы, дефицитной по фактору VIII, 100 мкл разведения стандарта или препарата и 100 мкл АЧТВ-реактанта и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 2 мин. Время свертывания фиксируют с момента прибавления к смеси 100 мкл предварительно прогретого до температуры $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 0,025 М раствора кальция хлорида. В зависимости от техники постановки анализа объемы реактивов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора VIII, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора VIII для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FVIII (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого препарата, найденная по калибровочному графику;

k – разведение исследуемого образца.

2. Хромогенный метод

Количественное определение фактора VIII проводят с помощью набора реактивов, в котором фактор VIII является кофактором для фактора IXa при активации фактора X в форму Xa, расщепляющего хромогенный субстрат.

Принцип метода

В присутствии ионов Ca^{2+} и фосфолипидов фактор X под действием фактора IXa активируется в Xa. При избытке фактора X и оптимальных количествах Ca^{2+} , фосфолипидов и фактора IXa скорость активации фактора X

линейно зависит от количества фактора VIII. Фактор Ха гидролизует хромогенный субстрат S-2765 (N-a-Z-DArg-Gly-Arg-pNA) с высвобождением хромогенной группы pNA, окраску которой регистрируют спектрофотометрически при 405 нм. Количество образовавшегося фактора Ха и, следовательно, интенсивность окрашивания, пропорциональны активности фактора VIII в образце.

Набор реактивов для определения активности фактора VIII стабилен в течение срока, указанного производителем при температуре хранения от 2 до 8°C.

Набор реактивов содержит:

1. 7,7 мг хромогена S-2765 с добавкой синтетического ингибитора тромбина I-2581. Реактив восстанавливают в 6,0 мл стерильной воды для инъекций. Восстановленный раствор стабилен в течение 1 мес при температуре от 2 до 8°C. Перед использованием нагревают до температуры 37°C.
2. Реактив бычьих факторов: 0,3 Ед фактора IX, 2,7 МЕ фактора X и 1 НИН Ед тромбина, лиофилизированных в присутствии 40 ммоль CaCl₂ и 0,2 ммоль фосфолипидов. Реактив восстанавливают в 2,0 мл стерильной воды для инъекций. Восстановленный раствор стабилен в течение 12 ч при температуре от 2 до 8°C, 2 нед при температуре минус 30 °C и 1 мес при температуре минус 80°C. Не следует хранить при температуре минус 20°C. Перед использованием нагревают до температуры 37°C.
3. Концентрат ×10 трис-буфера. Стабилен в течение 1 мес при температуре от 2 до 8°C. Перед употреблением разводят стерильной водой для инъекций в соотношении 1:10.

Дополнительные реактивы:

1. Международный стандартный образец – раствор концентрата фактора свертывания VIII человека (NIBSC, Eur.Pharm.Ref.Std. BRP

Н 0920000) или плазма, откалиброванная по международному стандарту фактора VIII.

2. Контрольная нормальная или патологическая плазма, откалиброванная по международному стандарту фактора VIII.
3. 0,9% раствор натрия хлорида.
4. 20% уксусная кислота или 2% лимонная кислота (используются в методике конечной точки накопления хромогена).
5. Вода лабораторная деионизованная MillyQ.

Оборудование:

1. Пластиковые пробирки;
2. Микропланшеты;
3. Термостат 37°C;
4. Спектрофотометр 405 нм или ридер микропланшет 405 нм;
5. Калиброванные пипетки;
6. Вортекс;
7. Секундомер.

Исследуемый образец перед определением разводят до ожидаемой активности 1 МЕ/мл.

Определение можно проводить в кинетическом режиме и по конечной точке, в пробирках (макрометод) и в микропланшетах (микрометод).

Калибровка

При проведении каждого определения проводят построение калибровочной кривой. Разведение стандартного образца готовят в 2 этапа: предварительное разведение до активности 1 – 2 МЕ/мл и конечные разведения для построения калибровочной зависимости в диапазоне 0 – 2 МЕ/мл. После разведения определение следует провести в течение 30 мин.

Ход определения

Определение в пробирках

200 мкл разбавленного стандартного, контрольного или исследуемого образца вносят в пробирки, инкубируют в течение 3-4 мин при температуре

37°C, прибавляют 50 мкл предварительно прогретого реактива факторов, инкубируют в течение 2-4 мин при температуре 37°C и прибавляют 50 мкл раствора хромогена.

Определение в микропланшетах

В лунки микропланшета вносят по 50 мкл разбавленного стандартного, контрольного или исследуемого образца, инкубируют в течение 3-4 мин при 37°C, прибавляют 50 мкл предварительно прогретого реактива факторов, инкубируют в течение 2-4 мин при температуре 37°C и прибавляют 50 мкл раствора хромогена.

Кинетический метод определения

После прибавления раствора хромогена в течение 2 – 10 мин измеряют изменение оптической плотности раствора при 405 нм.

Определение по конечной точке

После прибавления раствора хромогена смесь продолжают инкубировать при температуре 37°C в течение 2 – 10 мин, после чего для остановки реакции прибавляют 50 мкл 20% уксусной или 2% лимонной кислоты. Измеряют оптическую плотность раствора против буфера при 405 нм.

Расчеты

Строят зависимость изменения оптической плотности в минуту (для кинетического метода) или оптической плотности (для определения по конечной точке) разведений стандартного раствора от концентрации в них фактора VIII. Активность в исследуемом образце определяют по калибровочной кривой с учетом предварительного разведения образца.

Фактор IX

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора IX проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору IX. Источником фосфолипидов, необходимых для осуществления свертывания, является АЧТВ-реагент.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный рН 7,3 с добавлением 0,1% раствора бычьего или человеческого альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В пластиковую пробирку вносят 100 мкл плазмы, дефицитной по фактору IX, 100 мкл разведения стандарта или препарата и 100 мкл АЧТВ-реагента и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 2 мин. Время свертывания фиксируют с момента прибавления к смеси 100 мкл предварительно прогретого до температуры $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 0,025 М раствора кальция хлорида. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора IX, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора IX для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FIX (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

k – разведение исследуемого образца.

Фактор X

1. Клоттинговый метод

Определение активности фактора X проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору X. Процесс свертывания

активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный раствор рН 7,3 с добавлением 0,1% раствора человеческого или бычьего альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта фактора X в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят непосредственно после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору X, и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно прогретого до температуры $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора X, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора X для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность фактора X (A) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

k – разведение исследуемого образца.

2. Хромогенный метод

Фактор X активируют с помощью полученного из змеиного яда FX-активатора. Активированный фактор X (FXa) селективно расщепляет хромогенный субстрат FXa-1 N- α -бензилоксикарбонил-D-аргинил-L-глицил-

L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид, N-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид, метансульфонил-D-лейцил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилид, метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида ацетат с образованием *n*-нитроанилина. Образцы исследуют фотометрическим методом при 405 нм. Количество фактора X пропорционально увеличению оптической плотности раствора.

Определение фактора X хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору X, до концентрации ~ 1 МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят с помощью буферного раствора 3 разведения стандартного образца (в соответствии с инструкцией) и 3 разведения препарата. Каждое разведение стандартного образца определяют двукратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок или микропланшет при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 12,5 мкл каждого разведения испытуемого препарата или стандартного образца, в каждую лунку прибавляют по 25 мкл специфического активатора фактора X из яда гадюки Рассела и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 90 с, после чего в каждую лунку вносят по 150 мкл рабочего разведения хромогенного субстрата фактора X.

Определяют скорость изменения оптической плотности при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и рассчитывают среднюю скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$) или измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм через последовательные

интервалы времени (например, через 30 с) и строят график зависимости оптической плотности от времени и рассчитывают $\Delta A/\text{мин}$ как угол наклона прямой. Из значений $\Delta A/\text{мин}$ каждого индивидуального разведения стандартного образца и испытуемого препарата рассчитывают активность испытуемого препарата.

Фактор Виллебранда

Определение активности фактора Виллебранда проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом.

Активность фактора Виллебранда определяется путем сравнения его активности с активностью стандартного образца.

Метод агглютинации

Метод основан на определении коферментной активности фактора Виллебранда при агглютинации суспензии тромбоцитов в присутствии ристоцетина А.

Испытание может проводиться количественными методами с использованием автоматизированного оборудования или полуколичественным методом путем визуальной оценки агглютинации в серии разведений.

Полуколичественный метод

Из стандартного образца и восстановленного раствора препарата готовят последовательные разведения в 0,9% растворе натрия хлорида с 1–5% раствором альбумина человека до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 0,5, 1,0 и 2,0 МЕ/мл. По 0,05 мл каждого разведения стандартного образца и исследуемого препарата наносят на предметное стекло, добавляют по 0,1 мл суспензии тромбоцитов с ристоцетином и перемешивают в течение 1 мин. В качестве отрицательного контроля используют раствор разведения. После 1 мин инкубации при комнатной температуре визуально оценивают агглютинацию тромбоцитов. Максимальное разведение, при котором происходит агглютинация

тромбоцитов, является титром ристоцетиновой коферментной активности образца.

Количественный метод

Готовят не менее 2 серий последовательных разведений стандартного и испытуемого образцов с помощью буфера для разведения до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 0,5, 1,0 и 2,0 МЕ/мл.

Определение проводят в соответствии с инструкцией производителя автоматизированного оборудования. Получают значения зависимости изменения оптического поглощения (степени мутности раствора) от активности фактора Виллебранда.

Определение содержания фактора Виллебранда в испытуемом препарате осуществляют с использованием коэффициентов линейного уравнения зависимости оптической плотности раствора от содержания фактора Виллебранда в стандартном образце.

Иммуноферментный метод

Метод основан на определении коллаген-связывающей активности фактора Виллебранда. При специфическом связывании фактора Виллебранда с фибриллами коллагена и последующем связывании поликлональных антител к фактору Виллебранда, конъюгированных с ферментом, после добавления хромогенного субстрата образуется хромофор, который может быть количественно определен спектрофотометрическим методом. Существует линейная зависимость между связыванием коллагена с фактором Виллебранда и оптической плотностью.

Определение проводят с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России в соответствии с инструкциями по применению.

Для испытаний готовят не менее 3 последовательных серий разведений стандартного и испытуемого образцов с помощью буфера для разведения до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 1,0 МЕ/мл. Далее проводят

испытания в соответствии с инструкцией производителя используемой тест-системы.

Активированные факторы свертывания крови

Определение проводят коагулометрическим методом.

Для испытаний готовят восстановленный раствор препарата. При наличии в препарате гепарина его нейтрализуют добавлением протамина сульфата из расчета 10 мкг протамина сульфата на 1 МЕ гепарина. Готовят разведения препарата 1:10 и 1:100 с помощью трис-буферного раствора рН 7,5.

В 3 пробирки вносят по 0,1 мл стандартной плазмы человека и по 0,1 мл раствора фосфолипидов, помещают в водяную баню с температурой $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 60 с, после чего в первую пробирку добавляют 0,1 мл трис-буферного раствора (контрольная проба), во вторую – 0,1 мл испытуемого препарата в разведении 1:10, в третью пробирку – 0,1 мл испытуемого препарата в разведении 1:100. Далее к содержимому каждой пробирки немедленно добавляют по 0,1 мл нагретого до температуры 37°C раствора кальция хлорида 3,7 г/л. Отмечают время формирования сгустка от момента добавления раствора кальция хлорида.

Критерием приемлемости результатов является время коагуляции в контрольной пробе в интервале от 200 до 350 с.

Специфическая удельная активность

Специфическую активность факторов свертывания рассчитывают по формуле:

$$\text{Специфическая активность} = \frac{\text{Активность фактора свертывания крови, МЕ/мл}}{\text{Содержание белка, мг/мл}}$$

Определение активности антитромбина III

Хромогенный метод

Метод определения активности АТIII основан на его способности нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. К образцу, содержащему

АТШ, добавляют избыточные количества гепарина и тромбина. Образующийся комплекс АТШ-гепарин нейтрализует количество тромбина, пропорциональное количеству АТШ. Оставшийся тромбин селективно расщепляет хромогенный субстрат с образованием *n*-нитроанилина, абсорбцию которого определяют при 405 нм. Таким образом, количество АТШ обратно пропорционально величине поглощения свободного *n*-нитроанилина в образце.

Определение активности АТШ проводят с помощью коммерческих тестовых систем. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец АТШ или плазму-калибратор, аттестованную по международному стандарту. Стандартный образец или плазму-калибратор растворяют в дистиллированной воде согласно указаниям в инструкции. Зависимость величины оптической плотности от активности АТШ линейна в интервале активности АТШ от 0,1 до 1,0 МЕ/мл. Используя буфер с гепарином, готовят 4 разведения стандартного образца или плазмы-калибратора с активностью АТШ от 0,1 до 1,0 МЕ/мл. Анализ проводят при температуре 37°C согласно схеме, приведенной в инструкции к набору. Для каждого разведения трижды определяют величину оптической плотности при 405 нм и в линейных координатах строят калибровочный график зависимости абсорбции от активности АТШ.

Готовят 2 разведения исследуемого образца с ориентировочной активностью АТШ менее 1,0 МЕ/мл. Определение активности АТШ в испытуемых образцах проводят при температуре 37°C согласно указаниям в инструкции к набору. Активность АТШ в испытуемых разведениях находят по калибровочному графику. Активность АТШ в исследуемом образце определяют как:

$$A = A_x \cdot k,$$

где A_x – активность АТШ в соответствующем разведении;

k – разведение образца.

Количественное определение гепарина

1. Клоттинговый метод

Метод основан на способности гепарина за счет ингибирования ряда факторов удлинять время свертывания нормальной плазмы.

Для проведения анализа используют нормальную человеческую плазму, стандартный образец гепарина, АЧТВ-реагент и раствор хлористого кальция 0,025М. В качестве разбавителя стандартного и испытуемых образцов используют 0,9% раствор натрия хлорида. Стандартный образец гепарина растворяют в дистиллированной воде согласно указаниям в инструкции. Готовят 3 разведения стандартного образца с активностью гепарина 0,3, 0,4 и 0,5 МЕ/мл. Образцы стандарта с данными активностями должны удлинять время свертывания нормальной плазмы минимум в 1,5 раза, в противном случае следует использовать разведения с большей активностью гепарина. Параллельно готовят 3 разведения исследуемого образца таким образом, чтобы ориентировочно активность гепарина в данных разведениях попадала в интервал активности гепарина в разведениях стандартного образца.

Анализ проводят с помощью автоматического или полуавтоматического коагулометра в пластиковых пробирках при температуре 37°C. В пробирку вносят 100 мкл нормальной человеческой плазмы, 100 мкл разведения стандартного или исследуемого образца или 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида (холостой опыт), добавляют по 100 мкл АЧТВ-реагента и инкубируют смесь в течение 120 – 240 с при температуре (37±0,1)°C. Затем в пробирку вносят 100 мкл предварительно прогретого до температуры 37°C 0,025М раствора кальция хлорида и фиксируют время свертывания образца. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут быть изменены с соблюдением пропорции. Время свертывания нормальной плазмы (холостой опыт) должно составлять 25 – 40 с. Для каждого разведения стандартного и исследуемого образцов время свертывания определяют трижды.

2. Хромогенный метод

Метод основан на расщеплении хромогенного субстрата, специфического для активированного фактора X (FXa). При внесении в образец, содержащий гепарин, избыточных количеств АТШ и FXa происходит ингибирование количества FXa, пропорционального количеству гепарина. Оставшийся FXa отщепляет от специфического хромогенного субстрата *n*-нитроанилин, абсорбцию которого определяют при 405 нм. Таким образом, величина абсорбции обратно пропорциональна количеству гепарина. Данным методом определяют содержание как нефракционированного, так и низкомолекулярного гепарина в анти-Ха единицах.

Количество гепарина хромогенным методом определяют с помощью коммерческих тестовых систем. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец гепарина или плазму-калибратор, аттестованную по международному стандарту. Стандартный образец или плазму-калибратор разводят в дистиллированной воде согласно инструкции. Готовят 4 разведения стандартного образца с концентрацией гепарина менее 1 анти-Ха ед/мл, используя буфер для разведения рН 8,4. Анализ проводят при температуре 37°C в соответствии с инструкцией к набору. Для каждого разведения трижды определяют абсорбцию при 405 нм, после чего в линейных координатах строят калибровочный график зависимости величины поглощения от концентрации гепарина. Зависимость линейна в диапазоне концентраций гепарина 0 – 1,0 анти-Ха ед/мл.

Для исследуемого образца готовят 2 разведения с концентрацией гепарина менее 1 анти-Ха ед/мл. Анализ проводят согласно инструкции к набору при температуре 37°C. Для каждого разведения величину абсорбции определяют трижды.

Определение проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок, микропланшет или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 20 мкл стандартной плазмы человека и 20 мкл раствора антитромбина III. Далее в эти лунки вносят соответственно по 20 , 60 , 100 и 140 мкл испытуемого или стандартного препарата и доводят объем раствора в каждой лунке до 200 мкл буфером (активность гепарина в конечной реакционной смеси 0,02 - 0,08 МЕ/мл).

По 40 мкл из каждой лунки планшета переносят во вторую серию лунок, в которые добавляют по 20 мкл раствора бычьего фактора Ха и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 30 с, после чего в лунки добавляют по 40 мкл раствора хромогенного субстрата фактора Ха и вновь инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 3 – 15 мин, измеряя скорость расщепления субстрата путем постоянного измерения оптической плотности при длине волны 405 нм (кинетический режим) или после остановки реакции добавлением 20% (об/об) раствора уксусной кислоты ледяной (конечная точка определения).

Содержание гепарина в испытуемом разведении определяют по калибровочному графику с учетом разведения.

При проведении исследований в автоматическом режиме с использованием коагулометра получают значения зависимости изменения оптической плотности от концентрации гепарина.