

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМОСТАЗА **методы лабораторной** **диагностики**

*Кафедра клинической
лабораторной диагностики и
патологической анатомии
ФГБОУ ДПО ИПК ФМБА России*

Поварова Оксана Викторовна
К.М.Н.

ПОВАРОВА О.В.
Научный сотрудник НИЛ фармакологии сердечно-
сосудистой системы кафедры фармакологии
ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова

Исследование системы гемостаза необходимо проводить в следующих случаях:

- 1. тромбозы – предположение о наличии тромбоза, выявление причин тромбоза;**
- 2. кровотечения – определение возможных причин и степень функциональных нарушений;**
- 3. диагностика синдрома ДВС;**
- 4. лабораторный контроль терапии нарушений гемостатической функции и профилактического использования фармакологических средств (антикоагулянтная – антикоагулянтами прямого и непрямого действия, антиагрегантная, тромболитическая терапия) ;**
- 5. оценка допустимости оперативного вмешательства при выявлении нарушений в системе гемостаза.**

Исследование системы гемостаза складывается из 3-х этапов

- I. преаналитического этапа (назначение исследования, забор, хранение и транспортировку биологического материала, первичная обработка биоматериала(центрифугирование)**
- II. аналитического этапа**
- III. постаналитического этапа(выдача анализа в отделение и интерпретация результатов исследования)**

Преаналитический этап

- Подготовка к исследованию (учитывать прием препаратов, влияющих на процессы свертывания: НПВП, оральные контрацептивы, антибиотики широкого спектра действия и др)
- Физический и эмоциональный стресс активируют систему коагуляции и фибринолиза!!!!

Преаналитический этап

- Биологический материал:
 - **Кровь** – для тромбоэластограммы
 - **Плазма крови** – основной материал для исследования гемостаза!
- Забор крови:
 - **из вены – основной путь,**
 - **капиллярная кровь** -возможно-у новорожденных, для адаптированных методов исследования: длительность времени кровотока, АЧТВ, ПВ – первые капли, строго самотеком в центр пробирки с цитратом натрия)

Правила забора крови на исследование системы гемостаза (Воробьева Н.А., 2006).

1. Забор образца крови желательно производить из периферической вены – НЕ ПЕРВАЯ ПРОБИРКА, при невозможности – из тщательно промытого центрального венозного катетера (если вводился гепарин – после слива до 20 мл крови).
2. Используемый антикоагулянт – по рекомендации ВОЗ 109мМ цитрата натрия, что соответствует 3,8% цитрату, приготовленному из трехзамещенного 5,5 водного кристаллогидрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) или 3,2 % цитрату, приготовленному из трехзамещенного 2-х водного кристаллогидрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Соотношение цитрата и крови составляет 1:9**.
3. Предпочтительнее вакуумный метод забора с использованием вакутейнера(голубая маркировка)-НЕ ПЕРВАЯ ПРОБИРКА.
4. Кровь должна поступать в пробирку самотеком.
5. Забор крови осуществляется только в пластиковые пробирки (голубая маркировка) – стеклянные пробирки недопустимы.



** - при значении гематокрита в нормальном диапазоне (от 35 до 50%), при отклонениях от показателей по формуле Ingram: $X = V \times (100 - \text{HCT}) / (595 - \text{HCT})$, где X — добавляемый объем 3,2% цитрата, мл; V — конечный объем пробирки для крови, мл; HCT — показатель гематокрита у пациента, %.

Правила забора крови на исследование системы гемостаза

- 6. При необходимости компрессия жгутом выполняется не более 60 сек.**
- 7. Обязательно тщательное, но бережное перемешивание крови в пробирке.**
- 8. Лабораторное гемостазиологическое исследование должно быть проведено не позже 2 часов после забора крови, желательно сразу.**
- 9. Пробы до исследования хранятся при комнатной температуре.**
- 10. Кровь со сгустками не анализируется.**
- 11. Гемолизированная плазма не анализируется за исключением случаев внутрисосудистого гемолиза у пациента.**

Влияние факторов преаналитического этапа на показатели плазменного гемостаза
(по В.В. Долгову и П.В. Свирину)

Преаналитические факторы	Влияние
Время суток	Снижение содержания факторов свертывания и повышение уровня ингибитора активации плазминогена I типа (PAI-1) в ночное время
Прием пероральных контрацептивов	Повышение активности большинства факторов свертывания, агрегации тромбоцитов, снижение уровня АТ III
Длительный стаз (более 3 мин)	Увеличение фибринолитической активности, укорочение АЧТВ, ПВ, ТВ, повышение уровня фибриногена, АТ III
Стресс, физическая нагрузка	Повышение фибринолитической активности (уровня t-PA), укорочение АЧТВ, активация ф. VIII, увеличение vWF
Положение тела	В положении стоя происходит относительное увеличение содержания факторов свертывания
Температура +18-+24°C в течение 8 часов	Снижение активности факторов VIII, V и IX (удлинение АЧТВ)
Температура +4 °C	Увеличение активности факторов VII, XI и XII

Влияние алкоголя на гемостаз определяется дозой. Наблюдается уменьшение антитромбина и фибриногена, повышение ингибитора активатора плазминогена и уменьшение времени кровотечения.

Хронический алкоголизм – снижение количества тромбоцитов, нарушение агрегации тромбоцитов, что быстро восстанавливается после выхода из запоя.

Курение приводит к увеличению агрегации тромбоцитов и их адгезии, повышению в-тромбомодулина, t-PA, активности PAI-1 и фибриногена, снижению ф.VII.

Стабильность

Стабильность крови , смешанной с цитратом натрия в закрытой пробирке, различна для разных видов исследований системы гемостаза:

-ПВ (МНО) в неоткрытых пробирках с кровью, после центрифугирования или без него, при температуре 18 -24 °С остается стабильным до 24 часов после взятия.

Длительное охлаждение пробы до 2-4°С может вести к холодовой активации фактора VIII и укорочению ПВ (быстрое замораживание этим не сопровождается). В то же время пробы пациентов, которые принимают оральные антикоагулянты или гепарин, менее стабильны; их ПВ может варьировать, особенно если в составе ПВ-реактанта нет нейтрализующих гепарин веществ.

-АЧТВ в плазме крови пациентов, которым **не вводился гепарин**, стабильно в течение 4 часов при хранении центрифугированной или нецентрифугированной крови в закрытых пробирках при температуре 2-4°С или 18-24 °С. Если пациенту вводился нефракционированный гепарин, то пробы крови должны быть отцентрифугированы и плазма отделена от клеток в течение одного часа после взятия , и исследована –как можно скорее, но не позднее 4 час.

Стабильность

- для других тестов плазменного гемостаза (ТВ, протеин С, фактор VIII и др.) пробы крови в закрытых пробирках могут храниться при температуре 2 -4⁰С или 18-24 ⁰С, но должны быть отцентрифугированы в течение одного часа, а плазма исследована в течение 4 часов после взятия.
- исследование агрегационной функции тромбоцитов производится не позднее 4 час после взятия крови (лучше в течение 2 час). Богатая тромбоцитами плазма должна храниться при комнатной температуре; ее охлаждение нежелательно, поскольку ведет к активации тромбоцитов и изменению их свойств. Замораживание такой плазмы недопустимо.
- для определения биохимических маркеров активации тромбоцитов (тромбоцитарный фактор 4, β-тромбоглобулин, тромбоксан) взятие крови производится в специальную цитратную пробирку с дополнительными добавками (СТАД), после центрифугирования плазма быстро переносится во вторичную пробирку и замораживается до исследования

Стабильность

• При невозможности исследования параметров гемостаза в течение 24 часов (для ПВ) или в течение 4 часов (для остальных тестов) пробы бестромбоцитарной плазмы можно однократно заморозить и хранить до 2 недель при -20°C или до 6 месяцев при -70°C . Размораживать плазму перед анализом нужно быстро, в теплой воде, тщательно перемешивать и немедленно исследовать; если это невозможно, то допустимо ее хранение при $+4^{\circ}\text{C}$ не более 2 часов.

• NB!!!! Нужно помнить, что *после замораживания и оттаивания* в некоторых пробах возможно *удлинение АЧТВ*.

• NB!!! При исследовании гемостаза, как и для других лабораторных тестов, желательно взятие двукратного объема крови для возможного повторного (дублированного) исследования.

•

Центрифугирование

	Скорость	Длительность	Применение
Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП)	1000 -1500 оборотов/мин (450-500 G)	5-10 мин	Подсчет количества эритроцитов, оценка функции тромбоцитов
Бедная эритроцитами плазма (БТП)	3000-4500 оборотов/мин (1200-2000G)	15 мин	Оценка показателей плазменного гемостаза
Бестромбоцитарная плазма	4000 оборотов/мин	30 мин	

Представлены условия центрифугирования для центрифуг с диаметром ротора 37 см.

Для центрифуг другого диаметра:

ОТП – относительное центробежное ускорение 400 G – 5 минут;

БТП – при 1500-2000 G – 10 минут

Величина **$G=RCF$** (относительная центробежная сила) **$RCF=1.118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot n^2$** .

N- скорость вращения в оборотах в мин;

r-эффективный радиус вращения центрифуги- радиус от оси вращения (центра ротора) до дна пробирки

Аналитический этап

1. Исследование сосудисто-тромбоцитарного звена
2. Исследование коагуляционного звена гемостаза
3. Исследование фибринолиза

Тест должен иметь установленные:

- **диагностическую значимость**
- **чувствительность и специфичность,**
- **метод калибровки (стандартизации),**
- **систему контроля качества**

*NB!!! **Алгоритм** диагностики нарушений гемостатических функций должен строиться стандартно — **от простого к сложному, от оценочных методов к специальным.***

Лабораторные методы, используемые в исследовании гемостаза:

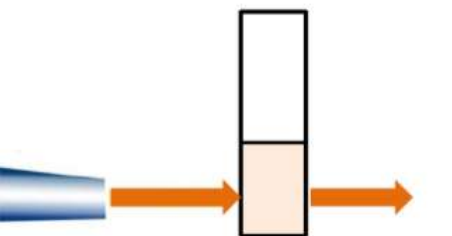
1. Клоттинговые: (ВСК, ПВ, АПТВ, ТВ ...)
2. Хромогенные: (активность АТIII, РС, PI)
3. Иммунологические: (количество отдельных факторов)
4. ПЦР: (ДНК-диагностика наследственных гемофилий и тромбофилий: аномалия Лейдена, гомоцистеинемия, дефицит АТ)
5. Проточная цитофлуориметрия: (определение рецепторов тромбоцитов)
6. Нефелометрия: (исследование функции тромбоцитов по методу Born)

Клоттинговые методы:

- ✓ **ПРИНЦИП:** основаны на определении времени образования, а также растворения сгустка в стандартных условиях.
- ✓ определяется активность отдельных звеньев системы свертывания и фибринолиза.
- ✓ **ТЕСТЫ** проводят :
 - ручной метод (воспроизводимость и точность определения самая низкая);
 - Полуавтоматические и автоматические анализаторы.
- ✓ По системе регистрации сгустка : оптические, оптико-механические, механические и турбодиметрические коагулометры.
- ✓ Обязательно в дублях.
- ✓ Допустимо расхождение по времени образования сгустка в параллельных исследованиях менее 0,5 сек.

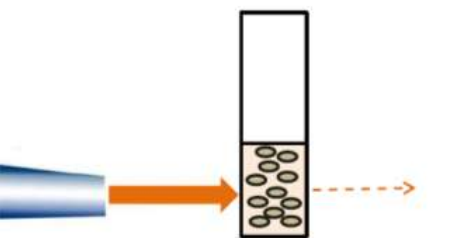
Турбидиметрический метод

Принцип метода

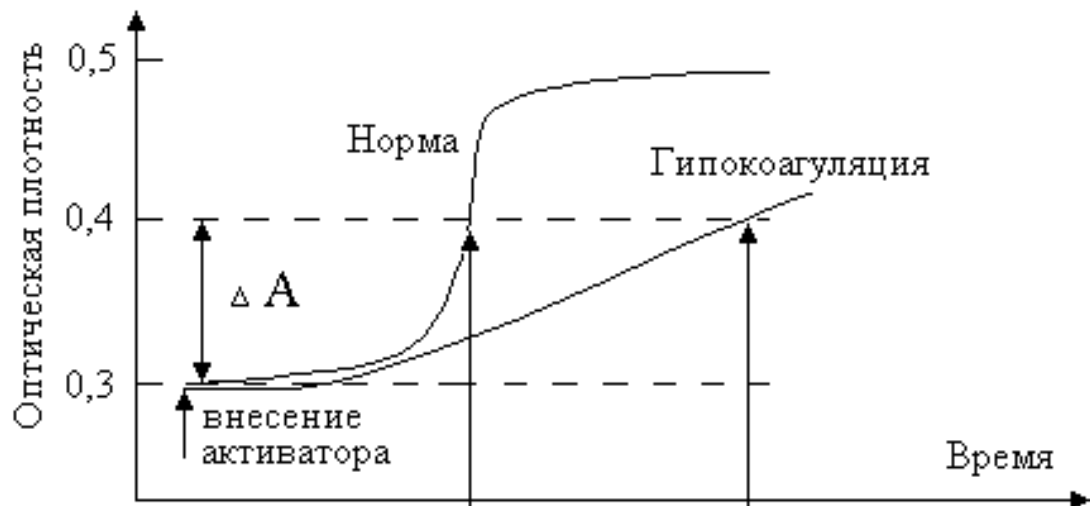


Светопропускание 100%

Регистрируются изменения светопропускания богатой тромбоцитами плазмы после добавления индуктора агрегации



Светопропуска



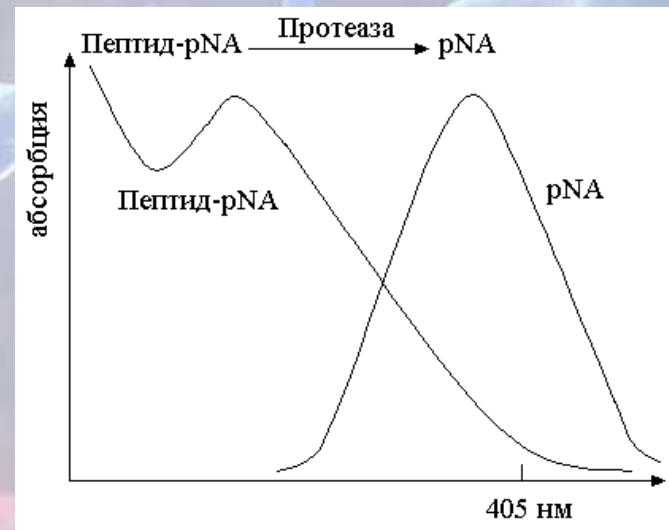
Хромогенные методы:

-это хромогенное (оптическое) определение хромогенных (окрашенных) веществ (нитроанилина), связанных с субстратами (белками) специфических реакций;

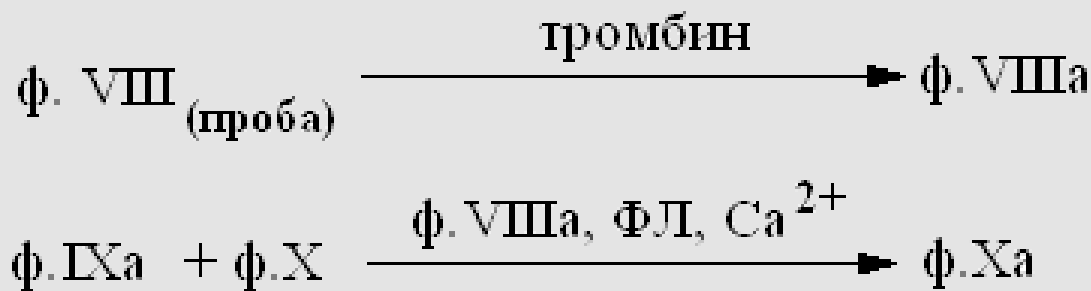
-определяется активность отдельных компонентов свертывающей, антитромбиновой или фибринолитической системы.

Принцип определения содержания фактора VIII

Определение фактора VIII основано на том, что количество образующегося фактора Ха в реакциях активации плазменного гемостаза прямо пропорционально содержанию VIII фактора в пробе



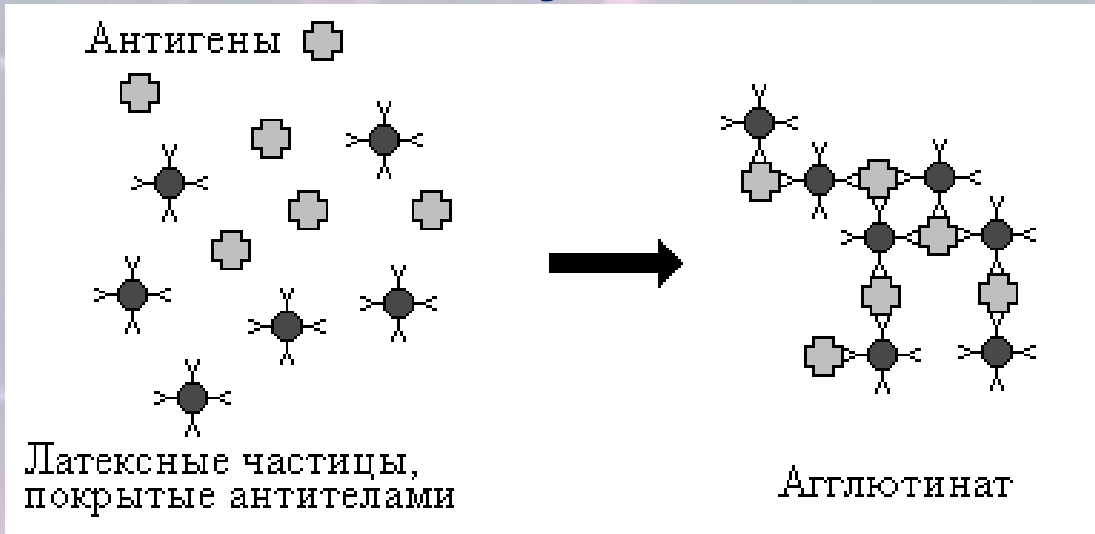
Активация ф. VIII, VIIIa-зависимый катализ активации фактором IXa фактора X



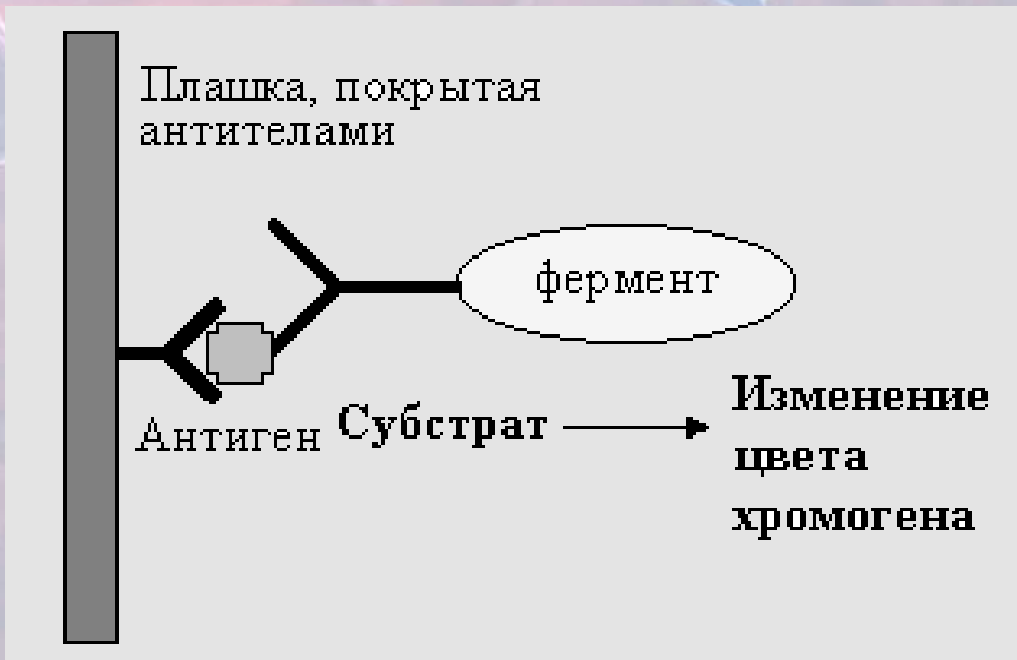
Измерение



Иммунохимические методы

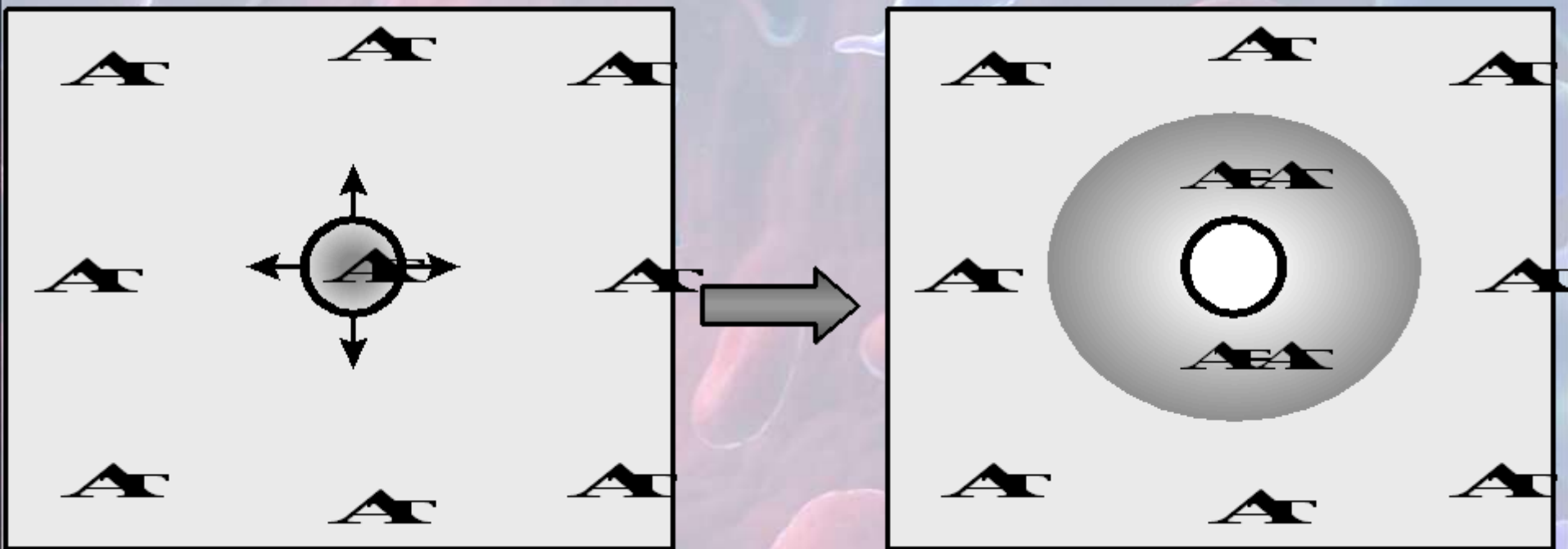


Принцип латекс-агглютинации



Принцип ELISA. На плашке, покрытой антителами против фактора гемостаза, связывается антиген

Принцип метода радиальной иммунодиффузии, используемый для полуколичественной оценки факторов гемостаза



Исследование сосудистого компонента:

1) Определение резистентности микрососудов:

- манжеточная проба;
- баночная проба;
- проба щипка

Принцип методик состоит в том, что при нарушении нормального состояния стенки капилляров после механического воздействия на месте давления возникают многочисленные петехии или кровоподтек.

Пример методики «проба жгута»:

отступив от локтевой ямки 1,5–2 см очерчивают круг 2,5 см в диаметре; на плечо накладывают манжетку тонометра и в течении 5 минут поддерживают давление в манжетке 80 мм рт. ст. Затем подсчитывают все появившиеся в очерченной области петехии (у здоровых людей образуется не более 10 петехий).

Клиническое значение:

Положительная проба возможна

при врожденной ломкости капилляров,

значительной тромбоцитопении,

тромбоцитопатии,

гиповитаминозе С,

болезни Виллебранда,

приеме непрямых антикоагулянтов,

гормональном сдвиге у женщин,

ДВС-синдроме.

Исследование тромбоцитарного компонента

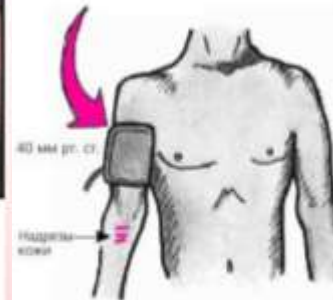
1. Определение времени кровотечения:

- по Дьюка;
- по Айви;
- по Шитиковой

Время кровотечения по Ivy



Метод Айви



- В норме время кровотечения по Айви не превышает 8 минут.

- более чувствительный тест Айви
- оценивают время кровотечения из надрезов на коже ладонной поверхности верхней трети предплечья на фоне искусственного повышения венозного давления с помощью манжеты для определения АД, в которой поддерживают давление 40 мм рт. ст.

ГОВАРОВА О.В.

Референтные пределы: взрослые – 2-9 мин, дети – 3-12 мин.

МЕТОД АЙВИ

- **Референтные пределы.** в норме не превышает 8 мин,
 - *но требуется уточнять нормативы применительно к каждой лаборатории, каждому лаборанту и типу применяемого устройства для надреза кожи.*
- **Интерпретация результатов.**
- **Результаты теста следует интерпретировать с учетом** данных других анализов, а также наличия или отсутствия клинических геморрагических проявлений у обследуемого.
- **Укорочение длительности кровотечения**
 - клинического значения не имеет и чаще свидетельствует о нестандартности процедуры.
- **Удлинение времени кровотечения-**
 - при тромбоцитопениях, тромбоцитопатиях и болезни Виллебранда
- **NB!!!!** **Значительное удлинение длительности** кровотечения, не соответствующее выраженности тромбоцитопении, наблюдается **при болезни Бернара-Сулье.**
- **NB!!!** При **гемофилиях** продолжительность кровотечения в большинстве случаев **не** отличается от нормы.

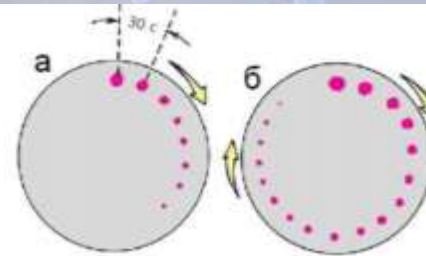
Клиническое применение результатов исследования

- Тест используется как ориентировочный для выявления пациентов с нарушением функционирования **сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза и болезнью Виллебранда.**
- **NB!!!** Дифференцировать варианты патологии этим методом нельзя.

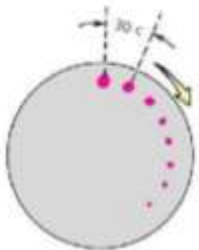
Метод Дьюка



- Предварительно мочку уха согревают между пальцами.
- Стерильным скарификатором или плоским ланцетом прокалывают нижний валик мочки уха (глубина прокола 3,5—4,0 мм) и включают секундомер.



- а) у здорового человека (время кровотечения 3,5 мин.)
- б) у больного с выраженной тромбоцитопенией (время кровотечения 20 мин.)



- Выступающие капли крови каждые 30 с промокают фильтровальной бумагой, не прикасаясь к ранке.
- Как только наступит момент, когда новые капли крови не образуются, выключают секундомер и определяют общую длительность кровотечения, а также оценивают размеры капель.

- В норме время кровотечения по Дьюку не превышает 4 мин. Его увеличение наблюдается при выраженных тромбоцитопениях или/и тяжелых нарушениях их функции (тромбоцитопатиях).
- Следует помнить также, что у 60 % больных с этой патологией тест оказывается отрицательным, и время кровотечения нормально.

Унифицированный метод определения времени свертывания крови (метод Ли-Уайта)

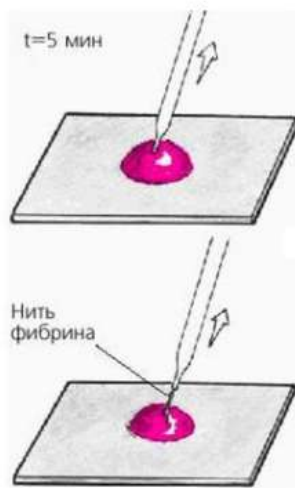
- **Материал для исследования.** Цельная нестабилизированная венозная кровь.
- **Ход определения.** Сухой иглой с широким просветом без шприца пунктируют локтевую вену. Выпустив первые капли крови на ватный тампон, набирают по 1 мл в сухую пробирку.
- Немедленно включают секундомер и ставят пробирку в водяную баню при температуре 37 градусов. Через 2 мин, а затем каждые 30 сек, пробирки наклоняют на 45-60 градусов, дожидаясь момента, когда кровь свернется.
- Отмечают время свертывания крови.
- **Нормальные величины. 5-10 минут.**

Унифицированный метод определения времени свертывания крови (метод Ли-Уайта)

- Клиническое значение.
- **Удлинение времени свертывания крови до 15 мин и более** наблюдается при тяжелой недостаточности факторов, участвующих во внутреннем пути образования протромбиназы, дефиците протромбина и фибриногена, а также при наличии в крови ингибиторов свертывания.

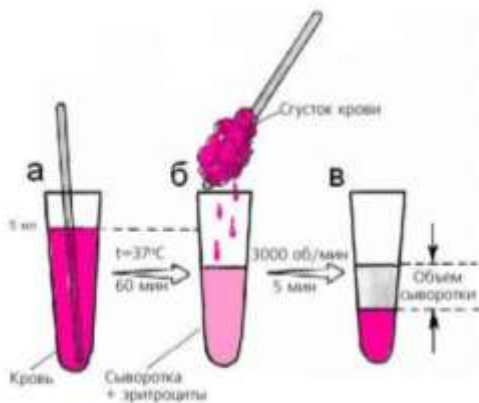
Время свертывания крови

Метод Моравица



- На предметное стекло наносят каплю крови, взятую из пальца или мочки уха.
- Включив секундомер, каждые 20–30 с в каплю крови опускают тонкий стеклянный капилляр.
- Время свертывания определяют в момент появления первой тонкой нити фибрина при вытягивании капилляра из капли крови.
- В норме свёртывание крови составляет около 5 мин.

Ретракция сгустка крови



- В клинической практике чаще используют непрямые методы оценки ретракции сгустка. Один из них заключается в определении объема сыворотки, выделяемой при ретракции сгустка крови, по отношению к объему плазмы исследуемой крови.

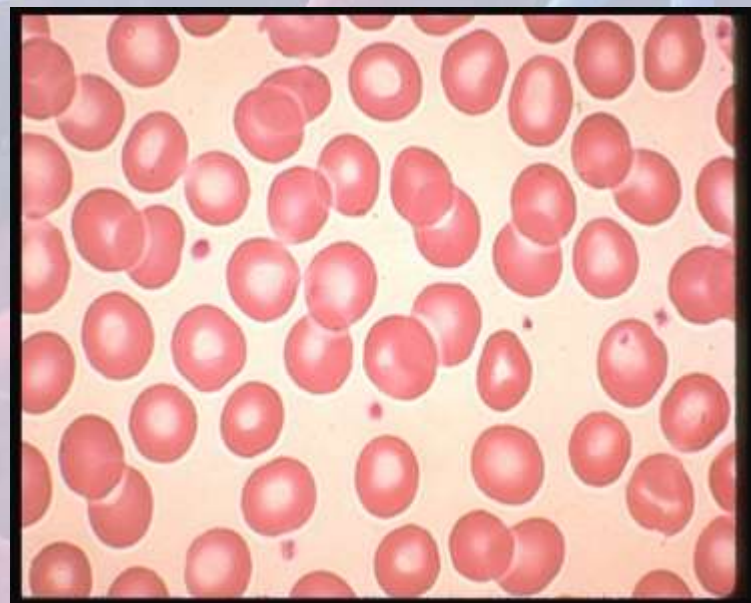
- В норме ретракция сгустка составляет 40—95%. Ее уменьшение наблюдается при выраженных тромбоцитопениях и тромбастении Гланцмана.

- а) в градуированную центрифужную пробирку набирают 5 мл крови, опускают в нее деревянную палочку и помещают пробирку в водяную баню в исследуемой крови определяют показатель гематокрита.
- Б) Через 1 ч после свертывания крови сгусток, прикрепившийся к палочке, удаляют, дав жидкой части стечь обратно в пробирку.
- В) измеряют объем жидкости, оставшейся в пробирке, центрифугируют ее при 3000 об/мин в течение 5 минут и измеряют объем осевших эритроцитов

Искомый объем сыворотки определяют по разнице между объемом оставшейся в пробирке жидкости и объемом эритроцитов.

2. Определение количества тромбоцитов: (170-420x10⁹/л)

- 1) В мазке по Фонио: не может быть рекомендован из-за малой точности (*ошибка метода до 25%*).
- 2) Подсчет в камере Горяева после гемолиза эритроцитов оксалатом аммония-**референтный метод** (ошибка 10%).
- 3) С помощью автоматического счетчика в венозной крови, стабилизированной ЭДТА(ошибка 2-4%).



Показатели тромбоцитов на автоматическом анализаторе

Показатель	Обозначение в бланке	Референтные значения	Примечание
Количество тромбоцитов	PLT, PL	180-420 тыс в 1 мкл	
Средний объем тромбоцита	MPV	6-12 фл.	Обратно пропорционален числу тромбоцитов. ЭДТА может приводить к увеличению MPV на 10-15 % за 2 часа. Цитрат натрия может увеличивать или уменьшать MPV; температура окруж. среды
Показатель гетерогенности тромбоцитов	PDW	10-15 %	Ложное повышение при микроцитозе, шизоцитозе, образовании микроагрегатов тромбоцитов, разрушении лейкоцитов- фрагменты клеток
Процент тромбоцитарной массы в объеме крови	PCT	0,15-0,35 %	Наиболее чувствительный показатель риска послеоперационных кровотечений, чем число тромбоцитов: снижение на 0,1% - увеличивает риск кровотечений

Определение ретенции (адгезивности) тромбоцитов

Определение ретенции (адгезивности) тромбоцитов



- В полиэтиленовый или силиконированный стеклянный шприц набирают 2 мл крови, присоединяют к нему полихлорвиниловую трубку (колонку) со стеклянными шариками диаметром 0,2–0,4 мм и устанавливают шприц в инфузионный насос, позволяющий опорожнять шприц со скоростью 2 мл в минуту.

- Количество тромбоцитов определяют дважды: до и после пропускания крови через колонку со стеклянными шариками.
- У здоровых людей индекс ретенции составляет 20–55%.
- Уменьшение этого показателя свидетельствует о нарушении адгезии тромбоцитов и встречается при многих врожденных тромбоцитопатиях (тромбастения Гланцмана, болезнь Бернара-Сулье, болезнь Виллебранда и др.).

Методы исследования агрегационной способности тромбоцитов

Качественные

- Качественный экспресс-метод визуальной оценки на предметном стекле по А.С. Шитиковой
- Качественный пробирочный метод по R.M. Biggs
- Гемолизат-агрегационный тест по З.С. Баркагану, Б.Ф. Архипову и В. М. Кучерскому

Количественные

- Турбидиметрический оптический метод по Борну и О'Брайену
-ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ
- VerifyNow
- Тромбоэластография
- Анализатор функции тромбоцитов (Platelet function analyzer, PFA-100)
- Импедансная агрегатометрия

Качественный экспресс-метод визуальной оценки на предметном стекле по А.С. Шитиковой

Проведение экспресс-анализа по Шитиковой

На обезжиренное предметное стекло нанести по 0,05 мл ОТП и 0,05 мл одного из активаторов, смешать при покачивании, включить секундомер. Отметить время появления агрегатов при рассматривании на темном фоне при боковом освещении. Каждое определение повторить не менее 3 раз, рассчитать среднюю арифметическую величину скорости появления агрегатов.

В нормальной плазме здоровых лиц время появления агрегатов на индукцию АДФ и коллагеном - 10-15 сек, на индукцию ристоцетином – 5-10 сек. Удлинение времени агрегации на 10-20 сек указывает на нарушение функций тромбоцитов, укорочение времени агрегации - на повышенную функцию клеток. Полное отсутствие агрегации под действием АДФ и коллагена свидетельствует о тромбастении Гланцманна, под действием ристоцетина – о синдроме Бернара-Сулье или болезни Виллебранда I или III типов.

Нормальные значения агрегационной активности тромбоцитов здоровых лиц рекомендуется установить в каждой диагностической лаборатории применительно к имеющемуся оборудованию и реагентам.

Гемолизат-агрегационный тест (ГАТ) по З.С. Баркагану, Б.Ф. Архипову и В. М. Кучерскому

Определяют время появления видимых агрегатов тромбоцитов после добавления к плазме гемолизата в различных концентрациях.

Принцип:

кровь набирают в силиконизированную пробирку, стабилизируют цитратом натрия и центрифугируют для получения тромбоцитарной плазмы.

Плазму отделяют, а оставшийся осадок эритроцитов дважды отмывают в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1:1, центрифугируют при 1500 об/мин по 10 мин.

После удаления изотонического раствора 0,1 мл отмытых эритроцитов гемолизируют в 1 мл дистиллированной воды (полученное разведение 10^{-1} . Далее готовят разведения от 10^{-2} (макс. доза гемолизата) до 10^{-6} (мин. доза гемолизата).

Исследуемую плазму разливают по 0,2 мл в пробирки, устанавливают в водяную баню 37°C на 1 мин для прогревания и добавляют 0,05 мл раствора гемолизата в разные пробирки с разной концентрацией.

Гемолизат-агрегационный тест (ГАТ) по З.С. Баркагану, Б.Ф. Архипову и В. М. Кучерскому

- *Определяют время появления видимых глазом в проходящем свете пылевидных агрегатов тромбоцитов, также отмечают время появления крупных хлопьевидных агрегатов.*
- 1. Определяется агрегационная активность одного тромбоцита:
 - **ААТ % = $K/B * 100$,**
 - где **К** - нормальное количество тромбоцитов, соответствующее полученному времени агрегации.
 - **Б** - истинное количество тромбоцитов, рассчитанное в камере Горяева
- 2. Степень активности тромбоцитов в ГАТ оценивают по индексу активности тромбоцитов (ИАТ):
 - **ИАТ = K_c/K_m** , где K_c - нормальное количество тромбоцитов, соответствующее времени агрегации при использовании минимальной дозы гемолизата, K_m - аналогичный показатель для теста с максимальной дозой гемолизата.
 - **Нормальные значения ИАТ.**
 - При исследовании с максимальной дозой гемолизата $13,8 \pm 0,5$ с минимальной дозой гемолизата : $46,8 \pm 3,4$ с.
 - **Клиническое значение:**
 - Снижение показателей характерно для тромбоцитопатий
 - Гиперагрегация хапактерна для предтромботических состояний, тромбозов.

Проведение анализа на агрегометре

Исследование на агрегометре провести в соответствии с инструкцией к прибору (Биола, Chrono-Log, Solar). Следует учитывать, что принцип работы этих приборов различен, получаемые агрегатограммы имеют различный вид, число определяемых параметров агрегации не одинаково.

Нормальные значения для агрегометра Биола:

АДФ – 50-75%

Ристоцетин – 55-95%

Коллаген – 50-80%

Нормальные значения для агрегометра Chrono-Log:

АДФ – 55-75%

Ристоцетин – 55-85%

Коллаген – 50-70%

Концентрации агонистов подобраны таким образом, что позволяют без дополнительного разведения верифицировать 97% всех наследственных и приобретенных тромбоцитопатий.

В то же время для контроля за препаратами, обладающими антиагрегатным действием, для получения значительно разбавленных растворов АДФ следует использовать следующие процедуры разведения исходного раствора.

Приготовление растворов АДФ

Концентрация разведенного раствора, М	Процедура разведения исходного раствора АДФ
$1 \cdot 10^{-4}$ М/л (0,05 мг/мл)	Исходный р-р АДФ с конц. $2 \cdot 10^{-4}$ М - в 2 раза: 0,1 мл исх. р-ра + 0,1 мл дист. воды
$1 \cdot 10^{-5}$ М/л (0,005 мг/мл)	Раствор АДФ с конц. $1 \cdot 10^{-4}$ М развести в 10 раз: 0,1 мл р-ра + 0,9 мл дист. воды
$1 \cdot 10^{-6}$ М/л (0,0005 мг/мл)	Раствор АДФ с конц. $1 \cdot 10^{-5}$ М развести в 10 раз: 0,1 мл р-ра + 0,9 мл дист. воды
$1 \cdot 10^{-7}$ М/л (0,00005 мг/мл)	Раствор АДФ с конц. $1 \cdot 10^{-6}$ М развести в 10 раз: 0,1 мл р-ра + 0,9 мл дист. воды

ЗАПИСЬ АГРЕГАТОГРАММЫ

Провести запись агрегатограммы (ОТП от 15-20 доноров) под влиянием всех 3 индукторов агрегации, установить пороговые дозы агрегации для получения однофазной обратимой и двухфазной необратимой агрегации.

Провести запись агрегатограммы исследуемой плазмы пациента. Сравнить полученные результаты с данными контрольных анализов.

По агрегатограмме определить степень агрегации (максимальное светопропускание, %), скорость агрегации (% светопропускания/мин), время агрегации (мин).

АДФ-агрегация проводится для исследования первой фазы (фаза обратимой агрегации и частичной секреции) и второй фазы (фаза необратимой агрегации и полной дегрануляции). При низких концентрациях после первой волны агрегации наступает дезагрегация и снижение агрегатограммы. При более высоких концентрациях АДФ ($2,5-5 \cdot 10^{-6}$ М) наблюдается двухволновая агрегатограмма. Для появления второй волны требуется синтез тромбоксана A_2 , и на этот процесс влияют ингибиторы циклооксигеназы (аспирин), однако вторая волна агрегации на АДФ зачастую сливается с первой волной и не видна отчетливо на агрегатограмме.

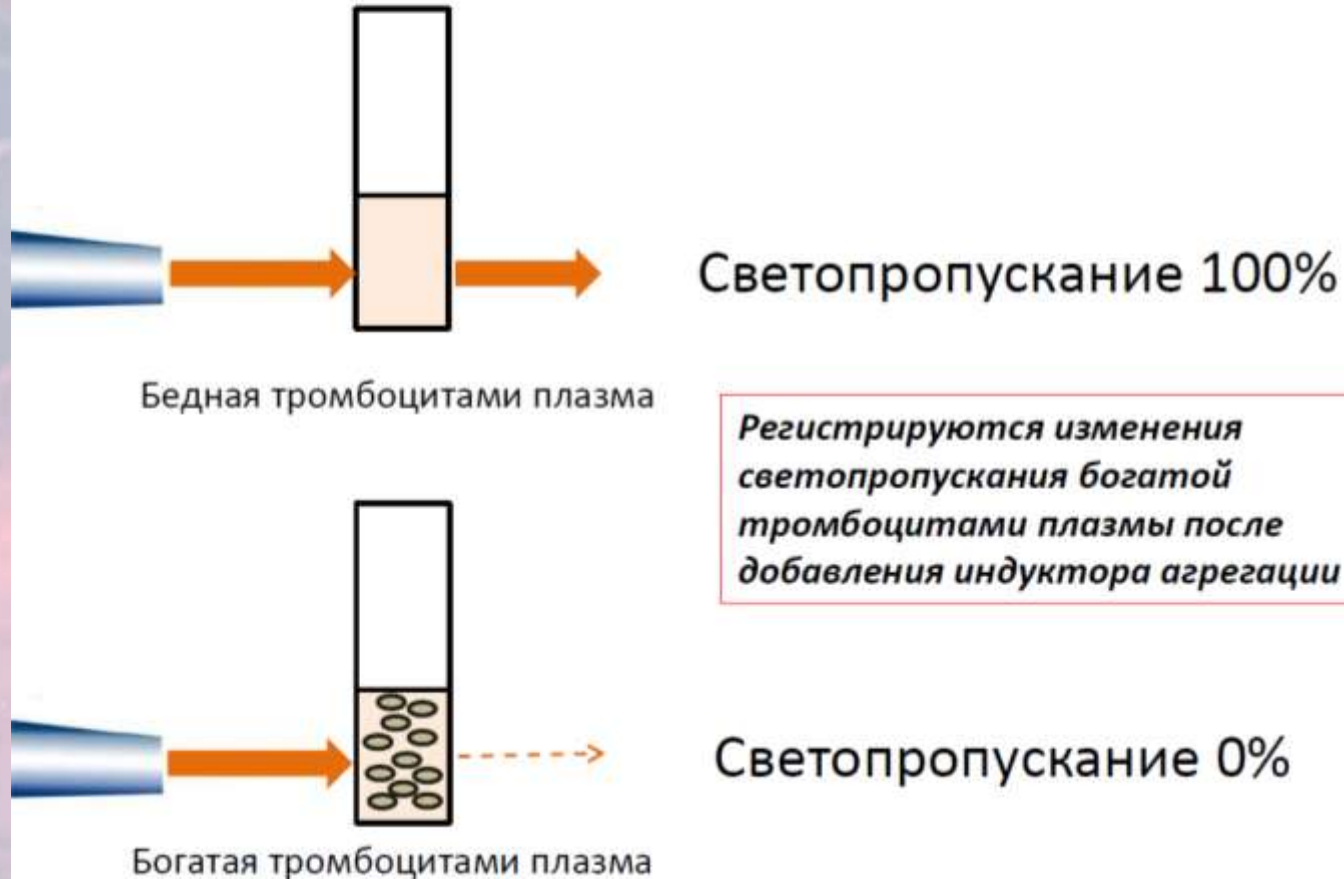
Агрегатограмма на коллаген имеет лаг-фазу, при которой происходит полимеризация коллагена, и имеет одну волну агрегации. Агрегация с коллагеном обусловлена высвобождением из тромбоцитов адениновых нуклеотидов и проводится для оценки секреторной функции клеток.

Ристоцетиновая агрегация возможна при нормальных тромбоцитах и нормальном содержании ф. Виллебранда. При болезни Виллебранда имеется дефект ф. Виллебранда, являющегося частью комплекса с фактором VIII, и агрегация нарушена. Агрегация на ристоцетин нарушена также при синдроме Бернара-Сулье. Внесение в исследуемую ОТП БТП от донора нормализует агрегатограмму при болезни Виллебранда и не нормализует при синдроме Бернара-Сулье.

Турбидиметрический метод исследования агрегации тромбоцитов



Принцип метода



Индукторы агрегации - естественные или искусственные активаторы:

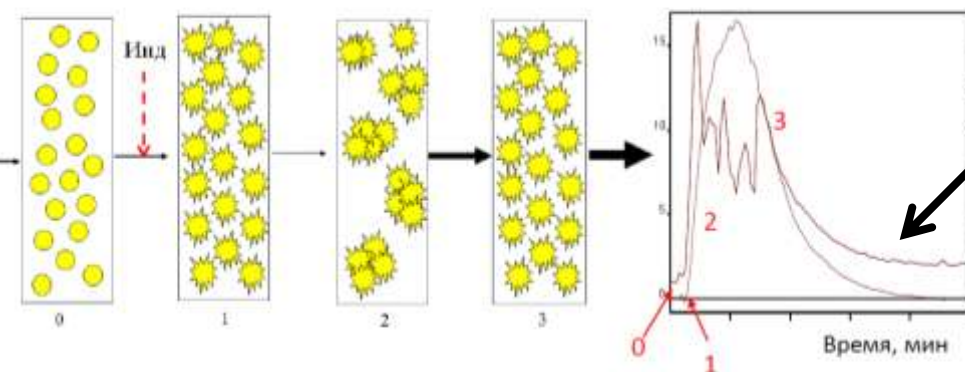
АДФ;

Адреналин;

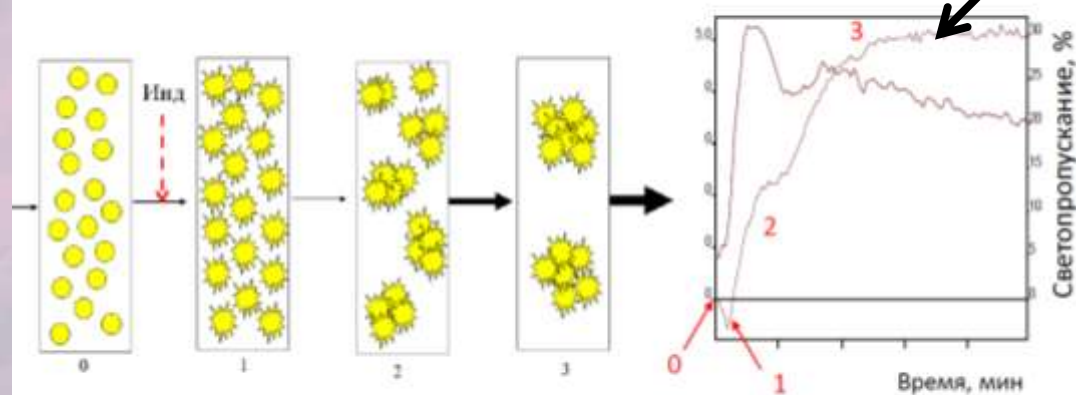
Коллаген;

Ристоцетин и др.

Низкая концентрация индуктора агрегации



Высокая концентрация индуктора агрегации



- 0 – неактивированные тромбоциты
- 1 – фаза активации
- 2 – фаза индуцированной агрегации
- 3 – фаза высвобождения с последующей стабилизацией

Агрегометр HELENA PACKS-4

СПИСОК МЕТОДИК:

Агрегация с АДФ

Агрегация с эпинефрином

Агрегация с коллагеном

Агрегация с ристоцетином

Агрегация с арахидонатом

Активность фактора фон Виллебранда (по ристоцетин-кофакторной активности)

Хромогенное определение:

Антитромбина III

Плазминогена

Протеина С

Гепарина

Активности фактора VIII

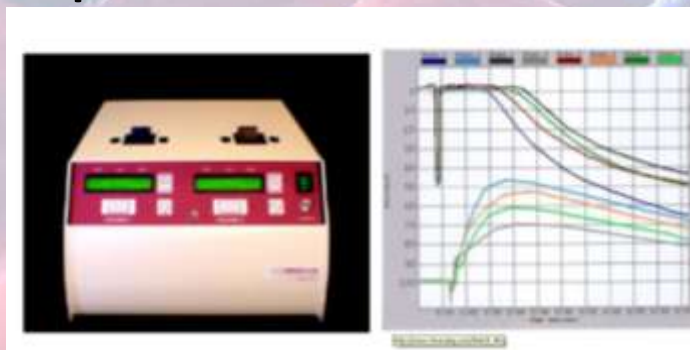
ИМПЕДАНСНАЯ АГРЕГАТОМЕТРИЯ

Принцип метода – измерение электрического импеданса (сопротивления) между двумя электродами, погруженными в цельную кровь, после добавления индуктора агрегации.

Контакт электродов с кровью – образование монослоя тромбоцитов.
Добавление индуктора приводит к увеличению тромбоцитарного слоя и увеличению импеданса.

Преимущества – метод электронного импеданса позволяет измерять агрегацию в гемолизированных, иктеричных и липидемичных образцах крови, не ведет к потере тромбоцитов большого объема при центрифугировании

Недостатки – необходимость частой тщательной промывки и высушивания многократных электродов, преимущественная регистрация тромбоцитарных макроагрегатов.



Анализатор функции тромбоцитов (Platelet function analyzer, PFA -100)

Метод позволяет наблюдать *in vitro* за процессом закупорки сосуда при моделировании этого процесса в специально созданном картридже.

Картридж содержит в себе специальный канал –моделирующий сосуд. Канал имеет в своей стенке микроотверстие, которое моделирует повреждение стенки сосуда. В цельной крови, проходящей по такому каналу, активирует процесс первичного гемостаза и образования сгустка.

На стенках в районе «повреждения» канала нанесены индукторы агрегации (коллаген и адреналин или АДФ), которые являются первичной причиной запуска процесса свертывания

Остановка перфузии фиксируется как «время окклюзии сосуда»(время закрытия мембраны - **Closure Time-CT**)

Преимущества- отсутствие специальной пробоподготовки, быстрое получение результата.

Недостатки – неспецифичность для оценки чувствительности к антиагрегантам, высокая стоимость одноразо

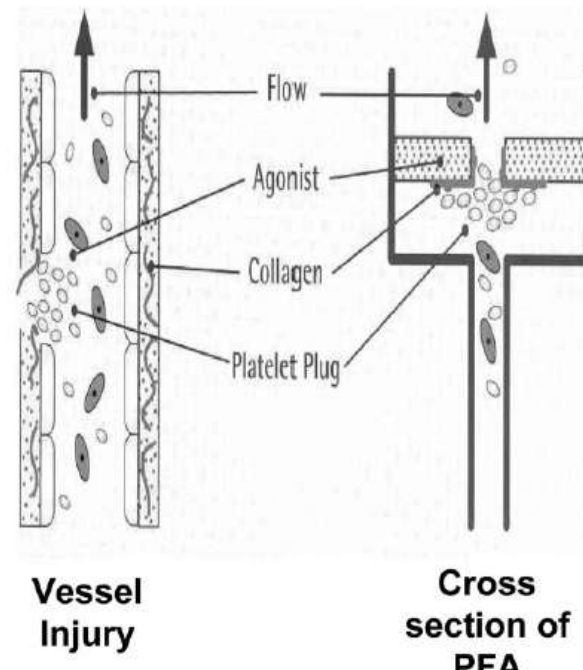


Оценка тромбоцитарного звена гемостаза



Platelet Function analyzer-100

гемостаза



Прибор для количественной оценки гемостатической функции тромбоцитов

Оценка времени закрытия мембраны (Closure Time-CT):

Нормативы : для мембраны Коллаген/Эпинефрин менее 183 сек

Для Коллаген/АДФ менее 122 сек

Если СТ Коллаген/Эпинефрин >>> 183 сек при СТ Коллаген/АДФ <<<122 сек – аспирин –индуцированное удлинение СТ.

СТ Кол/Эпи >>>183сек и СТ Кол/АДФ >>>122 сек – могут спровоцировать анемия($Ht < 0.28$), тромбоцитопения $< 100 \cdot 10^9 / л$, значимое снижение функции тромбоцитов.

Длительное применение аспирина могут увеличивать СТ Кол/АДФ!!!!

Тромбоэластография-

графическая регистрация процесса свертывания крови, позволяющая оценивать состояние системы свертывания крови.

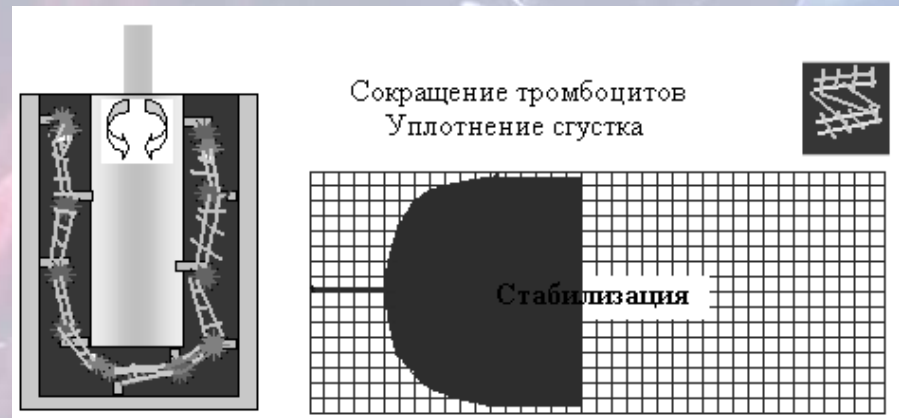
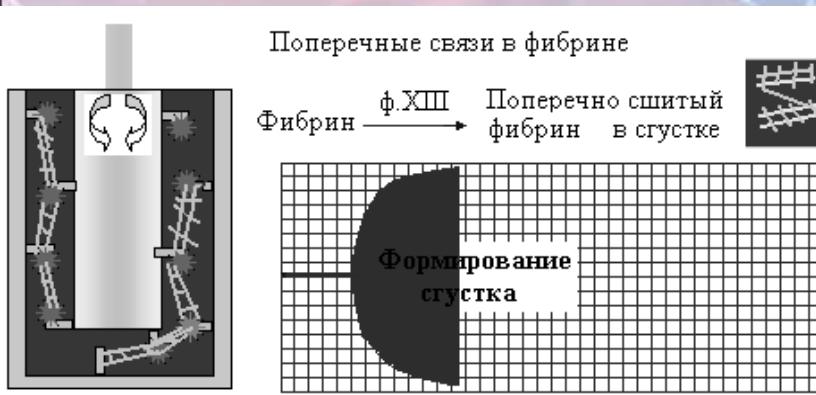
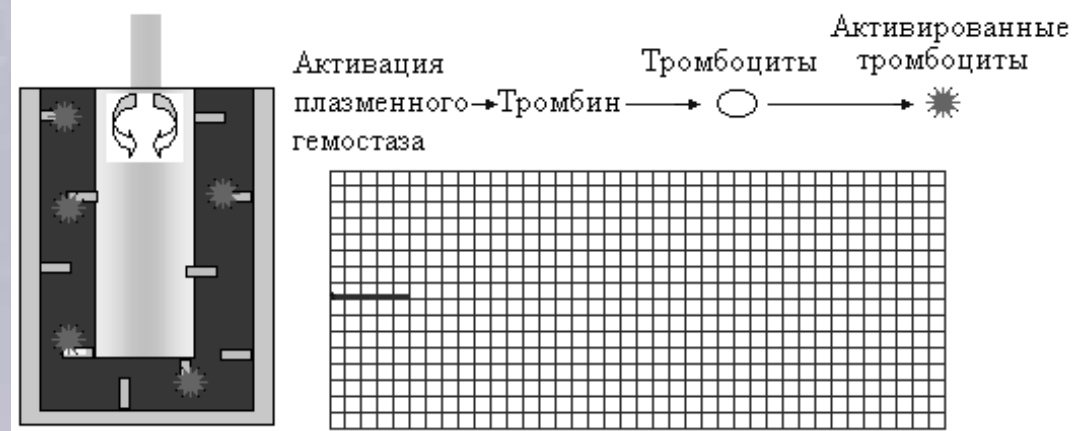
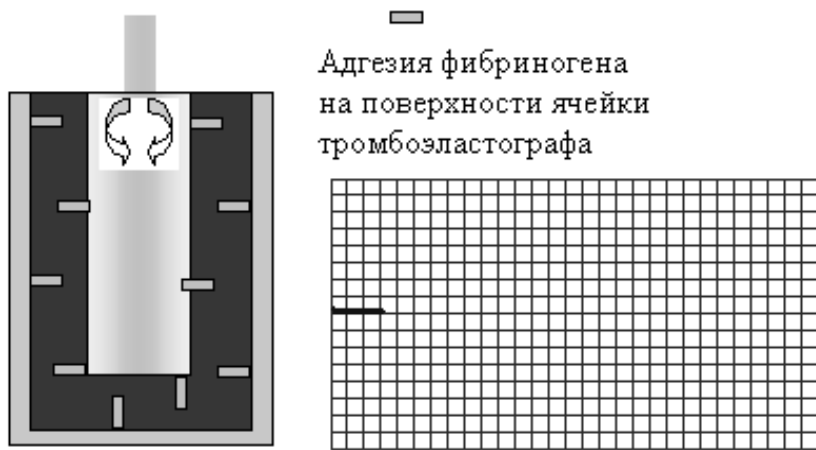


- Принцип работы тромбоэластографии заключается в регистрации амплитуды колебаний стержня в кювете с кровью, совершающие колебательные движения.
- Небольшое количество крови помещается в кювету, которая совершает медленные вращательные колебания на несколько градусов. В кювету помещается стержень датчика, а также могут добавляться активаторы свертывания (АДФ, арахидоновая кислота). Когда в кювете формируется сгусток, стержень начинает вращаться вместе со сгустком.
- Движения стержня регистрируются в виде кривой, получившей название **тромбоэластограмма**.



Тромбоэластограф ROTEG. Оценивает стадии образования, стабилизации и лизиса сгустка цельной крови, имеет 4 параллельных канала, может быть использован для оценки влияния лекарственных препаратов на свертывание

Тромбоэластография



Этапы формирования сгустка крови

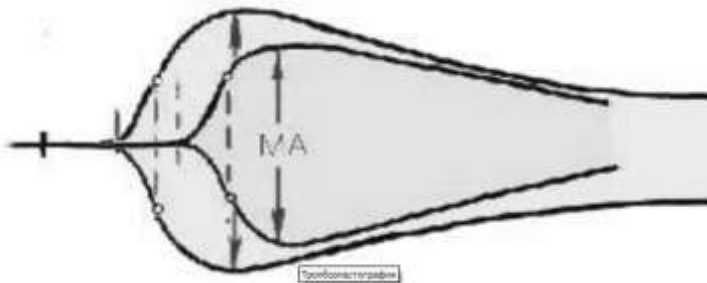
Тромбоэластография



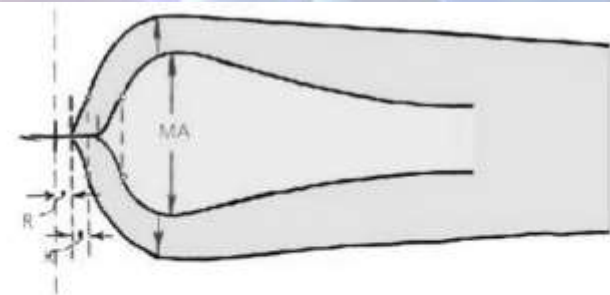
Предложено множество количественных показателей тромбоэластограммы, три из которых заслуживают внимания:

1. Время реакции (R) — время от начала исследования до начала свертывания крови (первых отклонений тромбоэластограммы от прямой линии).
2. Время коагуляции (K) — время от начала движений стержня прибора до момента, когда амплитуда тромбоэластограммы составит 20 мм.
3. Максимальная амплитуда (MA) тромбоэластограммы.

- Для гиперкоагуляции крови характерно укорочение R, K и увеличение MA
- Для гипокоагуляции — удлинение R и K и уменьшение MA



- Тромбоэластограмма при гипокоагуляции



- Тромбоэластограмма при гиперкоагуляции

Варианты тромбоэластографии при патологии



Норма: R, K, MA, угол α – нормальные значения



Наличие свободного гепарина в крови:
R, K – удлинены, MA, угол α – снижены



Тромбоцитопения/тромбоцитопатия, лечение антиагрегантами: R – норма, K – удлинено, MA – снижена



Гиперфибринолиз, лечение тромболитиками:
R – норма, MA – постоянное снижение, Ly30 >7.5%



Гиперкоагуляция с угнетением фибринолиза



ДВС-синдром:

Стадия 1 – гиперкоагуляция со вторичным гиперфибринолизом



Стадия 2 – гипокоагуляция

VerifyNow

Измеряется светопропускание цельной крови после добавления в неё пластиковых гранул, покрытых фибриногеном, и индуктора агрегации.

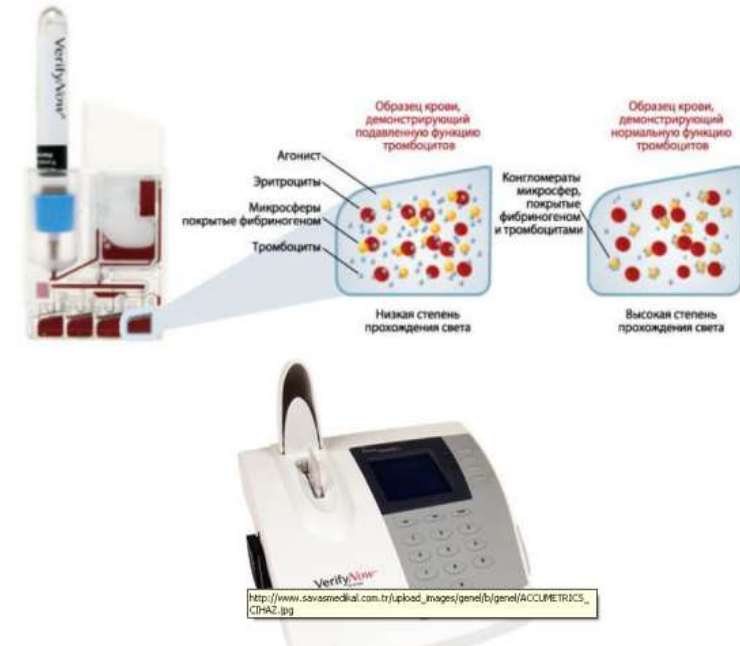
Результат исследования выдается в численном виде, в условных единицах агрегации.

Разработаны 3 вида картриджей с различными индукторами- для оценки антиагрегантного действия ацетилсалициловой кислоты (арахидоновая кислота), блокаторов P2Y₁₂(АДФ), блокаторов рецепторов GP IIb/IIIa на тромбоцитах (тромбин).

Для каждого агониста предложены референсные пределы для пациентов без терапии, и получающих антиагреганты.

Преимущества: можно проводить у постели больного, не требует доп. пробоподготовки

Недостатки: высокая стоимость прибора и картриджей.



ВАЖНО

- ***Ни один из методов не является унифицированным и стандартизованным.***
- ***Каждой лаборатории необходимо установить свои референсные значения, в зависимости от прибора и реагентов.***

The background of the slide is a microscopic view of blood components. It features numerous red blood cells (erythrocytes) appearing as reddish-orange biconcave discs, and several platelets (thrombocytes) which are smaller, purple, and have a characteristic shape with granules and a central nucleus. The overall color palette is a mix of light red, pink, and purple.

Исследование коагуляционного звена гемостаза

Скрининговые тесты

Унифицированный метод определения времени свертывания крови (метод Ли-Уайта)

- **Материал исследования:** *Цельная нестабилизированная венозная кровь.*
- **Ход определения.**
 1. Сухой иглой с широким просветом без шприца пунктируют локтевую вену. Выпустив первые капли крови на ватный тампон, набирают по 1 мл в сухую пробирку.
 2. Немедленно включают секундомер и ставят пробирку в водяную баню при температуре 37 °.
 3. Через 2 мин, а затем каждые 30 сек, пробирки наклоняют на 45-60 градусов,
 4. дожидаясь момента, когда кровь свернется.
 5. Отмечают время свертывания крови.
- **Нормальные величины. 5-10 минут.**
- **Клиническое значение. Удлинение времени свертывания крови до 15 мин и более**
 1. при тяжелой недостаточности факторов, участвующих во внутреннем пути образования протромбиназы,
 2. дефиците протромбина и фибриногена,
 3. при наличии в крови ингибиторов свертывания.

Скрининговые тесты

Активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время (АЧТВ)

- *Фосфолипидзависимый тест.*
- Оценка **внутреннего механизма** образования протромбиназы
- **Принцип метода:**
 - Инкубирование плазмы с оптимальным стандартизованным соотношением фосфолипидов и каолина активирует факторы внутреннего пути свертывания.
 - Добавление в систему ионов кальция купирует цитрат плазмы и позволяет получить фибриновый сгусток.
 - В процессе измерения АЧТВ регистрируют время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка.

АЧТВ используется для выявления:

- для исследования причины кровотечения или тромбозов;
- для диагностики гемофилии;
- при исследовании причин патологии беременности;
- для мониторинга антикоагулянтной терапии, в том числе гепаринотерапии;
- для выявления диссеминированного внутрисосудистого свертывания;
- для обнаружения дефицита отдельных факторов свертывания крови;
- для обнаружения специфических ингибиторов свертывания (например, к ф. VIII);
- для выявления неспецифических ингибиторов свертывания (волчаночный антикоагулянт);
- перед хирургическим вмешательством для исследования опасности кровотечения;
- для выявления заболеваний печени.

АЧТВ

- **Удлинение теста АЧТВ может быть вызвано:**
 - - синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС);
 - - заболеванием печени, где синтезируются почти все факторы свертывания крови;
 - - массивными гемотранфузиями цитратной крови;
 - - введением гепарина;
 - - дефицитом факторов внутреннего пути свертывания;
 - - дефицитом витамина К;
 - - присутствием ингибиторов свертывания, как специфических, так и неспецифических;
 - - наличием волчаночного антикоагулянта;
 - - наличием гемофилии.
- **Укорочение теста АЧТВ свидетельствует о гиперкоагуляции и опасности возникновения**
 - **тромбозов.**
 - *Тест не улавливает нарушения в тромбоцитах, недостаточность проконвертина (ф.VII),*
 - *фибринстабилизирующего ф. (ф.XIII) и недостаток кальция в системе.*

Протромбиновое время(ПВ)

- **Фосфолипидный тест**
- **Оценка внешнего пути образования протромбиназы**
- **Может быть выражено следующими способами:**
 - 1. **ПВ – время свертывания плазмы при добавлении тромбопластина (норма 14-18 сек);**
 - 2. **ПО=ПВ плазмы больного/ПВ нормальной плазмы (норма 0,9-1,1);**
 - 3. **МНО=ПО^{МИЧ} (норма 0,8-1,2);**
 - 4. **активность протромбина по Квику (рассчитывается по калибровочному графику, норма 70-130%);**
 - 5. **ПИ=(ПВ нормальной плазмы/ПВ плазмы больного) x 100 (норма 80-120%).**

Протромбиновый тест

- **Тест используют:**
 - ✓ для выявления нарушений активности факторов внешнего пути свертывания,
 - ✓ для оценки функции печени,
 - ✓ для контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия.
- **Основным реагентом** в тесте является тромбопластин - солевой экстракт тканей (легкие, плацента, головной мозг) животных и человека.
- **Принцип метода.** Определяется время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы в присутствии ионов кальция и избытка тканевого тромбопластина. В этих условиях время образования сгустка фибрина зависит только от активности факторов протромбинового комплекса.

Международное Нормализованное Отношение

Международным Комитетом по тромбозам и гемостазу рекомендован тест протромбиновое время (ПВ) с оценкой результатов по МНО

$$MHO = \left[\frac{\text{ПВ больного}}{\text{ПВ донорской пул плазмы}} \right]^{MICH}$$

При определении ПВ больного и стандартной плазмы с любым тромбопластином, учитывая международный индекс чувствительности (МИЧ или ISI в английской аббревиатуре) используемого тромбопластина, получают относительное значение, как будто был использован в качестве тромбопластина Международный стандарт ВОЗ, МИЧ которого принят за 1,0. Эту величину и принято называть Международным Нормализованным Отношением – МНО (INR - английская аббревиатура).

МИЧ для различных тромбопластинов варьирует от 0,9 до 2,8. Чем выше значение МИЧ, тем менее чувствителен к изменению содержания компонентов протромбинового комплекса тромбопластин и, следовательно, тем больше может быть ошибка в определении ПВ. Использование тромбопластинов с МИЧ 1,4 - 1,5 обеспечивает хорошее совпадение результатов даже при низких дозах не прямых антикоагулянтов. Основная цель, которую преследовало введение МНО, состояла в обеспечении оптимизации терапии оральными антикоагулянтами, а для лаборатории это еще освобождение от необходимости построения калибровочного графика для каждой серии тромбопластинов.

Рекомендуемый диапазон МНО при терапии непрямыми антикоагулянтами

Показатели	МНО
Профилактика системных тромбоэмболий Послеоперационная профилактика венозного тромбоза Лечение флеботромбоза и легочной тромбоэмболии Преходящие нарушения мозгового кровообращения Постинфарктная профилактика венозного тромбоза Мерцание предсердий Нестабильная стенокардия Пороки клапанов сердца Биологические протезы сердечных клапанов	2,0 - 3,0
Рецидивирующий тромбоз глубоких вен Инфаркт миокарда Механические протезы сердечных клапанов Рецидивирующие системные тромбоэмболии	3,0 - 4,5

МНО не используется

- 1. Для контроля внешнего пути свертывания крови у пациентов, не принимающих непрямым антикоагулянтов(АНД)
*(рекомендован протромбиновый тест)***
- 2. В начале терапии АНД**
- 3. При оценке функции печени**

Протромбиновое время(ПВ)

- Удлинение протромбинового времени связано с:
 - - введением пероральных антикоагулянтов;
 - - заболеванием печени;
 - - дефицитом витамина К;
 - - ДВС -синдромом;
 - - наследственным дефицитом протромбина, ф.VII, ф.X или ф.V.
- Укорочение протромбинового времени связано с опасностью тромбозов.

ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ (ТВ)

- характеризует конечный этап процесса свертывания : *превращение фибриногена в фибрин* под действием **тромбина**.
- **Принцип метода** заключается в том, что при добавлении тромбина к исследуемой цитратной плазме время образования сгустка фибрина зависит только от количества и активности фибриногена в данной плазме, от активности тромбина и от наличия ингибиторов.
- Реакция проходит в одну стадию.

ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ (ТВ)

- Ключевым реагентом при проведении теста является реагент **тромбин**, который должен:
 - 1. быть выделен в максимально очищенном виде,
 - 2. сохранять свою активность при выделении и лиофилизации.
- При проведении теста используют тромбин с активностью **3 МЕ/мл** и **6 МЕ/мл**.
- Для исследования плазмы, не содержащей гепарин, как правило, используют тромбин с активностью **3 МЕ/мл**.
- При работе с гепаринизированной плазмой необходимо использовать тромбин с активностью **6 МЕ/мл**.

ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ (ТВ)

Удлинение тромбинового времени может быть вызвано:

- молекулярными аномалиями и снижением уровня фибриногена (менее 1,0 г/л),
- избытком в крови гепарина в результате гепаринотерапии,
- проведением фибринолитической терапии,
- накоплением продуктов деградации фибрина/фибриногена,
- парапротеинемией,
- наследственной и приобретенной дисфибриногенемией,
- наличием в плазме ингибиторов тромбина и фибриногена.
- гипофибриногенемии, связанной с ДВС или наследственной или приобретенной патологией;
- повышенной концентрации продуктов деградации фибриногена/фибрина;
- присутствии в крови гепарина;
- наличии в крови ингибиторов тромбина или фибриногена;
- дисфибриногенемии, связанной с заболеванием печени или при наследственной патологии.

ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ (ТВ)

- **Укорочение тромбинового времени свидетельствует о риске тромбозов.**
- *Нормальные значения тромбинового времени:*
- - тромбин с активностью 6 МЕ/мл - **9-12 сек,**
- - тромбин с активностью 3 МЕ/мл - **14-18 сек.**

ФИБРИНОГЕН

- Белок плазмы крови, который синтезируется в печени.
- Содержание фибриногена не зависит от пола и возраста.
- Фибриноген является белком острой фазы воспаления
- Референтные значения 2-4 г/л

ФИБРИНОГЕН

Методы определения:

1. Клоттинговый метод по Клаусу- наиболее распространенный
2. Определение фибриногена по Р.А. Рутберг-метод ручной(взвешивании высушенного фибринового сгустка:1 мл плазмы+тромбопластин-кальциевой смеси или тромбина), менее чувствительный и воспроизводимый, чем п.1. Но более чувствительный при гипо- и дисфибриногенемии
3. Другие методы (турбидиметрический, фотохимический, иммунохимические) –определяют концентрацию фибриногена

ФИБРИНОГЕН

- **Количественный анализ фибриногена по методу Клаусса** проводится при **гиперфибриногенемиях**, связанных с тяжестью воспалительных, иммунных, деструктивных процессов, с риском развития гипервискозного синдрома, артериальных тромбозов и инфарктов органов.
- **Снижение концентрации фибриногена** наблюдается при остром ДВС-синдроме, при лечении фибринолитиками, при врожденных гипо- и дисфибриногенемиях.

ФИБРИНОГЕН

метод Клауса

- **Принцип метода** основан на особенностях кинетики реакции фибриноген-тромбин, когда исследуемую плазму крови разбавляют в 10 раз с целью снижения влияния ингибиторов тромбина (антитромбина III и др.). В условиях высоких концентраций тромбина и низких концентраций фибриногена время образования сгустка **зависит только от количества фибриногена.**
- *Метод Клаусса очень прост в исполнении, определяет только активный фибриноген, метод точен и стандартен, широко применяется за рубежом.*
- **Единственный недостаток метода** - невозможность работы ручным методом, т.к. образуемый сгусток плохо различим визуально.

ДИСФИБРИНОГЕНЕМИЯ

признаки

- **Увеличение тромбинового и рептилазного времени**
- **Расхождение результатов при измерении уровня фибриногена функциональным тестом (по Клаусу, низкое) и концентрационным (более высокое или нормальное)**

Дополнительные тесты

Оценка системы фибринолиза

- Оценка фибринолитической активности крови(ФАК)-функциональный тест (клоттинговый).
- **Преимущества**- простота исполнения и отсутствие специального оборудования
- **Недостаток**- невозможность автоматизации.

Две модификации:

- 1.Спонтанный эуглобулиновый фибринолиз
- 2.XIIa-зависимый фибринолиз(Хагеман-зависимый фибринолиз)

Оценка системы фибринолиза

Признаки	Спонтанный эуглобулиновый фибринолиз	Хагеман-зависимый фибринолиз
Сходство	Осаждение белков плазмы крови (эуглобулиновой фракции, содержащей плазминоген, фибриноген, факторы свертывания и не содержащую ингибиторов фибринолиза) слабой уксусной кислотой. Растворение осажденных белков в буферном растворе Добавление кальция хлорид и образование фибринового сгустка.	
Отличие	Время лизиса отражает ФАК.	Активация фактора XII (внутреннего механизма свертывания) путем добавления каолина , что приводит к сокращению времени свертывания
Референтные значения	2-4 часа	5-12 мин
Применение	Предпочтительно при состояниях с гиперфибринолизом	СКРИНИНГОВЫЕ исследования

Оценка системы фибринолиза

Активация фибринолиза (гипокоагуляция) наблюдается при:

1. Уменьшении концентрации фибриногена, гипо- и дисфибриногенемиях,
2. Снижении уровня ингибиторов плазминогена
3. Панкреатитах и панкреонекрозах
4. Операциях на органах внутренней секреции и легких
5. При осложнениях в акушерской практике,
6. При фебрильных состояниях,
7. ДВС-синдроме
8. Метастазирующих опухолях
9. Лечение фибринолитиками и активаторами плазминогена

Оценка системы фибринолиза

- **Ингибирование фибринолиза (удлинение лизиса сгустка, гиперкоагуляция) наблюдается при:**
 1. **Гиперфибриногенемии,**
 2. **Врожденном дефиците плазминогена или его аномалиях**
 3. **При повышенном потреблении или снижении синтеза плазминогена и его активаторов (тромбозы, васкулиты, сепсис, заболевания печени, ДВС- синдром)**
 4. **Беременности**

Предлагаемые тесты для скрининга системы гемостаза

СОГЛАСНО рекомендациям Всероссийской ассоциации по изучению тромбозов, геморрагий и патологии сосудов им. А.В. Шмидта –Б.А. Кудряшова и Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики по лабораторным методам исследования системы гемостаза.

1. количество тромбоцитов;
2. время кровотечения;
3. протромбиновый тест;
4. активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время (АЧТВ);
5. фибриноген, определенный по методу Клаусса;
6. D-димер;
7. орто-фенантролиновый тест (растворимые фибрин-мономерные комплексы, РФМК). Тест имеет ряд недостатков, но в силу доступности и широкой распространенности может быть сохранен в рекомендациях;
8. лизис эуглобулинов (есть недостатки, однако, других тестов для выявления гиперфибринолиза в настоящее время нет);
9. время свертывания крови (этот тест не рекомендуется вышеуказанными Рекомендациями Ассоциаций, однако, учитывая быстроту и простоту его выполнения, может быть использован в клинической практике).

Алгоритм диагностики нарушений гемостатических функций

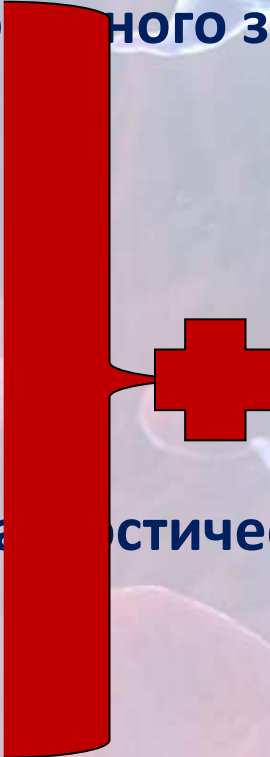
согласно рекомендациям Всероссийской ассоциации по изучению тромбозов, геморрагий и патологии сосудов им. А.В. Шмидта –Б.А. Кудряшова и Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики по лабораторным методам исследования системы гемостаза.

• I уровень – лаборатории первичного звена:

- количество тромбоцитов,
- время кровотечения,
- АЧТВ (АПТВ),
- протромбиновый тест,
- фибриноген по Клауссу,
- время свертывания крови

• II уровень – лаборатории диагностических стационаров

- агрегация тромбоцитов,
- тромбиновое время,
- Д-димер (или РФМК),
- лизис эуглобулиновых фракций (Хагеман-зависимый фибринолиз)



**Контроль
анти тромботической
терапии:
Нефракционированный
гепарин — АЧТВ.
Антагонисты витамина К —
МНО.**

Алгоритм диагностики нарушений гемостатических функций

- Специализированные лаборатории
- **Дополнительные тесты:**
- **При кровоточивости**
 - Фактор фон Виллебранда — активность
 - Факторы свертывания — активность
- **При тромбозах**
 - Антитромбин,
 - протеины С и S,
 - аРС-резистентность
 - Генетический анализ — фактор VIII, мутация протромбина G20210A,
 - гомоцистеин,
 - волчаночный антикоагулянт *(в соответствии с рекомендациями ISTH Международного общества по тромбозам и гемостазу)*
 - антифосфолипидные антитела.

Экспресс исследования при экстренных ситуациях

- количество тромбоцитов,
- время кровотечения,
- АЧТВ,
- протромбиновое время (активность или индекс),
- фибриноген,
- Д-димеры

Коагулограмма скрининговая

- выполняется в случае предполагаемых **приобретенных нарушений свертывающей системы**, в основном в коагуляционном гемостазе, при заболеваниях печени, почек, в акушерской практике **без подозрения на развитие острого синдрома ДВС**:
- количество тромбоцитов,
- АЧТВ,
- протромбиновое время (активность или индекс),
- тромбиновое время,
- фибриноген,
- растворимые фибрин-мономерные комплексы(РФМК)

Коагулограмма развернутая

- выполняется при наблюдении за больным с выраженными расстройствами системы гемостаза, при предполагаемом развитии синдрома ДВС после массивных кровопотерь и гемотрансфузий, при всех видах шока, у гематологических больных :
- количество тромбоцитов,
- АЧТВ,
- протромбиновое время (активность или индекс),
- тромбиновое время,
- фибриноген,
- растворимые фибрин-мономерные комплексы(РФМК)
- антитромбин III,
- Д-димер,
- мазок периферической крови.

Скрининговые тесты при кровоточивости

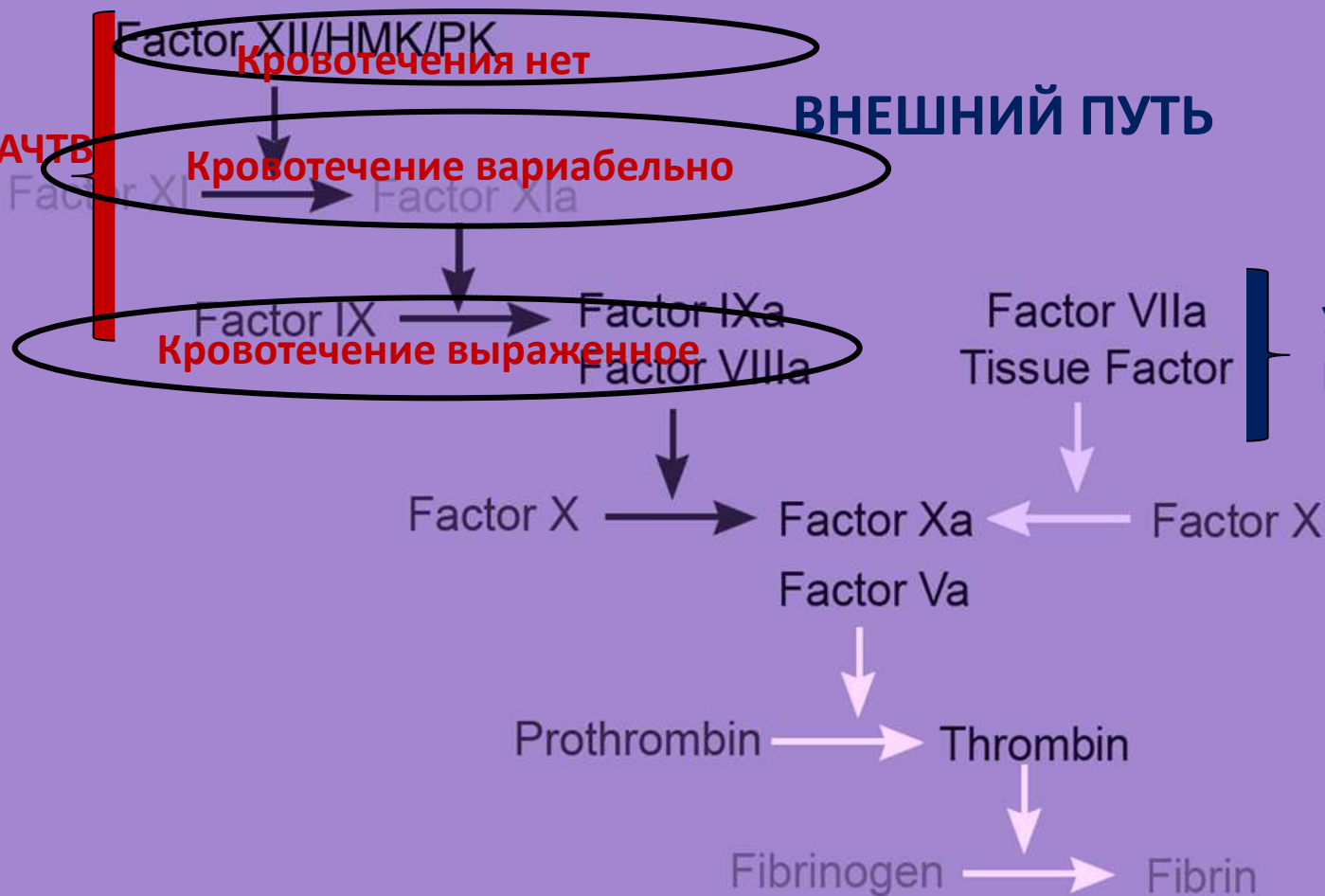
- выполняются *при первичной постановке диагноза у больного с геморрагическим синдромом неясного генеза*, в основном для диагностики врожденных коагулопатий:
 - количество тромбоцитов,
 - мазок периферической крови,
 - Время кровотечения,
 - АЧТВ,
 - протромбиновое время (активность или индекс),
 - антитромбин III,
 - фибриноген,
 - РФМК,
 - Д-димер.

Клинико-лабораторные признаки дефицита факторов свертывания

ВНУТРЕННИЙ ПУТЬ

ВНЕШНИЙ ПУТЬ

Удлинение АЧТВ



Дополнительные тесты при кровоточивости

- выполняются *для установки окончательного диагноза у больного с геморрагическим синдромом неясного генеза:*
 - Рептилазное время,
 - Фактор Виллебранда — активность, антиген к фактору Виллебранда,
 - Функциональная и индуцированная активность тромбоцитов,
 - Активность факторов (VIII, IX)

Скрининговые тесты при повышенном тромбообразовании

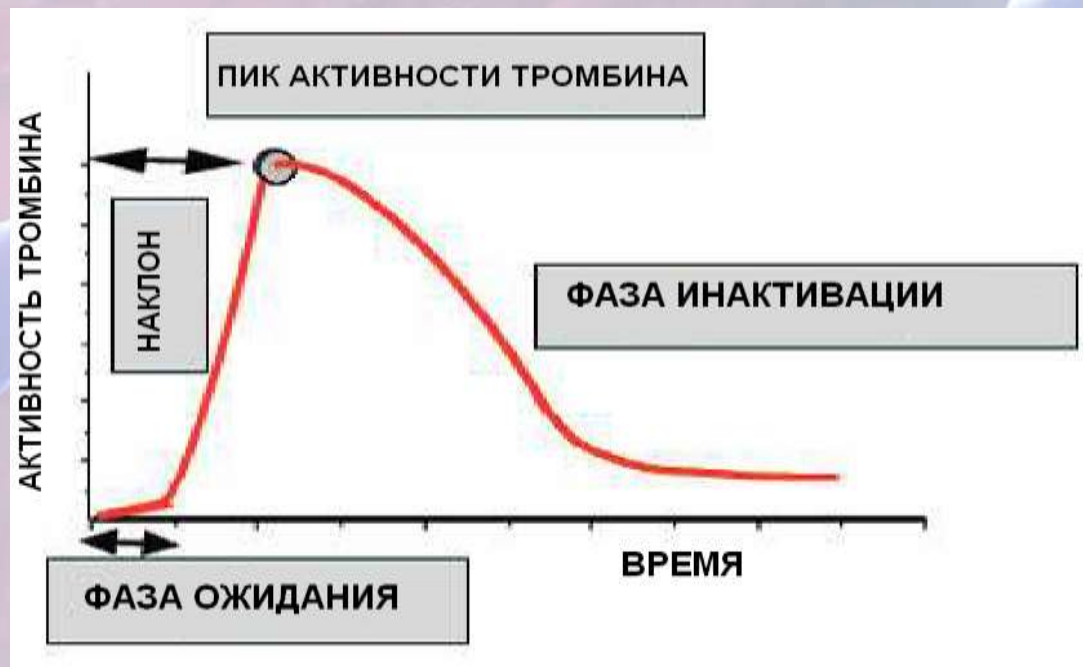
- выполняются при венозном тромбозе любой локализации :
 - количество тромбоцитов,
 - АЧТВ,
 - протромбиновое время (активность или индекс),
 - фибриноген,
 - РФМК,
 - Д-димер,
 - скрининговый тест на волчаночный антикоагулянт

Дополнительные тесты при повышенном тромбообразовании

- при повторных тромбозах или семейных тромбозах, тромбоэмболиях, возникающих в молодом возрасте, клиническом подозрении на тромбофилию :
- морфофункциональная оценка активации тромбоцитов,
- Антикоагулянты (антитромбин III, протеин С),
- волчаночный антикоагулянт (коррекционный и подтверждающий тест),
- аФЛ-антитела,
- аРС-резистентность,
- гомоцистеин,
- молекулярно-генетическое исследование
- Комплекс Т-АТ, F₁₊₂, ФМ, ФП А
- Тест генерации тромбина (TGA)
- Тесты повреждения эндотелия (tPA, PAI, vWF)
- Активационная тромбоэластометрия

«Кинетика образования эндогенного тромбина» (TGA-анализ) – современный скрининг системы свертывания

- Активность тромбина определяется по интенсивности флуоресценции продукта деградации синтетического субстрата, расщепляемого тромбином



TGA-анализ – универсальный метод оценки тромбогенного потенциала гемостаза

- ✓ **Диагностика тромбофилий**
- ✓ **Диагностика гемофилий**
- ✓ **Мониторинг противогемофилийной терапии для пациентов с наличием ингибитора фактора VIII**
- ✓ **Мониторинг антикоагулянтной терапии, направленной на ингибирование тромбина и фактора Ха (гепарин)**

SEVERON-ALPHA – универсальный автоматический анализатор открытого типа

SEVERON-ALPHA TGA

для 4 методов анализа:

коагулометрия

*АЧТВ, ПВ, ТВ, Фибриноген,
Протеин С, ВА, дефицит
факторов свертывания,
мутация Лейдена и другие.*

фотометрия

*С1-ингибитор, FVIII, Протеин С,
АТ-III и другие.*

турбидиметрия

*Д-димер, ВА, С-реактивный белок
и другие.*

флуориметрия

*кинетика образования
эндогенного тромбина (для
модификации Severon TGA)*



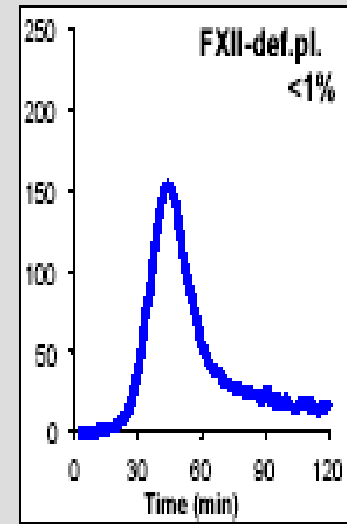
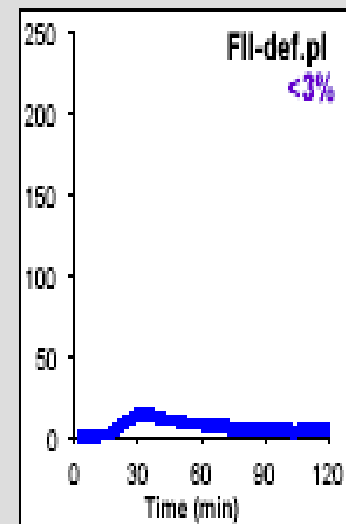
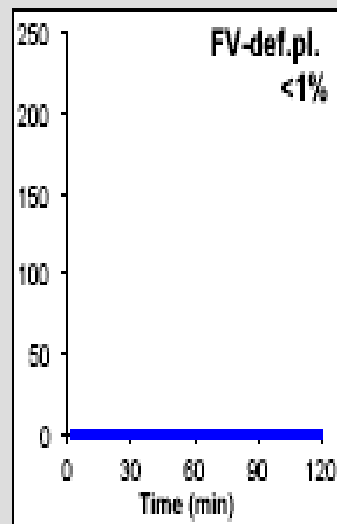
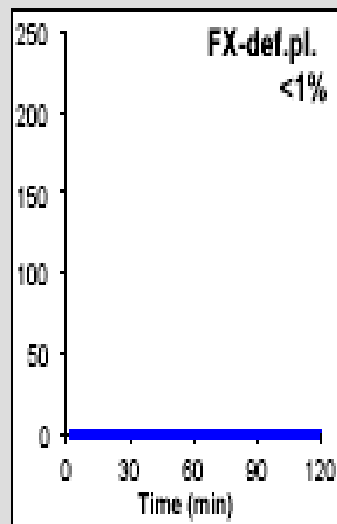
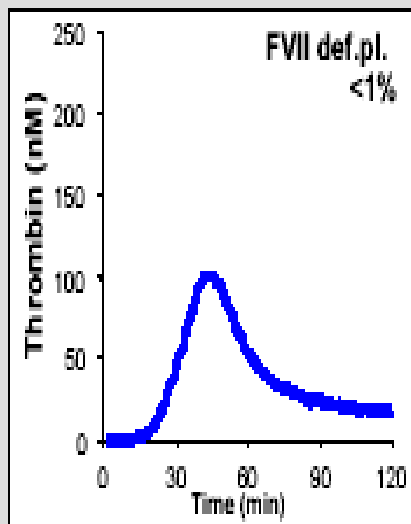
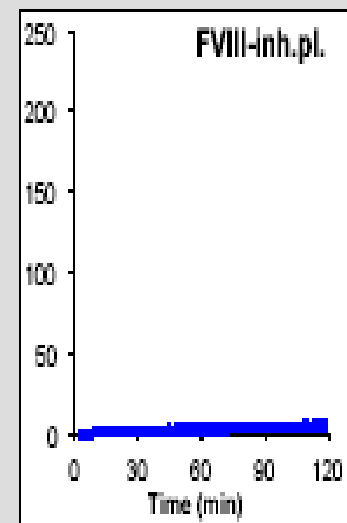
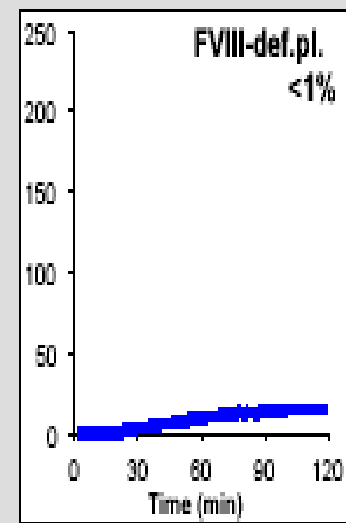
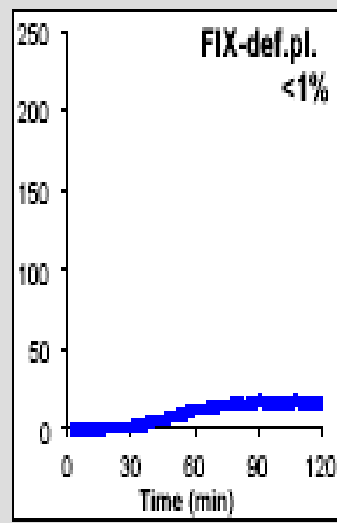
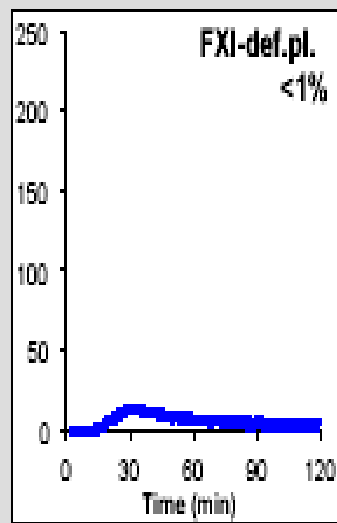
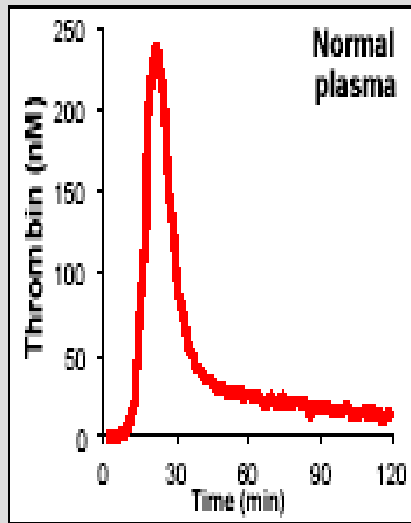
Длины волн фотометрического блока:

405, 570, 630 и 740 нм

Скорость проведения анализов на SEVERON-ALPHA
до 70 образцов/час (ПВ)

(Стационар на 300-400 больных)

Активность тромбина в плазме крови с дефицитом различных факторов свертывания



Контроль антитромботической терапии

Терапия	Тесты
Дезагрегантная терапия	<ul style="list-style-type: none">• морфофункциональная оценка активации тромбоцитов.• Аспирин- возможно определение 11-гидрокситромбоксана В2 в моче
Антикоагулянты непрямого действия	<ul style="list-style-type: none">• МНО,• АЧТВ(периодически).
Нефракционированный гепарин	<ul style="list-style-type: none">• АЧТВ,• тромбоциты,• общий анализ мочи
Низкомолекулярный гепарин	<ul style="list-style-type: none">• тромбоциты,• общий анализ мочи,• маркеры тромбинемии (Д-димер, РФМК)
Тромболитики	<ul style="list-style-type: none">• скрининговые тесты,• рептилазное время,• Д-димер

Подготовка к оперативным вмешательствам

Характер оперативного вмешательства	Тесты
Операции на ЛОР-органах, в офтальмологии, челюстно-лицевой хирургии	<ul style="list-style-type: none">•Количество тромбоцитов,•время кровотечения,•протромбиновое время (по показаниям, при общем обезболивании)
Общехирургические операции и операции без значительной кровопотери	<ul style="list-style-type: none">•Количество тромбоцитов,•АЧТВ,•протромбиновое время,•фибриноген.
Кардиохирургические операции, травматичные операции на органах брюшной полости, легких и операции с предполагаемой значительной кровопотерей	коагулограмма скрининговая