



Методы исследования системы гемостаза

План лекции

- Методы оценки системы гемостаза
- Тесты, характеризующие:
 - Тромбоцитарную функцию
 - Активность факторов коагуляции
 - Потребление протромбина
 - Фибринолиз
 - Действие гепарина
- Определение продуктов паракоагуляции, D-димеров
- Определение спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов

Преналитический этап

- Капиллярная кровь как диагностический материал имеет ограниченное значение.
- Для избежания неверных результатов капиллярная кровь может использоваться только для некоторых специально адаптированных методов:
 - подсчет тромбоцитов,
 - определение времени кровотечения,
 - определение протромбинового (ПВ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ).
- Определение АЧТВ в капиллярной крови используется исключительно для мониторинга гепаринотерапии.
- Определение ПВ в капиллярной крови используется в основном для контроля за приемом не прямых антикоагулянтов в амбулаторных и домашних условиях

Забор капиллярной крови

- Чистое и сухое место кончика пальца или ушной мочки пунктируется стерильным скарификатором.
- Прокол должен быть достаточно глубоким, чтобы кровь текла самотеком.
- Не допускается давление или сжатие.
- Для исследования используются первые капли крови, берется 10-50 мкл в стерильный капилляр, который держится горизонтально, один конец касается места прокола.
- В капилляре кровь с цитратом не перемешивается, предварительный забор антикоагулянта только усложняет процедуру.
- Капиллярная кровь при взятии в пробирку с цитратом должна быть перемешана во время или сразу после взятия.
- Не допускается, чтобы кровь стекала на дно по стенке пробирки, она должна прямо скапывать в цитрат, перемешиваясь с ним

Венозная кровь

- Это основной источник материала для анализа состояния гемостаза
- Забор крови - критическая процедура для тестов на коагулограмму
- Взятие крови должно быть приурочено ко времени исследования, чтобы свести до минимума время хранения проб
- Рекомендуется брать кровь на исследование утром от 7 до 9 часов
- Необязательно брать кровь строго натощак, можно рекомендовать пациенту легкий завтрак, но без жирной пищи.
- Исследование рекомендуется проводить у пациентов, отдохнувших не менее 15 мин после незначительной физической нагрузки.

Забор венозной крови

- Кровь берут из локтевой вены утром натощак силиконизированной иглой с широким просветом (внутренний диаметр 1,0 - 0,8 - 0,6 мм) без шприца (самотеком).
- Использование шприца нежелательно.
- Если кровь брать слишком быстро, то из-за турбулентного движения крови в шприце и смешивании ее с воздухом (вспенивание) происходит активация тромбоцитов и факторов свертывания крови.
- Если кровь брать медленно, то в шприце может начаться необратимое свертывание, опять же с активацией факторов гемостаза.
- Лучше использовать вторую пробирку из за попадания тромбопластина в первую пробирку (первая – ОАК, вторая - коагулограмма)

Забор венозной крови из подключичного катетера

- **Если гепарин не вводился:**
 - Желательно удалить до 10 мл крови (использовать ее на проведение гематологических или биохимических исследований), а затем забрать кровь на коагулологические исследования.
- **Если гепарин вводился:**
 - Удаляют до 20 мл крови, а затем берут кровь на исследование гемостаза.
 - Приоритет должны получать гепарин-независимые тесты (ПВ, рептилазное время, фибриноген, фибрин-мономеры, антитромбин), так как сохраняется высокая вероятность влияния следов гепарина на такие тесты, как АЧТВ, тромбиновое время.

Хранение крови и транспортировка

- Согласно международным рекомендациям срок доставки проб в лабораторию (ARUP Laboratories, 2002) для исследования показателей гемостаза **не должен превышать 45 минут** после взятия крови у пациента
- Транспортировка крови на большие расстояния и ее частое встряхивание искажают результаты исследования.
- Кровь нельзя хранить во льду, так как это может привести к холодовой активации фактора XII и вызвать значительные изменения функции тромбоцитов.

Положение тела, физическая нагрузка, эмоциональный стресс

- У здоровых людей через 8 ч лежания в постели концентрация фибриногена и активность антитромбина в крови примерно на 20% ниже, чем после 1 ч в положении стоя (кровь нужно забирать в одном положении)
- После серии приседаний содержание в плазме ФВ увеличивается до 50%, у спортсменов после бега на 10 км содержание ф.VIII повышается на 60%, ФВ - примерно в 3 раза, что приводит к укорочению АЧТВ.
- Активация фибринолиза после физической нагрузки связана с повышением в плазме тканевого активатора плазминогена (t-РА). Аналогичные изменения наблюдаются у пациентов, перенесших эмоциональный стресс.

Время кровотечения

- Время от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови.
- Характеризует функциональную активность тромбоцитов и взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой.
- Не выявляет всех тромбоцитарных нарушений
- Скрининговый тест позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного генеза, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки
- Наиболее доступный метод для выявления нарушений взаимодействия тромбоцитов с сосудистой стенкой
- Метод плохо стандартизуется
- Результаты теста позволяют лишь предположить наличие тех или иных нарушений
- Обладает низкой чувствительностью

Тромбоциты крови

- * Тромбоциты распознаются по размерам в диапазоне 2-20 фл
- * Ложное занижение числа тромбоцитов может быть при их агрегации, агглютинации под действием тромбоцитарных агглютининов и при прилипании тромбоцитов к лейкоцитам
- * При наличии аутоантител к тромбоцитам калиевая соль ЭДТА инициирует агрегацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией.

Тромбоэластография

- * Один из первых методов комплексной оценки гемостаза.
- * Тромбоэластография была предложена еще в 1948 г. Гартертом (Hartert)
- * До настоящего времени остается единственным методом, который качественно и полуколичественно позволяет охарактеризовать процесс образования сгустка, его механические характеристики, плотность, стабильность и процесс фибринолиза.
- * В настоящее время метод усовершенствован, он позволяет количественно оценить перечисленные параметры

Коагуляционные методы

- * Основаны на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания плазмы, до момента образования сгустка (выпадения фибрина).
- * Наиболее распространенный методический подход для оценки плазменного гемостаза в КДЛ.
- * Необходимо подчеркнуть, что коагуляционные методы являются скрининговыми, тем не менее на их основе сконструирован ряд методов для оценки активности факторов плазмы.

Ручные методы

- * Проводятся на водяной бане
- * Несмотря на термостатирование частое вынимание пробирки во время исследования для наблюдения за появляющимся сгустком является причиной того, что температура реакции не соответствует температуре водяной бани.
- * При визуальной оценке времени появления сгустка даже опытному лаборанту невозможно точно установить момент появления сгустка, что является главной причиной плохой повторяемости результатов.
- * Используется, когда отсутствуют или плохо работают (неплотный сгусток, не регистрируемый коагулометром) автоматические методы

Автоматизированные коагулометры

* В основе регистрации момента выпадения сгустка в коагулометрах используются несколько принципов:

- * механический
- * турбидиметрический
- * оптико-механический

Скрининговые тесты

- * Из-за дороговизны лабораторной оценки нарушений в системе гемостаза принято соблюдать этапность.
- * В качестве тестов «первой линии» используют несколько видов исследований (коагулограмма):
 - * Время кровотечения.
 - * Количество тромбоцитов.
 - * АЧТВ.
 - * Протромбиновое время (по Квику).
 - * Тромбиновое время и/или фибриноген
- * У пациентов с тромбофилическими состояниями скрининг не разработан

АЧТВ. Методика.

Набор реактивов для АЧТВ содержит активатор контактной фазы и фосфолипиды.

- * CaCl_2 добавляется в пробу отдельно как стартовый реактив.
- * Контактный активатор - это высокодисперсионная суспензия отрицательно заряженных частиц каолина (белая глина) или эллаговая кислота, полифенол или сульфатиды (отрицательно заряженные сульфатированные липиды) в смеси с каолином.
- * Вид и концентрация фосфолипидов - более важный компонент для характеристики набора АЧТВ, чем компоненты контактной фазы активации
- * Фосфолипиды используют или синтетические, или выделенные из тканей животных (мозг кролика) или из сои.
- * Лучшие результаты достигаются при использовании смеси разных фосфолипидов, включая отрицательно заряженный фосфатидилсерин.

АЧТВ. Диагностическое значение

- * **Укорочение АЧТВ** иногда определяется у больных с тромбофилией, но чаще объясняется нарушениями работы с кровью на преаналитическом этапе.
- * **Удлинение АЧТВ** наблюдается при:
 - * врожденном или приобретенном дефиците факторов II, V, VIII, IX, X, XI, XII, прекалликреина, ВМК;
 - * снижении активности ф-VIII на фоне болезни Виллебранда;
 - * лечении гепарином, гирудином или апротинином (ингибитор контактной фазы коагуляции);
 - * присутствии в крови ПДФ, волчаночного антикоагулянта;
 - * нарушении функции печени;
 - * коагулопатии потребления (ДВС-синдром);
 - * тяжелой дисфибриногенемии или афибриногенемии.

Протромбиновое время (ПВ)

- * Широко используемый скрининговый тест для оценки внешнего каскада свертывания плазмы.
- * ПВ обычно используется для определения активности ф.VII, контроля за лечением непрямыми антикоагулянтами, при скрининге системы гемостаза, редко для количественного определения фибриногена (в автоматических коагулометрах, имеющих специальную программу)

Протромбиновое время. Представление результатов.

- * Время свертывания в секундах;
- * Протромбиновый индекс (ПИ), который определяется как

$$ПИ = \frac{\text{время свертывания нормальной плазмы}}{\text{время свертывания плазмы больного}} \times 100\%;$$

- * Протромбиновое отношение (ПО), которое определяется как

$$ПО = \frac{\text{время свертывания плазмы больного}}{\text{время свертывания нормальной плазмы}};$$

- * ПТ по Квику - % от нормы, которая определяется по калибровочному графику;
- * Международное нормализованное отношение (МНО), которое представляет собой ПО, возведенное в степень Международного индекса чувствительности (МИЧ):
 - * Полужирным отмечены стандартизированные взаимодополняющие методы

МНО. Контроль за лечением непрямыми антикоагулянтами

- * Эффект непрямых антикоагулянтов в большей степени сказывается на внешнем каскаде, и соответственно больше меняется ПВ, чем АЧТВ.
- * МНО позволяет оценивать степень гипокоагуляции независимо от используемого тромбопластина, сравнивать результаты, полученные разными лабораториями.
- * Для контроля за терапией непрямыми антикоагулянтами рекомендуется использовать тромбопластины со значениями МИЧ ниже 2 (лучше 1,0-1,2).

Ограничения использования МНО

- * МНО не может использоваться на начальном этапе лечения непрямыми антикоагулянтами, так как существующие различия между разными тромбопластинами вносят слишком большие флуктуации на этом этапе, которые не могут быть компенсированы производителями реагентов.
- * МНО не используется для контроля и мониторинга состояния внешнего каскада активации протромбиназы в общей популяции пациентов, не принимающих не прямых антикоагулянтов. В этом случае нужно использовать протромбиновый тест (ПТ), различия в определении которого сохраняются между разными лабораториями

Тромбиновое время (ТВ)

- * Скрининговый тест на полимеризацию фибриногена/фибрина и на антикоагулянтную активность в плазме
- * ТВ регистрируется по свертыванию плазмы при добавлении к ней низкой или средней концентрации тромбина.
- * ТВ определяется в основном количеством и качеством фибриногена и присутствием антикоагулянтов в плазме
- * Если в плазме присутствует гепарин, то комплекс гепарин-анти-тромбин быстро нейтрализует добавленный тромбин и ТВ будет удлиняться.
- * ТВ - наиболее чувствительный тест на присутствие гепарина, но не пригоден для мониторинга терапии гепарином.
- * Непрямые антикоагулянты не влияют на ТВ
- * Увеличение ТВ происходит также в присутствии относительно высокой ПДФ (при назначении тромболитической терапии), при ДВС-синдроме, заболеваниях печени и при дисфибриногенемиях.



Вопросы?