

*Принципы лабораторной диагностики
нарушений свертывающей системы
крови у детей*

С.А.Румянцев

ФГУ ФНКЦ ДГОИ Минздравсоцразвития России

Дифференциальная диагностика нарушений свертывания крови

Кафедра онкологии и гематологии ПФ РНИМУ им Н.И.Пирогова

Электив «Значение исследований крови в клинической практике»

д.м.н., профессор С.А.Румянцев

Влияние различных факторов преаналитического этапа на результаты коагулологических исследований

Кровь рекомендуется брать:

- «бабочкообразной» иглой в градуированную силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку, содержащую антикоагулянт;
- в градуированный пластиковый шприц, содержащий антикоагулянт;
- в моноветт - коммерческая аспирационная система (градуированный шприц), содержащая антикоагулянт;
- в вакутейнер - коммерческая система (пробирка с определенным отрицательным давлением для взятия точного объема крови), содержащая антикоагулянт ;
- в специальные пробирки для транспортировки крови для исследования гемостаза. Например, пробирка СТАД содержит цитрат натрия (0,105 M), теофиллин, аденозин и дипиридамо́л. Три последних вещества предотвращают активацию тромбоцитов.

Влияние различных факторов преаналитического этапа на результаты коагулологических исследований

- Кровь в пробирке необходимо тщательно перемешать, перевертывая пробирку, при этом не допускается образования пены. Нельзя трясти пробу, так как это может вызвать денатурацию белков и активацию тромбоцитов.
- Сразу же после взятия крови происходит изменение активности компонентов системы свертывания и фибринолиза. В пробе, не закрытой пробкой, возрастает рН из-за потери CO_2 . Следствием этого является увеличение времени свертывания. На стабильность рН пробы влияет буферная система эритроцитов, а также использование буферных растворов цитрата. В пробе крови, хранящейся при комнатной температуре и закрытой пробкой, не происходит заметных изменений в результатах ПВ и АЧТВ. Эффект физиологического забуферивания за счет эритроцитов исчезает в открытой пробирке при попадании в нее атмосферного воздуха.
- 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. Стабилизированную кровь до центрифугирования (в том числе и в процессе транспортировки) хранят при комнатной температуре (+18... +25 °С). 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 (процесс запускается через контактную фазу и развивается достаточно часто) и вызвать значительные изменения функции тромбоцитов.

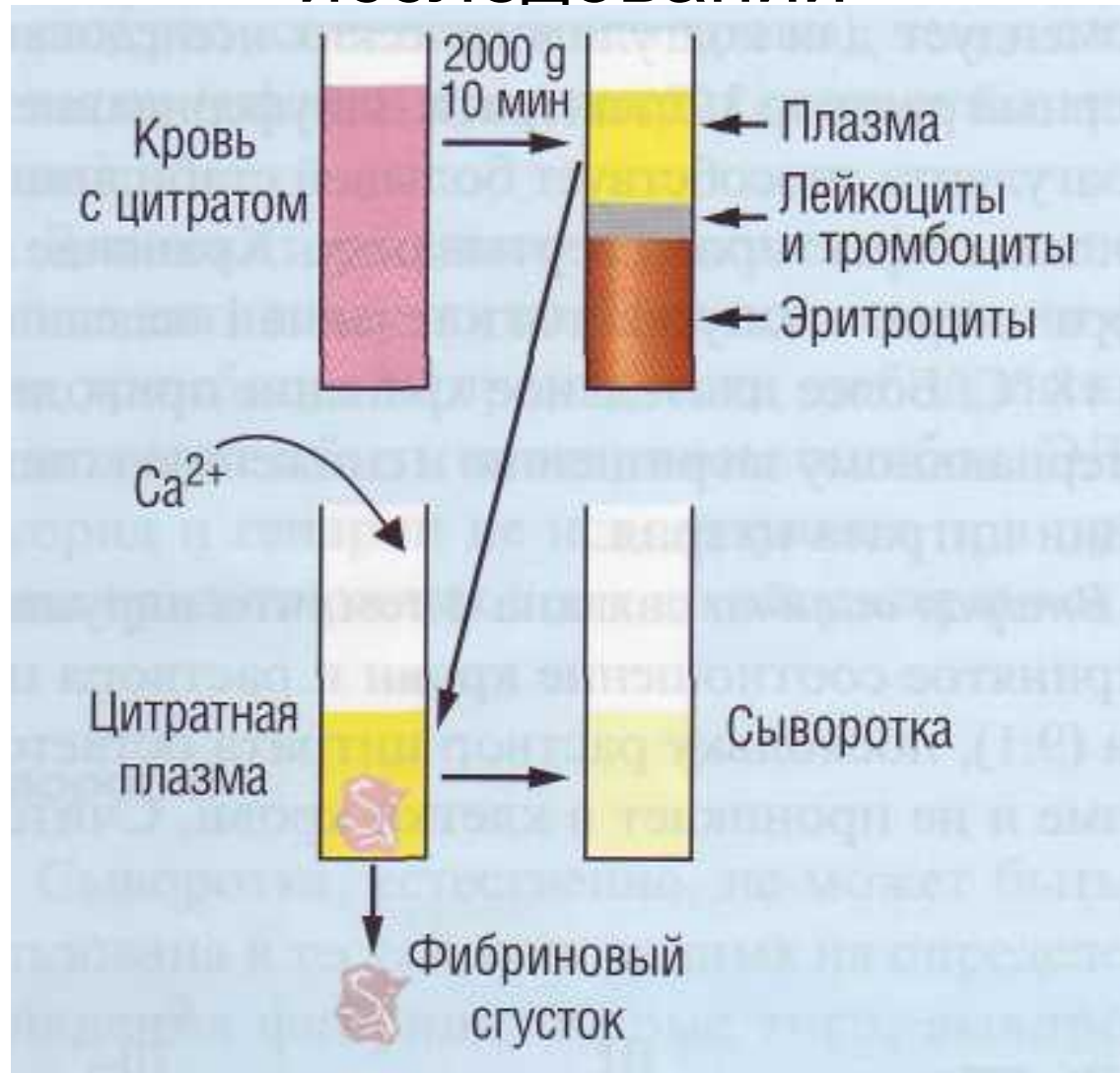
Проверка исследуемых образцов перед выполнением тестов

- Проверка образцов крови или плазмы перед проведением коагуляционных тестов позволяет избежать многих ошибок, связанных с преаналитическими погрешностями.
- *Неправильное соотношение кровь/цитрат* можно определить, если объем крови в пробирке меньше или больше, чем требуемый. При малом объеме крови будет зарегистрировано ложное удлинение коагуляционных тестов.
- *Пробы с видимыми сгустками фибрина*. В зависимости от степени свертывания коагуляционные тесты могут быть укорочены, нормальны или удлинены.
- *Гемолиз* может произойти при хранении неотцентрифугированной крови или после центрифугирования. В таких тестах результаты варьируют в зависимости от степени гемолиза. Если гемолиз присущ *in vivo*, что подтверждается взятием нового образца, то тесты могут выполняться для оценки гемостатической ситуации. Если гемолиз произошел после взятия крови, то такие образцы следует отбросить, чтобы не получить ложных результатов.

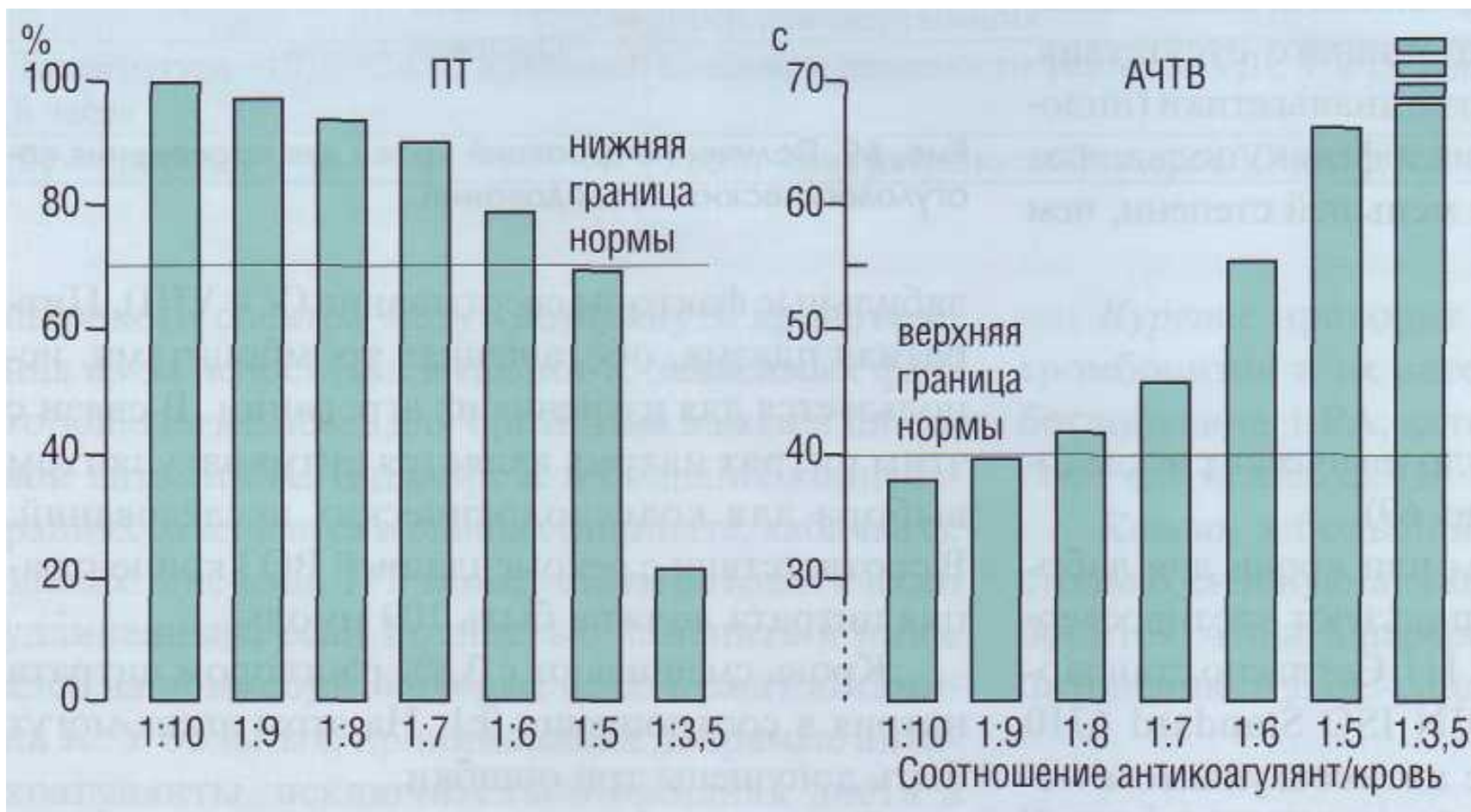
Влияние различных факторов преаналитического этапа на результаты коагулологических исследований

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

Получение фракций крови для проведения коагулологических исследований



Влияние разведения крови антикоагулянтом на протромбиновый тест (ПТ) и активированное частичное тромбопластино-вое время (АЧТВ), Разведение крови антикоагулянтом сопровождается удлинением ПВ (снижение ПТ) и АЧТВ, при разведении меньшем, чем 8:1, это приводит к регистрации ложноположительного результата





Взято недостаточное количество крови в антикоагулянт - типичная преаналитическая ошибка. Большое количество антикоагулянта по отношению к плазме может вызвать значительное изменение показателей коагулограммы

Соотношение объема плазмы и раствора цитрата при разном гематокрите.



Соотношение объема плазмы и раствора цитрата при разном гематокрите. При высоком гематокрите создаются условия избыточного количества антикоагулянта и слишком сильного разведения плазмы с получением результатов, соответствующих состоянию гипокоагуляции. Наоборот, при низком гематокрите есть высокая вероятность регистрации «ложной» гиперкоагуляции

Тромбоцитарные показатели

Число тромбоцитов (Platelets, PL, PLT)

- При подсчете на автоматических анализаторах тромбоциты распознаются по размерам в диапазоне 2-20 фл.
- Автоматические счетчики позволяют получать достаточно надежные результаты по количеству тромбоцитов.

Средний объем тромбоцита (MPV)

- У здоровых людей MPV равен 6-12 фл и находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов. Такое соотношение определяет постоянство тромбоцитарной массы в циркулирующей крови.
- MPV увеличивается с возрастом; отмечено, что у мужчин MPV несколько выше, чем у женщин.

Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (PDW)

- PDW - показатель, являющийся мерой гетерогенности размеров (анизоцитоза) тромбоцитов. Величина PDW в среднем составляет 10-15%.
- PDW может применяться для дифференциальной диагностики. Так, увеличение PDW свыше 10,5% было обнаружено у 50% больных эссенциальной тромбоцитемией, у 21% пациентов с реактивным тромбоцитозом и лишь у 14% здоровых людей.

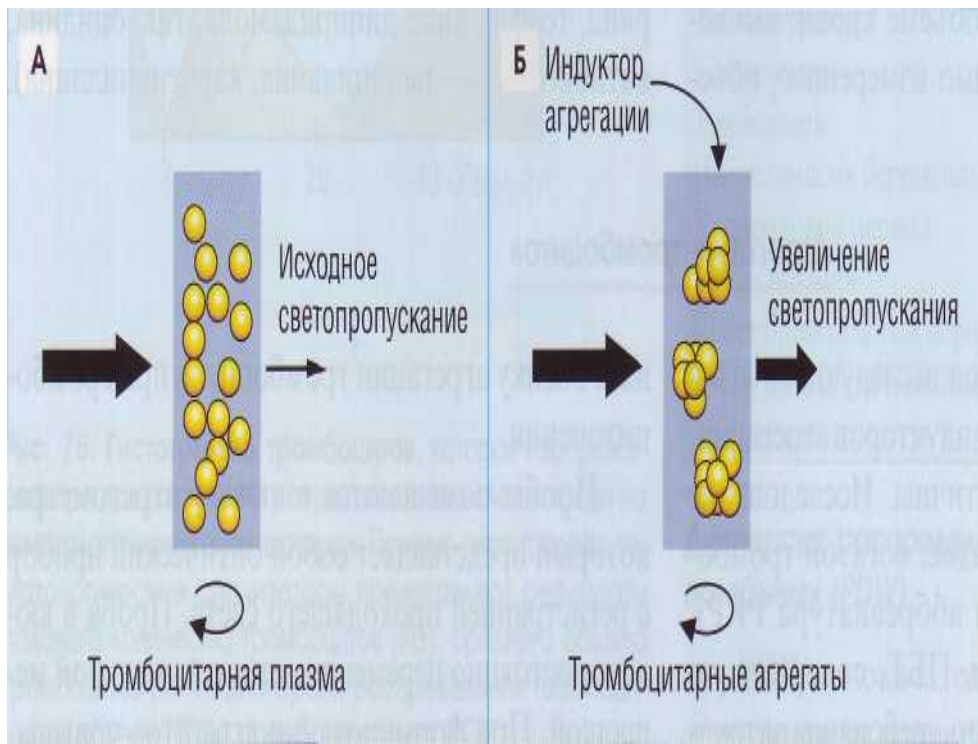
Время кровотечения

- Время кровотечения - это время от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови.
- Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов и взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой.
- Время кровотечения не выявляет всех тромбоцитарных нарушений, этот скрининговый тест позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного генеза, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки.

Тромбоцитарные показатели

Агрегация тромбоцитов

- Агрегацию тромбоцитов исследуют на агрегометре с использованием индукторов агрегации. Требования к пробам критичны. Исследование агрегации проводят на плазме, богатой тромбоцитами (ПБТ, английская аббревиатура PRP).



Принцип оценки индуцированной агрегации.

А - до агрегации; **Б** - агрегация. После добавления индуктора агрегации и формирования агрегатов тромбоцитов происходит просветление суспензии

Тромбоэластография

- Тромбоэластография (ТЭГ) - один из первых методов комплексной оценки гемостаза.

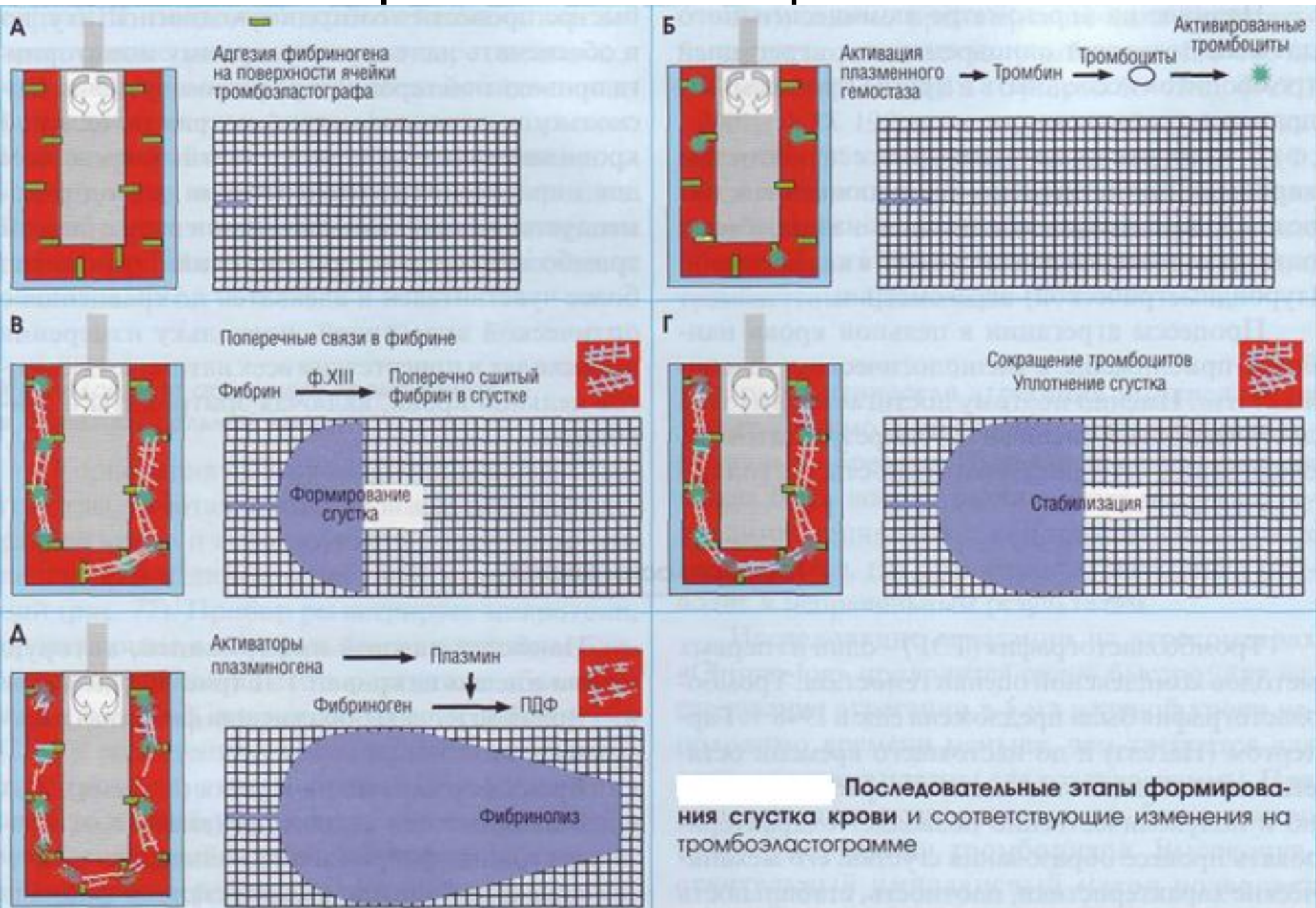
Принцип ТЭГ:

- исследуемый образец помещается между двумя поверхностями, на одну из которых подаются вращательно-колебательные движения, а другая соединена с устройством, принимающим и фиксирующим колебания.
- После добавления в образец активатора свертывания крови начинается образование сгустка.
- По мере полимеризации фибрина колебания с одной поверхности начинают передаваться на другую и регистрироваться.
- Получающаяся кривая зависимости амплитуды колебаний от времени характеризует процесс свертывания крови, а позже фибринолиза .

Наиболее важной информацией, которую можно извлечь из кривой ТЭГ, является:

- Время до начала образования фибрина (г-время).
- Время формирования сгустка (к-время).
- Максимальная амплитуда (зависит от концентрации фибриногена, количества и качества тромбоцитов, взаимодействия фибрина и тромбоцитов в сгустке).
- Время лизиса тромба.

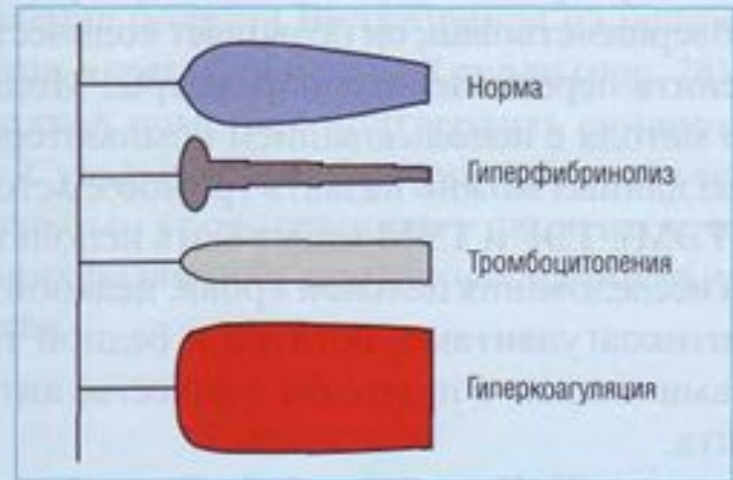
Тромбоэластограмма



Тромбоэластограмма



Тромбоэластограмма



Типичные примеры измененных ТЭГ



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

Методические основы лабораторной оценки плазменного гемостаза

- Коагуляционные, или клоттинговые, методы основаны на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания плазмы, до момента образования сгустка (выпадения фибрина).
- При постановке коагуляционных тестов необходимо перемешать плазму с реактивом до гомогенной суспензии и поддерживать стабильной температуру реакции.
- Коагуляционные тесты - в настоящее время наиболее распространенный методический подход для оценки плазменного гемостаза в клинико-диагностических лабораториях.

Автоматизированные коагулометры

- В основе регистрации момента выпадения сгустка в коагулометрах используются несколько принципов: механический, турбидиметрический, оптико-механический. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки, которые важно знать при интерпретации результатов исследований.

Ограничения коагуляционных методов:

- Ограниченное время регистрации. Тест должен быть проведен в течение примерно 10-200 с. Это возможно далеко не для всех анализов.
- Далеко не все компоненты гемостаза можно исследовать по времени образования сгустка. Компоненты системы фибринолиза, ингибиторы не оказывают прямого влияния на время свертывания, и их количественная оценка не поддается исследованию клоттинговым методом.
- Метод чувствителен к различным неспецифическим внешним воздействиям. Например, исследование активности ф.VIII клоттинговым методом невозможно у пациента, получающего терапию гепарином или непрямыми антикоагулянтами, хотя ни те ни другие не оказывают непосредственного влияния на этот фактор.
- Метод малочувствителен для определения повышенной активности компонентов системы свертывания крови.
- Для ряда тестов сложно создать устойчивые реактивы, удобные для применения

Преимущества и недостатки различных методов обнаружения сгустка

Методы	Преимущества	Недостатки
Механический	Принципиальная возможность работы на цельной крови, высокая толерантность к типу используемых реагентов и пробирок, низкая стоимость анализаторов	Низкая чувствительность - нет детекции слабых сгустков, необходимо применять мешалки в пробах
Оптико-механический	Точность больше, чем в механическом методе, перемешивание пробы во время снятия показаний	Чувствительность ниже нефелометрического метода, необходимо применять мешалки в пробах
Турбидиметрический	Чувствительность выше предыдущих методов, низкая стоимость анализаторов	Чувствительность ниже нефелометрического метода
Нефелометрический	Высокая чувствительность, высокая точность измерения	Высокая стоимость прибора

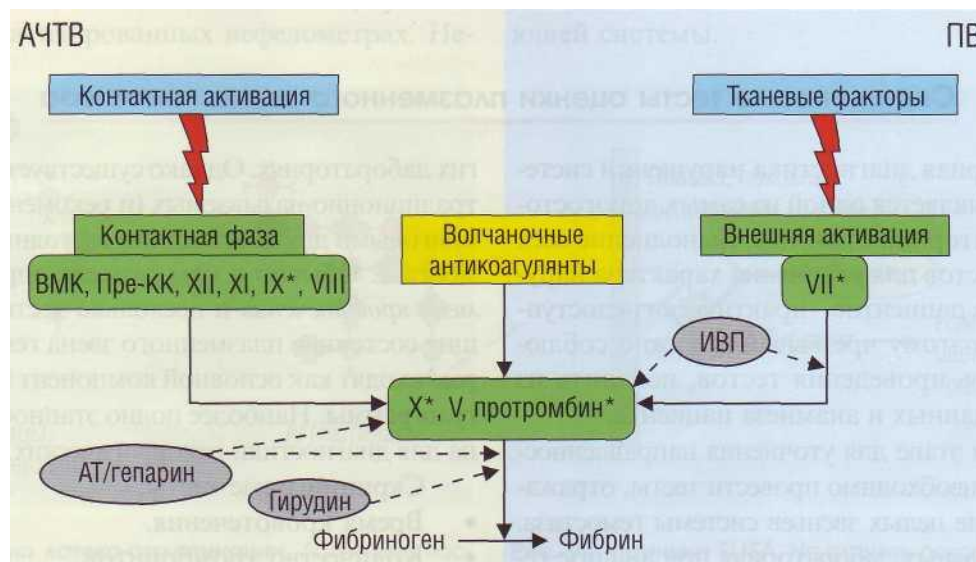
Скрининговые тесты оценки плазменного звена гемостаза

Скрининговые тесты:

- Время кровотечения.
- Количество тромбоцитов.
- АЧТВ.
- Протромбиновое время (по Квику).
- Тромбиновое время и/или фибриноген.

Факторы, влияющие на результаты скрининговых тестов АЧТВ и ПВ. Звездочкой зависимые факторы, на которые влияют антикоагулянты непрямого действия

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, или АПТВ)	Протромбиновое время (ПВ)
Оценка активности ВМК, прекалликреина, факторов XII, XI, IX, VIII, X, V, протромбина и, в некоторой степени, содержания фибриногена*	Оценка активности факторов VII, X, V, протромбина и, в некоторой степени, содержания фибриногена*
Контроль за лечением гепарином	Контроль за лечением непрямыми антикоагулянтами (антагонистами витамина К)
Определение волчаночного антикоагулянта	



Концентрация фибриногена начинает влиять на результаты тестов при снижении ее ниже определенного порога. Как правило, эти тесты не позволяют количественно определить фибриноген или заподозрить умеренное снижение его концентрации

Изменение АЧТВ и ПВ при патологии отдельных компонентов плазменного звена гемостаза

Дефицит фактора/терапия	ПВ	АЧТВ	Комментарий
Дефицит фактора XII, ВМК или ПК	Норма	Удлинено	При использовании некоторых реактивов АЧТВ не меняется
Дефицит факторов XI, VIII или IX	Норма	Удлинено	Степень удлинения АЧТВ зависит от реактивов
Дефицит факторов X, V или II	Удлинено	Удлинено	ПВ более чувствительно
Дефицит фактора VII	Удлинено	Норма	Подтип фактор VII Padova определяется только с тромбопластином из мозга кролика
Дефицит фибриногена, дисфибриногемия	Норма/удлинено	Норма/удлинено	Зависит от реагентов и использованного прибора, при фибриногене >1 г/л обычно норма
Гепарин в терапевтических концентрациях	Норма/удлинено (зависит от реактивов)	Удлинено/не определяется	Влияние гепарина на АЧТВ зависит от использованных реактивов
Низкомолекулярный гепарин	Норма/граничные изменения	Норма/удлинено	Изменения АЧТВ зависят от использованных реактивов
Лечение непрямыми антикоагулянтами	Удлинено	Тенденция к удлинению	АЧТВ менее чувствительный показатель, чем ПВ
Гирудин в терапевтических дозах	Удлинено	Удлинено	АЧТВ более чувствительный показатель, чем ПВ
ДВС-синдром	Удлинено/норма	Удлинено/норма	Зависит от тяжести и стадии ДВС
Волчаночный антикоагулянт	Норма/удлинение	Изменено/норма	При наличии волчаночного антикоагулянта ПВ, как правило, нормально. Удлинение АЧТВ зависит от реактивов
Тяжелая патология печени	Удлинено	Удлинено	Зависит от реактивов и приборов
Дефицит фактора XIII	Норма	Норма	Не влияет на АЧТВ и ПВ

Диагностическое значение АЧТВ

Укорочение АЧТВ иногда определяется у больных с тромбофилией. Это может быть связано с резистентностью фактора V к активному протеину C, повышенным уровнем фактора VIII или активированных факторов свертывания. Однако чаще всего укорочение АЧТВ объясняется нарушениями работы с кровью на преаналитическом этапе.

Удлинение А ЧТВ происходит 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

- 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)

Способы выражения протромбинового теста

Выражение, единицы	Расчет	Комментарий
Время свертывания, секунды		Очень сильно зависит от реагентов, приборов, способа регистрации
Протромбиновый индекс (ПИ), %	$ПИ = \frac{\text{время свертывания нормальной плазмы}}{\text{время свертывания плазмы больного}} \times 100\%$	ПИ в % не несет смысловой нагрузки, так как между количеством факторов и измерением ПВ в секундах нет пропорциональной зависимости
Протромбиновое отношение (ПО)	$ПО = \frac{\text{время свертывания плазмы больного}}{\text{время свертывания нормальной плазмы}}$	Зависит от реагентов, приборов; сравнивать ПО, измеренное в разных лабораториях, практически невозможно
ПТ по Квику – % от нормы	Определяется по калибровочному графику, который строится путем разведения стандартной плазмы (100% протромбина) в соотношении 1:1 (50% протромбина), 1:2 (33% протромбина), 1:3 (25% протромбина), 1:4 (20% протромбина)	Тест не стандартизован, однако рекомендуется для оценки состояния факторов внешнего пути активации плазменного гемостаза
Международное нормализованное отношение (МНО)	$МНО = ПО^{МНЧ}$	Рекомендуется использовать при контроле лечения непрямыми антикоагулянтами

Диапазоны активности факторов гемостаза в плазме и клинико-диагностическое значение изменения активности факторов

Фактор	Нормальный диапазон активности (%)	Снижение активности (без наследственных заболеваний)	Повышение активности
Протромбин	70–130	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты витамина К • Дефицит витамина К • Патология печени • Антифосфолипидный синдром 	<ul style="list-style-type: none"> • Стадия гиперкоагуляции при ДВС • Состояние после операции • Мутация протромбина 20210G→A • После введения витамина К
V	65–150	<ul style="list-style-type: none"> • Гиперфибринолиз • Патология печени • ДВС-синдром • Злокачественная опухоль 	<ul style="list-style-type: none"> • Последний триместр беременности • Холестаз • Состояние после операции • При/после ДВС
VII	70–130	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты витамина К • Патология печени • Дефицит витамина К 	<ul style="list-style-type: none"> • Тромбофилия • Острый тромбоз • Инфаркт миокарда • Гипертриглицеридемия • Введение витамина К • Холодовая активация
VIII	50–150	<ul style="list-style-type: none"> • ДВС-синдром • Гиперфибринолиз • Дефицит фактора Виллебранда • Лечение вальпроиновой кислотой 	<ul style="list-style-type: none"> • Тромбофилия • Рекуррентный тромбоз • Опухолевый процесс • Беременность • Патология печени • Заболевания почек • Острофазовая реакция
IX	50–130	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты витамина К • Патология печени • Амилоидоз • Лечение вальпроиновой кислотой • Дефицит витамина К 	<ul style="list-style-type: none"> • Сахарный диабет • Лечение кортикостероидами
X	70–140	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты витамина К • Патология печени • L-аспарагиназа • Амилоидоз • Дефицит витамина К 	<ul style="list-style-type: none"> • Состояние после введения витамина К
XI	70–130	<ul style="list-style-type: none"> • ДВС-синдром • Патология печени • Гиперфибринолиз 	<ul style="list-style-type: none"> • Гипертония • Астма
XII	70–130	<ul style="list-style-type: none"> • Тромбоз • ДВС-синдром • Гиперфибринолиз • Нефротический синдром 	<ul style="list-style-type: none"> • Диабет • Беременность

Маркеры активации гемостаза

Показатель	Характеристика	Диагностическое значение
D-димеры	Продукты, образующиеся при лизисе фибрина под влиянием плазмينا. Накапливаются при активации гемокоагуляции и фибринолиза	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, оценка эффективности тромболитической терапии
TAT – тромбин-анти-тромбиновый комплекс	Комплексы взаимодействия тромбина и анти-тромбина. Отражают количество образующегося тромбина в системе циркуляции за короткий период	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
F1+2 – фрагменты протромбина	Указывают на активацию протромбина фактором Ха и на образование тромбина <i>in vivo</i> . Отражают количество образующегося тромбина в системе циркуляции за длительный период	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением гепарином и непрямыми антикоагулянтами. Наследственный или приобретенный дефицит ингибиторов
РФМК	Фибрин-мономеры и олигомеры, а также их комплексы с ПДФ. Отражают активность тромбина <i>in vivo</i>	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
ФПА – фибрино-пептид А	Продукт протеолиза фибриногена. Отражает активность тромбина <i>in vivo</i>	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
ПДФ	Продукты деградации фибрина/фибриногена под влиянием плазмينا	Определяют состояние гиперфибринолиза, повышаются у больных с тромбозами (реактивный фибринолиз) и ДВС, при лечении фибринолитиками
ПАП – плазмин-α_2-анти-плазминовый комплекс	Отражает образование плазмينا <i>in vivo</i>	Выявление гиперфибринолиза или реактивного фибринолиза, ДВС, инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии
PF4 – фактор 4 тромбоцитов, β-TG – β-тромбоглобулин	Метаболиты, освобождаемые из тромбоцитов в плазму. Отражают активацию тромбоцитов <i>in vivo</i>	Диагностика гиперактивного состояния тромбоцитов, артериального тромбоза, повреждения сосудов, инсульта
vWF – фактор Виллебранда	Освобождается из эндотелиальных клеток. Маркер повреждения эндотелиальных клеток	Диагностика поражения сосудистой стенки, фактор риска инфаркта миокарда и инсульта
TM	Мембранный белок в эндотелиальных клетках, в плазме – маркер повреждения эндотелия	Диагностика повреждения сосудистой стенки, ДВС-синдрома
ф.ХIIa	Активный фактор XII, указывает на активацию контактной фазы	Фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний

Изменение некоторых показателей активации гемостаза при патологии

Заболевание	ТАГ	F1+2	ФПА	D-димеры	PF4	ТМ	ПАП
ДВС-синдром	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Активация фибринолиза	-	-	-	↑	-	-	↑
Состояние гиперкоагуляции	↑	↑	↑	↑	↑	-	-
Предтромботическое состояние	-/↑	-/↑	-/↑	↑	↑	↑	-
Инфаркт миокарда	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Малигнизация	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	-	-/↑
Антифосфолипидный синдром	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	↑	-/↑	-
Иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП)	-	-	-	-	↑	-	↑
Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура	↑	↑	↑	↑	↑	-	-