**Методические рекомендации к занятию № 14**

**по дисциплине «Клиническая (био)химия»**

**Тема:** **Коагулограмма.**

**Алгоритм диагностики нарушений системы свертывания крови**

Поскольку основные гемокоагуляционные компоненты более доступны для исследования, чем многие показатели других систем организма, их можно использовать как способ ориентировочной оценки стадии или степени тяжести течения различных заболеваний, а также получить ориентировку в состоянии систем, более патогномоничных конкретному заболеванию.

По этой же причине коагуляционные показатели могут быть использованы как прогностические признаки развивающейся патологии и ее предупреждения.

Следовательно, в протокол обследования больных, наряду с другими обязательными мероприятиями – такими, как, например, электрокардиография, общий анализ крови и т.п. – должна быть обязательна включена **коагулограмма** – "набор тестов, данные которых позволяют описать состояние системы свертывания крови и тех ее компонентов, которые транслируют свою активность на другие системы организма"

**Основные показания к проведению анализа**

* Плановые операции. Во время оперативного вмешательства всегда существует некоторый риск кровотечения. Поэтому важны знания о состоянии свертывающей системы крови.
* Беременность. В этот период могут происходить изменения в женском организме, причем как положительные, так и негативные. Проводится обычно раз в триместр. Если диагностируется фетоплацентарная недостаточность или гестозы – чаще.
* Сосудистые нарушения (повышенное тромбообразование, варикозное заболевание).
* Болезни печени.
* Аутоимунные патологии.
* Нарушение свертываемости крови.
* Сердечно-сосудистая патология (инфаркт, инсульт, ИБС).
* При назначении антикоагулянтов и фибринолитиков.
* Назначение контрацептивных препаратов. В этом случае анализ делается раз в 3 месяца.
* Лечение пиявками (гирудотерапия) - для предупреждения геморрагий.

На первом этапе тесты предназначены для выявления изменений в том или ином звене гемостаза.

**Коагулограмма 1-го этапа включает:**- определение протромбинового времени;
- определение АЧТВ;
- определение количества тромбоцитов (важно, чтобы этот тест выполнялся не только и не столько в общеклиническом анализе крови, а именно в составе коагулограммы 1-го этапа, поскольку позволяет получить более цельную - диагностически и прогностически - картину состояния системы гемостаза);
- определение концентрации фибриногена;
- определение тромбинового времени;
- определение времени свертывания цельной крови.

При выявлении у пациента гемостазиологических нарушений на 1 этапе обследование предполагает более точную оценку про- и антикоагулянтных механизмов, а также характеристику функциональной (антитромбогенной) активности сосудистой стенки и реологических свойств крови.

**Коагулограмма 2-го этапа должна содержать**:
- оценку агрегационной активности тромбоцитов;
- исследование антикоагулянтной системы, прежде всего, по ее главным компонентам: антитромбину III, эндогенному гепарину, комплексу тромбин-антитромбин III. В ряде случаев бывает необходимо расширить информацию о состоянии системы естественных антикоагулянтов. В этом случае могут быть выполнены исследования активности протеина С, протеина S и PGI2, что позволяет оценить активность реакций, естественно ингибирующих факторы VIIIa и Va и агрегацию тромбоцитов;
- определение общей фибринолитической активности крови, определение Хаггеман-зависимого фибринолиза и определение плазминогена;
- определение маркеров внутрисосудистого свертывания: растворимых комплексов фибрин-мономера (РФМК), ПДФ, Д-димера;
- поиск специфических гемокоагуляционных маркеров, присущих данной категории пациентов.

Отдельно рекомендуется выполнять исследование реологии крови, что позволяет оценить условия текучести крови и внутрисосудистые условия кровотока в целом.

**Дополнительные тесты:**

**При кровоточивости**

* Время кровотечения
* Кол-во ТЦ, индуцированная агрегация ТЦ
* Фактор Виллебранда (активность и АГ)
* АЧТВ, ПВ, фибриноген
* Факторы VIII, IX и др., их ингибиторы
* Лизис эуглобулинов
* Микс-пробы с РНП и дефиц. плазмами

**При артер. / венозн. тромбозах**

* Количество тромбоцитов
* АТ III, ПрC, ПрS, аРС-резистентность Генетическое тестирование на мутации генов ф.V (Leiden) и протромбина
* D-димер, ф.VIII, vWF (антиген)
* Гомоцистеин (в динамике)
* Волчаночный АК (>2 раз, через 12 нед),
* АТ к β2-ГП 1

**Волчаночный антикоагулянт**

Волчаночный антикоагулянт — гетерогенная группа антител против отри-цательно заряженных анионных фосфолипидов и их комплексов со специфическими белками. Антикоагулянты волчаночного типа связываются с фосфолипидными мембранами и «экранируют» их, при этом тормозится активация коагуляционных ферментных комплексов и замедляется свертывание крови in vitro. Вследствие повреждения антителами мембран эндотелиальных клеток, снижения продукции простациклина и нарушений в антикоагулянтной системе протеина С у пациентов возникает тромбофилическое состояние, чреватое развитием тромбозов (тромбоэмболий) и ишемическим поражением тканей.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

Присутствие волчаночного антикоаглянта приводит к удлинению времени образования сгустка в фосфолипидзависимых коагуляционных тестах, наиболее отчетливо — при низких концентрациях активаторов свертывания. Обусловленная волчаночного антикоаглянта гипокоагуляция не корригируется нормальной бедной тромбоцитами плазмой, но исправляется добавлением к исследуемой плазме тканевых или эритроцитарных фосфолипидов или разрушенных тромбоцитов.

Дополнительным признаком наличия волчаночного антикоаглянта в тесте с препаратами змеиных ядов может служить возрастание текстарин-экаринового (или лебетокс-эхитоксового) коэффициента. Его значимость обусловлена тем, что действие текстарина или лебетокса (прямого активатора фактора X) зависит от присутствия фосфолипидов и наличия волчаночного антикоаглянта, а экарина или эхитокса (прямого активатора протромбина) — не зависит.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза и получения цитратной плазмы. Наличие тромбоцитов в пробе, превышающее 10х109/л, может маскировать вызванные волчаночным антикоаглянтом коагуляционные сдвиги и дать лож-ноотрицательный результат, поэтому особое внимание уделяют режиму получения бестромбоцитной плазмы (необходимо двухэтапное центрифугирование).

Определение волчаночного антикоаглянта основано на клоттинговых тестах, результаты которых зависят от использования антикоагулянтов — гепарина4 и антагонистов витамина К. Во избежание ложноположительных результатов определения волчаночного антикоаглянта пациенту необходимо отменить гепарин минимум за 2 дня, кумариновые препараты (варфарин) — за 2 нед до взятия крови. Однако реальная клиническая ситуация (тромбозы, тромбоэмболии) не всегда позволяет отменить препараты перед лабораторным исследованием; в первую очередь, это относится к гепарину.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение волчаночного антикоаглянта проводят в соответствии с рекомендациями Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза (ISTH — исследовательская группа по В А и фосфолипидзависимым антителам); критерии диагностики были приняты в 1999 г. в Саппоро и обновлены в 2004 г. в Сиднее. Учитывая, что тест на волчаночный антикоаглянт со 100% чувствительностью отсутствует, на I этапе (скрининговые исследования) проводят минимум два теста с исследуемой и контрольной плазмой.

Чаще используют тесты, основанные на активированное частичное тромбопластиновое время с низким содержанием фосфолипидов (более чувствителен к АЧТВ-реагенту на основе каолина или кремнезема), а также dRVVT. Увеличение времени свертывания по сравнению с контрольной плазмой более чем в 1,2-1,25 раза может быть связано с наличием в исследуемом образце; дальнейшему исследованию подвергают только такие пробы.

На II этапе (подтверждающие исследования) проводят последовательно два микс-теста на основе того типа исследования, которое было положительным на I этапе:

• микс-тест с нормальной плазмой. Повторяют то исследование, которое было проведено на I этапе, взяв вместо исследуемой плазмы ее смесь в соотношении 1:1 с нормальной бедной тромбоцитами плазмой, прогретую при 37 °С в течение 1-2 ч. Если в исследуемой плазме присутствуют ингибиторы коагуляции, добавление нормальной плазмы не нормализует время свертывания — оно остается удлиненным более чем в 1,2 раза по сравнению с нормальной донорской плазмой. Такие пробы подвергают исследованию на следующей стадии;

• микс-тест с фосфолипидами. Повторяют исследование предыдущей стадии, взяв смесь в соотношении 1:1 исследуемой плазмы с препаратом компенсирующих фосфолипидов (тромбоцитином, эритрофосфатидом и т.д.); аналогично обрабатывают контрольную плазму. Если в исходно нарушенных коагуляционных тестах происходит полная или выраженная нормализация времени свертывания (оно становится близким к результату, полученному на смеси контрольной плазмы с фосфолипидами), результат подтверждающих проб на волчаночный коагулянт считают положительным.

Таким образом, заключение о наличии волчаночного коагулянта в исследуемой плазме, согласно руководству ISTH, делают на основании удлинения свертывания плазмы в фосфолипидзависимых коагуляционных тестах.

• Активированное частичное тромбопластиновое времяс люпус-чувствительным реагентом. Соотношение активированного частичного тромбопластинового времени больного/ активированное частичное тромбопластиновое время донора - более 1,2 (например, 40/30=1,33).

• dRVVT — тест с разведенным ядом гадюки Рассела. Соотношение dRVVT больного/dRVVT донора — более 1,2.

• Отсутствие коррекции удлиненного активированного частичного тромбопластинового времени в микс-тесте с донорской плазмой 1:1.

• Укорочение или коррекция активированного частичного тромбопластинового времени и dRVVT в подтверждающих тестах при добавлении фосфолипидов (гексагональных фосфолипидов, лиофилизиро- ванных тромбоцитов, экстракта мозга кролика и др.)

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Диагностический тест на волчаночный коагулянт дает положительные результаты только при патологии. Степень коррекции, т. е. соотношение времени свертывания без добавления фосфолипидов и после их внесения, свидетельствующее о наличии волчаночного коагулянта, остается предметом обсуждения; в любом случае следует придерживаться рекомендаций производителя используемых реагентов.

ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

На определение волчаночного коагулянта могут влиять многие факторы. Удлинение времени свертывания на I этапе может быть связано с наличием гепарина в пробе; для проверки его присутствия можно определить волчаночного коагулянта исследуемой плазмы исходно и после обработки сорбентом гепарина или гепариназой. Определение волчаночного коагулянта в период гепаринотерапии проводить нельзя.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если результаты скрининговых тестов не противоречат предположению о наличии волчаночного коагулянта, микс-пробы с нормальной плазмой не дали коррекции, но после добавления фосфолипидов произошла коррекция времени свертывания, то в плазме крови присутствует волчаночный коагулянт. Однако это не означает наличие у больного антифосфолипидного синдрома, так как волчаночный коагулянт может транзиторно появляться при вирусных заболеваниях, после вакцинации и приема некоторых лекарственных препаратов.

Наличие в плазме волчаночного ковгулянта на фоне аутоиммунной патологии (системной красной волчанки, ревматоидного артрита и др.) рассматривается как тромбофилическое состояние. При этом увеличивается риск рецидивирующих тромбозов вен и артерий, нарушений мозгового кровообращения, фетоплацентарной недостаточности и привычного невынашивания беременности (выкидышей, внутриутробной гибели плода), наблюдается наклонность к тромбоцитопении, развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, реже - к полиаллергии и другим иммунным нарушениям.

**Антитела к фосфолипидам**

Антифосфолипидные антитела представляют собой гетерогенную группу аутоантител, взаимодействующих с анионными и нейтральными фосфолипидами, с комплексами фосфолипидов и фосфолипидсвязывающих специфических белков плазмы крови, а также с гликопротеиновыми рецепторами клеток крови, ассоциированными с фосфолипидами. Антифосфолипидные антитела реагируют не собственно с фосфолипидами, а со связывающими их белками, поэтому правильнее считать антифосфолипидные антитела антителами к белково-фосфолипидным комплексам.

Указанные антитела классов IgG и IgM можно обнаружить как при первичном, так и при вторичном антифосфолипидном синдроме, сопровождающемся рядом воспалительных и невоспалительных заболеваний. В отличие от волчаночного антикоагулянта, они редко приводят к удлинению клоттинговых тестов (за исключением антител к р2-гликопротеину-1, часто ассоциированных с гипокоагуляционными сдвигами); наличие антифосфолипидного антитела связывают с риском развития тромбозов и других осложнений. Содержание антител указанных типов может быть умеренно повышено у некоторых здоровых людей, а также после перенесенных вирусных или бактериальных инфекций или приема некоторых лекарственных препаратов. В таких случаях необходимы сопоставление результатов с клинической картиной и повторное исследование с интервалом не менее 9-12 нед. В соответствии с критериями ISTH определение антифосфолипидных антител следует проводить методом иммуноферментного анализа с выявлением кардиолипинсвязанного р2-гликопротеина-1 и прямым определением антител к анти-р2-гликопротеину-1.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Зависят от диагностического набора и указываются фирмой-производителем. Так, для антител к КЛ IgG — менее 10—19 МЕ/мл, IgM — менее 10 МЕ/мл, IgA — менее 15 МЕ/мл.

ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

В ряде ситуаций ИФА-определению антител к фосфолипидам и специфическим белкам мешают ревматоидный, антинуклеарный факторы, криоглобулины; при их высокой концентрации в крови для диагностики антифосфолипидного антитела проводят определение волчаночного антикоагулянта.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антифосфолипидный синдром диагностируют лишь при постоянном наличии антифосфолипидных антител в крови пациента. Уровень стандартизации лабораторных исследований в этом направлении пока недостаточен, а риск гипер-диагностики относительно велик, поскольку у 1-5% людей в общей популяции определение антифосфолипидное антитело дает положительный результат. Лабораторными критериями антифосфолипидного синдрома у пациента являются:

• наличие в плазме волчаночного антикоагулянта, определяемого в соответствии с рекомендациями ISTH дважды или более с промежутком не менее 12 нед;

• наличие антител к кардиолипину (IgG и/или IgM) в среднем или высоком титре и/или анти-р2-1-антител (IgG и/или IgM) в высоком титре в плазме или сыворотке крови в двух или более измерений стандартным методом ELISA с промежутком не менее 12 нед.

О**пределение волчаночного антитела и антифосфолипидных антител** показано всем пациентам с тромботическими явлениями [тромбозами, инфарктами миокарда и острыми нарушениями мозгового кровообращения по ишемическому типу, особенно у молодых людей, повторным невынашиванием беременности и др.], даже если активированное частичное тромбопластиновое время у них не удлинено. Уровень антифосфолипидных антител оценивают не только для диагностики антифосфолипидного синдрома, но и для контроля эффективности его терапии (иммуносупрессивной или с применением экстракорпоральных методов).

**Иммунные ингибиторы факторов свертывания**

Аутоантитела к плазменным белкам — факторам свертывания крови (наиболее часто к VIII или IX) связывают соответствующие факторы и замедляют свертывание крови in vivo и in vitro. При значительном накоплении антител возможны почти полное блокирование плазменных факторов и развитие ингибиторной формы гемофилии с геморрагическим синдромом.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

При наличии в плазме пациента иммунных ингибиторов — аутоантител к факторам VIII или IX — немедленно после смешивания с нормальной донорской плазмой в микс-тесте 1:1 активированное частичное тромбопластиновое время в значительной степени приближается к референтным пределам, но после инкубации смеси тех же плазм в течение 1-2 ч при 37 °С активированное частичное тромбопластиновое время остается удлиненным. Добавление фосфолипидов не приводит к нормализации активированного частичного тромбопластинового времени, определение соответствующего фактора (VIII или IX) показывает снижение его уровня.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для количественного определения ингибиторных антител последовательные разведения исследуемой плазмы смешивают в соотношении 1:1 с нормальной пулированной плазмой, в получившихся микс-пробах после инкубации определют степень снижения активности факторов VIII или IX по сравнению с исходной нормальной плазмой. Активность плазменного ингибитора в единицах Bethesda равняется рассчитанной степени разведения исследуемой плазмы, при которой блокируется ровно 50% фактора. Остаточная факторная активность может быть определена отношением количества фактора в смеси исследуемой и нормальной плазм в пропорции 1:1 к количеству того же фактора в смеси нормальной плазмы с имидазоловым буферным раствором (после двухчасовой инкубации при 37 °С) и выражена в процентах.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

При наличии ингибиторных антител к плазменным факторам VIII и IX на фоне клинической картины геморрагического синдрома, кроме активированного частичного тромбопластинового времени плазмы, бывает удлинено время свертывания цельной крови, в то время как другие базовые коагуляционные тесты изменяются в гораздо меньшей степени или остаются нормальными.

Антитела к плазменным факторам часто выявляют у больных с тяжелой гемофилией, которым регулярно вводят концентраты или препараты факторов VIII и IX. Они также могут появляться при аллергических и иммунопатологических заболеваниях, онкопатологии, миеломной болезни и как реакция на некоторые лекарственные препараты. Антитела к факторам свертывания могут появляться у людей пожилого возраста, после иммуносупрессивной терапии они пропадают. Антитела, появившиеся у женщин спустя 2-5 мес после родов, могут самопроизвольно исчезнуть через 1-1,5 года.