

**ГООВПО «Донецкий национальный медицинский
университет им.
М. Горького»**

**Кафедра трансплантологии и клинической лабораторной
диагностики.**

Глобальные и лабораторные тесты гемостаза при геморрагическом синдроме у детей.

АВТОРЫ :

**ас. Федорова А.В., ас. Лисанова С.В.,
Смирнова Т.Я.**

Докладчик : ассистент Федорова Анжела Викторовна

* Патология системы гемокоагуляции в педиатрической практике может быть представлена как *тромбозами*, так и *геморрагическим синдромом*. Однако наиболее часто многие заболевания у детей сопровождается именно *геморрагическим синдромом*, отличительным признаком которого является повышенная кровоточивость. Развитие геморрагического синдрома у детей может быть обусловлено различными патогенетическими механизмами, в том числе первичной патологией системы гемостаза.



ГИПОКОАГУЛЯЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ

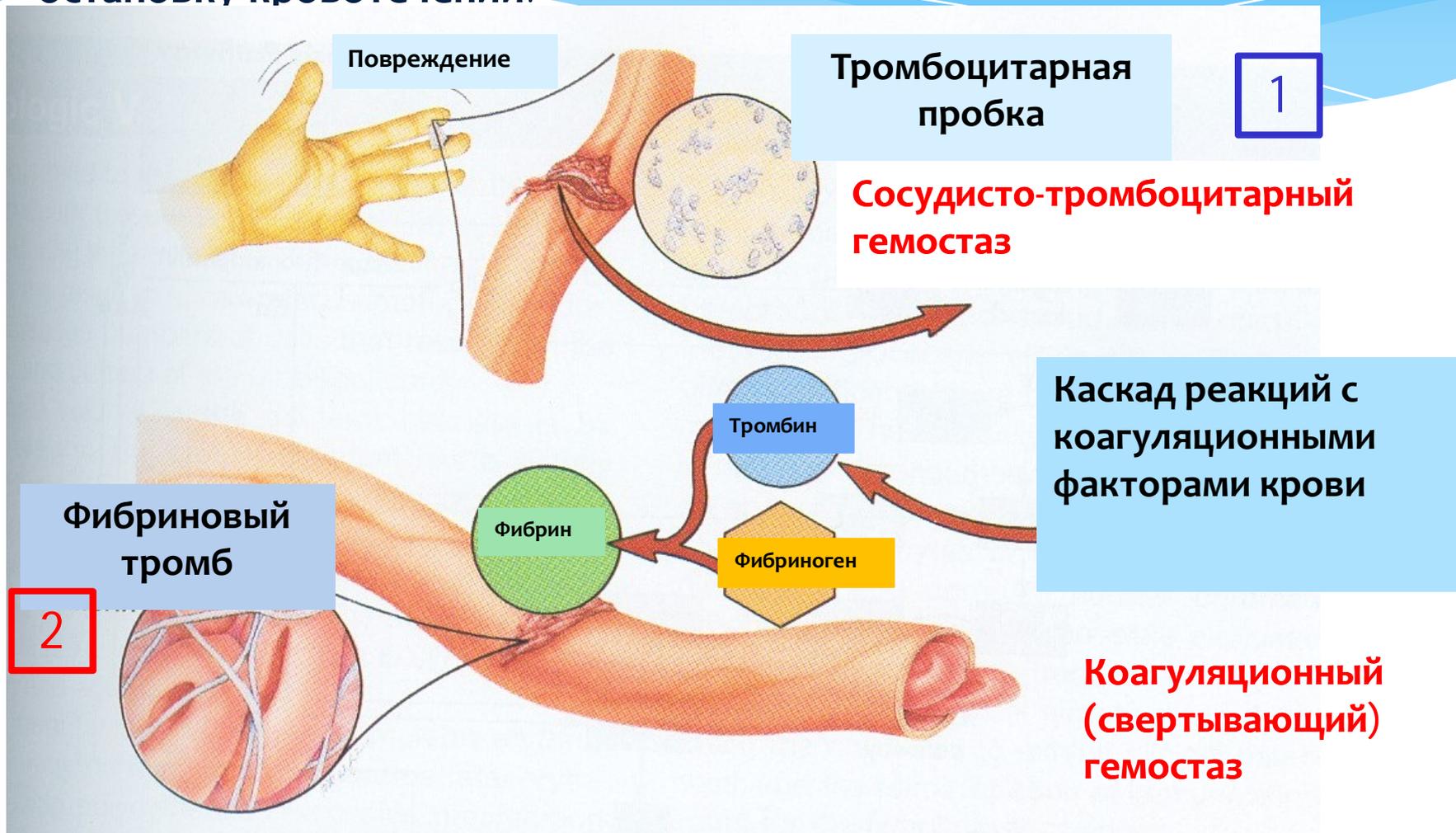
- сопровождаются геморрагическими проявлениями

- **КОАГУЛОПАТИИ:**
 - дефекты внешнего / внутреннего пути гемостаза
 - чрезмерная активация фибринолиза, дефицит α_2 -антиплазмина
 - передозировка антикоагулянтов
- **ТРОМБОЦИТОПЕНИИ, ТРОМБОЦИТОПАТИИ;**
- **ВАЗОПАТИИ.**



Гемостаз

Гемостаз (haemostasis; греч. haima **кровь** + stasis **стояние**) — комплекс реакций организма, направленных на предупреждение и остановку кровотечений.



Если ребенок склонен к кровоточивости, необходимо:

1. Провести глобальный тест гемостаза (ВСК, АВС)
** - необязательное исследование*
2. Провести тесты на патологию сосудистой стенки
** - по показаниям*
3. Оценить тромбоцитарное звено гемостаза
4. Провести скрининговые тесты коагуляционного гемостаза (АЧТВ, ПВ / ПО / МНО, фибриноген / ТВ)



СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА (функции)

- В неповрежденных сосудах - поддержание текущей крови в жидком состоянии.
- При повреждении сосуда:
 - ✓ остановка кровотечения (образование тромба),
 - ✓ участие в регенерации сосудистой стенки.

Основные компоненты системы гемостаза:

1. Сосудистая стенка.
2. Тромбоциты.
3. Плазменные белки систем свертывания и фибринолиза.
4. Антикоагулянты (физиологические).

ЭТАПЫ ГЕМОСТАЗА

1. **Сосудисто-тромбоцитарный** (микроциркуляторный, первичный) гемостаз.



2. **Коагуляционный** (плазменный, макроциркуляторный, вторичный) гемостаз.
-

3. **Фибринолиз**, регенерация тканей

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

* остановка кровотечения из мелких сосудов с низким артериальным давлением за счет образования тромбоцитарной пробки.

1. Локальная вазоконстрикция
2. Адгезия тромбоцитов
3. Агрегация тромбоцитов
 - Обратимая агрегация
 - Необратимая агрегация
4. Ретракция тромбоцитарной пробки

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

1. Локальная вазоконстрикция

- * рефлекторный ответ на болевое раздражение и выброс в кровь **норадреналина и адреналина**;
- * активация тромбоцитов и выброс в кровь серотонина, **тромбоксана A_2** , адреналина.

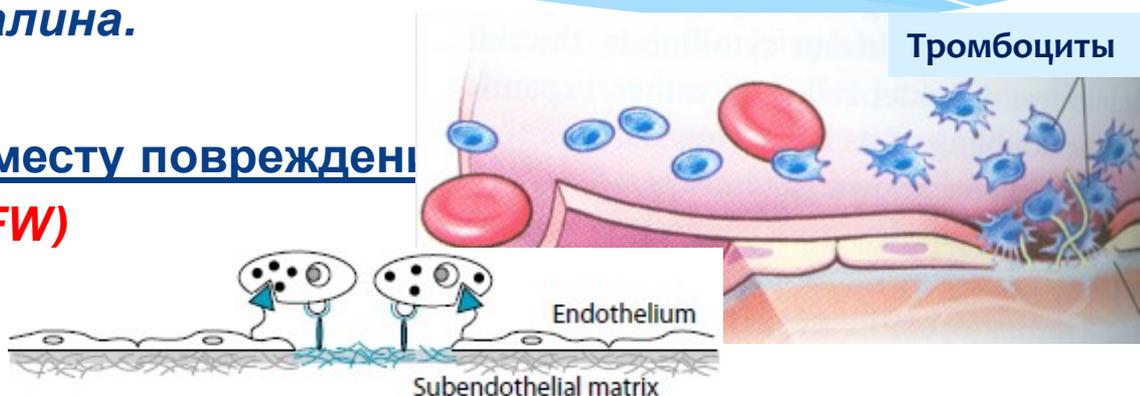
2. Адгезия тромбоцитов к месту повреждения

- * **фактор Виллебранда (FW)**

3. Агрегация тромбоцитов

- * Обратимая (образование белого тромба, способного пропускать плазму) - выброс **адреналина, АДФ, серотонина, тромбоксана A_2** ;
- * Необратимая (образование тромба, непроницаемого для плазмы) - **тромбин**.

- ## 4. Ретракция тромба (уплотнение тромба и образование тромбоцитарной пробки) – **тромбостенин (ф6).**



**Для оценки состояния сосудистого
компонента гемостаза применяют
пробы:**

щипка

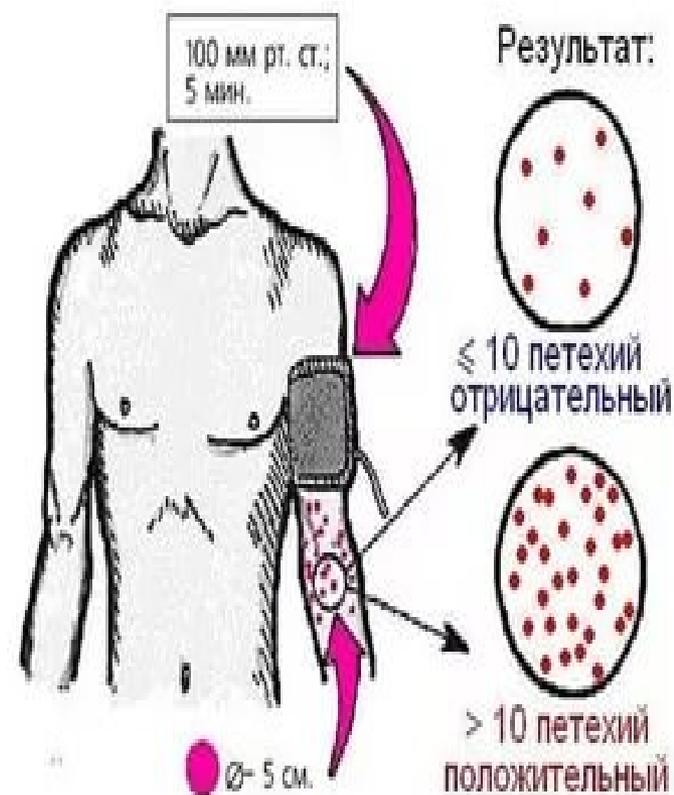
пробу Нестерова

**жгута (проба
Кончаловского)**

Проба жгута или манжеточная проба (проба Кончаловского).

- * Отступив на 2 см книзу от локтевого сгиба, очерчивают на внутренней поверхности предплечья круг диаметром 5 см. На плечо накладывают манжету тонометра, соединяют с манометром и поддерживают давление на уровне 90-100 мм рт.ст. в течение 5 мин. Затем манжету снимают и ждут восстановления кровотока в руке 5 мин, после чего подсчитывают количество петехий в очерченном круге. Количество петехий более 10 свидетельствует о снижении резистентности стенки капилляров, что может быть связано с нарушением функционального состояния тромбоцитов, снижением их количества и ангиотрофической функции тромбоцитов, а также с повышением проницаемости капилляров при различных патологических процессах (васкулиты, вазопатии).

Манжеточная проба Румпель-Леде-Кончаловского



**при резко
положительной
– количество 30
петехий и
более.**

**при
положительной
– 20-30 петехий**

**при слабо
положительной
пробе
количество
петехий 11-20;**

**норме число
петехий не
превышает 10**

* **Симптом щипка Кожевникова** –

Врач собирает под ключицей кожу и делает щипок. В норме изменений кожи не происходит. При нарушении эластичности капилляров на месте щипка кожи под ключицей появляются петехии или кровоподтеки, особенно через 24 часа.

Повышенная ломкость капилляров наблюдается при сепсисе, сыпном тифе, дефиците витамина С, эндокринных нарушениях, ДВС-синдроме, передозировке антикоагулянтов, дефиците факторов протромбинового комплекса.



- * **Проба Нестерова** - оценка проницаемости и резистентности капилляров с помощью аппарата Нестерова. На кожу внутренней стороны предплечья накладывают баночку аппарата Нестерова, под которой создают вакуум 0,4 атм. в течение 3 мин. Оценка результатов пробы оценивается 4 степенями по выраженности гиперемии и количеству петехий на опытном поле.
- * 0 степень – на бледном или слегка гиперемизированном фоне единичные мелкоточечные кровоизлияния (петехии до 20 шт.).
- * 1 степень – на гиперемизированном фоне множественные (20-40) петехии.
- * 2 степень – на интенсивно гиперемизированном фоне множественные слитые геморрагии.
- * 3 степень – сплошное кровоизлияние.
- * Примечание: 0 – 1 степени пробы Нестерова свидетельствуют о нормальной проницаемости и резистентности капилляров.
- * 2 – 3 степени – о повышении проницаемости и снижении резистентности капилляров.



Тесты тромбоцитарного звена

- ❖ **Длительность кровотечения** при стандартном проколе кожи - методы Ivy, Duke.
-

- ❖ **Количество тромбоцитов** в крови ($N = 150-400$) $\times 10^9$ /л)

- ❖ **Активность тромбоцитов** (агрегация спонтанная и индуцированная разными дозами АДФ, коллагеном, адреналином, тромбином, ристомицином (активность vWF)).
-

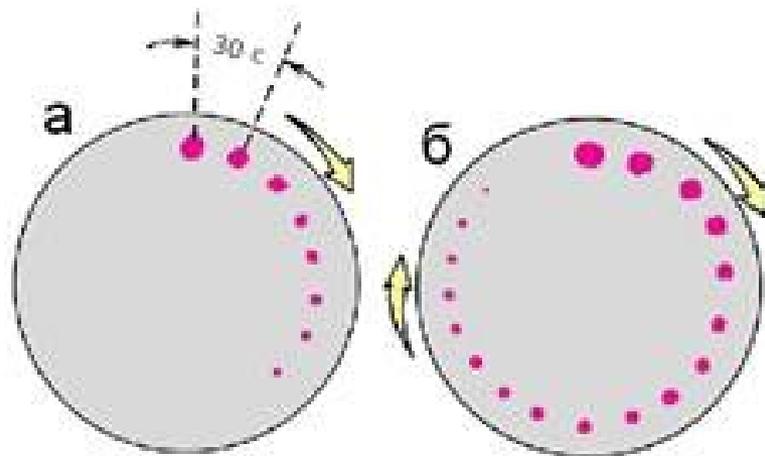
- ❖ **Проточная цитофлуориметрия** – выявление рецепторных гликопротеинов тромбоцитов (www.biocytex.fr), Р-селектина...

* **Время кровотечения по Дьюке** – определение длительности кровотечения из поверхностных микрососудов мочки уха после нарушения их целостности с помощью скарификатора. Каждые 30 сек. промокают каплю крови бумагой, до тех пор, пока кровь уже не появляется (N – 2-5 мин.) Увеличение времени свидетельствует о наличии тромбоцитопении, тромбоцитопатии, болезни Виллебранда.



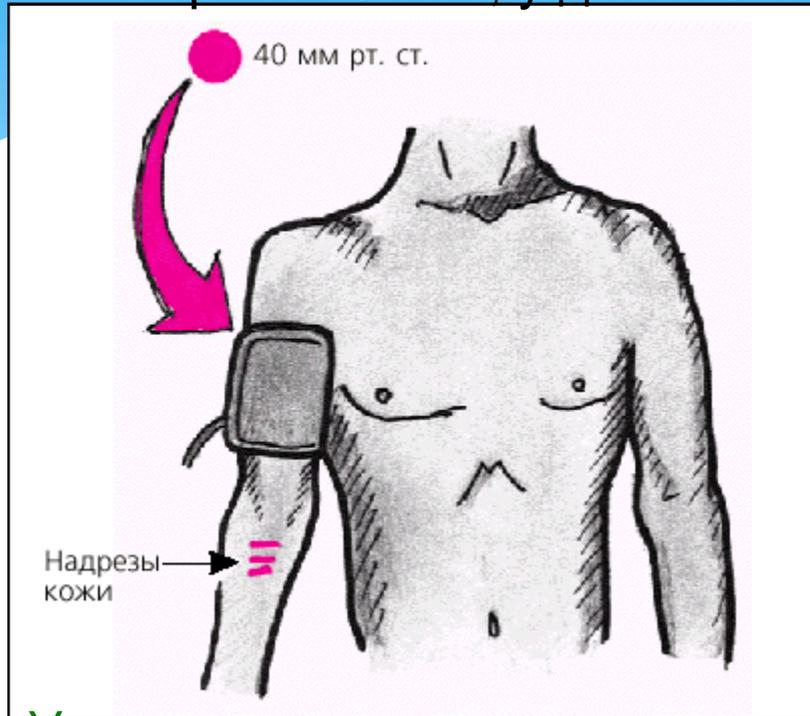
* Следует помнить, что тест не стандартизирован и не унифицирован.

Более чувствительным является тест Айви.



Время кровотечения по Айви (Ivy)

Норма 2-9 мин, у детей 3-12 мин. Учет времени – до 15 мин.



Simplex II,
Triplett Bleeding
Time Device,
скальпель,
скарификатор...



Учитывать:
*t° воздуха, t° тела,
прием аспирина,
НСПВ, др. препаратов*

Удлинение времени кровотечения - при тромбоцитопении, тромбоцитопатии, авитаминозе С, болезни Виллебранда, васкулитах и др.

Укорочение времени кровотечения – **клинически незначимо**.

Длительность кровотечения может быть нормальна при тромбоцитопении (иногда до $50 \times 10^9/\text{л}$) и при легком течении болезни Виллебранда.

Подсчет количества тромбоцитов

- ❖ В камере Горяева – низкая точность, возможно занижение результатов. $CV = 25-30\%$.
- ❖ По Фонио – в мазке крови на 1000 эритроцитов. Низкая точность, субъективность, но можно одновременно оценить морфологию тромбоцитов.
- ❖ На гематологическом анализаторе – точно, в стандартных условиях, быстро. Важно предотвратить агрегацию ТЦ и ЭР (перемешивание). CV реалын = 1-2% - важно для оценки динамики.



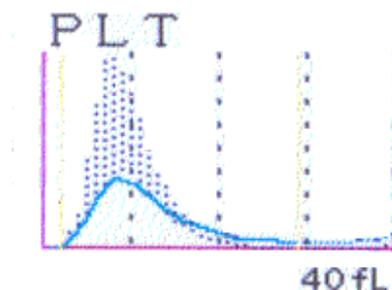
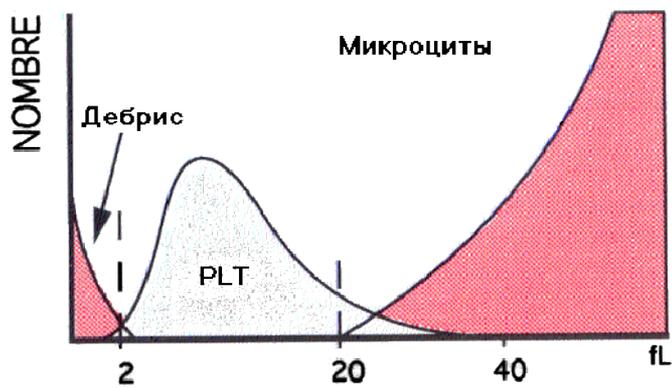
Тромбоцитарное звено на гематологическом анализаторе

PLT – количество тромбоцитов. Норма = от 180 до $320 \cdot 10^9$ /л;
при выходе за эти пределы необходима микроскопия мазка.

MPV – средний объем тромбоцитов. «Молодые» тромбоциты имеют больший объем. MPV увеличивается с возрастом:

- ❖ 8,6–8,9 фл у детей 1 - 5 лет;
- ❖ 9,5–10,6 фл у людей старше 70 лет.

PCT – тромбокрит - доля объема цельной крови, занимаемая тромбоцитами (аналогичен Hct). Норма = 0,15–0,40%.



- * **Определение степени агрегации тромбоцитов изучают с помощью анализатора агрегации тромбоцитов.** Проба служит для оценки сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.
- * Принцип метода заключается в регистрации агрегации тромбоцитов в результате активации данного процесса добавлением индуктора агрегации (АДФ, коллаген, адреналин и др.) к плазме, обогащенной тромбоцитами. Мерой определения процесса является графически регистрируемое падение оптической плотности плазмы крови в результате потребления тромбоцитов в агрегатах, образующихся под воздействием индукторов агрегации. С помощью этого метода возможно оценивать как повышенную, так и сниженную агрегационную активность тромбоцитов.

Агрегометры



AP 2110

*Анализатор агрегации тромбоцитов предназначен для исследования *in vitro* агрегационных свойств тромбоцитов турбидиметрическим методом.*



Анализатор агрегации тромбоцитов AMS 600



Рис. 4. АДФ-агрегация ($0,5 \times 10^{-6}$ М)
Нормальная кривая. Первичная агрегация с
дезагрегацией.

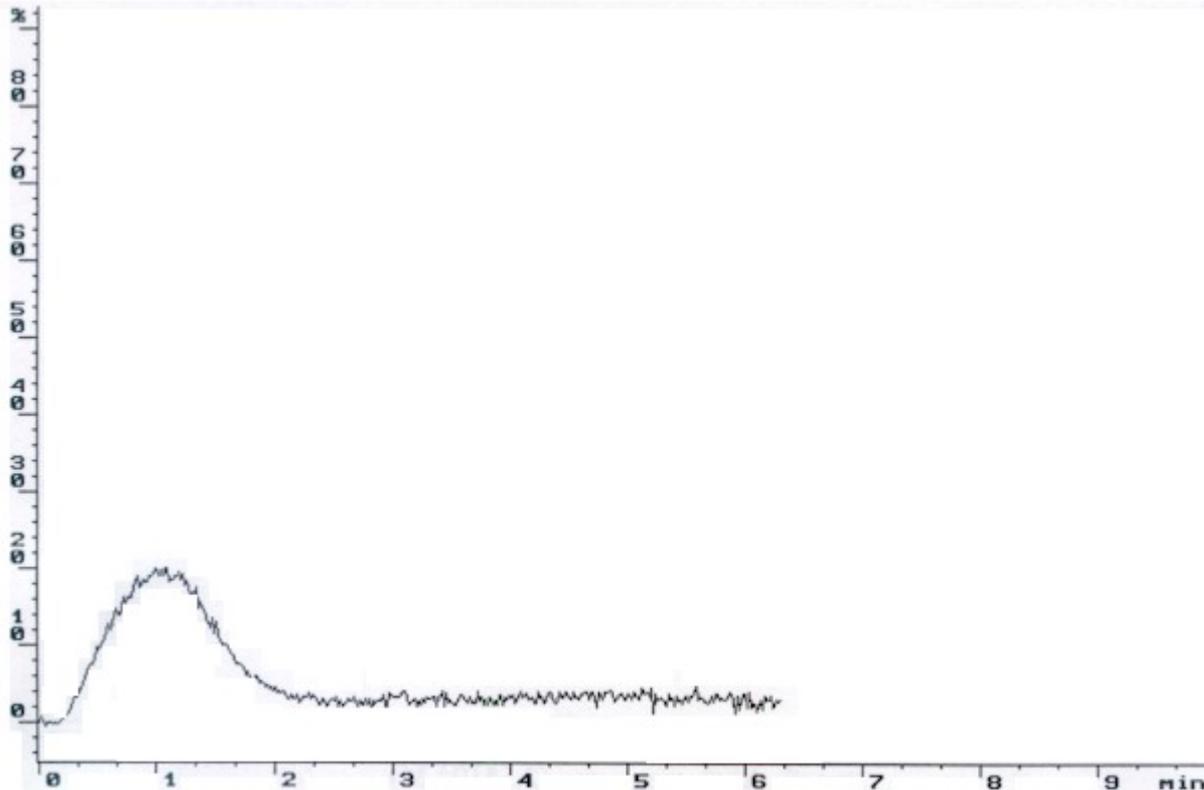


Рис. 5. АДФ-агрегация ($1,5 \times 10^{-6}$ М)
Нормальная кривая. Двухфазная агрегация.

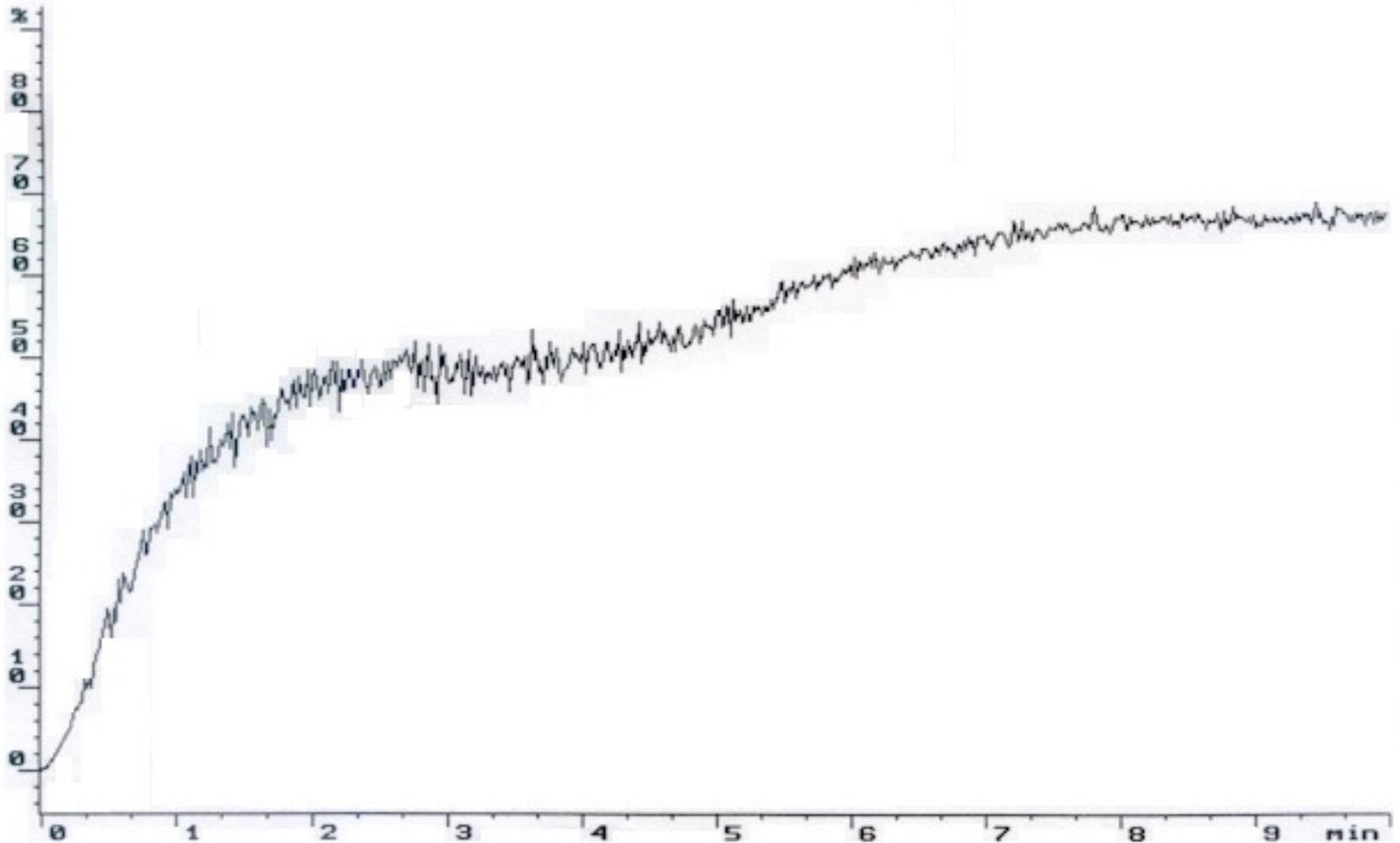
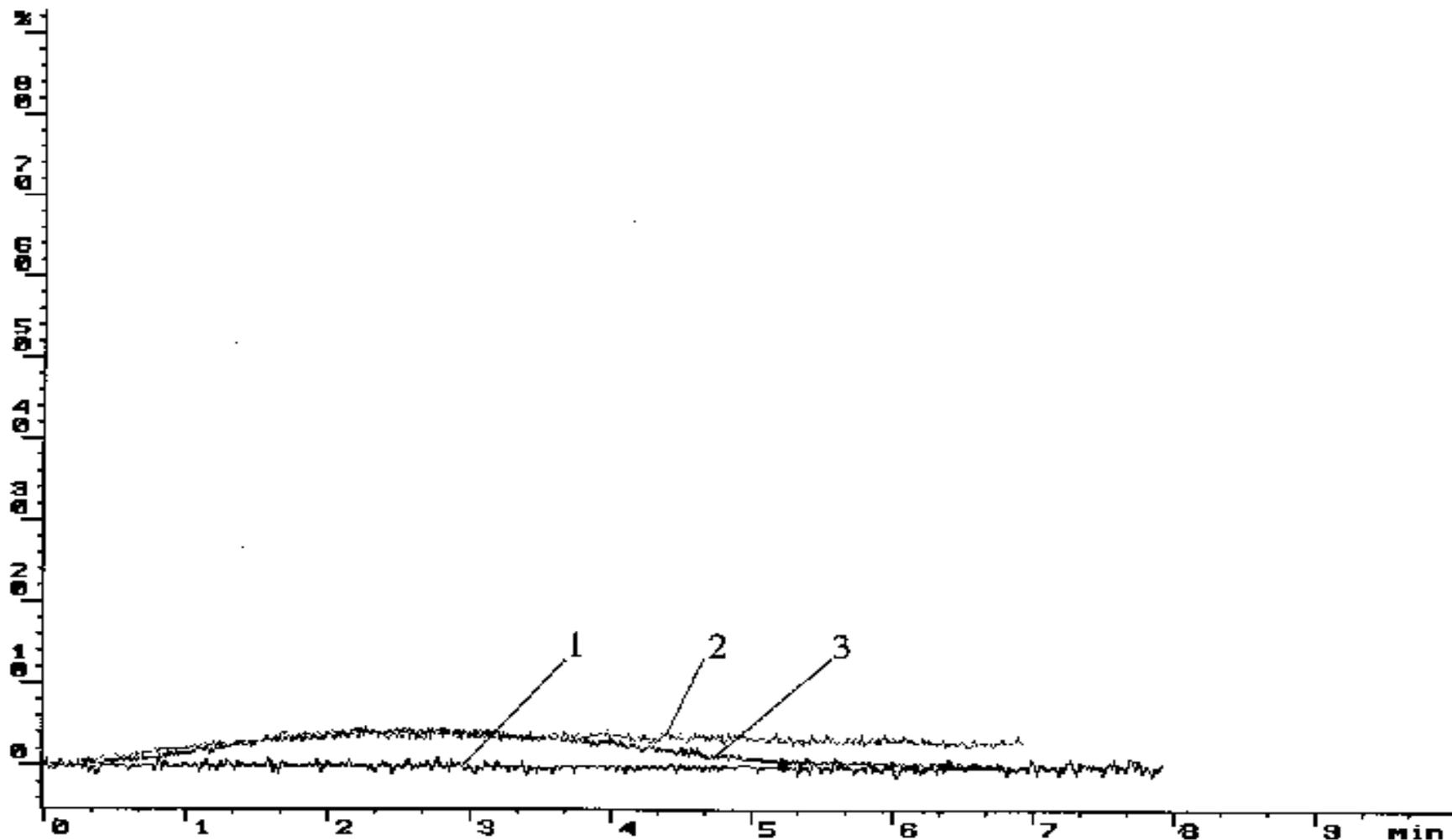


Рис. 6. Патологические кривые агрегации тромбоцитов.



Изменение агрегатограмм при нарушениях функции тромбоцитов

Состояние	АДФ	Адрена-лин	Арахидоно вая кислота	Тромбин	Коллаген	Ристомици н
Референсные значения:	8-12 с	15-20 с			15-20 с	
Болезнь Виллебранда	Н	Н	Н	Н	Н	V
Синдром Бернара-Сулье	Н	Н	Н	Н/V	Н	V
Тромбостения Гланцмана	V	V	V	V	V	+/-
Передозировка аспирина	V	V	V	+/-	V	+/-
Синдром серых тромбоцитов	V	V	Н/V	+/-	V	+/-

Примечание: Н - нормальная реакция на индуктор агрегации, V - сниженная реакция на индуктор агрегации.

Коагуляционный гемостаз (вторичный, макроциркуляторный, плазменный)

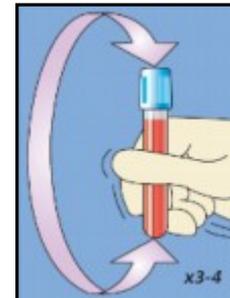
- * **Коагуляционный гемостаз** – это цепной ферментативный процесс, в котором последовательно происходит активация факторов свертывания и образование их комплексов.
- * Переход растворимого белка крови фибриногена в нерастворимый фибрин, в результате чего образуется прочный **фибриновый тромб**.
- * Процесс коагуляционного гемостаза крови осуществляется в 3 последовательные фазы:
 1. **Образование протромбиназы;**
 2. **Образование тромбина**
 3. **Образование фибрина и ретракция тромба**

Плазменный гемостаз



Взятие крови из вены «на гемостаз»

- Исключить или учесть действие вводимых лекарств. Знать, когда и **что в/в вливалось** пациенту и когда была взята кровь.
- После инфузии выждать не менее 1 ч (если возможно).
- Максимально аккуратная венепункция, жгут – не более 1 мин !
- При исследовании функции тромбоцитов и/или плазменного гемостаза – **не брать кровь из внутривенного катетера !**
- Взятую кровь **сохранять в закрытой пробирке**, как можно быстрее доставить в лабораторию (1 час).
- Плазму хранить до 4 ч при комнатной t°, иначе – заморозить.



Вакуумные пробирки для коагулологии



Цитрат – 3,2 % / 3,8 %, предпочтительнее **3,2 %**

❖ Обязательно правильное соотношение цитрат / кровь:

● Недобор крови → замедление свертывания

Неполное заполнение = повышение концентрации цитрата в пробе, существенное (>10%) удлинение АЧТВ и ПВ.

НСТ – от 25-30 до 55 %.

❖ 3-4 аккуратных переворачивания для перемешивания крови с цитратом (энергичное перемешивание => активация тромбоцитов).

❖ Хранение – температурный режим
(при комнатной температуре => гемолиз + активация ТЦ, в холодильнике при +8 °С запускается активация VII фактора свертывания крови)

Глобальные тесты гемостаза

Время свертывания цельной крови (ВСК) по Ли-Уайту:

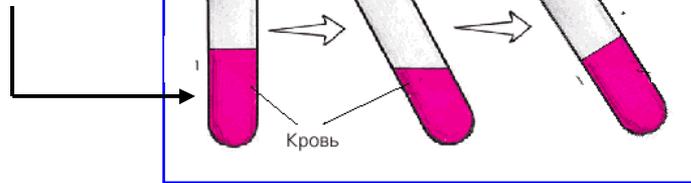
❖ **в стеклянной пробирке** при 20-22⁰ С – 6-11 мин;

при 37⁰ С – 5-7 мин;

❖ **в пластиковой пробирке** – 15-25 мин.



Кровь
пациента



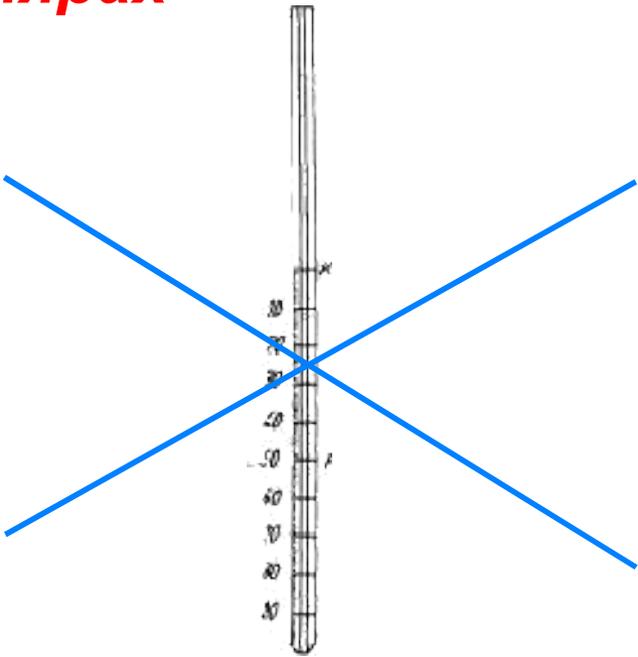
Удлинение времени наблюдается при глубоких дефектах свертывающей системы, тромбоцитопении, тромбоцитопатии, передозировке антикоагулянтами.

Укорочение - при гиперкоагуляционном синдроме, при ДВС-синдроме, тромбозах.

Основное применение теста ВСК - экспресс-диагностика грубых нарушений гемостаза вне КДЛ.



*** Методику Сухарева
в капиллярах**



**Не использовать, так как, не стандартизовано,
большой разброс результатов...**

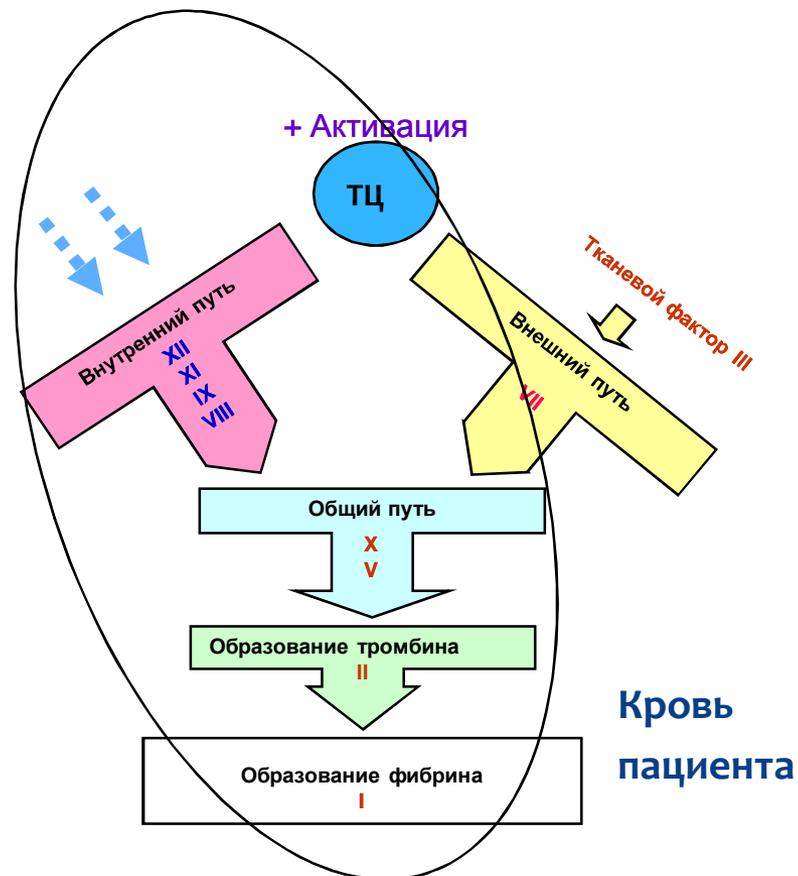
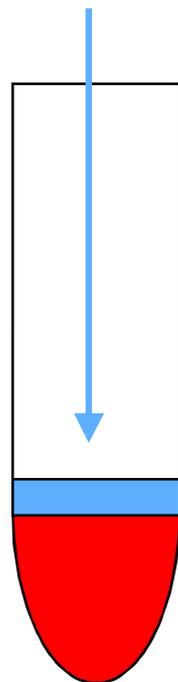
Глобальные тесты гемостаза

АКТИВИРОВАННОЕ ВРЕМЯ СВЕРТЫВАНИЯ (АВС) цельной крови – после добавления стандартного активатора (каолина).

Экспресс-анализаторы. Норма – 80-120 сек.

Активатор

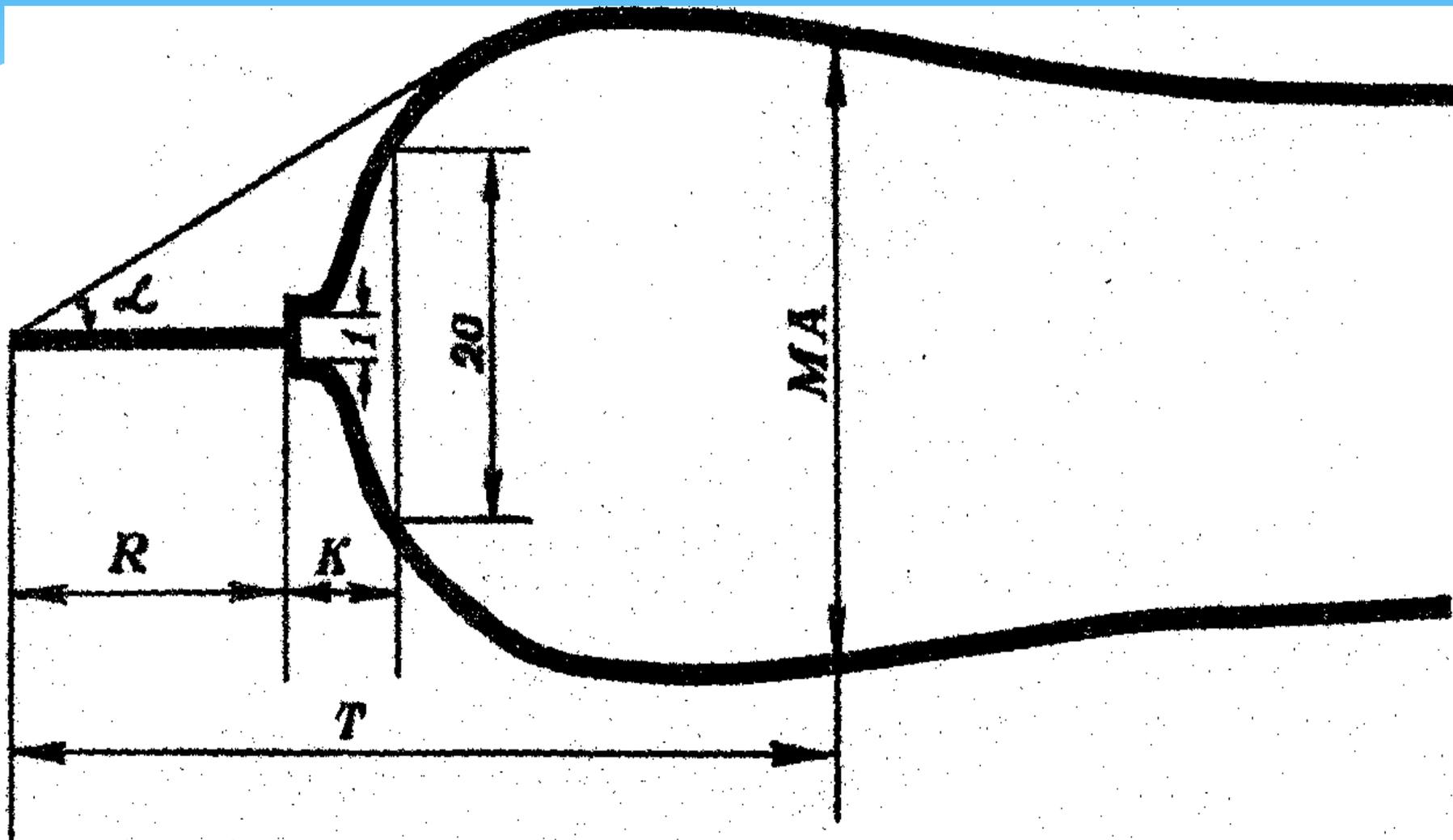
Интра-
операционный
мониторинг
гемостаза
(АИК, введение
гепарина и
протамин-сульфата).

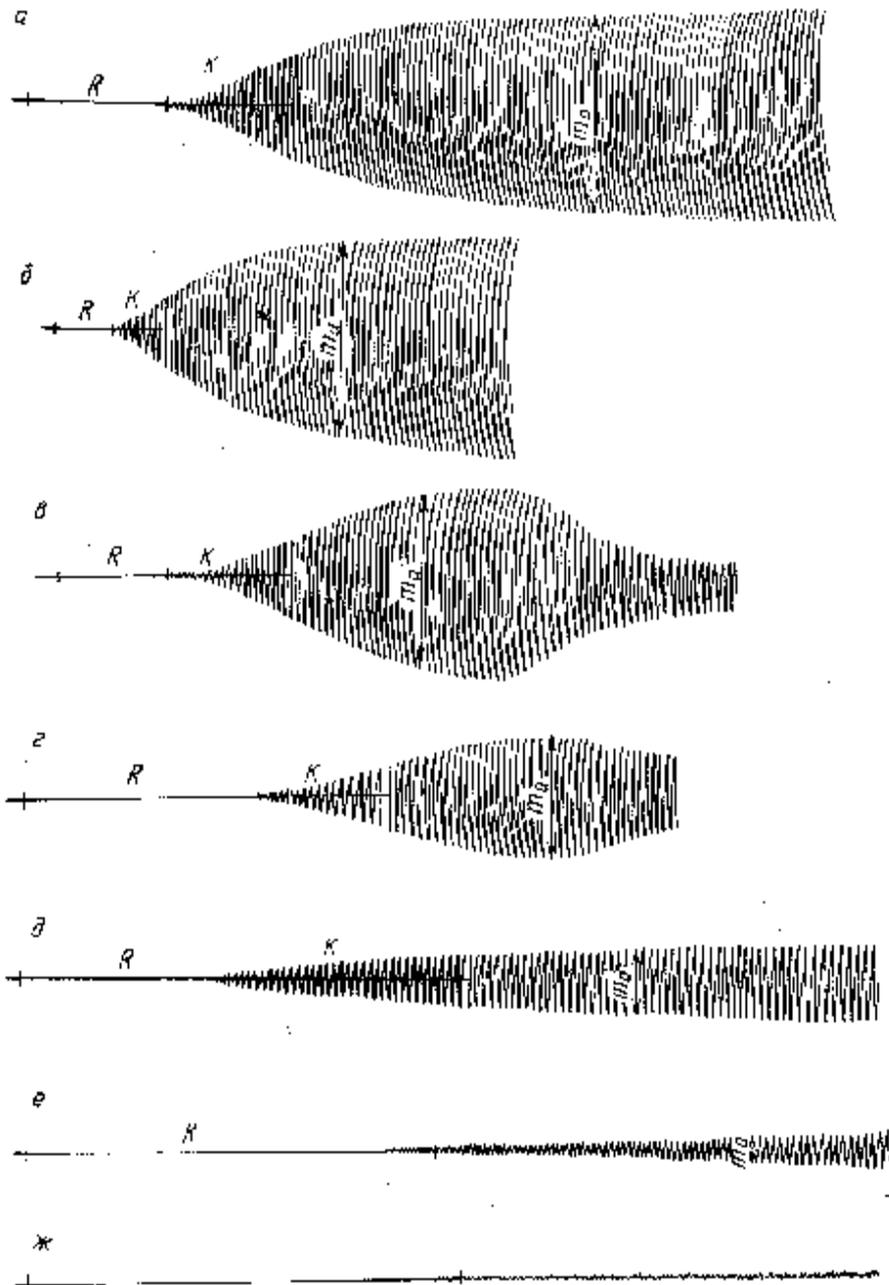


Тромбоэластография

- * **Тромбоэластография** - графическая регистрация процесса свертывания крови, позволяющая оценивать состояние системы гемостаза. Запись тромбоэластограммы производится с помощью прибора тромбоэластографа (гемокоагулографа) при постоянной температуре (37°C).
- * Принцип работы прибора заключается в изучении процесса свертывания крови в результате регистрации амплитуды колебаний стержня, вовлекаемого в колебательные движения кюветы с кровью. Кровь или плазму (6-7 капель) заливают в кювету, куда опускается цилиндр, подвешенный на тонкой стальной струне или пружине. Кювета с плазмой или кровью совершает маятникообразные движения, в которые при свертывании вовлекается цилиндр. Пока кровь жидкая цилиндр остается неподвижным, что соответствует прямому участку ТЭ. По мере образования нитей фибрина стержень начинает следовать за кюветой, причем угол поворота возрастает с увеличением эластичности сгустка. Через преобразователь электрические сигналы, регистрирующие угол поворота цилиндра, усиливаются и записываются писчиком на бумажной ленте.

Схема тромбоэластограммы и её констант





- а** – здорового человека
- б** – гиперкоагуляционная фаза ДВС-синдрома
- в** – переходная фаза
- г – ж** – гипокоагуляционная фаза

Основные исследования для уточнения причин кровоточивости

Тесты

- Время кровотечения по Айви
- Количество тромбоцитов
- Оценка функции тромбоцитов (адреналин, АДФ, ристомицин)
- АЧТВ
- Протромбиновое время
- Тромбиновое время
- Концентрация фибриногена
- Фактор Виллебранда
- Определение концентрации факторов (прежде всего VIII и IX)

Патологический уровень

более 10-12 мин

менее $80-100 \times 10^9/\text{л}$

снижение агрегации

гипокоагуляция (более 45 сек)

гипокоагуляция (ПО более 1,2)

значительно удлинено

менее 1,0 г/л

активность менее 50%

активность менее 25%

КОАГУЛОПАТИИ

Врожденные – изолированная недостаточность фактора (vWF, VIII, IX; реже - других)

Приобретенные – обычно сочетанная недостаточность нескольких факторов.



Коагулопатии

Гемофилия А – врожденная недостаточность ф.VIII (~ 1-3 :10000 населения). Тяжесть – по остаточному уровню фактора VIII.

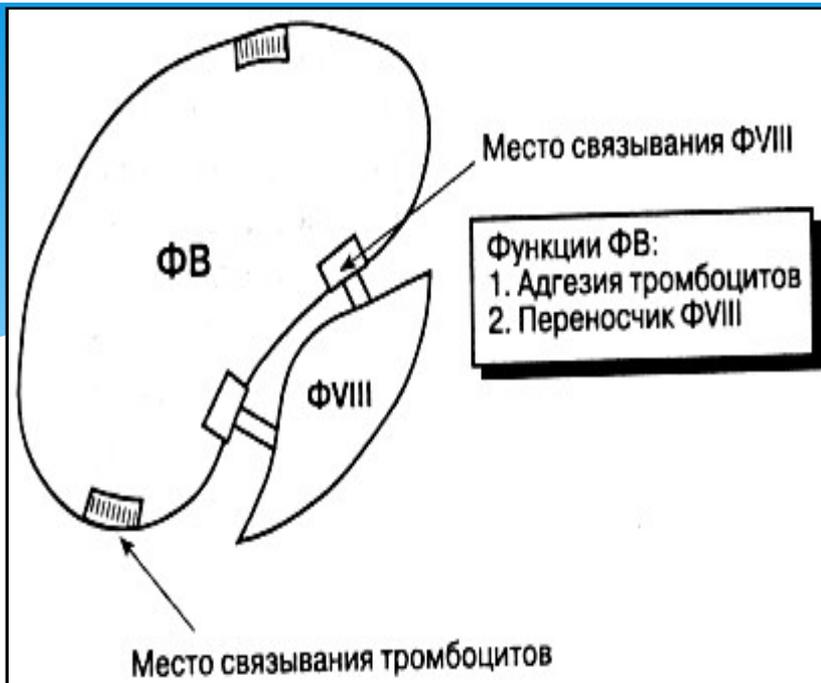
- *гематомный тип кровоточивости*: посттравматические кровоизлияния, гематомы, кровотечения из ЖКТ, после экстракции зуба, микро- макрогематурия и др.

Диагностика гемофилии:

- анамнез, клиника,
- ↑ времени свертывания крови и АЧТВ; коррекция при добавлении нормальной плазмы,
- нормальные ПВ, ТВ и функция ТЦ.

Диф. диагноз – коррекционные пробы с фактор-дефицитными плазмами, активность ф.VIII, титр ингибитора.

Болезнь Виллебранда



- **0,6 % до 1,3 %** в популяции.
- наследственный дефект / снижение выработки vWF.
- нарушение адгезии ТЦ => кровоточивость (петхимально-гематомная).

Диагностика:

1. ристоцетин-кофакторная активность (vWF:RCo – на агрегометре, реакция с ристомицином),
2. антиген фактора vWF:Ag – метод ИФА,
3. кол-во ТЦ, время кровотечения, АЧТВ, ПВ, активность ф.VIII, генетическая диагностика (?).

+ мультимеры vWF (электрофорез), связывание vWF с коллагеном в лунке

Дефицит витамина К

Причины:

- **Терапия** антибиотиками → угнетение кишечной микрофлоры,
- Холестаз, мальабсорбция, диета...

Диагностика:

↑ **ПВ**, **N-↑ АЧТВ**, сочетанное снижение **ф. II, V, IX, X, ПрС, ПрS** на фоне нормального содержания других факторов.

Патология печени

- **Нарушение синтеза** факторов гемостаза, кроме ф. VIII и фибриногена (в острых случаях),
- **Умеренная ТЦ-пения**,
- **Ускорение фибринолиза** (нарушение синтеза α_2 -АП, снижение печеночного клиренса t-РА), возможно развитие ДВС.

Диагностика:

↑ **ПВ** и **АЧТВ** (ПВ – в большей степени), **N-↑ фибриногена**, **ТЦ** и **ф. VIII**, сочетанное снижение **ф. II, V, VII, IX, XIII, АТ III, ПрС, ПрS**.

ВАЗОПАТИИ

Причины:

- **врожденные** – ангиоматоз, телеангиэктазии, болезнь Рандю-Ослера (недоразвитие субэндотелия),
- **геморрагическая пурпура** при инфекционных заболеваниях (корь, скарлатина, сыпной тиф...),
- **геморрагический васкулит** Шенлейн-Геноха.
- авитаминоз С и др.

Характерны-

телеангиэктазии

(сосудистые звездочки),
кровоточивость на фоне
воспаленной,
гиперемированной кожи.



Лабораторная оценка гемостаза при кровоточивости (USA)

Внутр. путь гемостаза	АЧТВ
Внешний путь гемостаза	ПВ / ПО / МНО
Фибринообразование	Фибриноген, ТВ или рептилазное время
Активность факторов	ф. II + V + VII или X (на базе ПВ), ф. VIII + IX + XI или XII (на базе АЧТВ), ф. XIII
Ингибиторы факторов	Микс-тесты ПВ / АЧТВ (с инкубацией), люпус-антикоагулянт, ингибиторы ф. VIII / IX
Болезнь Виллебранда	Активность ф. VIII, vWF:RCo, vWF:Ag, кривая ответа на ристоцетин, мультимеры vWF
Функция тромбоцитов	Агрегация ТЦ с АДФ, адреналином, тромбином, коллагеном, арахидонатом, ристоцетином
Фибринолиз	Лизис эуглобулинов, PAI-1
ДВС	D-димер (колич.), АЧТВ, ПВ, фибриноген



**Спасибо
за внимание !**