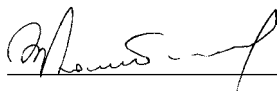


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

13 мая 2005 г.

Регистрационный № 150–1203

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА
ПОДТИПОВ БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА
И ТРОМБОЦИТОПАТИЙ
НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ТРОМБОЦИТОВ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии

Авторы: Д.Г. Цвирко, К.В. Сальников, Т.Н. Башманова, Н.Д. Волковец, Л.В. Лазаренко, В.В. Смольникова

Тромбоцитопатии представляют весьма распространенную группу геморрагических диатезов, с которой связано большинство встречающихся во врачебной практике геморрагических осложнений микроциркуляторного типа в виде пурпуры, рецидивирующих десневых и носовых кровотечений, мено- и метроррагий, гематурии и кровоизлияний во внутренние органы. По данным мировой литературы, среди наследственных нарушений гемостаза тромбоцитопатические состояния по частоте занимают первое место. Диагностика, дифференциация и лечение тромбоцитопатических состояний в клинической практике до сих пор затруднены, что не позволяет своевременно назначить направленное лечение и принять меры по социальной защите больного. Трудности диагностики связаны с изменчивостью форм этих заболеваний в период обострения и в период клинической ремиссии; ограниченной чувствительностью функциональных методов оценки полноценности тромбоцитов, особенно проявляющейся при выявлении начальных стадий и легких форм заболеваний, а также дисфункций тромбоцитов, обусловленных недостатком плазменного кофактора или наличием ингибитора функции тромбоцитов.

Среди вышеперечисленных состояний особое медико-социальное значение имеет болезнь Виллебранда. Практика показывает, что заподозрить болезнь Виллебранда можно только в тяжелых случаях, когда у больных выявляются все характерные клинико-лабораторные признаки. При легких, среднетяжелых формах заболевания и в период ремиссии диагностика болезни Виллебранда является весьма трудоемким и длительным процессом. Отсутствие четких критериев диагностики приводят к заниженным показателям распространенности данной нозологии. Кроме того, в Республике Беларусь до сих пор не диагностируются подтипы болезни Виллебранда у взрослых, что играет определяющую роль в лечении и профилактике осложнений, поскольку выбор соответствующей терапии зависит от варианта болезни.

Наследственные и приобретенные тромбоцитопатии часто своевременно не диагностируются, и больные долгое время безуспешно лечатся у специалистов различного профиля — акушеров-гинекологов, отоларингологов, стоматологов, хирургов и др., что ведет

к неоправданным оперативным вмешательствам и возникновению угрожающих жизни осложнений.

В настоящее время в Республике Беларусь широко внедрены автоматические и полуавтоматические коагулологические и агрегатометрические анализаторы отечественного производства — гемокоагулометр CGL 2110 и агрегометр AP 2110 (ЗАО «СОЛАР», г. Минск). Для выполнения гемостазиологических и агрегатометрических тестов на этих приборах используются стандартные тест-системы, что дает возможность максимально снизить неизбежные технические ошибки, возникающие при ручном исследовании, облегчить и ускорить воспроизведение методов и стандартизировать их.

ПРОГРАММА ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОРРАГИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО ТИПА

Алгоритм диагностики:

- анализ анамнестических данных;
- скрининговые тесты;
- оценка основных функций тромбоцитов;
- анализ уровня активности фактора Виллебранда;
- возможно использование тех или иных специфических методик (морфологических и иммунофенотипических), которые кратчайшим путем приводят к установлению диагноза на уровне локализации внутриклеточного дефекта тромбоцита.

Программа предполагает три этапа в обследовании больного.

I. Скрининговый этап обследования

Методы, включенные в этот раздел, предназначены для выявления изменений в том или ином звене гемостаза, а также устанавливают факт тромбоцитарной патологии у больного.

На основании жалоб пациента, особенностей геморрагических проявлений, семейного анамнеза можно установить ряд важнейших параметров:

- тип кровоточивости;
- характер патологии (врожденный или приобретенный);
- тип наследования;
- тяжесть геморрагического синдрома.

Основной вопрос, на который необходимо ответить на этом этапе, — являются ли кровотечения у больного следствием нарушений в системе гемостаза или они связаны с местными сосудисто-тканевыми изменениями. В таблице перечислены возможные проявления кровотечений и их дифференциально-диагностическое значение.

**Возможные проявления кровотечений
и их дифференциально-диагностическое значение**

Вид кровоточивости	Другие наиболее частые причины повышенной кровоточивости
Носовые кровотечения	Местный дефект (ринит, дефект сосудов сплетения Киссельбаха) или артериальная гипертензия
Десневые кровотечения	Пародонтоз
Меноррагии	Полипы, эрозии, опухоли гениталий
Гематурия	Местное повреждение урологического тракта (камни, опухоли, полипы)
Желудочно-кишечные кровотечения	Язвенные поражения слизистой, опухоли желудочно-кишечного тракта
Кровохарканье	Тромбоэмболия легочной артерии, рак легких или туберкулез

Каждому пациенту с геморрагическими проявлениями микроциркуляторного типа обязательно должна быть выполнена ориентировочная коагулограмма, поскольку капиллярная кровоточивость может наблюдаться при ряде коагулопатий (например, дефицит VII или X фактора), а также это необходимо для диагностики нарушений, в основе которых лежит изменение нескольких звеньев гемостаза (например, болезнь Виллебранда, дисфибриногенемия, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови).

Коагулограмма этапа I должна включать исследования:

- 1) активированного частичного тромбопластинового времени;
- 2) протромбинового времени с определением международного нормализованного отношения (МНО);
- 3) количества фибриногена;
- 4) определение количества тромбоцитов.

Набор из этих тестов, являясь минимально необходимым для первичной диагностики, направлен на получение общего представления

о свертывающем и противосвертывающем потенциале крови пациента, а также о состоянии того или иного звена системы гемостаза.

II. Функциональный этап обследования

Методы, включенные в этот раздел, позволяют выявить у большинства больных характер тромбоцитопатического синдрома в зависимости от механизмов нарушений тромбоцитов. Для дифференциальной диагностики дефекта тромбоцитов необходимо исследовать их функциональные свойства посредством измерения агрегации тромбоцитов под влиянием основных индукторов — АДФ, адреналина, коллагена, ристоцетина, а также используемых реже — тромбина и арахидоновой кислоты.

С диагностической целью рекомендуется применять комплекс агрегирующих агентов, каждый из которых преимущественно характеризует состояние отдельных реакций: состояние мембранных рецепторов (I фаза агрегации), наличие необходимых кофакторов (например, фактора Виллебранда при ристоцетин-агрегации), способность к реакции освобождения (коллаген-агрегация и II фаза агрегации при применении больших доз АДФ, адреналина). Кроме того, выбор индуктора агрегации может играть решающее дифференциально-диагностическое значение при некоторых формах тромбоцитопатий.

Результаты этих исследований позволяют диагностировать тромбоцитопатии, нозологическая принадлежность которых обусловлена характерным нарушением тех или иных функциональных свойств тромбоцитов или их сочетанием. Кроме того, для верификации диагноза болезни Виллебранда и распределения по подтипам требуются следующие тесты:

- 1) определение ристоцетин-кофакторной активности фактора Виллебранда в плазме;
- 2) исследование уровня VIII фактора в плазме;
- 3) исследование уровня антигена фактора Виллебранда в плазме (по возможности).

III. Функционально-морфологический этап обследования

Оценка морфологических особенностей тромбоцитов в мазке периферической крови, окрашенной по Романовскому — Гимзе, под-

счет тромбоцитов в крови и определение их размера в мазке являются важной частью диагностики тромбоцитарной патологии — при наследственных тромбоцитопатиях наблюдаются формы с микроцитозом (синдром Вискотта — Олдрича) или преобладанием гигантских форм кровяных пластинок (аномалии Бернара — Сулье).

В заключение необходимо отметить, что не во всех ситуациях диагностический поиск проходит через все предложенные программы алгоритма. Тщательно собранный анамнез и клиническое обследование в ряде случаев позволяют сразу же поставить правильный диагноз. Следует также учесть, что изменения лабораторных тестов часто обнаруживаются только в момент геморрагического эпизода. Нормальные лабораторные показатели у больных, имевших в анамнезе повышенную кровоточивость, не свидетельствуют об отсутствии у них геморрагического диатеза. В таких случаях рекомендуются повторные, а зачастую и многократные обследования. Часть лабораторных тестов, применяемых для исследования системы гемостаза, недостаточно чувствительны, особенно при выявлении начальных стадий и легких форм заболеваний. Нужно отметить, что и признаки кровоточивости появляются обычно тогда, когда содержание какого-либо фактора становится ниже критического уровня. Кроме того, при верификации наследственного характера патологии необходимо обследование родственников больного.

Ниже приводятся рекомендуемые тесты и методики для проведения дифференциальной диагностики тромбоцитопатий и подтипов болезни Виллебранда.

**КОМПЛЕКС МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПЕРВИЧНОГО (ТРОМБОЦИТАРНОГО) ГЕМОСТАЗА**

Требования техники безопасности

Работа с кровью и реагентами проводится с использованием средств индивидуальной защиты (халат, фартук, резиновые перчатки, защитные очки). Отработанные образцы крови, лабораторная посуда, перевязочный материал и другие предметы, контактирующие с кровью, собираются в отдельные специальные промаркированные емкости для последующей дезинфекции.

Перечень необходимого оборудования и реактивов

Перечень оборудования:

- анализатор агрегации тромбоцитов AP 2110 ЗАО «СОЛАР»;
- компьютер класса IBM PC/AT 286 и выше, имеющий последовательный интерфейс RS 232C и оснащенный специализированным программным обеспечением;
- блок подготовки проб PT 2110G ТУ РБ 14515311.006-96 (внешний термостат);
- кюветы полистирольные одноразовые;
- якоря магнитные;
- полистирольные мерные пробирки с пробкой из полиэтилена емкостью 10 мл;
- центрифуга ОПн-5;
- пробирки центрифужные;
- пробирки Эппендорф емкостью 1,5–2,0 мл;
- автоматические дозаторы на 50, 100, 200, 500 и 1000 мкл;
- наконечники для автоматических дозаторов;
- холодильники, морозильник (-20°C);
- штатив для пробирок.

Перечень реактивов:

- индукторы агрегации (АДФ, ристоцетин, коллаген, адреналин);
- донорская пул-плазма;
- исследуемая стабилизированная кровь;
- исследуемая богатая тромбоцитами плазма;
- исследуемая бестромбоцитная плазма;
- 3,8% раствор цитрата натрия;

- хлорид натрия, изотонический раствор 0,9% для инъекций;
- дистиллированная вода.

Приготовление реактивов

1. Приготовление 3,8% раствора цитрата натрия. Растворяют 3,8 г цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5 \text{H}_2\text{O}$) в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в холодильнике. Легко подвергается бактериальному загрязнению, в связи с чем раствор хранят не более недели.

2. Приготовление стабилизированной крови. В пластиковую мерную пробирку набирают антикоагулянт, ориентируясь на необходимый для исследования объем крови, в соотношении 1:9. Пункцируют локтевую вену, подставляют пробирку и собирают свободно вытекающую кровь до нужной метки. Немедленно перемешивают кровь с антикоагулянтом, не допуская образования воздушных пузырей. Пробирка до центрифугирования хранится при температуре 4 °С.

3. Приготовление богатой тромбоцитами плазмы. Для исключения контактной активации тромбоцитов в работе используется только пластмассовая или силиконовая посуда (кюветы, пробирки, пипетки). Кровь центрифугируют на малых оборотах (7 мин при 1000 об./мин). Из каждой пробирки осторожно отбирается по 2–3 мл супернатанта (верхнего слоя) в пластиковую кювету для исследования. Оставшуюся кровь снова центрифугируют для приготовления бестромбоцитной плазмы (см. ниже). Плазма, богатая тромбоцитами, используется для исследования функциональной активности тромбоцитов, бестромбоцитная плазма — для калибровки шкалы оптической плотности прибора и, при необходимости, для разведения богатой тромбоцитами плазмы до стандартного содержания клеток, которое должно составлять $200\text{--}250 \times 10^9/\text{л}$. В случае низкого содержания тромбоцитов (менее $200 \times 10^9/\text{л}$) результат исследования не является достоверным.

4. Приготовление бедной тромбоцитами плазмы. Оставшаяся кровь центрифугируется при 3000 об./мин в течение 15 мин. Из каждой пробирки осторожно отбирается по 2–3 мл супернатанта (верхнего слоя) в пластиковую кювету.

5. Донорская пул-плазма. Используют для проверки реактивов и для проведения коррекционно-ингибиторных проб. От 3–5 доно-

ров, предварительно коагулологически обследованных, берут венозную кровь и получают из нее бедную тромбоцитами плазму. Полученную от всех доноров плазму смешивают в равных количествах и разливают в пластиковые пробирки Эппендорф по 1,0–1,5 мл, плотно закупоривают и хранят при -20°C не более 2 недель. Для работы плазму размораживают при 37°C (повторно не замораживать!). Во время работы пробирку с плазмой держат в ледяной бане.

Определение количества тромбоцитов

Подсчет тромбоцитов производился в рамках общего анализа крови: ручным (визуальным) методом в мазке периферической крови или с использованием гематологических анализаторов. Кроме того, эти приборы позволили анализировать ряд новых параметров тромбоцитов (MPV, PDW, Pct), которые имеют существенное значение в диагностике.

Агрегация тромбоцитов под влиянием основных индукторов (АДФ, коллагена, ристоцетина, адреналина)

Агрегатометрия является незаменимым методом в клинической и экспериментальной научно-исследовательской работе для исследования механизмов агрегации, лабораторной оценки как повышенной агрегационной активности тромбоцитов, так и сниженной их способности к агрегации, а также для изучения влияния на тромбоциты различных соединений и фармакологических препаратов.

Принцип метода

Процесс агрегации, индуцируемый добавлением к богатой тромбоцитами исследуемой плазме стандартного количества агониста агрегации тромбоцитов, регистрируется фотометрически по падению ее оптической плотности.

Приготовление реагентов

АДФ. В лабораторной практике менее трудоемким является использование диагностических наборов, содержащих требуемые агрегирующие агенты с указанием способа их подготовки к работе, величин конечных концентраций в пробах при различных разведениях, интерпретации полученных результатов. В инструкциях к наборам, содержащим АДФ, указываются величины малой, средней и большой концентраций АДФ, вызывающих, соответственно, пер-

вичную (обратимую), двухфазную и однофазную (необратимую) агрегацию тромбоцитов.

Ристоцетин. Внести во флакон с 1,5% лиофилизированным раствором ристоцетина 0,5 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при покачивании и выдержать 20 мин при комнатной температуре. Раствор ристоцетина можно хранить в течение 2 недель при температуре 2–8° С, не замораживать.

Адреналин. Рекомендуемые растворы адреналина могутготавливаться из ампульного 0,1% хлористоводородного адреналина. Предлагаемая конечная концентрация для данного исследования $2,5\text{--}5,0 \times 10^{-6}$ моль.

Разведение и конечная концентрация адреналина в системе теста

	Разведение	Конечная концентрация в системе теста
А. Адреналин ампульный	1 мг/мл (1000 мкг/мл)	100 мкг/мл (5×10^{-4} моль)
Б. 9,9 мл физиологического раствора + 0,1 мл из раствора А	1:100 (10 мкг/мл)	1 мкг/мл (5×10^{-6} моль)
В. 0,5 мл физиологического раствора + 0,5 мл из раствора Б	1:200 (5 мкг/мл)	0,5 мкг/мл ($2,5 \times 10^{-6}$ моль)

При использовании адреналина из диагностических наборов приготовление рабочих растворов осуществляется согласно инструкции.

Коллаген. Внести во флакон с 0,2% лиофилизированным раствором коллагена 0,5 мл физиологического раствора, растворить содержимое при покачивании и выдержать 20 мин при комнатной температуре. Раствор коллагена можно хранить в течение 1 мес. при температуре 2–8° С, не замораживать.

Выполнение метода

Запустить на ПЭВМ программу анализа агрегационных свойств тромбоцитов АР.ЕХЕ согласно документации на программу. Последовательным нажатием кнопки «Mode» выбрать требуемый режим работы агрегометра (АР). Открыть крышку кюветного отделения и установить в него кювету с бестромбоцитной плазмой (500 мкл (300 мкл)), закрыть крышку кюветного отделения и нажать кнопку «Zero». После измерения коэффициента пропускания установлен-

ной плазмы в правой части индикатора появится значение 100,0. Вынуть из кюветного отделения кювету с бестромбоцитной плазмой и на ее место установить кювету с плазмой, богатой тромбоцитами (450 мкл (270 мкл)), отпустить в кювету магнитный якорь и закрыть крышку кюветного отделения. Нажать кнопку «Start». Произвести запись спонтанной агрегации. При этом программа графически отображает этот процесс в окне графика на экране ПЭВМ. Открыть крышку кюветного отделения, добавить в кювету реагент — индуктор агрегации (50 мкл (30мкл)), закрыть крышку и еще раз нажать на кнопку «Start». Срабатывание кнопки подтверждается звуковым сигналом. Программа начнет запись агрегации с выводом агрегационной кривой в окно графика на экране ПЭВМ. Произвести запись кривой агрегации тромбоцитов. По окончании записи нажать кнопку «Stop» на агрегометре. После этого можно распечатать произведенную запись агрегации и сохранить ее в базе данных.

Трактовка результатов

АДФ-индуцированная агрегация. АДФ представляет собой один из главных индукторов агрегации. Дозозависимая АДФ-индуцированная агрегация является удобной моделью как для исследования первичной агрегации тромбоцитов (I фазы), так и для оценки секреторных процессов в тромбоцитарных гранулах и реакции освобождения содержащихся в них биологически активных субстанций (II фазы). Выраженность АДФ-агрегации при стандартном содержании тромбоцитов в плазме, постоянной температуре и скорости перемешивания зависит только от применяемой концентрации АДФ.

Используя растворы АДФ различной концентрации, у здоровых лиц можно получить 3 вида агрегационных кривых:

- под действием малой дозы АДФ происходит только первичная (обратимая) агрегация;
- средняя концентрация АДФ позволяет получить двухфазную агрегационную кривую, отражающую процессы первичной и вторичной агрегации. Эта концентрация является наиболее подходящей для диагностических обследований больных с кровоточивостью, наследственными или приобретенными тромбоцитопатиями;
- большие дозы АДФ вызывают однофазную необратимую агрегацию. Агрегация происходит с такой силой и скоростью, что

переход первичной во вторичную фазу агрегации различить невозможно.

Исследование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при проявлениях кровоточивости позволяет определить, возникает ли первичная агрегация под влиянием АДФ и определяется ли двуфазная агрегация. В случае тромбастении Гланцманна, эссенциальной атромбии АДФ вообще не вызывает агрегацию тромбоцитов. В случае нарушений реакции освобождения наблюдается лишь первичная агрегация или ослабление вторичной. При приеме антиагрегантов (аспирин) исчезает или редуцируется вторичная агрегация (нарушение реакций освобождения).

Ристоцетин-агрегация. Ристоцетин- (ристомидин, аггрестин) агрегация тромбоцитов является одним из важнейших критериев диагностики болезни Виллебранда. Эта методика основывается на способности антибиотика ристоцетина при наличии на мембране тромбоцитов специфических гликопротеиновых рецепторов (ГП Ib-IX) в присутствии фактора Виллебранда вызывать агрегацию тромбоцитов. При болезни Виллебранда имеется дефект или снижение уровня плазменного фактора Виллебранда, в результате чего агрегация тромбоцитов приобретает патологический характер. В настоящее время используются следующие стандартные концентрации ристоцетина: 0,8; 0,9; 1,0 мг/мл. При подозрении на синдром Виллебранда тромбоцитарного типа или подтип 2В болезни Виллебранда дополнительно используются концентрации ристоцетина 0,6 мг/мл. В случаях выявления сниженной ристоцетин-агрегации со стандартными концентрациями необходимо исследовать, может ли донорская пул-плазма корректировать эту патологию. В этом случае состав системы является следующим: 300 мкл (180 мкл) богатой тромбоцитами плазмы больного + 150 мкл (90 мкл) донорской пул-плазмы инкубируют в течение 1 мин. И добавляют 50 (30 мкл) раствора ристоцетина. Наличие коррекции указывает на дефицит плазменного фактора Виллебранда у больного (I и III типы).

Следует помнить, что ристоцетин может вызывать преципитацию плазменных белков, приводящую к ложноположительным результатам, а также что ристоцетин-агрегация ингибируется при уремии, антибиотиком ванкомицином, парапротеинами и рядом

пептидов, связывающих ристоцетин или блокирующих рецепторы на поверхности тромбоцитов.

Адреналиновая агрегация. Агрегация, вызванная адреналином, похожа на агрегацию, индуцированную АДФ, но этому виду агрегации не предшествует изменение формы тромбоцитов. Кроме того, адреналиновая агрегация намного меньше зависит от концентрации индуктора, поэтому является наиболее подходящим методом для диагностических исследований при кровоточивости.

Коллагеновая агрегация. Коллаген вызывает агрегацию тромбоцитов с выраженным латентным периодом перед единственной фазой агрегации. По механизму и времени развития эта единственная волна соответствует второй фазе двухволновых кривых. Коллагеновая агрегация обусловлена прежде всего высвобождением из тромбоцитов адениновых нуклеотидов, поэтому является наиболее простым способом оценки секреторной функции тромбоцитов. Подобные изменения функциональных свойств тромбоцитов чаще наблюдаются при приобретенных формах тромбоцитопатий — лейкозах, уремии, заболеваниях печени, ДВС, а также при действии тромбоцитарных антител, иммунных комплексов, антиагрегантных препаратов. Нарушение секреции лежит также в основе наследственных тромбоцитопатий, таких как патология рецептора коллагена (дефицит гликопротеинов Ia-IIa или VI), тромбастения Гланцмана, синдром «серых» тромбоцитов, дефицит пула хранения и др.

Возможные ошибки при выполнении метода:

- низкий уровень тромбоцитов;
- несоблюдение температурных режимов хранения реагентов;
- нарушение объемных характеристик используемых реагентов и плазмы;
- использование липемической плазмы или плазмы с гемолизом эритроцитов;
- нарушение техники пипетирования.

Противопоказания к применению отсутствуют.

Определение активности плазменного фактора Виллебранда по ристоцетин-кофакторной активности тромбоцитов

Основная роль фактора Виллебранда реализуется в реакциях сосудисто-тромбоцитарного взаимодействия на стадиях адгезии и агрегации тромбоцитов, а также в качестве белка-носителя для фактора VIII, обеспечивая ему стабильность в кровотоке и доставку в нужной концентрации к месту повреждения. Фактор Виллебранда является важнейшим маркером альтерации эндотелия и состояния микроциркуляторного гемостаза.

Показания к применению

Снижение содержания фактора Виллебранда или отсутствие его функциональной активности является основной причиной болезни Виллебранда, поэтому определение его активности является одним из самых главных диагностических тестов.

Принцип метода

Метод определения активности фактора Виллебранда основан на его способности вызывать агрегацию тромбоцитов в присутствии антибиотика ристоцетина, причем способность к такой агглютинации находится в линейной зависимости от плазменной концентрации фактора Виллебранда. Кроме того, данная способность сохраняется у тромбоцитов после их фиксации формальдегидом, когда полностью утрачивается реакция на другие индукторы агрегации.

Реагенты:

- фиксированные человеческие тромбоциты, лиофильно высушенные;
- имидазоловый буфер;
- ристомидин (ристоцетин);
- исследуемая бестромбоцитная плазма.

Приготовление реагентов

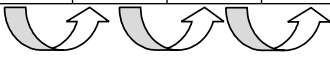
Приготовление стандартной суспензии тромбоцитов: во флакон с лиофильно высушенными человеческими тромбоцитами внести 1 мл дистиллированной воды и 3 мл физиологического раствора, тщательно перемешать, избегая вспенивания. После выдерживания при комнатной температуре в течение 4 ч реагент готов к работе. Хранить при комнатной температуре в течение 4 ч, не замораживать.

Приготовление имидазолового буфера: перелить содержимое флакона с концентратом буфера (5 мл) в мерную колбу вместимостью 100 мл и развести в 20 раз дистиллированной водой (до 100 мл). рН полученного раствора равен 7,4. Можно хранить при температуре 4° С в течение 20 дней.

Выполнение метода

Бестромбоцитную плазму (25 мкл) — исследуемый образец или разведения (см. ниже) донорской пул-плазмы — смешивают со стандартной суспензией тромбоцитов (250 мкл). К полученной смеси добавляют ристоцетин (25 мкл) и измеряют агрегацию тромбоцитов по трем основным показателям (скорость, степень, время агрегации). По калибровочному графику (строится на основе степени агрегации тромбоцитов) находят активность фактора Виллебранда (%) в плазме.

Построение калибровочной кривой проводится непосредственно перед проведением анализов. Для этого образец донорской пул-плазмы разбавляется по следующей схеме:

Пробирка №	1	2	3	4
Активность фактора Виллебранда, %	100	50	25	12,5
Объем образца, мкл	200	200	200	200
Донорская пул-плазма, мкл	200			
Имидазоловый буфер, мкл	–	100	100	100
				
Перемешать и перенести в следующую пробирку	100	100	100	

Нормальные показатели

В плазме здоровых лиц активность фактора Виллебранда составляет 50–150%.

Возможные ошибки при выполнении метода:

- использование липемической плазмы или плазмы с гемолизом эритроцитов;
- несоблюдение температурных режимов хранения реагентов;
- нарушение объемных характеристик используемых реагентов и плазмы;
- нарушение техники пипетирования.

Противопоказания к применению отсутствуют.

КОМПЛЕКС МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ВТОРИЧНОГО (КОАГУЛЯЦИОННОГО) ГЕМОСТАЗА

Требования техники безопасности

Работа с кровью и реагентами проводится с использованием средств индивидуальной защиты (халат, фартук, резиновые перчатки, защитные очки). Отработанные образцы крови, лабораторная посуда, перевязочный материал и другие предметы, контактирующие с кровью, собираются в отдельные специальные промаркированные емкости для последующей дезинфекции.

Перечень необходимого оборудования и реактивов

Необходимое оборудование:

- гемокоагулометр (турбидиметрический) CGL 2110 ЗАО «СОЛАР»;
- блок подготовки проб РТ 2110G ТУ РБ 14515311.006-96 (внешний термостат);
- кюветы полистирольные одноразовые;
- якоря магнитные;
- полистирольные мерные пробирки с пробкой из полиэтилена емкостью 10 мл;
- центрифуга ОПн-5;
- пробирки центрифужные;
- пробирки Эппендорф емкостью 1,5–2,0 мл;
- автоматические дозаторы на 100, 200 и 1000 мкл;
- наконечники для автоматических дозаторов;
- холодильники, морозильник (-20°C);
- штатив для пробирок.

Перечень реактивов:

- диагностические тест-наборы для коагулологических исследований;
- донорская пул-плазма;
- исследуемая стабилизированная кровь;
- исследуемая бестромбоцитная плазма;
- 3,8% раствор цитрата натрия;
- хлорид натрия, изотонический раствор 0,9% для инъекций;
- дистиллированная вода.

Приготовление реактивов

1. Приготовление 3,8% раствора цитрата натрия. Растворяют 3,8 г цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5 \text{H}_2\text{O}$) в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в холодильнике. Легко подвергается бактериальному загрязнению, в связи с чем раствор хранят не более недели.

2. Приготовление стабилизированной крови. В пластиковую мерную пробирку набирают антикоагулянт, ориентируясь на необходимый для исследования объем крови, в соотношении 1:9. Пункцируют локтевую вену, подставляют пробирку и собирают свободно вытекающую кровь до нужной метки. Немедленно перемешивают кровь с антикоагулянтом, не допуская образования воздушных пузырей. Пробирка до центрифугирования хранится при температуре 4°C .

3. Приготовление бедной тромбоцитами плазмы. Цельная кровь центрифугируется при 3000 об./мин в течение 15 мин. Из каждой пробирки осторожно отбирается по 2–3 мл супернатанта (верхнего слоя) в пластиковую кювету для исследования.

4. Донорская пул-плазма. Используют для проверки реактивов и для проведения коррекционно-ингибиторных проб. От 5–10 доноров, предварительно коагулологически обследованных, берут венозную кровь и получают из нее бедную тромбоцитами плазму. Полученную от всех доноров плазму смешивают в равных количествах и разливают в пластиковые пробирки Эппендорф по 1,0–1,5 мл, плотно закупоривают и хранят при -20°C не более 2 недель. Для работы плазму размораживают при 37°C (повторно не замораживать!). Во время работы пробирку с плазмой держат в ледяной бане.

Определение активированного частичного тромбопластинового времени (по Саен)

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) является самым чувствительным тестом для оценки внутреннего пути I фазы свертывания крови — протромбиназообразования. АЧТВ чувствительно к изменению активности факторов внутренней системы активации (факторов VIII, IX, XI, XII и фактора Флетчера), хотя легкий недостаток (>20 – 30%) этих факторов на нем не отражается.

Показания к применению

Тест АЧТВ позволяет выявить функциональную недостаточность всех факторов внутреннего пути свертывания, а также дефицит прекалликреина (фактора Флетчера) и высокомолекулярного кининогена (фактора Фитцджеральда). АЧТВ-тест используется как для диагностики коагулопатий, так и для наблюдения за эффективностью гепаринотерапии. При болезни Виллебранда увеличение АЧТВ косвенно указывает на дефицит VIII фактора.

Принцип метода

При добавлении к цитратной (рекальцифицированной) плазме активатора (эллаговая кислота) в условиях фосфолипидной (соя) активации время образования сгустка фибрина зависит только от активности в данной плазме факторов свертывания: I, II, VIII, IX, X, XI и XII.

Реагенты:

- АЧТВ-реагент (1 мг/мл соевых фосфолипидов в 0,1 мМ эллаговой кислоте, буфер, стабилизатор) лиофилизированный;
- раствор хлорида кальция 0,025 (10 мл).

Приготовление АЧТВ-реагента

Внести во флакон с лиофилизированным реагентом 2 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании и выдержать при комнатной температуре в течение 1 ч. Допускается хранить при температуре 2–8° С.

Выполнение метода

В пробирке смешивают 0,1 мл исследуемой бестромбоцитной плазмы и 0,1 мл АЧТВ-реагента. Смесь инкубируют при 37° С точно в течение 3 мин, затем добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция и включают секундомер (таймер коагулометра). Время образования сгустка является АЧТВ исследуемой плазмы.

При работе с реагентами, требующими инкубации в течение 180 с, необходимо провести следующие операции:

- нажать кнопку «Reset» и повторно кнопку «Warm», после чего начнется повторный цикл отсчета времени инкубации, равный 120 с;
- дождаться появления на индикаторе коагулометра 60 с и нажать кнопку «Start», при этом на индикаторе появится символ «Add», сопровождаемый звуковым сигналом, — прибор готов к добавлению реагента.

Нормальные показатели — 20–40 с.

Возможные ошибки при выполнении метода:

- несоблюдение температурных режимов хранения реагентов и плазмы;
- нарушение объемных характеристик используемых реагентов и плазмы;
- нарушение техники пипетирования.

Противопоказания к применению отсутствуют.

Определение протромбинового времени (по Quick) с определением МНО

Протромбиновое время является наиболее чувствительным тестом для оценки образования тромбина. Для получения нормальных результатов протромбинового времени необходимы все факторы I и II фаз свертывания крови, особенно факторы «протромбинового комплекса».

Показания к применению

Протромбиновое время является наиболее чувствительным тестом для оценки II фазы свертывания крови — образования тромбина. Используется протромбиновое время для:

- диагностики врожденного дефицита факторов протромбинового комплекса (II, V, VII, X);
- диагностики приобретенной недостаточности факторов протромбинового комплекса (например, при поражениях печени);
- контроля антикоагулянтной терапии.

Принцип метода

При избытке тромбопластина с оптимальным содержанием кальция и фибриногена в плазме время образования сгустка зависит от активности факторов протромбинового комплекса (II, VII, IX, X). На этом основании в реакционную смесь вводят тканевый тромбопластин и хлорид кальция. Источником факторов протромбинового комплекса служит исследуемая плазма. Если в ней снижена активность одного или нескольких факторов протромбинового комплекса, то время образования сгустка в плазме будет замедлено. Если же содержание факторов протромбинового комплекса достаточно для превращения протромбина в тромбин, действие последнего на фибриноген замедляется под влиянием антикоагулянтов

(антитромбинов) в основном гепарина, и при очень низком содержании фибриногена в плазме (ниже 1 г/л).

Реагенты:

– лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь с аттестованным международным индексом чувствительности.

Приготовление реагента

Внести во флакон с лиофилизированным реагентом 2,0 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании и выдержать при 37° С в течение 20 мин. Перед каждым определением разведенный реагент перемешать, чтобы не было осадка. Хранить не более 7 дней при температуре 2–8° С.

Выполнение метода

Перед исследованием определяют протромбиновое время донорской пул-плазмы (ПВ₁). Для этого в кювету вносят 0,1 мл плазмы, инкубируют 1 мин при 37° С, затем добавляют 0,2 мл разведенного техпластина. Время от момента добавления техпластина до образования сгустка соответствует протромбиновому времени и выражается в секундах. Протромбиновое время донорской пул-плазмы принимается за 100%. Аналогично определяют протромбиновое время исследуемой бестромбоцитной плазмы (ПВ₂).

Нормальные показатели

Нормальное протромбиновое время должно быть в пределах 12–15 с. МНО рассчитывают по формуле:

$$\text{МНО} = \left(\frac{\text{ПВ}_2}{\text{ПВ}_1} \right)^{\text{МИЧ}},$$

где ПВ₁ — протромбиновое время донорской пул-плазмы;

ПВ₂ — протромбиновое время исследуемой плазмы;

МИЧ — международный индекс чувствительности.

Возможные ошибки при выполнении метода:

– несоблюдение температурных режимов хранения реагентов и плазмы;

– нарушение объемных характеристик используемых реагентов и плазмы;

– нарушение техники пипетирования.

Противопоказания к применению отсутствуют.

Метод определения уровня фибриногена А (по Claus)

Показания к применению

Показания теста нарушаются при гипо- и дисфибриногемии, при введении в организм гепарина и других антикоагулянтов, при нарастании уровня ПДФ, нарушающих процесс сборки фибрин-мономеров. Учет показаний этого теста важен для правильной трактовки сдвигов во всех других коагуляционных пробах, так как замедление конечного этапа свертывания неизбежно нарушает их показания.

Принцип метода

В тромбиновом тесте оценивается конечный этап свертывания крови по времени коагуляции цитратной плазмы под влиянием стандартного количества тромбина.

Реагенты:

- тромбин человека, лиофильно высушенный;
- стабилизатор (этиленгликоль — 1 мл).

Приготовление реагентов

Стабилизированный раствор тромбина. Внести во флакон с лиофильно высушенным тромбином 1 мл дистиллированной воды и 0,2 мл стабилизатора. Рекомендуется хранить в морозильной камере не более 1 мес.

Рабочий раствор тромбина. Следует готовить *ex tempore* за 1 ч до проведения анализа. Рабочий раствор получают разведением стабилизированного раствора тромбина в 20 раз: 0,1 мл (0,05 мл) стабилизированного тромбина + 1,9 мл (0,95 мл) физиологического раствора. Рабочий раствор не хранить!

Выполнение метода

0,2 мл исследуемой бестромбоцитной плазмы инкубируют 2 мин при температуре 37° С, затем добавляют 0,2 мл рабочего раствора тромбина (18–25° С). Время от момента добавления тромбина до образования сгустка соответствует тромбиновому времени и выражается в секундах. По калибровочной кривой находим соответствующее тромбиновому времени значение уровня фибриногена А в г/л.

Нормальные показатели

В нормальной плазме тромбиновое время составляет 15–17 с; у здоровых людей концентрация фибриногена в плазме колеблется в пределах 2–4 г/л.

Возможные ошибки при выполнении метода:

- изменение активности раствора тромбина при неправильном хранении;
- несоблюдение температурных режимов хранения реагентов и плазмы;
- нарушение объемных характеристик используемых реагентов и плазмы;
- нарушение техники пипетирования.

Противопоказания к применению отсутствуют.

Определение активности VIII фактора в плазме

Принцип метода При добавлении к цитратной (рекальцифицированной) плазме активатора (эллаговая кислота) в условиях фосфолипидной (соя) активации время образования сгустка фибрина зависит только от активности в данной плазме факторов свертывания: I, II, VIII, IX, X, XI и XII.

Реагенты:

- АЧТВ-реагент (1 мг/мл соевых фосфолипидов в 0,1 мМ эллаговой кислоте, буфер, стабилизатор) лиофилизированный;
- раствор хлорида кальция 0,025 (10 мл);
- плазма субстратная, дефицитная по VIII фактору (стабилизированная, лиофильно высушенная, с активностью VIII фактора менее 2%).

Приготовление АЧТВ-реагента

Внести во флакон с лиофилизированным реагентом 2 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании и выдержать при комнатной температуре в течение 1 ч. Допускается хранить при температуре 2–8° С.

Приготовление исследуемой плазмы

Исследуемую бестромбоцитную плазму развести 0,85% физиологическим раствором в 10 раз (1 объемная часть плазмы и 9 объемных частей буферированного физиологического раствора).

Выполнение метода

В пробирке смешивают 0,05 мл исследуемой разведенной плазмы, 0,05 мл дефицитной плазмы и 0,1 мл АЧТВ-реагента. Смесь инкубируют при 37° С точно в течение 3 мин, затем добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция и включают секундомер (таймер

коагулометра). Полученный результат, выраженный в секундах, переводят в единицы активности исследуемого фактора по предварительно построенному калибровочному графику.

Нормальные показатели — 50–150%.

Возможные ошибки при выполнении метода:

– несоблюдение температурных режимов хранения реагентов и плазмы;

– нарушение объемных характеристик используемых реагентов и плазмы;

– нарушение техники пипетирования.

Противопоказания к применению отсутствуют.

Трактовка результатов

1. Тромбастения Гланцманна — характерны нормальные значения числа тромбоцитов в периферической крови; морфология тромбоцитов не изменена; резкое угнетение обеих фаз АДФ-агрегации; нарушение агрегации тромбоцитов под воздействием адреналина и коллагена; нормальная агрегация с ристомидином.

2. Болезнь пула хранения. Нормальный уровень тромбоцитов; морфологически определяются макро- и микротромбоциты; резкое угнетение II фазы АДФ-агрегации на всех дозах (0,5–2,5 мкмоль); коллаген-агрегация практически отсутствует или резко угнетена; ристомидин-агрегация сохранена.

3. Синдром Бернара — Сулье. Умеренная тромбоцитопения; характерны гигантские «серые» тромбоциты; на фоне нормальной агрегации с АДФ, адреналином и коллагеном нарушена ристомидин-агрегация.

4. Болезнь Виллебранда. Ниже приводятся средние значения основных лабораторных тестов при различных подтипах болезни Виллебранда.

Таблица 1

Лабораторные характеристики I типа болезни Виллебранда

Лабораторные тесты	Значения $M \pm \sigma$
1	2
Длительность кровотечения, мин	$10,4 \pm 4,2$
Количество тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	189 ± 56

1		2
АЧТВ, с		29,6 ± 12,2
ФVIII, %		104 ± 35
Агрегация АДФ 1,5 мкмоль	степень, %	66,3 ± 14,3
	скорость, %/мин	34,6 ± 19,1
Ристоцетин-агрегация с 1,0 мг	степень, %	23,7 ± 2,3
	скорость, %/мин	11,2 ± 0,6
Снижение какой волны		2 волны
Ристоцетин-агрегация с 0,9 мг	степень, %	16,3 ± 2,5
	скорость, %/мин	9,6 ± 1,3
Коррекция с ристоцетином	степень, %	36,9 ± 5,4
	скорость, %/мин	33,4 ± 2,9
РКА фВ, %		64 ± 25

Примечания: ФVIII — коагуляционная активность VIII фактора; РКА фВ — уровень фактора Виллебранда по ристомицин-кофакторной активности.

Таблица 2

**Лабораторные характеристики ПА и ПМ типов
болезни Виллебранда**

Лабораторные тесты		Значения М ± σ
Длительность кровотечения, мин		7,2 ± 2,5
Количество тромбоцитов, × 10 ⁹ /л		228 ± 69
АЧТВ, с		39,7 ± 9,6
ФVIII, %		60,4 ± 26,9
Агрегация АДФ 1,5 мкмоль	степень, %	71,2 ± 15,6
	скорость, %/мин	31,2 ± 9,9
Ристоцетин-агрегация с 1,0 мг	степень, %	61,2 ± 14,7
	скорость, %/мин	17,8 ± 6,3
Снижение какой волны		I волна
Ристоцетин-агрегация с 0,9 мг	степень, %	26,8 ± 14,5
	скорость, %/мин	9,2 ± 2,8
Коррекция с ристоцетином	степень, %	65,4 ± 5,6
	скорость, %/мин	32,9 ± 5,9
РКА фВ, %		41 ± 23

Таблица 3

Лабораторные характеристики IIВ-типа болезни Виллебранда

Лабораторные тесты		Значения $M \pm \sigma$
Длительность кровотечения, мин		11,5 ± 0,7
Количество тромбоцитов, × 10 ⁹ /л		118 ± 32
АЧТВ, с		29,3 ± 2,1
ФVIII, %		114 ± 25
Агрегация АДФ 1,5 мкмоль	степень, %	66,4 ± 5,1
	скорость, %/мин	21 ± 2,9
Ристоцетин-агрегация с 1,0 мг	степень, %	81,9 ± 6,3
	скорость, %/мин	55,9 ± 14,8
Ристоцетин-агрегация с 0,6 мг	степень, %	74,4 ± 2,7
	скорость, %/мин	57,1 ± 7,8
РКА фВ, %		183 ± 21

Одним из основных диагностических критериев данного подтипа служит патологическая агрегация с ристомидином в дозе 0,6 мг/мл.

Таблица 4

Лабораторные характеристики IIIН-типа болезни Виллебранда

Лабораторные тесты		Значения $M \pm \sigma$
Длительность кровотечения, мин		6,4 ± 2,8
Количество тромбоцитов, × 10 ⁹ /л		225 ± 8
АЧТВ, с		76 ± 14
ФVIII, %		29 ± 4
Агрегация АДФ 1,5 мкмоль	степень, %	56,3 ± 8,7
	скорость, %/мин	21,9 ± 8,7
Ристоцетин-агрегация с 1,0 мг	степень, %	54 ± 4,5
	скорость, %/мин	32,1 ± 8,3
Ристоцетин-агрегация с 0,9 мг	степень, %	41,6 ± 5,4
	скорость, %/мин	29,9 ± 9,1
РКА фВ, %		89 ± 21

Таблица 5

Лабораторные характеристики III типа болезни Виллебранда

Лабораторные тесты		Значения $M \pm \sigma$
Длительность кровотечения, мин		$8,2 \pm 1,6$
Количество тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$		153 ± 50
АЧТВ, с		45 ± 12
ФVIII, %		21 ± 8
Агрегация АДФ 1,5 мкмоль	степень, %	$74 \pm 6,8$
	скорость, %/мин	$31,9 \pm 5,7$
Ристоцетин-агрегация с 1,0 мг	степень, %	$8,9 \pm 2,3$
	скорость, %/мин	$5,6 \pm 1,2$
Ристоцетин-агрегация с 0,9 мг	степень, %	$6,5 \pm 1,3$
	скорость, %/мин	$4,9 \pm 2,3$
Коррекция с ристоцетином	степень, %	$16,9 \pm 4,5$
	скорость, %/мин	$15,1 \pm 2,9$
РКА фВ, %		18 ± 5

**ЛАБОРАТОРНЫЕ КРИТЕРИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ТРОМБОЦИТОПАТИЙ
НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
СВОЙСТВ ТРОМБОЦИТОВ**

Тромбоцитопатия	Нарушения агрегационных функций тромбоцитов
Патология рецептора коллагена	Отсутствие или снижение коллаген-индуцированной агрегации
Синдром Бернара — Сулье	Отсутствие или снижение ристоцетин-агрегации
Синдром Виллебранда тромбоцитарного типа	Агрегация с низкими дозами ристоцетина
Тромбастения Гланцманна	Отсутствие или снижение агрегации с АДФ, адреналином
Синдром «серых» тромбоцитов	Нарушена агрегация с коллагеном
Дефицит пула хранения (δ -гранул)	Отсутствие второй волны агрегации с АДФ, снижение агрегации на коллаген
Аспириноподобный синдром	Снижение агрегации с АДФ, адреналином и коллагеном
Нарушение мобилизации Ca^{2+}	Нарушение всех видов агрегации
Нарушение фосфоинозитидного обмена	Нарушение агрегации с коллагеном и адреналином, нормальная агрегация с арахидоновой кислотой

Приложение 4

**ЛАБОРАТОРНЫЕ КРИТЕРИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ
ТРОМБОЦИТОПАТИЙ**

Тест	Тромбастения	Болезнь пула хранения	Нарушение механизма реакции освобождения	Синдром Бернара — Сулье
Количество тромбоцитов	N	N	N	Умеренная тромбоцитопения
Морфология тромбоцитов	N	N, микро- и макро- циты	N	Характерны «гигантские» тромбоциты
АДФ-агре- гация (2,5 мкмоль)	Нарушена	N	N	N
АДФ-агрега- ция (0,5– 1,5 мкмоль)	Угнетение обеих фаз	Угнетение I фазы	Угнетение II фазы	N
Агрегация тромбоцитов с адреналином	Нарушена	Нарушена	Нарушена	N
Агрегация тромбоцитов с коллагеном	Нарушена	Нарушена	Нарушена	N
Ристоцетин- агрегация	N	N	N	Нарушена

**ЛАБОРАТОРНЫЕ КРИТЕРИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ
БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА**

Тесты	I тип	II тип				III тип
		IIA	IIВ	IIМ	IIН	
Количество тромбоцитов	N или ↓	N	↓	N	N	N
Время кровотечения	N или ↑↑	↑	↑↑	↑	N	↑↑
Адгезия к стеклу	↓	↓↓	N	↓	N	↓↓
АЧТВ	↑	N	N	N	↑↑	↑↑
Активность VIII фактора	↓	N	N	N	↓↓	↓↓
Уровень плазменного VWF:RCof	↓	↓	↑	↓	N	↓↓
Уровень антитгена ФВ	↓ или N	N	N	N	N	↓↓
Ристоцетин-агрегация	↓ I фаза	↓ II фаз	↑	↓ II фаз	N	↓ II фаз

Приложение 6

**ЛАБОРАТОРНЫЕ КРИТЕРИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА,
СИНДРОМА БЕРНАРА — СУЛЬЕ И ГЕМОФИЛИИ А**

Тесты	Болезнь Виллебранда	Болезнь Бернара — Сулье	Гемофилия А
Количество тромбоцитов	N	N или снижено	N
Размер тромбоцитов	N	«Гигантские» тромбоциты	N
Время кровотечения	Удлинено	Удлинено	N
Адгезия к стеклу	Снижена	Снижена	N
Ристоцетин-агрегация	Снижена	Снижена	Снижена при уровне ФVIII <25%
Агрегация с другими агонистами	N	N, снижена с низкими дозами тромбина, бычьим ФВ	N
Уровень VIII фактора	Снижен	N	Снижен
Уровень ФВ	Снижен	N	N
Тесты, характеризующие I фазу свертывания крови (АЧТВ)	N или удлинены	N	Удлинены
Коррекция нарушений донорской плазмой	Есть	Нет	Есть

**АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА
И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЕЕ ПО ПОДТИПАМ**

