



## Набор реагентов для определения активности антитромбина III в плазме крови человека по U. Abildgaard.

Антитромбин III (АТIII) или ко-фактор гепарина – основной антагонист тромбина при образовании этого фермента в крови. В отсутствие гепарина АТIII медленно и необратимо ингибирует тромбин и другие факторы свертывания и фибринолиза. В присутствии гепарина АТIII становится быстрым ингибитором этих ферментов. Наследственный и приобретенный дефицит АТIII в крови приводит к развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания и в некоторых случаях острых тромбозов. Сниженная концентрация АТIII наблюдается у больных с заболеваниями печени (при циррозе), с нефротическим синдромом в результате экскреции ингибитора с мочой. Концентрацию АТIII снижают оральные контрацептивы и инъекции гепарина.

### Принцип метода.

В исследуемой плазме тепловой обработкой удаляют фибриноген, вносят стандартное количество тромбина, смесь инкубируют и затем определяют в ней остаточную (после взаимодействия с антитромбином III) активность тромбина. Активность тромбина определяют по времени свертывания стандартного раствора фибриногена. Чем выше активность антитромбина III в исследуемой плазме, тем ниже остаточная активность тромбина, и тем медленнее происходит образование сгустка.

### Состав набора код ПФА-2/1

1. Тромбин, лиофилизированный (4 мл) - 2 флакона,
2. Фибриноген, лиофилизированный (2 мл) - 4 флакона,
3. Дефибрированная плазма - калибратор, лиофилизованная, (1 мл) - 1 флакон,
4. Буфер имидазольный концентрированный (5 мл) - 1 флакон.

### Приготовление реагентов.

**1. Рабочий буферный раствор.** Буфер имидазольный концентрированный (5 мл) перелить в мерную колбу вместимостью 100 мл и долить до метки дистиллированной водой (разведение в 20 раз), тщательно перемешать. Рабочий буферный раствор хранить при температуре +2-8 °С не более 1 месяца.

**2. Тромбин.** Во флакон с лиофильно высушенным тромбином внести 4 мл физиологического раствора и растворить содержимое при осторожном покачивании. Использовать через 15 минут после растворения.

**3. Фибриноген.** Во флакон с лиофильно высушенным фибриногеном внести 2 мл дистиллированной воды, аккуратно перемешать содержимое флакона и дать постоять не менее 15 минут. Раствор фибриногена использовать в течение рабочего дня.

**4. Дефибрированная плазма-калибратор.** Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Использовать через 20 минут после растворения.

### Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8 <sup>0</sup> С	+18-22 <sup>0</sup> С	-18-20 <sup>0</sup> С
Тромбин	2 дня	8 часов	2 мес.
Фибриноген	8 часов	4 часа	2 мес.
Дефибрированная плазма - калибратор	8 часов	4 часа	2 мес.

### Получение и подготовка плазмы для анализа.

**1. Получение плазмы.** Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку на 3,8% (0,109 моль/л) цитрате натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови на 3,2% (0,109 моль/л) цитрате натрия, центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Время хранения образцов плазмы при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8<sup>0</sup>С не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при -20<sup>0</sup>С.

**2. Подготовка исследуемой плазмы пациента для анализа.** Плазму прогреть на водяной бане в течение 6 мин при 56<sup>0</sup>С (желательно перед анализами проверить температуру водяной бани обычным термометром), затем центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин (1200g), надосадочную жидкость отобрать в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку.

**Построение и использование калибровочного графика**  
Для построения калибровочного графика прилагается дефибрированная плазма-калибратор. **Не прогревать при 56<sup>0</sup>С.**

Активность антитромбина III в %	A*	0,5A	0,25A
Номер пробирки	1	2	3
Плазма-калибратор, мл	0,3	-	-
Рабочий буферный раствор, мл	0,6	0,5	0,5
Перемешать и перенести в следующую пробирку		0,5 ↑	0,5 ↑

\*аттестованное значение антитромбина III в дефибрированной плазме-калибраторе в %.

Во всех 3 разведениях провести определение активности анти- тромбина III по методу, описанному ниже.

На оси Y по логарифмической шкале отложить время свертывания в секундах, а на оси X по линейной шкале отложить активность антитромбина III в %. Калибровочный график линейен в интервале активности АТIII от 25 до 100%.

### Проведение анализа.

Исследуемую дефибрированную плазму развести рабочим буферным раствором в 3 раза.

В кювету коагулометра внести:	Объем
Разведенная дефибрированная плазма (калибратор или исследуемая)	100 мкл
Тромбин	100 мкл
Инкубировать при 37 <sup>0</sup> С точно 2 или 3 минут*.	
Раствор фибриногена	100 мкл
Зафиксировать на коагулометре время образования сгустка	

\*в зависимости от типа коагулологического анализатора.

Используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца определить активность АТIII в %.

### Интерпретация результатов.

**В нормальной плазме здоровых лиц активность анти- тромбина III составляет 80 - 120%.**

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности АТIII могут полностью нейтрализовать тромбин в системе, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности АТIII для таких образцов могут быть получены при разведении исходной плазмы в 6 раз. При этом полученный результат должен быть умножен на 2. Возможное присутствие в исследуемой плазме гепарина до 1 ед/мл не влияет на измерение активности анти- тромбина III, за счет присутствия в тромбине инактиватора гепарина.

### Меры предосторожности.

Все компоненты данного набора предназначены только для диагностики in vitro. Компоненты набора следует рассматривать, как потенциально биологически опасные вещества, при работе с которыми необходимо соблюдать все меры предосторожности.

При работе с исследуемыми образцами следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита ВИЧ1 и ВИЧ2, гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

### Контроль качества.

Нормальные и патологические значения анти- тромбина III следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕ- НАМ:

Плазма контрольная – 1 параметров

код КМ-2

*По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться  
в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией»  
по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2.  
тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61,  
e-mail: [info@renam.ru](mailto:info@renam.ru)*