



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения фибринолитической активности плазмы крови человека (ХIIа-зависимый фибринолиз)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения фибринолитической активности плазмы крови человека (ХIIа-зависимый фибринолиз) предназначен для исследования системы фибринолиза и позволяет оценить состояние внутреннего и внешнего механизмов активации плазминогена, образования плазмина и лизиса фибринового сгустка. Метод чувствителен к различным патологиям в плазменных протеолитических системах и применяется в комплексе с другими методами.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

Буфер имидазоловый концентрированный (2,0 мл) – 1 флакон;
 Кальция хлорида 0,025 М раствор (10 мл) – 2 флакона;
 Уксусная кислота 1% раствор (10 мл) – 1 флакон;
 Каолин 0,5% суспензия (5,0 мл) – 2 флакона.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 50 анализов.

Принцип действия. Тест основан на измерении времени полного лизиса эуглобулиновой фракции, полученной из плазмы крови при осаждении в кислой среде и содержащей факторы свертывания крови и фибринолиза. Из плазмы крови выделяют эуглобулиновую фракцию, содержащую плазминоген, фибриноген, факторы свертывания и не содержащую ингибиторов фибринолиза. При добавлении к этой фракции кальция хлористого образуется сгусток фибрина, который затем лизируется плазмином. Реакция активируется фактором ХIIа. Время от момента образования сгустка до его растворения выражает фибринолитическую активность исследуемой плазмы крови.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определения ХIIа-зависимого фибринолиза: билирубин в концентрации до 0,2 г/л; гемоглобин (свободный) – до 1 г/л; триглицериды – до 1,2 г/л. Уменьшение концентрации фибриногена (гипофибриногенемия и дисфибриногенемия) вызывает уменьшение времени лизиса эуглобулиновой фракции.

Гиперфибриногенемия вызывает увеличение времени лизиса эуглобулиновой фракции (процесс угнетения фибринолиза). Результаты определения ХIIа-зависимого фибринолиза могут зависеть от назначения препаратов. Препараты ϵ -аминокапроновой кислоты вызывают угнетение фибринолиза и удлинение времени лизиса эуглобулиновой фракции.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения ХIIа-зависимого фибринолиза в одной пробе плазмы одним набором не превышает 10%. Коэффициент вариации результатов определения ХIIа-зависимого фибринолиза в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Значения, соответствующие нормальным

Нормальный диапазон полного лизиса эуглобулиновой фракции, полученный при определении ХIIа-зависимого фибринолиза у не менее 100 здоровых доноров, составляет 5 - 12 мин и указан в паспорте для каждой серии набора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор ХIIа-зависимый фибринолиз предназначен только для диагностики *in vitro*.

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

При работе с набором ХIIа-зависимый фибринолиз и с исследуемыми образцами крови пациентов следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиН 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010); Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика ВИЧ-инфекции» (СП 3.1.5. 2826 от 11.01.2011). При работе следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, т.к. образцы плазмы крови человека следует рассматри-

вать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита человека ВИЧ1 и ВИЧ2, вирусы гепатита В и С или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термобаня с возможностью поддерживать температуру $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$;
- центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- мерный цилиндр вместимостью 50 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл, 200-1000 мкл и 1-10 мл;
- вода дистиллированная;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М);
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- пластиковые прозрачные или силиконированные стеклянные пробирки вместимостью 10 мл;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов ХIIа-зависимый фибринолиз предназначен для определения времени лизиса эуглобулинового сгустка, полученного из плазмы человеческой крови.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

Процедура получения биологического материала

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% 5,5-водным цитратом натрия (0,109 моль/л) в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 2-водным цитратом натрия (0,109 моль/л), центрифугировать при комнатной температуре ($18-25^\circ\text{C}$) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 г).

Плазму крови после получения или анализируют сразу, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками и замораживают при температуре не выше -20°C .

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре $2-8^\circ\text{C}$. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре $-18-20^\circ\text{C}$ и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Ограничения по использованию биологического материала

При работе с кровью общим правилом является немедленное отделение плазмы от форменных элементов, так как некоторые вещества могут поглощаться и инактивироваться эритроцитами и лейкоцитами. Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочий буферный раствор. Буфер имидазоловый концентрированный (2,0 мл) перелить в мерный цилиндр и долить до объема 40 мл дистиллированной водой (разведение в 20 раз), тщательно перемешать. Рабочий буферный раствор хранить при температуре $2-8^\circ\text{C}$ не более 1 мес.

Каолин. Суспензия легкой фракции каолина в дистиллированной воде. является готовым реагентом для проведения анализа. Вскрытый флакон можно использовать повторно при условии хранения при $2-8^\circ\text{C}$ в плотно укупоренном виде.

Уксусная кислота, 1% раствор. Является готовым реагентом для проведения анализа. Вскрытый флакон можно использовать повторно при условии хранения при $2-8^\circ\text{C}$ в плотно укупоренном виде.

Кальция хлорида 0,025 М раствор. Является готовым реагентом для проведения анализа. Вскрытый флакон можно использовать повторно при условии хранения при $2-8^\circ\text{C}$ в плотно укупоренном виде. Перед проведением анализа прогреть при температуре 37°C . Повторно не прогревать.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение анализа

Внести в пробирку	Объем, мл
Дистиллированная вода	8,0
Уксусная кислота 1% раствор	0,2
Плазма контрольная (исследуемая)	0,5
Каолин 0,5% суспензия	0,2
Перемешать и инкубировать полученную смесь при 37 ⁰ С точно 30 минут	
Центрифугировать смесь 6 минут при 1500 об/мин и отобрать надосадочную жидкость, не затрагивая осадка.	
К осадку добавить рабочий буферный раствор	0,5
Аккуратно, пипетированием перемешать полученную смесь	
Внести кальция хлорида 0,025 М раствор	0,5
Через 30-60 сек после образования сгустка включить секундомер и отметить время полного лизиса сгустка.	

Регистрация результатов

Секундомером регистрируют время полного лизиса (растворения) эуглобулинового сгустка.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Учет результатов проводится путем сравнения времени лизиса эуглобулиновых сгустков нормальной человеческой плазмы и исследуемой плазмы пациента.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активация фибринолиза в организме происходит при гетеротранфузионном шоке, пептонном шоке, ожогах, электротравме, во время приступов эпилепсии и у больных, находящихся в состоянии ожидания хирургического вмешательства. Увеличение времени лизиса эуглобулиновой фракции (процесс угнетения фибринолиза) указывает на первую фазу ДВС – синдрома. Снижение фибринолитической активности крови является одним из ведущих факторов тромбообразования и атеросклероза, у больных с тромбоэмболическими осложнениями.

В связи с ориентировочным характером и недостаточной специфичностью теста спонтанного лизиса эуглобулинового сгустка (зависит от содержания фибриногена и неполноценной полимеризации фибрина в плазме) необходимо использование определения отдельных фибринолитических факторов, таких как плазминоген, антиплазмин и т.д.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.

Нормальные и патологические значения ХШа-зависимого фибринолиза следует контролировать с помощью Плазмы контрольной (пуп здоровых доноров) Плазма Н, код КМ-1.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в закупоренном виде при температуре 2-8°С. Вскрытые компоненты набора можно хранить в плотно закупоренном состоянии при температуре 2-8°С не более 30 суток.

Транспортирование наборов должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°С не более 10 сут. Замораживание набора ХШа-зависимый фибринолиз не допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора ХШа-зависимый фибринолиз требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН № 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с набором ХШа-зависимый фибринолиз с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на $\frac{3}{4}$, завязывают, маркируют надписью: «Отходы. Класс Б», наносят на бирку название организации, дату и ФИО исполнителя и помещают на участок временного хранения до вывоза транспортом специального подразделения к месту обеззараживания и утилизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., «Ньюдиамед», 2001.- 285 с.
2. Козлов А.А., Берковский А.Л., Качалова Н.Д., Сергеева Е.В., Простакова Т.М. Пособие для врачей-лаборантов по методам исследования плазменного гемостаза. Противосвертывающая система, система фибринолиза. М. Принт. 2014.- 24 с.
3. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000.- 360 с.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБОУ «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