



## ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов для исследования XIIa-калликреин-зависимого, спонтанного и индуцированного эуглобулинового фибринолиза

### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Фибринолиз-тест предназначен для исследования фибринолиза при диагностике и контроле за лечением тромбозов и ДВС-синдромов по следующим методикам:

1. *Определение XIIa-калликреин-зависимого фибринолиза (XIIa-ЗЛ);*
2. *Определение спонтанного эуглобулинового фибринолиза;*

### Состав набора:

1. Суспензия каолина (концентрированная 10:1, 50 мг/мл), 10 мл - 1 фл.
2. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М), 10 мл - 1 фл.
3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл - 1 фл.
4. Уксусная кислота (10 % раствор), 10 мл - 1 фл.

### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения *in vitro*.

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

### ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- Центрифуга лабораторная;
- термобаня на +37 °С;
- секундомер;
- пипетки вместимостью 0,18, 0,2-1,0 и 5,0-10,0 мл;
- пробирки стеклянные;
- цилиндры мерные вместимостью 100 и 200 мл;
- вода дистиллированная;
- физиологический (0,9 %) раствор натрия хлорида;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконизированную пробирку, содержащую 3,8 % раствор натрия лимоннокислого трёхзамещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолиз, избыток цитрата натрия и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

Каталожный номер набора: **009**

**ООО фирма "Технология-Стандарт"**

656037, Барнаул, а/я 1351, тел./факс (3852) 22-99-37, 22-99-38, 22-99-39, 27-13-00

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ XIIa-КАЛЛИКРЕИН-**

## ЗАВИСИМОГО ФИБРИНОЛИЗА

**Принцип метода.** В основу метода положен факт ускорения лизиса эуглобулинов, полученных из обработанной каолином бедной тромбоцитами плазмы.

Из исследуемой плазмы выделяют эуглобулиновую фракцию, в которой с помощью каолина активирован "мост": "фактор XIIa → калликреин → пламиноген". Определяют время эуглобулинового лизиса при такой активации.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

#### 1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

##### 1.1. Приготовление рабочего раствора кальция хлорида

В день исследования, в соответствии с потребностью, концентрированный раствор кальция хлорида развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды), получают рабочий раствор кальция хлорида (0,277 %).

##### 1.2. Разведение концентрированного буфера трис-HCl

Перед определением, в соответствии с потребностью, концентрированный буфер трис-HCl развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды), получают рабочий раствор буфера трис-HCl.

##### 1.3. Приготовление рабочего раствора уксусной кислоты

Перед определением, в соответствии с потребностью, 10 % раствор уксусной кислоты развести дистиллированной водой в 10 раз (1 объем концентрированного раствора + 9 объемов воды), получают рабочий 1 % раствор уксусной кислоты.

##### 1.4. Суспензия каолина

Содержимое флакона с 10,0 мл концентрированной суспензии каолина перенести в мерный цилиндр и довести объем дистиллированной водой до **100,0 мл**. В результате получают рабочую 0,05 % суспензию каолина.

#### 2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

##### 2.1. Получение активированной каолином фракции эуглобулинов плазмы

В пробирке последовательно смешать 0,5 мл плазмы, 7,5 мл дистиллированной воды, 0,25 мл рабочей 0,05 % суспензии каолина и 0,18 мл 1 % уксусной кислоты. Смесь инкубировать на водяной бане при температуре +37 °C в течение 30 мин, затем провести ее центрифугирование в течение 5-6 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость слить, пробирку опрокинуть на фильтровальную бумагу и осушить в течение одной минуты. Оставшийся на дне пробирки эуглобулиновый осадок развести в 0,5 мл рабочего раствора буфера трис-HCl.

##### 2.2. Определение времени каолин-активированного лизиса сгустка

К 0,5 мл раствора эуглобулинов в пробирке добавить 0,5 мл 0,277 % раствора кальция хлорида, осторожно перемешать покачиванием пробирки (не встряхивая!) и инкубировать на водяной бане при температуре +37 °C. Регистрируют время с момента добавления кальция хлорида до полного (при +37 °C) растворения сгустка.

#### 3. ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат выражают в минутах. В норме, при использовании набора, время XIIa-зависимого эуглобулинового лизиса составляет **4-10 мин**. Замедление лизиса наблюдается при нарушении внутреннего XIIa-зависимого фибринолиза за счет снижения уровня или недостаточной активации участвующих в реакции компонентов плазменных протеолитических систем (свертывания, калликреин-кининовой, фибринолиза). В связи с высокой лабильностью этих систем XIIa-ЗЛ может нарушаться при очень многих видах патологии - у большинства больных тромбозами, при синдроме ДВС, заболеваниях печени, иммунных и иммунокомплексных болезнях и др. При ДВС-синдроме отмечается закономерное угнетение XIIa-ЗЛ, начинающееся уже в первой фазе этого процесса.

Удлинение лизиса (до 30-60 мин и более) чаще всего обусловлено наличием в высоком титре ингибиторов фибринолиза, либо дефицитом пламиногена, реже - фактора XII, плазменного прекалликреина или высокомолекулярного кининогена. Для разграничения этих нарушений в систему дополнительно вводят стрептокиназу или урокиназу. При дефиците пламиногена они существенно не ускоряют процесс лизиса, а при дефиците остальных компонентов системы - нормализуют его.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОНТАННОГО

## ЭУГЛОБУЛИНОВОГО ФИБРИНОЛИЗА

**Принцип метода.** Определяют время спонтанного лизиса сгустка, получаемого из эуглобулиновой фракции плазмы при добавлении к ней раствора кальция хлорида.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

#### 1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Содержание раздела аналогично разделу 1 методики определения XIIa-калликреин-зависимого фибринолиза.

#### 2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

##### 2.1. Получение эуглобулиновой фракции плазмы

В пробирке последовательно смешать 8,0 мл дистиллированной воды, 0,18 мл 1 % уксусной кислоты и 0,5 мл плазмы. Компоненты смешать переворачиванием пробирки, которую затем инкубировать в сосуде с водой, охлажденной до температуры +2... +8 °C, в течение 30 мин. Затем смесь центрифугировать в течение 5-6 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость слить, пробирку опрокинуть на фильтровальную бумагу и осушить в течение одной минуты. Оставшийся на дне пробирки осадок эуглобулинов развести в 0,5 мл рабочего раствора буфера трис-HCl.

##### 2.2. Определение времени спонтанного лизиса сгустка

К 0,5 мл раствора эуглобулинов в пробирке добавить 0,5 мл 0,277 % раствора кальция хлорида, осторожно перемешать покачиванием пробирки (не встряхивая!) и инкубировать на водяной бане при +37 °C. Регистрируют время с момента добавления кальция хлорида до полного (при +37 °C) растворения сгустка.

#### 3. ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат выражают в минутах. В норме время спонтанного лизиса эуглобулинов составляет **180-240 мин**. Укорочение времени лизиса свидетельствует об активации, а удлинение - об угнетении фибринолиза.

Метод может применяться для изучения потенциальной способности фибринолиза к активации *"in vivo"* при искусственной стимуляции выброса из эндотелия в кровь тканевого активатора пламиногена (ТПА). Для этого определяют время спонтанного эуглобулинового лизиса плазмы из крови, полученной из вены до и после компрессии сосудов конечности. Венозный стаз осуществляется путем наложения манжеты сфигмоманометра на плечо и поддержания в ней минимального АД (80 мм рт. ст.) в течение 15-20 мин. По истечении этого срока вторую порцию крови берут из локтевой вены той же руки до снятия манжеты и в ней определяют спонтанный эуглобулиновый лизис. Время лизиса сгустка после венозного стаза укорачивается в норме в 1,5 - 2 раза, а при недостаточном выходе в кровь ТПА - остается удлинненным.

### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на проведение **400** анализов по одному из приведенных тестов.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2... +8 °C в течение всего срока годности набора (**18 мес**). Допускается транспортировка при температуре до +25 °C в течение 30 сут. Замораживание не допускается.

Время использования набора не должно превышать 2 мес с момента вскрытия его компонентов.

Рабочий раствор кальция хлорида можно хранить при комнатной температуре (+18... +25 °C) не более 1 дня или не более 2 дней - при температуре +2... +8 °C.

Рабочий раствор буфера можно хранить при температуре +2... +8 °C не более 1 недели.

Рабочий (1 %) раствор уксусной кислоты можно хранить при температуре +2... +8 °C не более 2 дней.

Рабочую суспензию каолина можно хранить при температуре +2... +8 °C не более 2 мес.

Следует отметить, что на результаты эуглобулиновых методов влияет изменение концентрации фибриногена у больных. Гиперфибриногенемия способствует удлинению времени лизиса эуглобулинов, гипофибриногенемия - укорочению.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. - М.: "Ньюдиамед-АО", 2008. - 292 с.

2. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. - СПб.: ФормаТ, 2006. - 208 с.