



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ГЕМОСТАЗА (ФИБРИНОЛИЗ)

ПРИНЦИП МЕТОДА

НАEMOSTAZ-DAC-II предназначен для исследования фибринолитической системы крови и включает два метода оценки фибринолитической активности:

- определение времени лизиса эуглобулинов плазмы;
 - определение Хагеман (XII-a)-зависимого фибринолиза.
- Время лизиса сгустка, установленное по лизису эуглобулиновой фракции, отражает фибринолитическую активность плазмы, освобожденной от ингибиторов. Определение Хагеман (XII-a) - зависимого фибринолиза основано на максимально стандартизированной активации фактора XII ксилином.

СОСТАВ НАБОРА

1. Acetic acid 1 % : уксусная кислота 1 %, 13 ml.
 2. Boric Acid Buffer: боратный буфер pH 9,0, 30 ml.
 3. Michaelis,s Buffer: буфер Михаэлиса pH 7,4, 30 ml.
 4. Kaolin: каолин, 0,075 g.
 5. Calcium Chloride 0,025 mol/l:
- Кальция хлорид 0,025 mol/l, 33 ml.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты при 2-8°C стабильны до срока, указанного на этикетке.

ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитратная кровь: кровь отберите утром, натощак, из локтевой вены, силиконированной иглой с широким просветом, без шприца и наложения жгута. Первые капли отбросьте, так как в них содержится тромбопластин. Кровь смешайте в пластиковой пробирке с предварительно налитым в нее раствором цитрата натрия (3,8 %) в соотношении 9:1.

Плазма, бедная тромбоцитами: цитратную кровь отцентрифугируйте 20 мин при 4000 об/мин. Полученную плазму перенесите в пластиковую пробирку. Плазма стабильна 4 часа при 18-20°C, допускается однократное замораживание на 2-3 недели при минус 20-40°C или в морозильных камерах холодильников при минус 4-12°C на 4-5 суток.

Внимание! Исключить повторное замораживание и размораживание бедной тромбоцитами плазмы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

Плазма нормальная свежая или замороженная.
Таймер.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор предназначен только для диагностики in vitro. Образцы анализов пациентов должны рассматриваться как потенциально опасные и обрабатываться как инфекционные.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РЕАГЕНТОВ

1. Acetic acid 1 %, Boric Acid Buffer, Michaelis,s Buffer, Calcium Chloride 0,025 mol/l готовы к использованию.
2. **Суспензия каолина:** прилейте 15 мл дистиллированной воды во флакон с Kaolin. Тщательно перемешайте для получения однородной суспензии.

Стабильна при 2-8°C 7 дней.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ**A. ВРЕМЯ ЛИЗИСА ЭУГЛОБУЛИНОВ**

1. Внесите в маркированные пробирки по 0,5 ml образцов цитратной плазмы, бедной тромбоцитами.
2. Добавьте по 8 ml дистиллированной воды, перемешайте и добавьте по 0,15 ml 1 % уксусной кислоты.
3. Содержимое пробирок инкубируйте 30 min при 2-8°C.
4. Отцентрифугируйте смесь 5 минут при 1500 об/мин, слейте надосадочную жидкость и удалите ее остатки, опрокинув пробирку на фильтровальную бумагу (Примечание 1).
5. Осадок эуглобулинов растворите в 0,5 ml боратного буфера осторожно помешивая стеклянной палочкой.
6. Отберите две пробы раствора по 0,2 ml в центрифужные пробирки и поместите их на водяную баню 37°C.
7. Добавьте к каждой пробе по 0,2 ml забуференного раствора CaCl₂ 0,025 mol/l, через несколько минут образуется сгусток (Примечание 2).
8. С этого момента отметьте время до полного лизиса сгустка.

B. ХАГЕМАН (XII-a)-ЗАВИСИМЫЙ ФИБРИНОЛИЗ

1. Внесите в маркированные пробирки по 0,5 ml образцов цитратной плазмы, бедной тромбоцитами.
2. Добавьте по 7,75 ml дистиллированной воды, 0,25 ml суспензии каолина и 0,15 ml 1 % уксусной кислоты.
3. Содержимое пробирок инкубируйте 30 min при 37°C.
4. Отцентрифугируйте смесь 5 минут при 1500 об/мин, слейте надосадочную жидкость и удалите ее остатки, опрокинув пробирку на фильтровальную бумагу (Примечание 1).
5. Осадок эуглобулинов растворите в 0,5 ml буфера Михаэлиса при перемешивании.
6. Отберите две пробы растворенного осадка по 0,2 ml и поместите в центрифужные пробирки.
7. Добавьте к каждой пробе по 0,2 ml забуференного раствора CaCl₂ 0,025 mol/l, через 1 минуту образуется сгусток (Примечание 2).
8. С этого момента отметьте время до полного просветления раствора.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Надосадочная жидкость должна быть тщательно удалена со стенок пробирки. В надосадочной жидкости много ингибиторов плазменной системы, поэтому ее незначительные капельки на стенках пробирки резко удлиняют лизис сгустка, искажая данные исследования.
2. После образования сгустка пробирку нельзя встряхивать, так как иногда после встряхивания сгусток ретрагирует и резко удлиняется его лизис.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

Хагеман-зависимый фибринолиз : 4 - 11 мин.
Время лизиса эуглобулинов : 180-300 мин.

Данные величины ориентировочны, рекомендуется определение собственных нормальных величин в каждой лаборатории.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля хода реакции и процедуры измерения рекомендуется использовать Контрольные сыворотки (нормальные и патологические).

Каждая лаборатория должна установить собственную внутреннюю систему контроля качества.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- При пониженном фибринолитическом потенциале плазмы эуглобулиновый лизис продолжается более 300 минут. Такое явление наблюдается при тромбозах, в предтромботическом состоянии, при III-IV стадии ДВС-синдрома, у страдающих геморрагическими васкулитами, сепсисом, токсикозом во время беременности. Замедление лизиса является признаком претромбоза, который отражает состояние гиперкоагуляции или способствует его развитию.

При повышении плазменного потенциала лизис эуглобулинов ускорен (продолжается менее 150 минут). Чрезмерное сокращение времени фибринолиза наблюдается при передозировке фибринолитиков, устропротекающем ДВС крови с выраженным геморрагическим синдромом, при акушерских осложнениях.

- Активность Хагеман-зависимого фибринолиза рекомендуется определять для диагностики тромбозов сосудов макро- и микроциркуляции. У больных крупозной пневмонией, особенно осложненной инфекционно-токсическим шоком и ДВС-синдромом, тромбозом вен нижних конечностей, т. е. с органной или региональной фибринацией резко ослаблен Хагеман-зависимый фибринолиз.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Балуда, З. С. Баркаган, Е. Д. Гольдберг "Лабораторные методы исследования системы гемостаза", Томск, 1980 г.
2. Инструкция по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования", М, 1986 г.
3. Учебно-методическое пособие "Исследование системы гемостаза", Кишинев, 1990 г.
4. У.П. Иванов "Руководство по гемостазиологии", Минск, 1991 г.