

Набор реагентов для определения активности фибрин-стабилизирующего фактора (фактора XIII)

Фактор XIII, присутствующий в плазме в виде проэнзима, конвертируется в активный фермент на конечном этапе свертывающего каскада под действием тромбина в присутствии ионов Ca^{2+} . Активированный фактор XIII действует как трансамидаза, переводя водородные связи между двумя фибрин мономерами в стабильные пептидные связи. Он создает ϵ -(γ)-глутамил-лизиновые связи между этими мономерами. Эти реакции трансамидирования имеют место между α и γ цепями фибрин мономеров, не затрагивая β -цепи. Фактор XIII – это β -глобулин с молекулярной массой 340 000 и содержанием в плазме 20–30 мг/л, синтезируется печенью. Фибрин стабилизирующая активность, кроме плазмы, найдена также в тромбоцитах и плаценте.

Снижение уровня фактора XIII наблюдается у больных с врожденным дефицитом, а также, как вторичный синдром при тяжелых поражениях печени, при сепсисе, лучевой болезни, после тяжелых операций. Клиническая картина дефицита фактора XIII проявляется в тяжелом геморрагическом синдроме, при этом продолжительность кровотечения может достигать 12 – 36 часов.

Принцип метода.

Определение активности фактора XIII основано на оценке лизиса фибринового сгустка, содержащего различное количество исследуемого фактора XIII, в 5%-ой монохлоруксусной кислоте.

Набор Фактор XIII-тест

код ФС-3

Состав набора

1. Фибриноген, очищенный от XIII фактора (2 мл) – 2 флакона,
2. Суспензия каолина 1%-ая (10 мл) – 1 флакон,
3. Тромбин (2мл) – 2 флакон,
4. Кальция хлорида 0.1М раствор (5 мл) – 1 флакон,
5. Буфер имидазоловый концентрированный (5мл) – 1 флакон,
6. Монохлоруксусная кислота 50% (7 мл) – 2 флакон,
7. Плазма-калибратор (1 мл) – 1 флакон.

Приготовление реагентов:

Рабочий буферный раствор. Буфер имидазоловый 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°C не более 1 месяца.

5%-ая монохлоруксусная кислота. Развести содержимое флакона в 10 раз дистиллированной водой (1:9). Содержимое флакона перенести в мерный цилиндр и довести дистиллированной водой до 70 мл. Хранить при 2-8°C в течение 1 месяца.

Суспензия каолина, 1%-ая. Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед проведением анализа встряхивать. Хранить при 2-8°C в течение 1 месяца.

Раствор фибриногена. Внести во флакон с лиофильно высушенным фибриногеном 2 мл дистиллированной воды и растворить при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Тромбин-кальциевая смесь. Внести во флакон с тромбином 2мл кальция хлорида 0,1М раствора и растворить при осторожном покачивании. Смесь готова к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Плазма-калибратор. Внести во флакон с плазмой-калибратором 1мл дистиллированной воды и растворить при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8°C	+18-22°C	-18-20°C
Раствор фибриногена	8 часов	4 часа	-
Тромбин-кальциевая смесь	8 часов	4 часа	2 мес.
Раствор плазмы-калибратора	8 часов	4 часа	

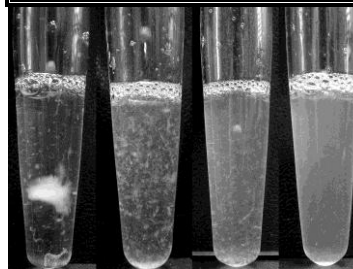
Получение исследуемой плазмы для анализа.

Венозную кровь взять в пластиковую пробирку на 3,8% (0.109моль/л) цитрате натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови на 3,2% (0.109моль/л) цитрате натрия. центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 1,0 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 4 часов, при 2 - 8°C не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C.

Проведение анализа.

Плазму-калибратор и исследуемые образцы плазмы последовательно развести рабочим буферным раствором в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 и 512 раз.

Внести в пробирку:		Объем
Одно из разведений плазмы-калибратора (исследуемой)		100 мкл
Раствор фибриногена		100 мкл
Суспензия каолина		100 мкл
Тромбин-кальциевая смесь		100 мкл
Смесь инкубировать при 37°C 30 минут.		
Внести в пробирки 5% монохлоруксусную кислоту		3 мл
Инкубировать 5 минут при 37°C. Встряхнуть каждую пробирку.		



Зафиксировать то наименьшее разведение плазмы-калибратора и исследуемой плазмы, при котором фибриновый сгусток после инкубации с монохлоруксусной кислотой разрушается на мелкие фибриновые нити (см. рисунок).

Интерпретация результатов.

Наименьшее разведение плазмы-калибратора, при котором фибриновый сгусток после инкубации с монохлоруксусной кислотой разрушается на мелкие фибриновые нити, обычно составляет 1:128 – 1:256. Уровень фактора XIII можно рассчитать по формуле:

$$A_{пл} = \frac{T_{пл}}{T_k} \times A_k, \quad \text{где}$$

$A_{пл}$ - активность фактора XIII в исследуемой плазме в %;

A_k - активность фактора XIII в плазме-калибраторе в % (указано в паспорте);

$T_{пл}$ – титр исследуемой плазмы;

T_k – титр плазмы-калибратора.

В нормальной плазме здоровых лиц уровень активности фактора XIII составляет 60 – 150%.

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.

Срок годности набора – 24 месяца

Контроль качества.

Нормальные и патологические значения фактора XIII следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ: Плазма контрольная на 18 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

