

УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от « » 2010 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»
Президент
МБООИ «Общество больных
гемофилией»

Ю.А. Жулев
«12» 03 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для определения
плазминогена фотометрическим методом
(РЕАХРОМ-ПЛАЗМИНОГЕН)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов РЕАХРОМ-ПЛАЗМИНОГЕН предназначен для определения плазминогена в плазме крови человека фотометрическим методом с использованием хромогенного субстрата с целью диагностики тромбофилий, вызванных дефицитом или аномалиями этого белка, для выявления ДВС-синдрома и для контроля за лечением фибринолитиками. При активации плазминоген преобразуется в сериновую протеазу плазмин – основной фермент фибринолиза, расщепляющий фибриновый сгусток.

Набор предназначен для проведения 40 макроанализов при расходе 0,1 мл рабочего раствора субстрата на 1 определение или для проведения 200 микроанализов при расходе 0,02 мл раствора субстрата на 1 определение.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения плазминогена в плазме крови человека основан на его способности образовывать комплекс с активатором - стрептокиназой. Комплекс гидролизует специфический пептидный хромогенный субстрат. Количество высвобождающегося при этом красителя - паранитроанилина (рНА) - прямо пропорционально активности плазминогена в образце плазмы.

Процесс идет по следующей схеме:

Плазминоген + стрептокиназа (избыток) = комплекс.

Комплекс + пептид-рНА = пептид + рНА (желтый).

Количество выделившегося красителя определяют фотометрически при длине волны 405 нм.

2.2. Состав набора

- Буфер концентрированный – 1 фл. (5,0 мл).
- Стрептокиназа, лиофильно высушенная – 2 фл.

- Плазма-калибратор, лиофильно высушенная – 1 фл.
- Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 2 фл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Плазмин - активный фермент, принимающий участие как в первичном, так и во вторичном фибринолизе, в больших количествах циркулирует в плазме в виде своего неактивного предшественника плазминогена. Плазминоген может активироваться до плазмина различными путями, наиболее важным из которых является активация природным тканевым активатором, который синтезируется и высвобождается эндотелиальными клетками. Активировать плазминоген могут также такие внешние активаторы, как стрептокиназа из гемолитического стрептококка и урокиназа, природный активатор из почек. Потребление плазминогена наблюдается как при первичном, так и при вторичном фибринолизе. Вторичный фибринолиз, связанный с диссеминированным внутрисосудистым свертыванием, является наиболее важной причиной потребления плазминогена. С другой стороны первичный фибринолиз, включающий только фибринолитический механизм, также вызывает быстрое потребление циркулирующего фермента.

Чувствительность определения активности плазминогена с помощью набора РЕАХРОМ-ПЛАЗМИНОГЕН – 10%. Линейность измерения в пределах 20-100%.

Активность плазминогена в плазме-калибраторе - в пределах 80-110%.

Коэффициент вариации определения активности плазминогена и допустимое отклонение от аттестованного значения активности плазминогена в плазме-калибраторе – не более 10%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- Спектрофотометр или фотозлектроколориметр, длина волны 405 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм;
- рН-метр;

- центрифуга лабораторная, развивающая ускорение 2000 g (3000 об/мин);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 1,0 и 2,0 мл;
- баня водяная, поддерживающая температуру $\pm 37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- колба мерная вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- цитрат натрия 0,11 М (3,8%) раствор;
- бумага масштабнo-координатная Н-1;
- пробирки центрифужные пластиковые или стеклянные силиконизированные;
- кислота уксусная концентрированная (96%);
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь отобрать в пластиковую или стеклянную силиконизированную пробирку на 3,8% (0,11 М) цитрате натрия (9:1), центрифугировать в течение 7 мин при 1000 об/мин (240 g), плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы.

Плазму можно хранить при комнатной температуре (18-25°C) - не более 2 ч или при температуре 2-8°C не более 8 ч. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 20°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

7.1. Приготовление реагентов

Рабочий буферный раствор.

Буфер концентрированный развести дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Для этого содержимое флакона с концентратом буфера перенести количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавить дистиллированную воду до метки, закрыть пробкой и перемешать переворачиванием.

Рабочий буферный раствор должен иметь рН $7,4 \pm 0,5$.

Хранить при температуре 2-8°C не более 2 мес.

Стабилизированный раствор стрептокиназы.

Во флакон с лиофильно высушенной стрептокиназой внести 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое осторожным покачиванием, не встряхивать!

Рабочий раствор стрептокиназы.

Стрептокиназу развести рабочим буферным раствором в 6 раз (1,0 мл стрептокиназы+5,0 мл рабочего буферного раствора). Готов к проведению анализа через 20 мин после разведения.

Раствор хромогенного субстрата.

Во флакон с хромогенным субстратом внести 2,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 мин после разведения.

Раствор плазмы-калибратора.

Во флакон с плазмой-калибратором внести 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 мин после разведения.

7.2. Стабильность.

Реагенты	2-8 ⁰ С	18-25 ⁰ С	-18-20 ⁰ С
Рабочий раствор стрептокиназы	5 сут	2 сут	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	14 сут	2 сут	2 мес.
Раствор плазмы – калибратора	8 ч	2 ч	2 мес.

7.3. Построение калибровочного графика.

Для проведения анализа необходимо использовать пластиковые пробирки. Приготовить серию разведений плазмы-калибратора в следующей последовательности:

Пробирка №	1	2	3	4
Активность плазминогена, %	1,0 А*	0,5 А	0,25 А	0,125 А
Рабочий раствор буфера, мл	1,8	1,0	1,0	1,0
Плазма-калибратор, мл	0,2	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл	1,0	1,0	1,0	

*А - активность плазминогена в плазме-калибраторе, указана в паспорте.

Во всех пробирках провести определение активности плазминогена по методу, описанному ниже.

На оси ординат (Y) отложить величины оптической плотности, полученные для каждого разведенного раствора плазмы-калибратора, а на оси абсцисс (X) отложить активность плазминогена, %.

Калибровочный график должен представлять собой прямую линию

Калибровочный график линеен в интервале активности плазминогена от 20 до 100%.

7.4. Проведение анализа.

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму рабочим буферным раствором в 10 раз по следующей схеме: 0,1 мл плазмы + 0,9 мл буфера.

Анализ провести в пластиковых кюветах, термостатируемых при температуре 37⁰С.

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Рабочий раствор стрептокиназы, мл	0,5	-
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор), мл	0,5	-
Рабочий буферный раствор, мл	-	1,0
Перемешать и инкубировать при температуре 37 ⁰ С точно 5 мин.		
Раствор хромогенного субстрата, мл	0,1	-
Перемешать и инкубировать при температуре 37 ⁰ С точно 3 мин.		
Уксусная кислота концентрированная, мл	0,1	-

Измерить оптическую плотность образца против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

На спектрофотометре или ФЭК при длине волны 405 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм определить оптическую плотность окрашенного в желтый цвет раствора, образовавшегося после взаимодействия плазминогена со стрептокиназой и хромогенным субстратом.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

В нормальной плазме здоровых лиц активность плазминогена составляет 80-135%.

Образцы с высоким уровнем активности плазминогена могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов, поэтому точные значения активности плазминогена для таких образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы не в 10, а в 20 раз. При этом результат, полученный по калибровочному графику, должен быть умножен на 2.

Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазмы пациентов:

- с повышенным содержанием липидов;
- с повышенным содержанием билирубина.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение набора должно проводиться при температуре 2-8⁰С в течение всего срока годности - 24 мес. Допускается хранение набора при температуре до 25⁰С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

Стабилизированный раствор стрептокиназы можно хранить при температуре 2-8⁰С не более 10 сут.

Рабочий раствор стрептокиназа можно хранить при комнатной температуре (18-25⁰С) не более 2 сут, при температуре 2-8⁰С не более 5 сут или в замороженном состоянии при температуре минус 18-20⁰С не более 2 мес.

Раствор плазмы-калибратора можно хранить при комнатной температуре (18-25°C) не более 2 ч, при температуре 2-8°C не более 8 ч или в замороженном состоянии при температуре минус 18-20°C не более 2 мес.

Раствор хромогенного субстрата можно хранить при комнатной температуре не более 2 сут, при температуре 2-8°C не более 14 сут или в замороженном состоянии при температуре минус 18-20°C не более 2 мес.

По вопросам, касающимся качества набора РЕОХРОМ-ПЛАЗМИНОГЕН, следует обращаться в МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу:

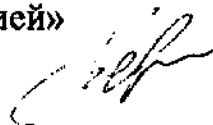
125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4, Гематологический научный центр РАМН, тел/факс (495) 614-90-57, e-mail: renam@blood.ru

и в Лабораторный Центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117241, г. Москва, Научный проезд, д. 14 а, тел.: (499) 120-60-96.

Заведующий отделом производства НПО «РЕНАМ»

МБООИ «Общество больных гемофилией»

кандидат биологических наук

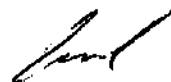


А.Л.Берковский

Научный руководитель лаборатории

клинической коагулологии ГНЦ РАМН

доктор медицинских наук



С.А.Васильев