

УТВЕРЖДЕНА

приказом Росздравнадзора
от « » 2012 г.
№



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению Набора реагентов для определения активности α 2-антиплазмина оптическим методом
(Реахром-антиплазмин)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Реахром-антиплазмин предназначен для определения активности ингибитора фибринолиза α 2-антиплазмина в плазме крови человека. Врожденный дефицит α 2-антиплазмина ассоциирован с геморрагическими состояниями. Снижение уровня α 2-антиплазмина наблюдается при болезнях печени и ДВС-синдроме. Увеличенный уровень α 2-антиплазмина часто наблюдается в послеоперационный период.

Один набор предназначен для проведения 20 макро определений при расходе по 0,5 мл раствора плазмина на 1 анализ или для 100 микро определений (планшетный метод) при расходе по 75 мкл плазмина на 1 анализ.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

α 2-антиплазмин – это ингибитор фибринолиза, очень быстро связывающий плазмин и необратимо ингибирующий его. Это одноцепочечный гликопротеин, имеющий молекулярную массу 60–70 кД и мигрирующий при электрофорезе как α 2-глобулин. Метод определения активности α 2-антиплазмина основан на его способности нейтрализовать плазмин. Активность α 2-антиплазмина в плазме определяют, добавляя к ней избыток плазмина. При этом происходит ингибирование плазмина пропорционально количеству α 2-антиплазмина в плазме. Оставшееся количество плазмина катализирует отщепление паранитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата.

Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности α 2-антиплазмина в плазме.

Процесс идет по следующей схеме:

α 2-антиплазмин (плазма) + плазмин (избыток) $\Rightarrow$

(α 2-антиплазмин – плазмин) + плазмин (остаток).

Субстрат-pNA + плазмин (остаток) $\Rightarrow$ Пептид + pNA.

2.2. Состав набора

- Плазмин, лиофильно высушенный – 2 флакона;

- Плазма-калибратор, лиофильно высушенная – 1 флакон;
- Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 2 флакона;
- Буферный раствор – 3 флакона (по 5,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В нормальной плазме здоровых лиц активность $\alpha 2$ -антиплазмина составляет 80-120%.

Активность $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме-калибраторе - 80-120%. Допустимое отклонение от аттестованного значения не более 10%.

Чувствительность определения 10%.

Отклонение от линейности в диапазоне активности $\alpha 2$ -антиплазмина от 25 до 100% не более 10%.

Коэффициент вариации результатов определения активности $\alpha 2$ -антиплазмина не превышает 10%.

Допустимый разброс результатов определения активности $\alpha 2$ -антиплазмина в одной пробе крови разными наборами одной серии не превышает 10%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора Реахром-антиплазмин класс 1.

4.2. 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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, длина волны 405 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм;
- центрифуга лабораторная;
- пипетки вместимостью 0,02-0,2 мл, 0,1-1,0 мл;
- термобаня, поддерживающая температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- секундомер;
- вода дистиллированная;
- вакуумные системы для взятия крови;
- цитрат натрия 0,11 М (3,8%) раствор;
- бумага масштабно-координатная Н-1;
- пробирки пластиковые вместимостью 5,0 или 10 мл;
- кислота уксусная 20%;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре 2-8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагентов

Буферный раствор. Готов для использования. Буферный раствор должен иметь $pH=7,5\pm0,05$.

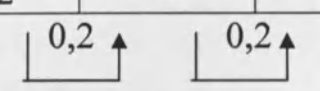
Плазмин. Во флакон с лиофильно высушенным плазмином внести 5,0 мл буферного раствора и растворить содержимое осторожным покачиванием, не встряхивать. Готов к проведению анализа через 20 мин после растворения.

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

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

7.2. Построение калибровочного графика.

Приготовить серию разведений плазмы-калибратора с известной активностью $\alpha 2$ -антиплазмина (А) буферным раствором по схеме:

Пробирка №	1	2	3
Активность $\alpha 2$ -антиплазмина, %	1,0 А*	0,5 А	0,25 А
Буферный раствор, мл	0,4	0,2	0,2
Плазма-калибратор, мл	0,2	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл			

*А – активность $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме-калибраторе указана в паспорте на набор.

В каждом разведении плазмы-калибратора провести определение оптической плотности по методу, описанному ниже в п. 7.3.

На линейной масштабной-координатной бумаге отложить по оси У величины оптической плотности, ед. опт. плотн., полученные для каждого разведения плазмы-калибратора, на оси Х – отложить соответствующую данному разведению активность $\alpha 2$ -антиплазмина, %.

Калибровочный график линеен в интервале активности $\alpha 2$ -антиплазмина от 25 до 100%.

7.3. Проведение анализа.

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму буферным раствором в 3 раза по следующей схеме: 0,1 мл плазмы + 0,2 мл буферного раствора.

Анализ провести в пластиковых пробирках, термостатируемых при температуре 37°C.

Внести в кювету	Исследуемый образец	Кювета сравнения
Плазмин, мкл	500	-
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор), мкл	100	-
Буферный раствор, мкл	-	600
Перемешать и инкубировать при температуре 37°C точно 3 мин		
Раствор хромогенного субстрата, мкл	100	-
Перемешать и инкубировать при температуре 37°C точно 2 мин		
Уксусная кислота 20%, мкл	1000	-

Измерить оптическую плотность исследуемого образца плазмы, ед. опт. плотн., против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭК) при длине волны 405 нм и использовании кювет с длиной оптического пути 10 мм.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По значению оптической плотности, ед. оптич. плотн., образца исследуемой плазмы определить по калибровочному графику активность $\alpha 2$ -антиплазмина, %, в данном образце.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Образцы с высоким уровнем активности $\alpha 2$ -антиплазмина могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов, поэтому точные значения активности для таких образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы не в 3, а в 6 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 наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание компонентов набора допускается. Срок годности наборов – 24 мес.

Пронумерованно
и прошнуровано 5 листов
Президент МБОУ «Обш
больных гемофилией»


Ю.А.Жулёв