

Набор реагентов для определения активности антитромбина III оптическим методом.

Антитромбин III (АТШ) или ко-фактор гепарина – основной антагонист тромбина при образовании этого фермента в крови. Он является единственным ингибитором свертывания крови, врожденный дефицит которого клинически проявляется тромбозами. В отсутствие гепарина АТШ медленно и необратимо ингибирует тромбин и другие факторы свертывания и фибринолиза. В присутствии гепарина АТШ становится быстрым ингибитором этих ферментов. Наследственный и приобретенный дефицит АТШ в крови приводит к развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания и в некоторых случаях острых тромбозов. Сниженная концентрация АТШ наблюдается у больных с заболеваниями печени (при циррозе), с нефротическим синдромом в результате экскреции ингибитора с мочой. Концентрацию АТШ снижают оральные контрацептивы и инъекции гепарина.

Принцип метода.

Метод определения активности АТШ основан на способности АТШ нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. Активность АТШ определяют в плазме, добавляя к ней избыток тромбина. При этом происходит ингибирование тромбина комплексом АТШ-гепарин пропорционально количеству АТШ в плазме. Оставшееся количество тромбина катализирует отщепление пара-нитроанилина (рNA) от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного рNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности АТШ.

Процесс идет по следующей схеме:

АТШ + гепарин (избыток) ⇒ АТШ-гепарин.

АТШ-гепарин + тромбин (избыток) ⇒

АТШ-гепарин-тромбин + тромбин (остаток).

Субстрат-рNA + тромбин (остаток) ⇒ Пептид + рNA.

Состав набора:

Буфер с гепарином концентрированный (5мл) – 2фл.

Тромбин человека (10 НИН/фл, 2.5мл), – 2 фл.

Плазма-калибратор, лиофильно высушенная (1мл) – 1 фл.

Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный (2мл) – 2фл

Приготовление реагентов.

1. **Рабочий буферный раствор.** Буфер с гепарином концентрированный (5 мл) развести дистиллированной водой в 10 раз (1:9). Рабочий буферный раствор должен иметь pH=8,4 ± 0,05. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения. Хранить при температуре 2-8°C не более 10 дней.

2. **Рабочий раствор тромбина.** Во флакон с лиофильно высушенным тромбином внести 2.5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

3. **Раствор плазмы-калибратора.** Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

4. **Раствор хромогенного субстрата.** Во флакон с хромогенным субстратом внести 2 мл дистиллированной воды, оставить без перемешивания на 20 минут, затем содержимое флакона тщательно перемешать

Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8°C	+18-22°C	-18-20°C
Рабочий раствор тромбина	5 дня	2 дня	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	14 дней	5 дней	2 мес.
Раствор плазмы – калибратора	8 часов	8 часов	2 мес.

Получение исследуемой плазмы для анализа.

Венозную кровь взять в пластиковую или стеклянную силиконизированную пробирку на 3,8% (0.11моль/л) цитрате натрия (9:1), центрифугировать 7 мин при 1000 об/мин, плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. Центрифугирование следует проводить как можно скорее

после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковые пробирку. Для анализа достаточна 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8°C не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C.

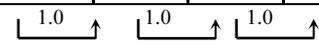
Дополнительные реагенты:

1. Цитрат натрия 0.11М (3.8%) раствор.

2. Уксусная кислота 50% концентрации.

Построение и использование калибровочного графика.

Для проведения анализа необходимо использовать пластиковые пробирки.

Пробирка №	1	2	3	4
Активность АТШ в %	1.0A*	0.5A*	0.25A*	0.125A*
Рабочий раствор буфера, мл	1.9	1.0	1.0	1.0
Плазма-калибратор, мл	0.1	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл				

*A - активность антитромбина III в плазме-калибраторе, указана в паспорте на набор.

Для построения калибровочного графика используют плазму-калибратор с известной активностью АТШ (А). На оси ординат (Y) по линейной шкале отложить величины оптической плотности, полученных для каждого разведения плазмы-калибратора, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале отложить активность антитромбина III в %.

Калибровочный график линеен в интервале активности АТШ от 10 до 100%.

Проведение анализа.

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму рабочим буферным раствором в 20 раз по следующей схеме:

0.1мл плазмы + 1.9мл буфера.

Анализ проводится в пластиковых пробирках, термостатируемых при 37°C.

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор)	100 мкл	-
Рабочий раствор тромбина	100 мкл	-
Рабочий раствор буфера	-	1500мкл
Перемешать и инкубировать при 37°C точно 180 сек.		-
Рабочий раствор хромогенного субстрата	100 мкл	-
Перемешать и инкубировать при 37°C точно 60 сек.		-
50%-ая уксусная кислота	1000 мкл	-

Измерить оптическую плотность образца против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм. Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определить активность АТШ.

Интерпретация результатов.

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности АТШ могут полностью нейтрализовать тромбин в системе, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности АТШ для таких образцов могут быть получены при разведении исходной плазмы в 40 раз. При этом полученный результат необходимо умножен на 2.

Заниженные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных:

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

В нормальной плазме здоровых лиц активность антитромбина III составляет 80 - 120%.

Контроль качества.

Нормальные и патологические значения антитромбина III следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ:

Плазма контрольная – 11параметров код КМ-2

Плазма контрольная патологическая – 11параметров код КМ-4

Паспорт
Набора реагентов для определения активности антитромбина III
РеаХром-АТIII тест

Серия № 1905

Годен до: 05.07

№ п/п	Наименование показателя	По ТУ	Фактическое значение
1	Внешний вид тромбина (Серия 0805)	Пористая масса белого цвета	Соответствует
2	Внешний вид концентрата буфера (Серия 0505)	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
3	Внешний вид плазмы-калибратора (Серия 4505)	Пористая масса желтого цвета	Соответствует
4	Внешний вид хромогенного субстрата (Серия 1905)	Пористая масса белого цвета	Соответствует
5	Растворимость тромбина и плазмы-калибратора, мин. не более	3	Соответствует
6	Растворимость хромогенного субстрата, мин. не более	20	Соответствует
5	Активность антитромбина III в плазме-калибраторе с. 4505, %	80 - 120	95
6	Допустимое отклонение активности антитромбина III в плазме-калибраторе от аттестованного значения, % не более	10	Соответствует
7	Чувствительность, % не более	10	Соответствует
8	Линейность в диапазоне активности 10-100 %, отклонение в % не более	10	Соответствует
9	Коэффициент вариации результатов определения, % не более	10	Соответствует

ОТК

Разработчик и изготовитель:
МБООИ Общества больных гемофилией
НПО РЕНАМ
 125167 Москва, Ново-Зыковский пр., 4а
 Тел. (095) 213-00-72, 212-51-03

