

## Набор реагентов для определения активности плазминогена оптическим методом.

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 плазима 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.

### Принцип метода

Метод определения активности плазминогена в образце плазмы основан на его способности образовывать комплекс со стрептокиназой, который гидролизует пептидный хромогенный субстрат. Количество высвобождаемого при этом паранитроанилина (pNA) прямо пропорционально активности плазминогена в образце плазмы.

Процесс идет по следующей схеме:

**Плазминоген + стрептокиназа (избыток) ⇒ Комплекс**

**Комплекс + Пептид-pNA ⇒ Пептид + pNA (желтый)**

### Состав набора

Буфер концентрированный (5 мл) – 1 фл.

Стрептокиназа, лиофильно высушенная (1 мл) – 2 фл.

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

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

### Приготовление реагентов:

1. **Рабочий буферный раствор.** Буфер концентрированный (5 мл) развести дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь pH=7,4±0,05. Хранить при температуре 2-8<sup>0</sup>С не более 2 месяцев.

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

3. **Рабочий раствор стрептокиназы.** Стрептокиназу развести рабочим буферным раствором в 6 раз (1мл Стрептокиназы+5мл рабочего буферного раствора). Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

4. **Раствор хромогенного субстрата.** Во флакон с хромогенным субстратом внести 2 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

5. **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.

### Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8 <sup>0</sup> С	+18-22 <sup>0</sup> С	-18-20 <sup>0</sup> С
Рабочий раствор стрептокиназы	5 дней	2 дня	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	14 дней	2 дня	2 мес.
Раствор плазмы – калибратора	8 часов	2 часа	2 мес.

### Дополнительные реагенты.

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

2. Уксусная кислота концентрированная (96%).

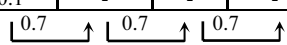
### Получение исследуемой плазмы для анализа.

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 пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8<sup>0</sup>С не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20<sup>0</sup>С.

### Построение и использование калибровочного графика.

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

Пробирка №	1	2	3	4
Активность плазминогена в %	1.0А*	0.5А	0.25А	0.125А
Рабочий раствор буфера, мл	1.4	0.7	0.7	0.7
Плазма-калибратор, мл	0.1	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл				

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

Для построения калибровочного графика используют плазму-калибратор с известной активностью плазминогена (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 плазминогена в %. Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определить активность плазминогена. Калибровочный график линеен в интервале активности плазминогена от 10 до 100%.

### Проведение анализа.

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму рабочим буферным раствором в 15 раз по следующей схеме:

0.1мл плазмы + 1.4мл буфера.

Анализ проводится в пластиковых кюветках, термостатируемых при 37<sup>0</sup>С.

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Рабочий p-р стрептокиназы	500 мкл	-
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор)	500 мкл	-
Рабочий буферный раствор	-	1000 мкл
Перемешать и инкубировать при 37 <sup>0</sup> С точно 5 мин.	-	-
Раствор хромогенного субстрата	100 мкл	-
Перемешать и инкубировать при 37 <sup>0</sup> С точно 3 мин.	-	-
Уксусная к-та концентрированная	100 мкл	-

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

### Интерпретация результатов.

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 исходной плазмы в 30 раз. При этом результат, считанный из калибровочного графика, должен быть умножен на 2.

Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных:

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

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

### Контроль качества.

Нормальные и патологические значения Нормализованного Отношения следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ:

Плазма контрольная – 11 параметров

код КМ-2

Плазма контрольная патологическая – 11 параметров код КМ-4

**Паспорт  
Набора реагентов для определения активности плазминогена  
РеаХром-Плазминоген тест**

Серия № 1105

Годен до: 06.07

№ п/п	Наименование показателя	По ТУ	Фактическое значение
1	Внешний вид стрептокиназы (серия 1105)	Пористая масса белого цвета	Соответствует
2	Внешний вид буфера концентрированного (серия 1105)	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
3	Внешний вид плазмы-калибратора (серия 4005)	Пористая масса желтого цвета	Соответствует
4	Внешний вид хромогенного субстрата (серия 1105)	Пористая масса белого цвета	Соответствует
5	Растворимость стрептокиназы и плазмы-калибратора, мин. не более	3	Соответствует
6	Растворимость хромогенного субстрата, мин. не более	3	Соответствует
5	Активность плазминогена в плазме-калибраторе серии 4005, %	70 - 140	<b>105</b>
6	Допустимое отклонение активности плазминогена 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**

