

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 (рNA) прямо пропорционально активности плазминогена в образце плазмы.

Процесс идет по следующей схеме:

Плазминоген + стрептокиназа (избыток) ⇒ Комплекс

Комплекс + Пептид-рNA ⇒ Пептид + рNA (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 рН=7,4±0,05. Хранить при температуре 2-8⁰С 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 ⁰ С | +18-22 ⁰ С | -18-20 ⁰ 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%).

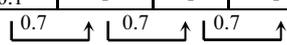
Получение исследуемой плазмы для анализа.

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 - 8⁰С не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20⁰С.

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 37⁰С.

| Внести в кювету: | Образец | Кювета сравнения |
|--|---------|------------------|
| Рабочий р-р стрептокиназы | 500 мкл | - |
| Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор) | 500 мкл | - |
| Рабочий буферный раствор | - | 1000 мкл |
| Перемешать и инкубировать при 37 ⁰ С точно 5 мин. | - | - |
| Раствор хромогенного субстрата | 100 мкл | - |
| Перемешать и инкубировать при 37 ⁰ 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 | 105 |
| 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

