

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 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.

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 пара-нитроанилина (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 (2 мл) – 2 фл.
Плазма-калибратор, лиофильно высушенная (1 мл) – 1 фл.
Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный (2мл) – 2 фл

Код ФА-2

Приготовление реагентов:

- 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 2-8°С не более 2 месяцев.
- Стрептокиназа.** Во флакон с лиофильно высушенной стрептокиназой внести 2 мл дистиллированной воды и растворить содержимое осторожным покачиванием, не встряхивать!
- 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.
- 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.
- 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°С	+18-22°С	-18-20°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.

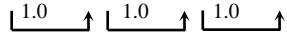
- Цитрат натрия 0.11М (3.8%) раствор.
- Уксусная кислота концентрированная (96%).

Получение исследуемой плазмы для анализа.

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку на 3,8% (0,109 моль/л) цитрате натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови на 3,2% (0,109 моль/л) цитрате натрия, центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Время хранения образцов плазмы при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8°С не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при -20°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	1.8	1.0	1.0	1.0
Плазма-калибратор, мл	0.2	-	-	-
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 Y отложить величины оптической плотности, полученных для каждого разведения плазмы-калибратора, а на оси X по линейной шкале отложить активность плазминогена в %. Калибровочный график линеен в интервале активности плазминогена от 10 до 100%. Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определить активность плазминогена.

Проведение анализа.

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму рабочим буферным раствором в 10 раз по следующей схеме: 0.1мл плазмы + 0.9мл буфера.

Анализ проводится в пластиковых кюветках, термостабируемых при 37°С.

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°С точно 5 мин.		-
Раствор хромогенного субстрата	100 мкл	-
Перемешать и инкубировать при 37°С точно 3 мин.		-
Уксусная кислота, 50%-ая	500 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 20 раз. При этом результат, считанный из калибровочного графика, должен быть умножен на 2.

Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больших:

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

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

Меры предосторожности.

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.

Контроль качества.

Нормальные и патологические значения активности плазминогена следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ: Плазма контрольная код КМ-2

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемо-

