

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения плазминогена фотометрическим методом (Реахром-плазминоген) по ТУ 9398-270-05595541-2010.

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение. Медицинское изделие для диагностики *in vitro* Набор реагентов для определения плазминогена фотометрическим методом по ТУ 9398-270-05595541-2010 (сокращенное наименование Реахром-плазминоген) предназначено для качественного определения активности плазминогена в плазме крови хромогенным методом как вручную, так и на автоматических анализаторах.

Область применения. Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

Предназначенный пользователь. Определение активности плазминогена с помощью набора Реахром- плазминоген может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

Диагностическая роль. 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 потребление циркулирующего фермента.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**Состав набора**

Стрептокиназа, лиофильно высушенная – 50 тыс.ед./флакон – 2 шт;
Плазма-калибратор, лиофильно высушенная - 1мл/флакон – 1 шт. ;
Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный - 4 мкМ/флакон – 2 шт. ;
Буфер концентрированный - 5 мл/ флакон – 1 шт.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 40 определений ручным методом, 100 определений на коагулометрах Sysmex и 70 определений на коагулометрах ACL (IL).

Принцип метода

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

Процесс идет по следующей схеме:

Плазминоген + стрептокиназа (избыток) ⇒ Комплекс
Комплекс + Пептид-pNA ⇒ Пептид + pNA (желтый)

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ КАЛИБРАТОРУ

Активность плазминогена в плазме-калибраторе устанавливаются при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против пула донорской плазмы, полученного от не менее 100 здоровых доноров. Значения активности плазминогена в плазме-калибраторе указаны в паспорте медицинского изделия.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения плазминогена: высокая концентрация фибриногена, билирубин в концентрации до 0,2 г/л, свободный гемоглобин – до 2 г/л, триглицериды – до 10 г/л. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно завышенных результатов. При терапии апротинином могут быть получены ложно заниженные результаты.

Чувствительность

Минимальная активность плазминогена, определяемая набором Реахром-плазминоген – не более 10%.

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

Воспроизводимость

Активность плазминогена в плазме-калибраторе - 80-120%. Допустимое отклонение от аттестованного значения не более 10%. Коэффициент вариации результатов определения активности плазминогена не превышает 10%. Допустимый разброс результатов определения активности плазминогена в одной пробе крови разными наборами одной серии не превышает 10%.

Диапазон определяемых значений активности

С помощью набора Реахром-плазминоген можно определить не менее 10% активности плазминогена. Верхний предел не ограничен.

Линейность

Линейность определения зависит от модели коагулометра. Отклонение от линейности в диапазоне активности плазминогена от 10 до 100% не более 10%.

Значения активности, соответствующие нормальным

Нормальный диапазон значений плазминогена, полученный при определении активности плазминогена набором Реахром-плазминоген у не менее 100 здоровых доноров, составляет 80-140%, что соответствует биологическому референтному интервалу [1].

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов Реахром-плазминоген предназначен только для диагностики *in vitro*. Класс потенциального риска применения набора – 2а.

Набор реагентов Реахром-плазминоген не является источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляет рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

При работе с набором и образцами крови следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиН 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010); Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика ВИЧ-инфекции» (СП 3.1.5. 2826 от 11.01.2011).

При работе следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита человека ВИЧ1 и ВИЧ2, вирусы гепатита В и гепатита С или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Плазма-калибратор получены из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее ее следует рассматривать как потенциально вирус-опасные.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Автоматический коагулометр открытого типа с оптической системой регистрации результатов реакции.
- спектрофотометр, ФЭК, биохимический или любой другой анализатор, имеющий длину волны для регистрации 405 нм;
- центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- термостат, поддерживающий температуру 37±1°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М) или
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- уксусная кислота 50% концентрации
- вода дистиллированная;
- мерный цилиндр;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**Вид анализируемого биологического материала**

Набор реагентов Реахром-плазминоген предназначен для определения активности плазминогена в плазме человеческой крови.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянкой поверхностью.

Процедура получения биологического материала

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 от плюс 18 до плюс 25°C в течение 15 минут при 3000 об/мин (1200g).

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 часов при комнатной температуре от плюс 18 до плюс 25°C и не более 8 часов при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре от минус 18 до минус 20°C и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

Ограничения по использованию биологического материала

При работе с кровью общим правилом является немедленное отделение плазмы от форменных элементов, так как некоторые вещества могут поглощаться и инактивироваться эритроцитами и лейкоцитами.

Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Рабочий раствор стрептокиназы:

- для ручного метода: 1 мл Стрептокиназы+5 мл рабочего буферного раствора;
- для коагулометров Sysmex: 1 мл Стрептокиназы+5 мл рабочего буферного раствора;
- для коагулометров ACL IL: 2 мл Стрептокиназы+2 мл рабочего буферного раствора.

Растворы готовы к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Раствор хромогенного субстрата. Во флакон с хромогенным субстратом внести 2 мл дистиллированной воды (для коагулометров Sysmex, ACL IL и ручного метода), 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.

Время растворения лиофильно высушенных реагентов при комнатной температуре не превышает 3 минуты.

Рабочий буферный раствор. Буфер концентрированный развести в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерную емкость, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать). pH рабочего буферного раствора должен составлять от 7,35 до 7,45.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение анализа на автоматическом анализаторе

- Выбрать на коагулометре программу для определения плазминогена.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу Calibrate, калировка прибора.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу определения плазминогена.
- Считать результаты.

Проведение анализа ручным методом и на полуавтоматическом коагулометре

Построение калибровочного графика

Использовать только пластиковые пробирки. Приготовить серию разведенной плазмы-калибратора:

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	0,7	0,7	0,7	

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

С каждым разведенным раствором плазмы-калибратора с установленной активностью плазминогена, %, провести определение оптической плотности по методу, описанному ниже. 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 %. Калибровочный график должен представлять собой восходящую прямую линию. Калибровочный график должен быть построен для каждой серии реагентов.

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 пробирках, термостатируемых при 37⁰С, в соответствии со схемой:

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

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведение анализа на автоматическом анализаторе

Автоматический анализатор регистрирует скорость нарастания оптической плотности при расщеплении хромогенного субстрата.

При проведение анализа ручным методом и на полуавтоматическом коагулометре

Измерить оптическую плотность образца против кюветы сравнения в оптическом канале анализатора или на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм. По калибровочному графику определить активность плазминогена.

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 дополнительном разведении исходной плазмы в 2 раза буферным раствором для разведения образцов, используемым в соответствующем коагулометре. При определении вручную в этом случае, исследуемую плазму следует развести в 30 раз. При этом полученный результат должен быть умножен на 2.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности плазминогена следует контролировать с помощью Плазмы контрольной (Реагента для контроля правильности определения параметров свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем по ТУ 9398-026-5595541-2009), код КМ2.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности!

Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8⁰С. Допускается хранение при температуре до плюс 25⁰С не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

Реагенты	+2-8 ⁰ С	+18-25 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	4 часа	2 мес.
Рабочий буферный раствор	1 месяц	5 дней	Не замораживать!

Транспортирование наборов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8⁰С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25⁰С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора Реахром-плазминоген требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с набором Реахром-плазминоген с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на три четверти, завязывают, маркируют надписью: «Отходы. Класс Б», наносят на бирку название организации, дату и ФИО исполнителя и помещают на участок временного хранения до вывоза транспортом специального подразделения к месту обеззараживания и утилизации.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 наборы реагентов Реахром-плазминоген, не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Г. Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости («Отходы. Класс Г»). Диагностические средства собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного) в соответствии с требованиями нормативных документов в зависимости от класса опасности отходов. Вывоз отходов класса Г для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Г осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алан, Г.Б. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам / Г.Б. Алан. – М.: Лабора, 2013. – 1280 с.
2. Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушения гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2008. – 292 с.
3. Долгов В.В., Свириной П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. - М.-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2005. -227 с.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2 тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru

