1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов для количественного определения активатора прекалликреина хромогенным методом (далее – набор реагентов) предназначен для количественного определения активатора прекалликреина в продуктах крови и лекарственных средствах хромогенным методом «in vitro».

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных проб и 6 калибровочных проб, всего – 96 определений.

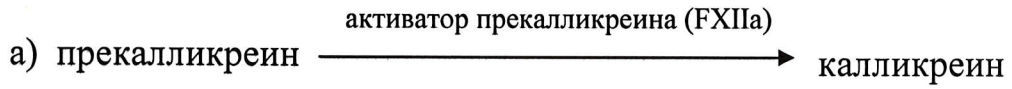
1.2 Калликреины, основные кининогеназы, относятся к трипсиноподобным сериновым протеиназам и локализуются в плазме крови, в тканях органов, в основном с экзокринной функцией, и в их секретах, стенке кишечника, почках и моче, половых и потовых железах. Плазменный и тканевые калликреины различаются по физикоохимическим свойствам, ингибиторному спектру и специфичности. Так, первый – щелочной белок с pI около 8,6 и молекулярной массой 90,76 кДа, рассчитанной по структуре гена; вторые – это кислые гликопротеины с pI 3,5-4,5, молекулярной массой от 24 до 40 кДа. При этом калликреины обоих типов освобождают кинины из кининогенов. Активатором неактивного прекалликреина в активный калликреин является биологически активный фрагмент фактора свертывания крови XII (фактор Хагемана). Активатором прекалликреина могут выступать также плазмин и трипсин. Эндогенная активация прекалликреина в калликреин осуществляется в результате последовательного активирования ряда протеолитических ферментов. При этом активация фактора Хагемана является обратимой и регулируется по принципу обратной связи. Это имеет большое физиологическое значение в осуществлении тесной связи калликреин-кининовой системы с системой свертывания крови. Активатор прекалликреина запускает трансформацию прекалликреина в калликреин, что в свою очередь, через серию биохимических реакций приводит к синтезу вазоактивного пептида – брадикинина. Брадинининин, обладая мощным сосудорасширяющим действием, мотет вызвать гипотензивный эффект у пациентов при введении препаратов крови с высоким содержанием примесей активатора прекалликреина. Кроме того, активатор прекалликреина в высоких концентрациях может приводить не только к гипотензии, но и к вазодилатации. В настоящее время активно развиваются исследования роли калликреинов в регуляции кровяного давления, развитии сердечнососудистых, онкологических заболеваний и многих других физиологических и патогенетических процессов.

2 ПРИНЦИП МЕТОДА

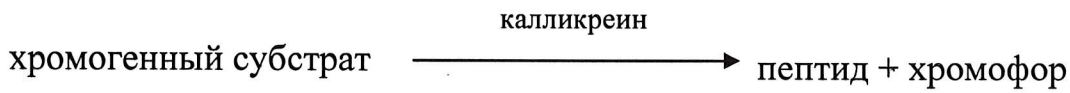
2.1 Хромогенный метод количественного определения активности активатора прекалликреина рассчитан на определение активности активатора прекалликреина в плазме, продуктах крови и лекарственных средствах. В основу метода положен двух стадийный фотометрический метод превращения прекалликреина в калликреин в присутствии активатора прекалликреина, образовавшийся калликреин способен отщеплять хромофор от синтетического хромогенного субстрата, а высвободившийся хромофор определяется спектрофотометрическим методом. На первой стадии, активатор прекалликреина (FXIIa) активирует прекалликреин и переводит его в активную форму калликреин. На второй стадии, калликреин селективно расщепляет хромогенный субстрат H-D-пролил-L-фенилаланил-L-аргинина-р-нитроанилин дигидрохлорид. Исследование образца проводят фотометрическим методом при длине волны 405 нм. Значение оптической плотности (или увеличение поглощения) прямо пропорционально количеству активатора прекалликреина.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1-я стадия



2-я стадия



3 КОМПЛЕКТНОСТЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 В комплект поставки набора реагентов для количественного определения активатора прекалликреина хромогенным методом входят следующие компоненты:

– микропланшет стрипованный (8×12) – 1 шт.;

– хромогенный субстрат (лиофилизированный препарат) – 3 флакона;

– стандарт активатора прекалликреина, откалиброван относительно международного стандарта EPRS (Batch 6,0) (лиофилизированный препарат) – 3 флакона;

– субстрат прекалликреина (лиофилизированный препарат) – 3 флакона;

– концентрат буферного раствора для разведения, 12 мл – 1 флакон;

– 20 % раствор уксусной кислоты, 3 мл – 2 флакона;

– инструкция по применению.

4 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

4.1 Содержание и эксплуатация зданий и помещений, в которых осуществляется производство набора реагентов, должны соответствовать требованиям санитарных норм и правил «Специфические санитарно-эпидемиологические требования к содержанию и эксплуатации организаций здравоохранения, иных организаций и индивидуальных предпринимателей, которые осуществляют медицинскую, фармацевтическую деятельность», утвержденными постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 3 марта 2020 г. № 130.

4.2 Персонал, использующий набор реагентов, должен быть обеспечен в установленном порядке средствами индивидуальной защиты и спецодеждой, должен соблюдать правила личной гигиены и асептики, принятые в медицинских учреждениях в отношении препаратов крови, в соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь. Меры предосторожности при выполнении работ с условно-патогенным биологическим материалом должны выполняться в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 февраля 2013 г. № 11.

4.3 Утилизация брака и отходов от набора реагентов после его использования проводится в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г № 14.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

– универсальный автоматический фотометр BioTek ELx800 (8-ми канальный ридер для микропланшет), позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 405 нм;

– вихревой смеситель типа VORTEX TTS 2;

– магнитная мешалка типа MAG HS 7;

– термостат суховоздушный типа ТС 80 М2;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,35; 0,5; 1,0 и 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования, «Ленпипет», Россия;

– штатив для пробирок;

– вода дистиллированная;

– перчатки хирургические резиновые;

– пробирки одноразовые с пробками;

– стакан стеклянный вместимостью 300 мл.

6 ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа компоненты набора реагентов и исследуемые образцы необходимо выдержать при комнатной температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

6.1 Приготовление рабочего буферного раствора: в стакан вместимостью 300 мл внести 228 мл воды дистиллированной, добавить содержимое флакона с концентратом буферного раствора для разведения и тщательно перемешать на мешалке магнитной.

Приготовленный рабочий буферный раствор может храниться в течение 4 недель при температуре (2-8) °С.

6.2 Приготовление рабочего раствора хромогенного субстрата: во флакон, содержащий хромогенный субстрат, внести 3,5 мл воды дистиллированной. Через 30 мин тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

При вскрытии и растворении содержимого флакона необходимо следить, чтобы на пробке флакона не осталось сухого вещества.

Приготовленный рабочий раствор хромогенного субстрата может храниться в течение 1 месяца при температуре (2-8) °С.

6.3 Приготовление раствора стандарта активатора прекалликреина: во флакон, содержащий стандарт активатора прекалликреина, внести 1,0 мл воды дистиллированной. Через 30 мин тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

При вскрытии и растворении содержимого флакона необходимо следить, чтобы на пробке флакона не осталось сухого вещества.

Приготовленный раствор активатора прекалликреина может храниться в течение 2 часов при температуре (2-8) °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.4 Приготовление раствора субстрата прекалликреина: во флакон, содержащий субстрат прекалликреина, внести 2,0 мл воды дистиллированной. Через 30 мин тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

При вскрытии и растворении содержимого флакона необходимо следить, чтобы на пробке флакона не осталось сухого вещества.

Приготовленный раствор субстрата прекалликреина может храниться в течение 2 часов при температуре (2-8) °С.

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

7.1 Время хранения исследуемых образцов до анализа – не более 4 часов при комнатной температуре и не более 8 часов при температуре (2-8) °С. Допускается однократное замораживание исследуемых образцов при температуре минус (18-20) °С и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Подготовка калибраторов.

Пробирки поместить в штатив и промаркировать следующим образом:

– B_0; B_1; B_2; B_3; B_4 – для приготовления калибровочных растворов.

Приготовление калибровочных растворов:

– в пробирку с маркировкой B_4 внести 200 мкл раствора из флакона содержащего стандарт активатора прекалликреина и 200 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 2 раза);

– в пробирку с маркировкой B_3 внести 200 мкл раствора из пробирки с маркировкой B_4 и 200 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 4 раза);

– в пробирку с маркировкой B_2 внести 200 мкл раствора из пробирки с маркировкой B_3 и 200 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 8 раз);

– в пробирку с маркировкой B_1 внести 200 мкл раствора из пробирки с маркировкой B_2 и 200 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 16 раз);

– в пробирку с маркировкой B_0 внести 200 мкл рабочего буферного раствора (нулевая активность активатора прекалликреина).

Таким образом, получают калибровочные пробы с различной активностью активатора прекалликреина в диапазоне 3-50 МЕ/мл.

Для пробирок с маркировками B_4; B_3; B_2 и B_1 точное значение активности активатора прекалликреина в полученных калибровочных пробах определяют, разделив активность активатора прекалликреина, указанную на флаконе, на коэффициент разведения 2, 4, 8 и 16 соответственно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.2 Процедура анализа.

8.2.1 Составить протокол маркировки пробирок. Пробирки в монопликатах промаркировать следующим образом:

$C_0 – C_5$ – калибровочные пробы;

X_1 - X_i – исследуемые пробы.

8.2.2 Составить протокол маркировки лунок микропланшета. Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом:

$C_0 – C_5$ – калибровочные пробы;

X_1 - X_i – исследуемые пробы.

8.2.3 Схема анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема анализа

1 Внесение реагентов	Во все пробирки внести по 75 мкл калибровочных растворов и исследуемых проб. Во все пробирки внести по 75 мкл раствора субстрата прекалликреина
2 Инкубация	Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 45 мин
3 Отбор смеси калибровочных растворов и исследуемых образцов	В соответствии с маркировкой из пробирок перенести в лунки микропланшета по 50 мкл инкубационной смеси. Во все лунки микропланшета внести по 100 мкл раствора хромогенного субстрата
4 Инкубация	Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 20 мин
5 Остановка реакции	Во все лунки микропланшета внести по 50 мкл 20 % раствора уксусной кислоты
6 Измерение	Встряхнуть микропланшет и измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 405 нм

8.2.4 Отобрать из пробирок, маркированных B_1; B_2; B_3; B_4, по 75 мкл раствора и внести в пробирки маркированные C_1; C_2; C_3; C_4. Отобрать из флакона, содержащего стандарт активатора прекалликреина, 75 мкл раствора и внести в пробирку маркированную C_5.

Отобрать 75 мкл рабочего буферного раствора и внести в пробирку, маркированную C_0 (нулевая проба, не содержащая активатор прекалликреина).

Внести в пробирки, маркированные X_1 - X_i, по 75 мкл раствора исследуемых проб.

Во все пробирки внести по 75 мкл раствора субстрата прекалликреина.

8.2.5 Пробирки аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 45 мин.

8.2.6 В соответствии с маркировкой из пробирок перенести в лунки микропланшета по 50 мкл инкубационной смеси.

Во все лунки микропланшета внести по 100 мкл раствора хромогенного субстрата.

8.2.7 Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 20 мин.

8.2.8 Остановить реакцию добавлением 50 мкл 20 % раствора уксусной кислоты.

8.2.9 Встряхнуть микропланшет и измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 405 нм. Измерения провести не позднее 20 мин после остановки реакции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок микропланшета. В соответствии с маркировкой лунок получить значения величин оптической плотности (C_0 – C_5). Вычесть значение оптической плотности калибровочной пробы, не содержащей активность активатора прекалликреина (C_0 – фоновый сигнал) из значений оптической плотности для калибровочных проб (C_0 – C_5) соответственно (C_i – C_0) и исследуемых проб (X_1 - X_i) соответственно (X_i – C_0).

9.2 Построить калибровочную кривую в линейных координатах, откладывая по оси ординат значения оптической плотности после вычитания фонового сигнала (C_i – C_0), а по оси абсцисс – значения активности активатора прекалликреина (МЕ/мл) в соответствующих калибровочных пробах.

9.3 Определить по калибровочной кривой активность активатора прекалликреина (МЕ/мл) в исследуемых пробах. В случаях, когда полученная активность активатора прекалликреина в анализируемой пробе превышает 50 МЕ/мл, образец следует дополнительно развести рабочим буферным раствором и повторить измерение.

10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

10.1 Чувствительность – минимальная активность активатора прекалликреина, определяемая набором реагентов, рассчитанная на основании значения 2 SD (среднее квадратичное отклонение) от среднего арифметического значения $\overline{B}$ (МЕ/мл).

Минимальная активность активатора прекалликреина, определяемая с помощью набора реагентов, составляет 1,5 МЕ/мл.

10.2 Воспроизводимость результатов – коэффициент вариации результатов определения активности активатора прекалликреина в лунках микропланшета с двукратным разведением стандарта активатора прекалликреина (%).

Коэффициент вариации результатов определения (n = 8) активности активатора прекалликреина в исследуемых пробах с использованием набора реагентов не должен превышать 10 %.

10.3 Продолжительность анализа – 1,5 ч.

10.4 Диапазон определяемой активности активатора прекалликреина – (3-50) МЕ/мл.

11 СРОК ГОДНОСТИ

11.1 Срок годности набора реагентов – 1 год от даты его изготовления при температуре хранения от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

11.2 Не использовать набор реагентов после окончания срока годности.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1 Условия транспортирования набора реагентов должны соответствовать условиям его хранения.

12.2 Набор реагентов транспортируют всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12.3 Набор реагентов должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение всего срока годности.

Допускается хранение набора реагентов при более высокой температуре до 25 °С – не более одних суток. Замораживание набора реагентов не допускается.

13 ЮРИДИЧЕСКИЙ АДРЕС ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий)

220053, Республика Беларусь, г. Минск, Долгиновский тракт, 160
УНП 190572781, ОКПО 37652513
Тел.: (8-017) 289-01-06
Факс: (8-017) 289-87-45
E-mail: rnpc@blood.by; http://blood.by/

14 РАЗРАБОТЧИКИ

Заведующий лабораторией рекомбинантных белков ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» _____ А.П. Власов

Старший научный сотрудник лаборатории рекомбинантных белков ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» _____ О.В. Жоров

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru