

**ИНСТРУКЦИЯ**

**по применению медицинского изделия для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения активности анти-тромбина III в плазме крови человека клоттинговым методом (Реаклот-АТIII) по ТУ 9398-023-05595541-2011»**

**НАЗНАЧЕНИЕ**

**Предназначенное применение.** Медицинское изделие для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения активности анти-тромбина III в плазме крови человека клоттинговым методом (Реаклот-АТIII) по ТУ 398-023-05595541-2011» (сокращенное наименование – «Реаклот-АТIII») предназначено для количественного определения активности анти-тромбина III (далее – «АТIII») в плазме крови клоттинговым методом как вручную, так и на автоматических анализаторах.

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

**Предназначенный пользователь.** Определение активности анти-тромбина III с помощью набора Реаклот-АТIII может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

**Диагностическая роль.** Анти-тромбин III или кофактор гепарина – основной антагонист тромбина при образовании этого фермента в крови. В отсутствие гепарина АТIII медленно и необратимо ингибирует тромбин и другие факторы свертывания и фибринолиза. В присутствии гепарина АТIII становится быстрым ингибитором этих ферментов. Наследственный и приобретенный дефицит АТIII в крови приводит к развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания и в некоторых случаях к развитию острых тромбозов. Сниженная концентрация АТIII наблюдается у больных с заболеваниями печени (при циррозе), с нефротическим синдромом в результате экскреции ингибитора с мочой. Концентрацию АТIII снижают оральные контрацептивы и инъекции гепарина [1-4].

**ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА****Состав набора**

Тромбин, лиофильно высушенный - 4 мл/флакон - 2 шт.;  
Фибриноген, лиофилизированный 2 мл/флакон - 4 шт.;  
Дефибринированная плазма - калибратор, лиофильно высушенная – 1мл/флакон – 1 шт.;  
Буфер имидазоловый концентрированный – 5 мл/флакон – 1 шт.

**Число анализируемых проб биологического материала**

Один набор предназначен для проведения 160 определений ручным методом на полуавтоматическом коагулометре. Количество анализов на автоматических анализаторах зависит от конструкции прибора.

**Принцип метода.**

В исследуемой плазме тепловой обработкой удаляют фибриноген, вносят стандартное количество тромбина, смесь инкубируют и затем определяют в ней остаточную (после взаимодействия с анти-тромбином III) активность тромбина. Активность тромбина определяют по времени свертывания стандартного раствора фибриногена. Чем выше активность анти-тромбина III в исследуемой плазме, тем ниже остаточная активность тромбина, и тем медленнее происходит образование сгустка.

**МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ КАЛИБРАТОРУ**

Активность АТIII в плазме-калибраторе устанавливают при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против 3-го Международного Стандарта Анти-тромбина III, код 06/166, полученного из National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Значения активности АТIII в плазме-калибраторе указано в паспорте медицинского изделия.

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения АТIII: билирубин в концентрации не более 0,2 г/л, свободный гемоглобин – не более 2 г/л, триглицериды – не более 10 г/л, низкомолекулярный и нефракционированный гепарин – не более 1 МЕ/мл. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно заниженных результатов.

**Чувствительность**

Минимальная активность АТIII, определяемая набором Реаклот-АТIII - не более 15%.

**Воспроизводимость**

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

**Диапазон определяемых значений активности**

С помощью набора Реаклот-АТIII можно определить не менее 10% активности АТIII. Верхний предел не ограничен.

**Линейность определения в диапазоне определяемых активностей**

Линейность определения активности АТIII зависит от модели коагулометра. Отклонение от линейности в диапазоне активности АТIII от 25 до 100% не более 10%.

**Значения активности, соответствующие нормальным**

Нормальный диапазон значений АТIII, полученный при определении активности АТIII набором Реаклот-АТIII у не менее 100 здоровых доноров, составляет 80-120%, что соответствует биологическому референтному интервалу [1].

**Ограничения метода**


Клиническая диагностика не должна основываться только на результатах определения активности анти-тромбина III набором Реаклот-АТIII. При постановке диагноза должны быть рассмотрены клинические симптомы и другая значимая тестовая информация.

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Набор реагентов Реаклот-АТIII предназначен только для диагностики in vitro. Класс потенциального риска применения набора –1.

Набор реагентов Реаклот-АТIII 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, тромбин и фибриноген получены из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее их следует рассматривать как потенциально вирус-опасные.

**ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

- Полуавтоматический или автоматический коагулометр открытого типа с любой системой регистрации образования сгустка.
- термостат, поддерживающий температуру 37±1°C и 56±1°C;
- центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- 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);
- мерный цилиндр вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

**АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ****Вид анализируемого биологического материала**

Набор реагентов Реаклот-АТIII предназначен для определения активности анти-тромбина III в плазме крови. Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной 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 белков.

#### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Тромбин.** Во флакон с лиофильно высушенным тромбином внести 4 мл физиологического раствора и растворить содержимое при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

**Фибриноген.** Во флакон с лиофильно высушенным фибриногеном внести 2 мл дистиллированной воды, дать постоять не менее 15 минут и аккуратно перемешать содержимое флакона. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

**Дефибринированная плазма-калибратор.** Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

**Рабочий буферный раствор.** Буфер концентрированный имидазольный 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.

**Подготовка исследуемой плазмы пациента для анализа.** Плазму прогреть в водяной бане в течение 6 мин при 56°C (желательно перед анализами проверить температуру водяной бани обычным термометром), затем центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин (1200g), надсадочную жидкость отобрать в пластиковую или стеклянную силиконизированную пробирку.

**Проведение анализа ручным методом на полуавтоматическом коагулометре**

#### Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика прилагается дефибринированная плазма-калибратор. **Не прогревать при 56°C.**

Использовать только пластиковые пробирки. Приготовить следующие разведения плазмы-калибратора:

| Активность антиромбина III в %              | A*  | 0,5A | 0,25A |
|---|-----|------|-------|
| Номер пробирки                              | 1   | 2    | 3     |
| Плазма-калибратор, мл                       | 0,3 | -    | -     |
| Рабочий буферный раствор, мл                | 0,6 | 0,5  | 0,5   |
| Перемешать и перенести в следующую пробирку |     |      |       |

\*аттестованное значение антиромбина III в дефибринированной плазме-калибраторе в %.

Во всех 3 разведениях провести определение времени свертывания по методу, описанному ниже.

На оси Y по логарифмической шкале отложить время свертывания в секундах, а на оси X по линейной шкале отложить активность антиромбина III 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 3 раза следующим образом:

0.1 мл плазмы + 0.2 мл рабочего буферного раствора.

| В кювету коагулометра внести:                                     | Объем, мкл |
|---|------------|
| Разведенная дефибринированная плазма (калибратор или исследуемая) | 50         |
| Тромбин   | 50         |
| Инкубировать при 37°C точно 2 или 3 минут*.                       |            |
| Раствор фибриногена   | 50         |
| Зафиксировать на коагулометре время образования сгустка           |            |

\*в зависимости от типа коагулологического анализатора.

#### РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

На коагулометре зафиксировать время от момента добавления раствора фибриногена до момента образования сгустка.

#### РАСЧЕТЫ

Используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца определить активность АТIII в %.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

**В нормальной плазме здоровых лиц активность антиромбина III составляет 80 - 120%.**

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности АТIII могут полностью нейтрализовать тромбин в системе, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности АТIII для таких образцов могут быть получены при разведении исходной плазмы в 6 раз. При этом полученный результат должен быть умножен на 2.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности антиромбина III следует контролировать с помощью реагента «Плазма контрольная (пул здоровых доноров) Плазма Н по ТУ 9398-004-05595541-2009», код КМ-1.

#### 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 8°C. Допускается хранение при температуре до плюс 25°C 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°C  | +18-22°C | -18-20°C         |
|---------------------------------------|---------|----------|------------------|
| Тромбин                               | 2 дня   | 8 часов  | 2 мес.           |
| Фибриноген                            | 8 часов | 4 часа   | 2 мес.           |
| Дефибринированная плазма – калибратор | 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 8°C 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 25°C не более 10 суток. Замораживание не допускается.

#### ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора Реаклот-АТIII 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 Реаклот-АТIII 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 специально подразделения к месту обеззараживания и утилизации.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 наборы реагентов Реаклот-АТIII, 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. Отходы буфера относятся к отходам класса А.

#### СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

| Символ | Наименование символа                         |
|--------|--|
|        | Номер по каталогу                            |
|        | Медицинское изделие для диагностики in vitro |
|        | Биологический риск                           |
|        | Температурный диапазон                       |
|        | Обратитесь к инструкции по применению        |
|        | Изготовитель                                 |

#### 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. Kottke-Marchant, K. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis / K. Kottke-Marchant, A. Duncan // Pathology & Laboratory Medicine. – 2002. – Vol. 126, №11 – P. 1367-13675.
4. Tait, R.C. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. / R.C. Tait. // Br. J. Haematol. – 1994 – Vol.87 – P. 106-112.

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](mailto:info@renam.ru)