

ИНСТРУКЦИЯ**по применению медицинского изделия для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения анти Ха активности гепарина оптическим методом (Реахром-гепарин) по ТУ 9398-032-05595541-2011»****НАЗНАЧЕНИЕ**

Предназначенное применение. Медицинское изделие для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения анти Ха активности гепарина оптическим методом по ТУ 9398-032-05595541-2011» (сокращенное наименование Реахром-гепарин) предназначено для мониторинга за введением гепарина (в том числе низкомолекулярного), путем определения его анти Ха активности в плазме крови.

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

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

Диагностическая роль. Мониторинг за введением гепарина позволяет в первую очередь не допустить геморрагических осложнений и в тоже время оценить эффективность антикоагулянтной терапии.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**Состав набора**

Антитромбин III, лиофильно высушенный – 1 мл/флакон – 2 шт;
Фактор Ха, лиофильно высушенный – 2 мл/флакон – 2 шт;
Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 2 мл/флакон – 2 шт;
Буфер концентрированный – 5 мл/флакон – 2 шт;
Плазмы-калибраторы – 1 мл/флакон – 3 шт;
Плазмы контрольные – 1 мл/флакон – 2 шт.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 20 определений при расходе реагентов по 200 мкл ручным методом или 80 определений при расходе реагентов по 50 мкл планшетным методом.

Принцип метода.

Метод определения активности гепарина основан на способности комплекса АТШ-гепарин нейтрализовать активированный фактор Ха. Активность гепарина определяют в плазме, добавляя к ней избыток антитромбина III и фактора Ха. При этом происходит ингибирование фактора Ха комплексом АТШ-гепарин пропорционально количеству гепарина в плазме. Оставшееся количество фактора Ха катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности гепарина в плазме.

Процесс идет по следующей схеме:

АТШ (избыток) + гепарин \Rightarrow АТШ-гепарин.
АТШ-гепарин + Ха (избыток) \Rightarrow АТШ-гепарин-Ха+Ха (остаток).
Субстрат-pNA + Ха (остаток) \Rightarrow Пептид + pNA.

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ КАЛИБРАТОРАМ И КОНТРОЛЬНЫМ МАТЕРИАЛАМ

Активность гепарина в плазмах-калибраторах и контрольных плазмах устанавливаются при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против Третьего Международного Стандарта низкомолекулярного гепарина, код 11/176, полученного из National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Значение активности гепарина в плазмах-калибраторах и в контрольных плазмах указано в паспорте медицинского изделия.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения активности гепарина: билирубин в концентрации не более 0,2 г/л; свободный гемоглобин - не более 2,0 г/л; триглицериды - не более 10,0 г/л. При превышении указанных концентраций возможно получение ложных результатов.

Чувствительность

Набор Реахром-гепарин позволяет определять не более 0,05 антиХа ед/мл активности гепарина.

Воспроизводимость

Активность гепарина в плазмах-калибраторах составляет:
уровень 0 – 0 антиХа ед/мл;
уровень 1 – 0,4 - 0,6 антиХа ед/мл;
уровень 2 – 0,7 - 1,1 антиХа ед/мл.
Допустимое отклонение от аттестованного значения – не более 10%.
Коэффициент вариации результатов определения активности гепарина не превышает 10%. Допустимый разброс результатов при параллельном определении активности гепарина в одной пробе крови разными наборами одной серии не превышает 10%.

Диапазон определяемых значений активности

С помощью набора Реахром-гепарин можно определить активность гепарина в диапазоне от 0 до 1,1 антиХа ед/мл.

Линейность определения в диапазоне определяемых концентраций

Отклонение от линейности в диапазоне активности гепарина от 0 до 1,1 антиХа ед/мл - не более 10%.

Значения активности, соответствующие нормальным

При введении гепарина в профилактических целях его активность в плазме должна составлять 0,1 – 0,3 антиХа ед/мл.

При введении гепарина в терапевтических целях его активность в плазме должна составлять 0,3 – 0,7 антиХа ед/мл.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Набор реагентов Реахром-гепарин 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» (Сан-ПиН 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.

Плазмы-калибраторы, контрольные плазмы, Антитромбин III и фактор Ха 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.

⚠ Антитромбин III и фактор Ха, входящий в набор, содержит консервант азид натрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводной системы с образованием потенциально взрывоопасных азидов металлов.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр, ФЭК или любой другой оптический анализатор с длиной волны 405 нм;
- пластиковые микрокуветы с длиной оптического пути 1 см;
- микропланшеты 96-луночные с плоским дном;
- термостат (термобаня), поддерживающий температуру 37±1°C;
- пробирки пластиковые вместимостью 3 - 5 мл и 10 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, от 50 до 200 мкл и от 200 до 1000 мкл;
- секундомер;
- вода дистиллированная;
- физиологический раствор (0,9% раствор натрия хлористого в дистиллированной воде);
- уксусная кислота концентрации 50%;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,2% 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);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**Вид анализируемого биологического материала**

Набор реагентов Реахром-гепарин предназначен для определения активности гепарина 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 (1200 g).

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 2 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, так как при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочий раствор антитромбина III. Во флакон с лиофильно высушенным антитромбином III внести 1 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Рабочий раствор фактора Ха. Во флакон с лиофильно высушенным фактором Ха внести 2 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Раствор 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. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Плазмы-калибраторы. Внести во флакон с плазмой-калибратором 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании (избегать образования пены). Перед использованием раствор плазмы нужно выдержать при комнатной температуре в течение 20 минут.

Плазм контрольные. Внести во флакон с плазмой контрольной 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании (избегать образования пены). Перед использованием раствор плазмы нужно выдержать при комнатной температуре в течение 20 минут.

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.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика используют плазмы-калибраторы с известными активностями гепарина, указанными в паспорте медицинского изделия. На оси ординат (Y) по линейной шкале отложить величины оптической плотности, полученные для каждой плазмы-калибратора, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале отложить активность гепарина в антиХа ед/мл плазмы. Правильность построения калибровочного графика проконтролировать с помощью контрольных плазм.

Проведение анализа

Раствор 1. Развести исследуемую плазму или плазмы-калибраторы трех уровней или плазмы контрольные двух уровней рабочим буферным раствором в 5 раза по схеме:

0.1мл плазмы + 0.4мл рабочего буферного раствора.

Раствор 2. Непосредственно перед проведением анализа приготовить реакционную смесь по схеме:

Внести в пробирку или лунку планшета:	Пробирка	Лунка планшета
Рабочий буферный раствор	400 мкл	100
Рабочий раствор антитромбина III	100 мкл	25
Раствор 1	100 мкл	25

Анализ проводится в пластиковых пробирках или планшетах, прогретых при температуре 37°C.

Внести в пробирку или лунку планшета:	Пробирка	Лунка планшета	Кювета сравнения
Рабочий раствор фактора Ха	200 мкл	50 мкл	
Раствор 2	200 мкл	50 мкл	
Рабочий буферный раствор	-		1000мкл
Инкубировать при 37°C точно 5 минут.			
Раствор хромогенного субстрата	200 мкл	50 мкл	
Инкубировать при 37°C точно 5 минут.			
50%-ая уксусная кислота	400 мкл	100 мкл	

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность образца против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭКе или любом другом оптическом анализаторе) при длине волны 405 нм.

РАСЧЕТЫ

Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определить активность гепарина в анти-Ха единицах.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности гепарина могут полностью нейтрализовать фактор Ха в системе, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности гепарина для таких

образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы в 10 или в 20 раз рабочим буферным раствором (Раствор 1). При этом результат, считанный из калибровочного графика, должен быть умножен на 2 или 4 соответственно.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Правильность и воспроизводимость определения активности гепарина следует контролировать с помощью контрольных плазм, входящих в состав набора Реахром-гепарин.

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
Рабочий раствор антитромбина III	3 дня	1 день	2 мес.
Рабочий раствор фактора Ха	3 дня	1 день	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	10 дней	2 дня	2 мес.
Растворы плазм-калибраторов	8 часов	4 часа	1 мес.
Растворы контрольных плазм	8 часов	4 часа	1 мес.

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 Реахром-гепарин 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-гепарин» 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-гепарин», 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

- Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Мелкумян А.Л., Козлов А.А., Нешкова Е.А., Яровая Г.А. Методы определения активности гепарина: учебно-методическое пособие; М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015, 64 с.
- Нарушения реакций образования тромбина: Под ред. Р.У. Колмена; М.: Медицина, 1988, 240 с.
- Friberger P, Egberg N, Holmer E, et al. Antithrombin assay - the use of human or bovine thrombin and the observation of a „second“ heparin cofactor. *Thromb Res.* 1982; 25: 433-6.

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.