

**ИНСТРУКЦИЯ****по применению медицинского изделия для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения активности антитромбина III хромогенным методом (Реахром-АТIII) по ТУ 21.20.23-062-05595541-2017»****НАЗНАЧЕНИЕ**

**Предназначенное применение.** Медицинское изделие для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения активности антитромбина III хромогенным методом (Реахром-АТIII) по ТУ 21.20.23-062-05595541-2017» (сокращенное наименование – «Реахром-АТIII») предназначено для количественного определения активности антитромбина III (далее – «АТIII») 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 антитромбина III с помощью набора Реахром-АТIII может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

**Диагностическая роль.** Антитромбин III или кофактор гепарина – основной антикоагулянт тромбина при образовании этого фермента в крови. В присутствии 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 человека с гепарином, лиофильно высушенный – 20 МЕ/флакон – 2 шт.;

Плазма-калибратор, лиофильно высушенная – 1 мл/флакон – 1 шт.;

Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 4 мкМ/флакон – 2 шт.;

Буфер имидазольный концентрированный – 5 мл/флакон – 1 шт.

Тромбин человека получен из донорской плазмы, содержит гепарин, стабилизатор бычий сывороточный альбумин и консервант азид натрия в концентрации 0,05 г/л.

Плазма-калибратор с установленной активностью АТIII получена из донорской плазмы с добавлением буфера НЕРЕС.

«Буфер имидазольный концентрированный («Буфер имидазольный») по ТУ 9398-035-05595541-2011» (ФСР 2011/12508) производства МБООИ «Общество больных гемофилией».

Хромогенный субстрат - пептид (Tos-Gly-Pro-Arg)-паранитроанилин с добавлением маннитола.

**Число анализируемых проб биологического материала**

Один набор предназначен для проведения 40 определений ручным методом, 60 определений на коагулометрах Sysmex и 80 определений на коагулометрах ACL. Количество анализов на других автоматических анализаторах зависит от конструкции прибора.

**Принцип метода**

Метод определения активности АТIII основан на способности АТIII нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. Активность АТIII определяют в плазме крови, добавляя к ней избыток тромбина с гепарином. При этом происходит ингибирование тромбина комплексом АТIII-гепарин пропорционально количеству АТIII в плазме. Оставшееся количество тромбина катализирует отщепление паранитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при длине волны 405 нм, обратно пропорциональна активности АТIII в анализируемой пробе.

Процесс идет по следующей схеме:

АТIII + гепарин (избыток) + тромбин (избыток) ⇒

⇒ АТIII-гепарин-тромбин + тромбин (остаток).

Тромбин (остаток) + субстрат-pNA ⇒ Пептид + pNA.

**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 Антитромбина III, код 06/166, полученного из National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Значения активности АТIII в плазме-калибраторе указаны в паспорте медицинского изделия.

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения активности 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 2,0 МЕ/мл. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно заниженных результатов.

**Чувствительность**

Минимальная активность АТIII, определяемая набором Реахром-АТIII - не более 10%.

**Воспроизводимость**

Активность АТIII в плазме-калибраторе составляет 80-120%. Допустимое отклонение от аттестованного значения - не более 5%. Коэффициент вариации результатов определения активности АТIII в контрольной плазме - не более 5%. Межфлаконовая вариация – не более 5%. Допустимый разброс результатов определения активности АТIII в одной пробе крови разными наборами одной серии - не более 5%.

**Диапазон определяемых значений активности**

С помощью набора Реахром-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 10 до 100% - не более 5%.

**Значения активности, соответствующие нормальным**

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

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

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

Набор реагентов Реахром-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: СанПиН 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»; СП 3.1.5. 2826 от 11.01.2011 «Профилактика ВИЧ-инфекции».

⚠ 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 и тромбин с гепарином получены из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее, эти компоненты набора следует рассматривать как потенциально вирус-опасные.

⚠ Реагент тромбин с гепарином, входящий в набор Реахром-АТIII, содержит консервант азид натрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводной системы с образованием потенциально взрывоопасных азидов металлов.

**ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

- Автоматический анализатор открытого типа с оптической системой регистрации результатов реакции.
- спектрофотометр, ФЭК, биохимический, коагулологический 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);
- мерный цилиндр вместимостью 100 мл;
- уксусная кислота 50% концентрации;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

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

Набор реагентов Реахром-АТIII предназначен для определения активности антитромбина 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, так как при этом происходит частичная деградация белков.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Рабочий раствор тромбина с гепарином.** Во флакон с лиофильно высушенным тромбином ввести 3 мл дистиллированной воды (для анализаторов Sysmex) или 2,5 мл дистиллированной воды (для анализаторов ACL и ручного метода) и растворить содержимое при осторожном покачивании. Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре - не более 3 минут. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

**Раствор хромогенного субстрата.** Во флакон с хромогенным субстратом ввести 1 мл дистиллированной воды (для анализаторов Sysmex) или 2 мл дистиллированной воды (для анализаторов ACL и ручного метода), оставить без перемешивания на 20 минут, затем содержимое флакона тщательно перемешать. Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре - не более 3 минут.

**Раствор плазмы-калибратора.** Во флакон с лиофильно высушенной плазмой-калибратором ввести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре - не более 3 минут. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

**Рабочий буферный раствор.** Буфер имидазоловый 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 ИССЛЕДОВАНИЯ

### Проведение анализа на автоматическом анализаторе

- Выбрать на анализаторе программу для определения АТШ.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки анализатора (для коагулометров ACL реагент тромбин с гепарином поместить в ячейку, предназначенную для реагента Ха).
- Запустить программу Calibrate, калибровка прибора.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки анализатора.
- Запустить программу определения АТШ.
- Считать результаты.

### Проведение анализа ручным методом и на полуавтоматическом коагулометре

#### Построение калибровочного графика

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

Пробирка №	1	2	3	4
Активность АТШ, %	1.0А*	0.5А*	0.25А*	0.125А*
Рабочий раствор буфера, мл	2.9	1.0	1.0	1.0
Плазма-калибратор, мл	0.1	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл				

\*А - активность антитромбина III в плазме-калибраторе, указанная в паспорте на набор.

С каждым разведенным раствором плазмы-калибратора с установленной активностью АТШ, %, провести определение оптической плотности по методу, описанному ниже. На оси ординат (Y) по линейной шкале отложить величины оптической плотности (ед. опт. плотн.), полученные для каждого разведения плазмы-калибратора, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале отложить соответствующую активность АТШ (%). Калибровочный график должен представлять собой нисходящую прямую линию. Калибровочный график должен быть построен для каждой серии реагентов.

#### Проведение анализа

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму рабочим буферным раствором в 30 раз следующим образом:  
0.1мл плазмы + 2.9мл рабочего буферного раствора.

Анализ провести в пластиковых пробирках, термостатируемых при плюс 37°C, в соответствии со схемой:

Внести в пробирку:	Образец	Кювета сравнения
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор), мкл	100	-
Рабочий раствор тромбина с гепарином, мкл	100	-
Рабочий буферный раствор, мкл	-	1500
Перемешать и инкубировать при плюс 37°C точно 180 секунд		
Рабочий раствор хромогенного субстрата, мкл	100	-
Перемешать и инкубировать при плюс 37°C точно 120 секунд		
50% уксусная кислота, мкл	1000	-

## РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

### При проведении анализа на автоматическом анализаторе

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

### При проведении анализа ручным методом и на полуавтоматическом коагулометре

Измерить оптическую плотность (ед. опт. плотн.) исследуемого образца против кюветы сравнения в оптическом канале анализатора или на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм. По калибровочному графику определить активность АТШ, %.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Образцы с высоким уровнем активности АТШ могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности АТШ для таких образцов могут быть получены при дополнительном разведении исходной плазмы в 2 раза буферным раствором для разведения образцов, используемым в соответствующем анализаторе. При определении вручную в этом случае исследуемую плазму следует развести в 60 раз. При этом полученный результат должен быть умножен на 2.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности антитромбина III следует контролировать с помощью реагента «Плазма контрольная по ТУ 9398-026-05595541-2009», номер по каталогу производителя КМ-2.

## 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/Срок хранения	Температура хранения, °C, в диапазоне		
	+2-8°C	+18-25°C	-18-20°C
Рабочий раствор тромбина с гепарином	5 дней	2 дня	2 месяца
Раствор хромогенного субстрата	14 дней	5 дней	2 месяца
Раствор плазмы – калибратора	8 часов	4 часа	2 месяца
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 термомониторов 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-АТШ требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

## МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» отходы от работы с набором Реахром-АТШ 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.

Наборы реагентов Реахром-АТШ, 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.

## СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

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

## ЛИТЕРАТУРА И НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

- Алан, Г.Б. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам / Г.Б. Алан. – М.: Лабора, 2013. – 1280 с.
- Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушения гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2008. – 292 с.
- Kotke-Marchant, K. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis / K. Kotke-Marchant, A. Duncan // Pathology&Laboratory Medicine. – 2002. – Vol. 126, №11 –P. 1367-13675.
- Tait, R.C. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population./ R.C. Tait. // Br. J. Haematol. – 1994 – Vol.87 – P. 106-112.
- ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
- ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
- Приказ Минздрава России от 19.01.2017 г №11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинских изделий».

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)