

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения активности анти-тромбина 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 антиромбина III хромогенным методом (Реахром-АТIII) по ТУ 21.20.23-062-05595541-2017» (сокращенное наименование – «Реахром-АТIII») предназначено для количественного определения активности антиромбина 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 антиромбина 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. Антиромбин 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 в некоторых случаях 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 мМ/флакон – 2 шт.;

Буфер имидазоловый 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 HEPES.

«Буфер имидазоловый концентрированный («Буфер имидазоловый») 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 устанавливается при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против 3-го Международного Стандарта Антиромбина 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%. Межфлаконная 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, полученный 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 веществ 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 $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- 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 антиромбина 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 внести 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 внести 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 30 минут.

Раствор плазмы-калибратора. Во флакон с лиофильно высушенной плазмой-калибратором внести 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 АТIII.
- 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 АТIII.
- 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 АТIII, %	1.0A*	0.5A*	0.25A*	0.125A*
Рабочий раствор буфера, мл	2.9	1.0	1.0	1.0
Плазма-калибратор, мл	0.1	-	-	-

Перемешать и перенести в пробирку, мл

1.0 1.0 1.0

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

С каждым разведенным раствором плазмы-калибратора с установленной активностью АТIII, %, провести определение оптической плотности по методу, описанному ниже. На оси ординат (Y) по линейной шкале отложить величины оптической плотности (ед. оп. плотн.), полученные для каждого разведения плазмы-калибратора, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале отложить соответствующую активность АТIII (%). 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°С, 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°С точно 180 секунд		
Рабочий раствор хромогенного субстрата, мкл	100	-
Перемешать и инкубировать при плюс 37°С 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. оп. плотн.) исследуемого образца против кюветы сравнения в оптическом канале анализатора или на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм. По калибровочному графику определить активность АТIII, %.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Образцы с высоким уровнем активности АТIII могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности АТIII 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°С. Допускается хранение при температуре до плюс 25°С 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, °С, в диапазоне		
	+2-8°С	+18-25°С	-18-20°С
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°С 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°С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора Реахром-АТIII 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-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 специального подразделения к месту обеззараживания и утилизации.

Наборы реагентов Реахром-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.

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

Дата утверждения инструкции 11 сентября 2017 г.

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.
- Kottke-Marchant, K. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis / K. Kottke-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