

## ИНСТРУКЦИЯ

## по применению медицинского изделия для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения анти-Ха активности гепарина хромогенным методом (Реахром-гепарин) по ТУ 21.20.23-073-05595541-2021»

## НАЗНАЧЕНИЕ

**Предназначенное применение.** Медицинское изделие для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения анти-Ха активности гепарина хромогенным методом (Реахром-гепарин) по ТУ 21.20.23-073-05595541-2021» (сокращенное наименование - Реахром-гепарин) предназначено для количественного определения анти-Ха активности низкомолекулярного гепарина (НМГ) в плазме крови хромогенным методом на автоматических коагулометрах с целью оценки эффективности антикоагулянтной терапии.

**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 оценить эффективность антикоагулянтной терапии и в тоже время не допустить геморрагических осложнений [1].

**Область применения.** Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика, научно-исследовательская практика.

## НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ ТЕСТА

Гепарин значительно ускоряет инактивацию факторов свертывания Ха и тромбина в присутствии антитромбина III. По этой причине препараты НМГ широко используются в качестве терапевтических антикоагулянтов [1,2,3]. Определение анти-Ха активности НМГ является наиболее чувствительным тестом, позволяющим оценивать активность введенного гепарина непосредственно в плазме крови пациента.

## ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

## Состав набора

Антитромбин III, лиофильно высушенный – 1,0 МЕ во флаконе – 2 флакона;  
Фактор Ха, лиофильно высушенный – 15,0 нкат во флаконе – 4 флакона;  
Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 3,0 мкМ во флаконе – 2 флакона;  
Буфер имидазольный – 5,0 мл во флаконе – 1 флакон;  
Плазма-калибратор уровень 0, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;  
Плазма-калибратор уровень 1, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;  
Плазма-калибратор уровень 2, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;  
Плазма контрольная уровень 1, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон.  
Плазма контрольная уровень 2, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон.  
Все компоненты набора расфасованы в стеклянные флаконы, укупоренные резиновыми пробками и снабженные полимерными резьбовыми колпачками.  
Антитромбин III и фактор Ха получены из донорской плазмы, с добавлением буфера и стабилизатора.  
Хромогенный субстрат представляет собой пептид Z-dArg-Gly-Arg-пара-нитроанилид с добавлением маннитола.  
Буфер имидазольный – «Буфер имидазольный концентрированный («Буфер имидазольный») по ТУ 9398-035-05595541-2011» (ФСР 2011/12508) производства МБООИ «Общество больных гемофилией», Россия.  
Плазмы-калибраторы трех уровней и плазмы контрольные двух уровней с аттестованными анти-Ха активностями гепарина получены из донорской плазмы с добавлением различных количеств НМГ и стабилизированы HEPES-буфером.

## Комплект поставки

Набор реагентов Реахром-гепарин;  
инструкция по применению;  
паспорт на серию набора реагентов Реахром-гепарин.

## Число анализируемых проб биологического материала

Число определений с помощью набора Реахром-гепарин зависит от типа используемого коагулометра.

## Принцип метода

Метод определения активности гепарина основан на способности комплекса АТIII-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 АТIII-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:

АТIII (избыток) + гепарин  $\Rightarrow$  АТIII-гепарин.

АТIII-гепарин + Ха (избыток)  $\Rightarrow$  АТIII-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 устанавливают при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против 3-го 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 на каждую серию Реахром-гепарина.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

## Аналитическая специфичность

Использование для анализа избытка человеческого фактора Ха и специфического хромогенного субстрата к нему обеспечивает специфичность метода определения анти-Ха активности в плазме крови пациента.

## Влияние потенциально интерферирующих веществ

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

## Точность

Анти-Ха активность гепарина в плазмах-калибраторах составляет:

уровень 0 – 0 МЕ/мл;

уровень 1 – 0,4 - 0,7 МЕ/мл;

уровень 2 – 0,8 - 1,2 МЕ/мл.

Анти-Ха активность гепарина в плазмах контрольных составляет:

уровень 1 – 0,4 – 0,7 МЕ/мл;

уровень 2 – 0,8 – 1,2 МЕ/мл.

Допустимое отклонение анти-Ха активности гепарина от аттестованного значения - не более 10%. Точное значение анти-Ха активности гепарина в плазмах-калибраторах и плазмах контрольных указано в паспорте на каждую серию набора Реахром-гепарин.

## Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения анти-Ха активности гепарина, межфлаконная вариация - не более 5%. Допустимый разброс результатов при определении анти-Ха активности гепарина в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии - не более 5%.

## Аналитическая чувствительность

Минимальная анти-Ха активность гепарина, определяемая с помощью набора Реахром-гепарин - не более 0,1 МЕ/мл.

## Диапазон определяемых значений активности

Реахром-гепарин позволяет определять любое значение анти-Ха активности гепарина (с учетом соответствующего разведения), начиная от 0,1 МЕ/мл.

## Значения анти-Ха активности, соответствующие нормальным

При введении НМГ в профилактических целях его анти-Ха активность в плазме крови должна составлять 0,3 – 0,7 МЕ/мл.

При введении гепарина в терапевтических целях его анти-Ха активность в плазме крови должна составлять 0,7 – 1,2 МЕ/мл.

## Линейность

Линейность определения анти-Ха активности гепарина - в диапазоне от 0,1 до 1,2 МЕ/мл.

Отклонение в тесте на «линейность» - не более 10%.

## Тест на «открытие»

Отклонение в тесте на открытие - не более 10%.

## Ограничения метода

Благодаря множеству факторов воздействие одинаковой дозы гепарина варьируется от пациента к пациенту. Поэтому результаты, полученные с помощью набора Реахром-гепарин, всегда должны рассматриваться в сочетании с историей болезни конкретного пациента, клиническими данными и другой значимой информацией.

Реахром-гепарин нельзя использовать для определения гепарина в образцах пациентов, находящихся на гепарин-нейтрализующей терапии (например протамин сульфатом), так как компоненты реагента будут компенсировать нейтрализующий эффект и приводить к ложным результатам.

## 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 с образцами крови следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: СП 2.1.3678-20 от 24.12.2020 «Санитарно-эпидемиологические требования к эксплуатации помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов, осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг» и СанПиН 3.3686-21 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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, не следует исключать остаточного минимального риска при работе с набором, поскольку плазма крови человека является потенциально опасным биологическим материалом.

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.

## ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр автоматический;
- пробирки пластиковые вместимостью 3-5 мл;
- дозаторы переменной емкости от 100 до 1000 мкл и от 1,0 до 5,0 мл с наконечниками;
- цилиндр мерный объемом 100 мл;
- секундомер;
- вода дистиллированная;
- 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);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

Примечание – Набор реагентов Реахром-гепарин совместим со всеми типами автоматических коагулометров с длиной волны 405 нм.

## 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 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 анализируемого 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 этом происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Рабочий буферный раствор.** Буфер имидазоловый концентрированный развести в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерный цилиндр, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать). Раствор готов к работе через 30 минут. Значение pH рабочего буферного раствора должно находиться в диапазоне от 7,35 до 7,45.

**Рабочий раствор антитромбина III.** Во флакон с лиофильно высушенным антитромбином III внести 1,0 мл дистиллированной воды (для коагулометров Stago – 4,0 мл рабочего буферного раствора) и растворить содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

**Рабочий раствор фактора Ха.** Во флакон с лиофильно высушенным фактором Ха внести 5,0 мл рабочего буферного раствора и растворить содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

**Раствор хромогенного субстрата.** Во флакон с хромогенным субстратом внести 2,0 мл дистиллированной воды (для коагулометров Stago – 4,0 мл дистиллированной воды) и растворить при осторожном покачивании. Реагент 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.

**Плазмы 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.

Примечание - Время растворения лиофильно высушенных реагентов должно составлять не более 3 минут.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбрать на коагулометре программу для определения анти-Ха активности гепарина. Поместить флаконы с приготовленными реагентами из набора Реахром-гепарин в соответствующие ячейки коагулометра. Запустить программу Calibrate, калибровка прибора. Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки анализатора. Запустить программу определения анти-Ха активности гепарина. Считать результаты. Примечание - Калибровочный график должен быть построен для каждой серии набора Реахром-гепарин, а также для каждого используемого прибора.

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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 анти-Ха активности гепарина для таких образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы в 2 или 4 раза рабочим буферным раствором. При этом полученный результат 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°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 реагентов после первого вскрытия флакона.**

| Реагенты                         | Температура хранения, °С в диапазоне |              |               |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------|---------------|
|                                  | от +2 до +8                          | от+18 до +25 | от -18 до -20 |
| Рабочий раствор антитромбина III | 14 суток                             | 7 суток      | 2 месяца      |
| Рабочий раствор фактора Ха       | 14 суток                             | 3 суток      | 2 месяца      |
| Раствор хромогенного субстрата   | 30 суток                             | 14 суток     | 2 месяца      |
| Растворы плазм-калибраторов      | 8 час                                | 4 час        | 2 месяца      |
| Растворы контрольных плазм       | 8 час                                | 4 час        | 2 месяца      |
| Рабочий буферный раствор         | 30 суток                             | 5 суток      | -             |

Допускается дробное использование приготовленных лиофильно высушенных реагентов путем розлива по аликвотам в пластиковые пробирки, укупоривания, однократного быстрого замораживания аликвот при температуре от минус 18 до минус 20°С и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

Оттаивать замороженные аликвоты следует при температуре от плюс 35 до плюс 37°С на водяной бане и использовать в течение 2 часов после оттаивания. Повторное замораживание не допускается. При размораживании плазм-калибраторов и плазм контрольных необходимо следить, чтобы полностью растворилась криоглобулиновая фракция.

Транспортирование наборов должно осуществляться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре от плюс 2 до плюс 8°С. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание наборов при транспортировании 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 содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» (СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021) отходы от работы с набором Реахром-гепарин с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

В соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 реагенты из набора Реахром-гепарин, не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Б, за исключением Буфера имидазолового.

Отходы класса Б 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.

Вывоз отходов класса Б для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями для дальнейшей передачи в организации, имеющие соответствующую лицензию, с целью последующего уничтожения на специально оборудованных площадках в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

Буфер имидазоловый из набора Реахром-гепарин, не подлежащий использованию, с истекшим сроком годности, и не состоящий в контакте с плазмой крови пациентов, относится к отходам класса А. Отходы класса А собирают в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета, кроме желтого и красного, с надписью «Отходы. Класс А», утилизируют и транспортируют в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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                                 |

Дата утверждения инструкции 15.10.2021 г.

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.

ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

- ГОСТ Р 51088-2013. Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
- ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
- ГОСТ Р ИСО18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация. Предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
- ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
- ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции.
- ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия.
- ГОСТ Р ЕН 13612-2010 Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.
- ГОСТ Р ЕН 13641-2010 Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro.
- ГОСТ ISO 17511-2011 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам.
- 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 (804) 333-22-61, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru, сайт: www.renam.ru.

