

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 тест) 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 тест») по ТУ 9398-023-05595541-2011» (сокращенное наименование – «Реаклот АТIII тест») предназначено для количественного определения активности анти-тромбина III (далее – «АТIII») в плазме крови клоттинговым методом как вручную, так и на автоматических анализаторах.

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

Диагностическая роль. 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].

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

НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ ТЕСТА

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.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**Состав набора**

Тромбин, лиофильно высушенный - 4 мл/флакон - 2 флакона;
Фибриноген, лиофилизированный - 2 мл/флакон - 4 флакона;
Плазма - калибратор дефибрированная, лиофильно высушенная – 1мл/флакон – 1 флакон;
Буфер имидазоловый концентрированный – 5 мл/флакон – 1 флакон.

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 указаны 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.

Точность

Активность АТIII в плазме-калибраторе составляет 80-120%. Допустимое отклонение активности АТIII в плазме-калибраторе от аттестованного значения не более 10%.

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%.

Чувствительность

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

Воспроизводимость

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 тест можно определить не менее 10% активности АТIII. Верхний предел не ограничен.

Значения активности, соответствующие нормальным

Нормальный диапазон значений АТIII, полученный при определении активности АТIII набором Реаклот АТIII тест 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 тест. При постановке диагноза должны быть рассмотрены клинические симптомы и другая значимая тестовая информация.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Набор реагентов Реаклот АТIII тест 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 56,0±0,1°С;
- 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 тест 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°С 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°С и не более 8 часов при температуре от плюс 2 до плюс 8°С. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре от минус 18 до минус 20°С 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.

Плазма-калибратор дефибринированная. 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 на водяной бане в течение 6 мин при 56°C (желательно перед анализом проверить температуру водяной бани обычным термометром), затем центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин (1200g), надосадочную 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 антитромбина 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	0,5		0,5

*аттестованное значение антитромбина 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 антитромбина 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 минуты*.	
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 антитромбина 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 антитромбина 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	от плюс 2 до плюс 8°C	от плюс 18 до плюс 25°C	от минус 18 до минус 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 проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. 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 тест 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 тест с использованием образцов плазмы крови пациентов и наборы с истекшим сроком годности 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.

Вывоз отходов класса Б для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Б осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

Отходы рабочего буферного раствора 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

Дата утверждения инструкции 25 апреля 2011г.

ЛИТЕРАТУРА

- 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

- 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 18113-1-2015 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 испытания.
- 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.
- 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» МБОУ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2. Тел (804)333-22-61, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru, сайт www.renam.ru