

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения активности альфа 2-антиплазмина оптическим методом

(Реахром-антиплазмин) по ТУ 9398-007-05595541-2012»

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение. Медицинское изделие для диагностики *in vitro* Набор реагентов для определения активности $\alpha 2$ -антиплазмина оптическим методом (Реахром-антиплазмин) по ТУ 9398-007-05595541-2012 (сокращенное наименование Реахром-антиплазмин) предназначено для диагностики активности $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме крови человека оптическим методом с использованием хромогенного субстрата.

Предназначенный пользователь. Определение активности $\alpha 2$ -антиплазмина с помощью набора Реахром-антиплазмин может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

Диагностическая роль. Врожденный дефицит $\alpha 2$ -антиплазмина ассоциирован с геморрагическими состояниями. Снижение уровня $\alpha 2$ -антиплазмина наблюдается при болезнях печени и ДВС-синдроме. Увеличенный уровень $\alpha 2$ -антиплазмина часто наблюдается в послеоперационный период.

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

НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ АНАЛИТА

$\alpha 2$ -антиплазмин представляет собой серпин и является основным ингибитором плазмина в крови. Он быстро ингибирует плазмин, затрудняет присоединение плазминогена к фибрину и образует перекрестные связи с альфа-цепями фибрина во время фибринообразования. $\alpha 2$ -антиплазмин продуцируется печенью. При избыточном образовании плазмина в крови его нейтрализация происходит в следующей последовательности: $\alpha 2$ -антиплазмином, $\alpha 2$ -макроглобулином, $\alpha 1$ -антитрипсином, антитромбином III и С1-инактиватором. Несмотря на наличие различных ингибиторов, участвующих в инактивации плазмина *in vivo*, наследственный дефицит $\alpha 2$ -антиплазмина проявляется сильным кровотечением – очевидное свидетельство недостаточности контроля активности плазмина другими ингибиторами.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**Состав набора**

Плазмин, лиофильно высушенный, объем после восстановления 5,0 мл/флакон – 2 флакона;

Плазма-калибратор, лиофильно высушенная, объем после восстановления 1,0 мл/флакон – 1 флакон;

Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный, объем после восстановления 2,0 мл/флакон – 2 флакона;

Буферный раствор концентрированный 2,0 мл/флакон – 1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 20 макро определений при расходе по 0,5 мл раствора плазмина на один анализ или для 100 микро определений (планшетный метод) при расходе по 75 мкл раствора плазмина на один анализ.

Принцип метода

Метод определения активности $\alpha 2$ -антиплазмина основан на его способности нейтрализовать плазмин. Активность $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме определяют, добавляя к ней избыток плазмина. При этом происходит ингибирование плазмина пропорционально количеству $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме. Оставшееся количество плазмина катализирует отщепление паранитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме.

Процесс идет по следующей схеме:

$\alpha 2$ -антиплазмин (плазма) + плазмин (избыток) \Rightarrow

($\alpha 2$ -антиплазмин – плазмин) + плазмин (остаток).

Субстрат-pNA + плазмин (остаток) \Rightarrow Пептид + pNA.

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ КАЛИБРАТОРУ

Активность $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме-калибраторе устанавливают при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против пула нормальной человеческой плазмы, полученной от не менее 100 здоровых доноров. Значения активности $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме-калибраторе указано в паспорте медицинского изделия.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения $\alpha 2$ -антиплазмина: 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.

Точность

Активность $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме-калибраторе – в диапазоне 80 - 120%. Допустимое отклонение активности $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме-калибраторе от аттестованного значения не более 10%.

Чувствительность

Чувствительность определения $\alpha 2$ -антиплазмина – не более 10%.

Линейность

В тесте на «линейность» отклонение от линейности в диапазоне активности $\alpha 2$ -антиплазмина от 25 до 100% – не более 10%.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации и межфлаконная вариация результатов определения активности $\alpha 2$ -антиплазмина не превышает 10%.

Допустимый разброс результатов определения активности $\alpha 2$ -антиплазмина в одной пробе крови разными наборами одной серии не превышает 10%.

Значения активности, соответствующие нормальным

Нормальный диапазон значений $\alpha 2$ -антиплазмина, полученный при определении активности $\alpha 2$ -антиплазмина набором Реахром-антиплазмин у не менее 100 здоровых доноров, составляет 80-120%, что соответствует биологическому референтному интервалу [1].

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Набор реагентов Реахром-антиплазмин 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».

Плазма-калибратор и плазмин 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

- 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-антиплазмин предназначен для определения активности $\alpha 2$ -антиплазмина 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 повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белков.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**Приготовление реагентов:**

Рабочий буферный раствор. Буферный раствор концентрированный развести в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерный цилиндр, довести до 40,0 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать). Готов к работе через 30 минут.

Плазмин. Во флакон с лиофильно высушенным плазмином внести 5,0 мл буферного раствора и растворить содержимое осторожным покачиванием, не встряхивать! Готов к проведению анализа через 20 мин после растворения.

Раствор хромогенного субстрата. Во флакон с хромогенным субстратом внести 2,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 мин после растворения.

Раствор плазмы-калибратора. Во флакон с плазмой-калибратором внести 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре – не более 3 минут. Готов к проведению анализа через 20 мин после растворения.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение анализа ручным методом и на полуавтоматическом коагулометре

Построение калибровочного графика

Использовать только пластиковые пробирки. Приготовить серию разведений плазмы-калибратора с известной активностью $\alpha 2$ -антиплазмина (А) в следующей последовательности:

Пробирка №	1	2	3
Активность $\alpha 2$ -антиплазмина, %	1,0 А*	0,5 А	0,25 А
Рабочий буферный раствор, мл	0,4	0,2	0,2
Плазма-калибратор, мл	0,2	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл	0,2 ↑ 0,2 ↑		

*А - активность $\alpha 2$ -антиплазмина в плазме-калибраторе указана в паспорте на набор. В каждом разведении плазмы-калибратора провести определение оптической плотности по методу, описанному ниже. На оси абсцисс (Х) отложить активность $\alpha 2$ -антиплазмина в %, а на оси ординат (У) отложить величины оптической плотности, ед. опт. плотн., полученные для каждого разведения плазмы-калибратора. Калибровочный график должен представлять собой нисходящую прямую линию. Калибровочный график линейен в интервале активности $\alpha 2$ -антиплазмина от 25 до 100%. Калибровочный график должен быть построен для каждой серии реагентов.

Проведение анализа.

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму рабочим буферным раствором в 3 раза по следующей схеме: 0,1 мл плазмы + 0,2 мл рабочего буферного раствора.

Анализ провести в пластиковых пробирках, термостатируемых при температуре 37°C.

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Плазмин, мкл	500	-
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор), мкл	100	-
Рабочий буферный раствор, мкл	-	600
Перемешать и инкубировать при температуре 37°C точно 3 мин.		
Раствор хромогенного субстрата, мкл	100	-
Перемешать и инкубировать при температуре 37°C точно 2 мин.		
Уксусная кислота 20%, мкл	1000	-

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность исследуемого образца плазмы, ед. опт. плотн., против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм и использовать кювет с длиной оптического пути 10 мм.

По значению оптической плотности образца исследуемой плазмы определить по калибровочному графику активность $\alpha 2$ -антиплазмина, %, в данном образце.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Образцы с высоким уровнем активности $\alpha 2$ -антиплазмина могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности $\alpha 2$ -антиплазмина для таких образцов могут быть получены при разведении исходной плазмы в 6 раз. При этом результат, полученный по калибровочному графику, должен быть умножен на 2.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности $\alpha 2$ -антиплазмина следует контролировать с помощью реагента Плазмы контрольной (Реагента для контроля правильности определения параметров свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем по ТУ 9398-026-5595541-2009), код КМ2.

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 закупоренном 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 закупоренном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

Реагенты	2-8°C	18-25°C	-18-20°C
Плазмин	5 сут	1 сут	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	14 сут	2 сут	2 мес.
Раствор плазмы-калибратора	8 ч	2 ч	2 мес.

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 Реахром-антиплазмин 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-антиплазмин с использованием образцов плазмы крови пациентов и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса 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.

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 14 февраля 2012г.

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.

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 ИСО 18113-2-2015 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.
- 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