

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения анти Ха активности гепарина оптическим методом (Реахром-гепарин) по ТУ 9398-032-05595541-2011»

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение. Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения анти Ха активности гепарина оптическим методом («Реахром-гепарин») по ТУ 9398-032-05595541-2011» (сокращенное наименование «Реахром-гепарин») предназначено для количественного определения активности низкомолекулярного гепарина (НМГ) в плазме крови человека оптическим методом с целью контроля антикоагулянтной терапии НМГ.

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 не допустить геморрагических осложнений и в тоже время оценить эффективность антикоагулянтной терапии.

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

НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ ТЕСТА

Определение анти Ха активности низкомолекулярного гепарина является наиболее чувствительным тестом, позволяющим оценивать активность введенного гепарина непосредственно в плазме пациента.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

Антитромбин III, лиофильно высушенный – 2 флакона;
Фактор Ха, лиофильно высушенный – 2 флакона;
Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 2 флакона;
Буфер концентрированный – 5,0 мл/флакон – 2 флакона;
Плазмы-калибраторы, 3 уровня активности гепарина, лиофильно высушенные, объем после восстановления 1,0 мл/флакон – 3 флакона;
Плазмы контрольные, 2 уровня активности гепарина, лиофильно высушенные, объем после восстановления 1,0 мл/флакон – 2 флакона.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 20 определений при расходе реагентов по 200 мкл ручным методом или 80 определений при расходе реагентов по 50 мкл планшетным методом.

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 2-го Международного Стандарта низкомолекулярного гепарина, код 01/608, полученного из National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Значение активности гепарина в плазмах-калибраторах и в контрольных плазмах указано в паспорте медицинского изделия.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

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

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

Точность

Активность гепарина в плазмах-калибраторах составляет:

уровень 0 – 0 антиХа МЕ/мл;

уровень 1 – 0,4 - 0,6 антиХа МЕ/мл;

уровень 2 – 0,7 - 1,1 антиХа МЕ/мл.

Допустимое отклонение от аттестованного значения – не более 10%.

Чувствительность

Набор Реахром-гепарин позволяет определять не более 0,1 антиХа МЕ/мл активности гепарина.

Тест на «линейность»

Отклонение в тесте на «линейность» в диапазоне активности гепарина от 0,1 до 1 антиХа МЕ/мл не превышает 10%.

Тест на «открытие»

Отклонение в тесте на открытие не превышает 10%.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения активности гепарина не превышает 10%. Допустимый разброс результатов при параллельном определении активности гепарина в одной пробе крови разными наборами одной серии не превышает 10%.

Диапазон определяемых значений активности

С помощью набора Реахром-гепарин можно определить активность гепарина в диапазоне от 0,1 до 1,0 антиХа ед/мл.

Значения активности, соответствующие нормальным

При введении гепарина в профилактических целях его активность в плазме должна составлять 0,1 – 0,3 антиХа ед/мл.

При введении гепарина в терапевтических целях его активность в плазме должна составлять 0,3 – 0,7 антиХа ед/мл.

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 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».

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

- Спектрофотометр, микропланшетный ридер или любой другой оптический анализатор с длиной волны 405 нм;
- пластиковые микрокюветы с длиной оптического пути 1 см;
- микропланшеты 96-луночные с плоским дном;
- термостат (термобаня), поддерживающий температуру 37±1°C;
- пробирки пластиковые вместимостью 3 - 5 мл и 10 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, от 50 до 200 мкл и от 200 до 1000 мкл;
- мерный цилиндр;
- секундомер;
- вода дистиллированная;
- уксусная кислота концентрации 50%;
- 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.

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 от 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 концентрированный развести в 20 раз, содержимое флакона перенести в мерный цилиндр, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать.

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. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Рабочий раствор фактора Ха. Во флакон с лиофильно высушенным фактором Ха внести 2,0 мл дистиллированной воды (для коагулометров Stago – 5,0 мл рабочего буферного раствора) и растворить при осторожном покачивании. Раствор 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. Раствор 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.

Плазм 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.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения активности гепарина.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу Calibrate, калибровка прибора.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу определения активности гепарина.
- Считать результаты

Проведение анализа ручным методом

Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика используют плазмы-калибраторы с известными активностями гепарина, указанными в паспорте медицинского изделия. На оси ординат (Y) по линейной шкале отложить величины оптической плотности, полученные для каждой плазмы-калибратора, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале отложить активность гепарина в антиХа ед/мл плазмы. Правильность построения калибровочного графика проконтролировать с помощью контрольных плазм.

Проведение анализа

Раствор 1. Развести исследуемую плазму или плазмы-калибраторы трех уровней или плазмы контрольные двух уровней рабочим буферным раствором в 5 раза по схеме: 0.1мл плазмы + 0.4мл рабочего буферного раствора.

Раствор 2. Непосредственно перед проведением анализа приготовить реакционную смесь по схеме:

Внести в пробирку или лунку планшета:	Пробирка	Лунка планшета
Рабочий буферный раствор	400 мкл	100
Рабочий раствор антитромбина III	100 мкл	25
Раствор 1	100 мкл	25

Анализ проводится в пластиковых пробирках или планшетах, прогретых при температуре 37°C.

Внести в пробирку или лунку планшета:	Пробирка	Лунка планшета	Кювета сравнения
Рабочий раствор фактора Ха	200 мкл	50 мкл	
Раствор 2	200 мкл	50 мкл	
Рабочий буферный раствор	-		1000мкл
Инкубировать при 37°C точно 5 минут.			
Раствор хромогенного субстрата	200 мкл	50 мкл	
Инкубировать при 37°C точно 5 минут.			
50%-ая уксусная кислота	400 мкл	100 мкл	

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

РАСЧЕТЫ

Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определить активность гепарина в анти-Ха единицах.

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 активности гепарина для таких образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы в 10 или в 20 раз рабочим буферным раствором (Раствор 1). При этом результат, считанный из калибровочного графика, 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°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	+2-8°C	+18-22°C	-18-20°C
Рабочий раствор антитромбина III	3 дня	1 день	2 мес.
Рабочий раствор фактора Ха	3 дня	1 день	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	10 дней	2 дня	2 мес.
Растворы плазм-калибраторов	8 час	4 час	1 мес.
Растворы контрольных плазм	8 час	4 час	1 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-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 обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с набором «Реахром-гепарин» 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.

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 9 марта 2011 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Нарушения реакций образования тромбина: Под ред. Р.У. Колмена; М.: Медицина, 1988, 240 с.
3. 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 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 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