

## ИНСТРУКЦИЯ

### по применению набора реагентов для определения анти Ха активности гепарина оптическим методом (Реахром-гепарин)

#### Назначение

Набор предназначен для определения анти Ха активности гепарина как не фракционированного, так и низкомолекулярного, в плазме пациентов при мониторинге гепаринотерапии.

Один набор предназначен для проведения 20 макро или 100 микро анализов.

#### Принцип метода

Основным ингибитором тромбина, активированного фактора Ха и других сериновых протеаз коагуляционного каскада является анти-тромбин III (АТIII). В нормальных условиях скорость ингибирования мала, но она возрастает в несколько тысяч раз в присутствии гепарина. Этот механизм объясняет антикоагулянтное действие гепарина. Препараты низкомолекулярного гепарина в комплексе с АТIII ингибируют действие активированного фактора Ха в гораздо большей степени, чем тромбина. По этой причине тест ингибирования фактора Ха является наиболее чувствительным и информативным из всех способов определения активности гепарина в плазме крови.

Метод определения активности гепарина основан на способности комплекса АТIII-гепарин нейтрализовать активированный фактор Ха. Активность гепарина определяют в плазме, добавляя к ней избыток антиромбина 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.

#### Состав набора реагентов

Антиромбин III (1мл), лиофильно высушенный – 2 флакона.

Фактор Ха (2мл), лиофильно высушенный – 2 флакона.

Буфер концентрированный (5мл) – 1 флакон.

Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный (2мл) – 2 флакона.

#### Аналитические и диагностические характеристики

Растворимость всех лиофилизированных компонентов набора не более 3 мин.

Коэффициент вариации определения антиХа активности - не более 10%.

Линейность – в диапазоне 0 – 1 антиХа ед/мл.

Отклонение от линейности в указанном диапазоне – не более 10%.

Прецизионность и воспроизводимость составляют  $\pm 10\%$ .

При проведении гепаринотерапии терапевтическая область содержания гепарина в плазме пациента составляет **0,3-0,7** антиХа ед/мл, а профилактическая область **0,1-0,3** антиХа ед/мл.

#### Оборудование и материалы

- Спектрофотометр, ФЭК или любой другой оптический анализатор с длиной волны 405 нм;
- пластиковые микрокюветы с длиной оптического пути 1 см;
- термостат (термобаня), поддерживающий температуру  $37 \pm 1$  °С;
- пробирки пластиковые вместимостью 3 - 5 мл и 10 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- секундомер;
- набор плазм-калибраторов с аттестованными значениями антиХа активности гепарина производства НПО Ренам, код ГП-3;
- набор контрольных плазм с аттестованными значениями антиХа активности гепарина производства НПО Ренам, код ГП-4;
- вода дистиллированная;
- физиологический раствор (0,9% раствор натрия хлористого в дистиллированной воде);
- уксусная кислота концентрации 50%;

- 3,8 % 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М);
- 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

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 (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре 2-8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Пробы крови пациентов не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов.

#### Проведение анализа

##### Приготовление реагентов

**Рабочий буферный раствор.** Буфер концентрированный (5 мл) развести дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь  $pH=8,4 \pm 0,05$ . Стабилен при температуре 2-8°C не более 20 дней.

**Рабочий раствор антиромбина III.** Во флакон с лиофильно высушенным антиромбином III внести 1 мл дистиллированной воды 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 2 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

**Раствор хромогенного субстрата.** Во флакон с хромогенным субстратом внести 2 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

##### Построение и использование калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика используют плазмы-калибраторы с известными активностями низкомолекулярного гепарина (поставляются дополнительно, не входят в состав набора).

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

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

Рабочий буферный раствор	400 мкл
Рабочий раствор антиромбина III	100 мкл
Раствор 1	100 мкл

##### Проведение анализа.

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

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

##### Регистрация результатов

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

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 анти-Ха единицах в мл плазмы. Калибровочный график линеен в интервале активности гепарина от 0 до 1.0 анти-Ха ед/мл. Используя

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

Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных:

- с повышенным содержанием липидов;
- с повышенным содержанием билирубина.

#### **Условия хранения и стабильность**

Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в закупоренном виде при температуре 2-8°C. Вскрытые компоненты набора можно хранить в плотно закупоренном состоянии при температуре 2-8°C не более 30 суток.

#### **Стабильность 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.

#### **Контроль качества.**

Для внутрилабораторного контроля качества следует использовать набор гепаринизированных плазм производства НПО РЕНАМ с аттестованными значениями антиХа активности (код ГП-4).

#### **Меры предосторожности**

Набор реагентов предназначен только для диагностики *in vitro*. Компоненты набора не предназначены для приема *per os* и не предназначены для инъекций.

Компоненты набора не токсичны, не взрывоопасны, не обладают аллергенным действием, при растворении в дистиллированной воде не выделяют токсичных продуктов. Потенциальный риск приме-

нения набора реагентов – класс 2а. Медицинское изделие (МИ) относится к классу риска 2а, т.к. это МИ с измерительной функцией с нефиксированным перечнем выполняемых лабораторных исследований, при применении которого терапевтическое решение должно приниматься после проведения дальнейших исследований, это МИ с умеренным индивидуальным риском и низким риском для общественного здоровья (Приложение 2 к Приказу МЗ № 4н от 6 июня 2012 г.).

При работе с набором реагентов следует соблюдать правила, описанные в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Инструкция утверждена Минздравом СССР в 1991 г.).

При работе с исследуемыми образцами крови пациентов следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, т.к. образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита человека ВИЧ1 и ВИЧ2, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

#### **Меры по безопасной утилизации отходов**

После окончания работы все отходы должны быть обработаны так, как это описано в СП № 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

*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](mailto:info@renam.ru)*

### Калибровочный график

