



Набор реагентов для определения анти Ха активности гепарина коагулологическим методом.

Набор предназначен для мониторинга за введением гепарина (в том числе и низкомолекулярного), путем определения его анти Ха активности в плазме.

Метод основан на способности небольших количеств гепарина исследуемой плазмы в присутствии антитромбина III (АТIII) нейтрализовать экзогенный активированный фактор Ха.

Принцип метода.

Процесс происходит в два этапа:

1. инактивация избытка фактора Ха комплексом АТIII-гепарин.
 2. измерение коагулологической активности остаточного фактора Ха на фосфолипидной мембране в присутствии ионов кальция.
- Источником АТIII, фибриногена и фактора V служит субстратная плазма.

Состав набора.

Субстратная плазма, лиофильно высушенная (2мл) – 2 фл.
 Реагент 1 - смесь фактора Ха и фосфолипидов, лиофильно высушенная (2мл)–2 фл.
 Хлорида кальция 0.035M (5мл) – 1фл.

Приготовление реагентов:

1. **Реагент 1 - смесь фактора Ха и фосфолипидов.** Во флакон с лиофильно высушенным реагентом 1 внести 2 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения. Возможно однократное замораживание – оттаивание.
2. **Субстратная плазма.** Во флакон с лиофильно высушенной субстратной плазмой внести 2 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения. Возможно однократное замораживание – оттаивание.
3. **Раствор кальция хлорида 0.035M.** Раствор кальция хлорида после вскрытия флакона можно хранить при +2-8⁰С в закрытом состоянии до окончания срока годности, указанного на этикетке. Прогретый при 37⁰С раствор должен быть использован в течение 8 часов.

Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8 ⁰ С	+18-22 ⁰ С	-18-20 ⁰ С
Реагент 1	2 дня	1 день	1 мес.
Раствор субстратной плазмы	8 часов	8 часов	1 мес.

Получение исследуемой плазмы для анализа.

Венозную кровь взять в пластиковую или стеклянную силиконизированную пробирку на 3,8% (0.11моль/л) цитрате натрия (9:1), центрифугировать 7 мин при 1000 об/мин, плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8⁰С не более

8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20⁰С.

Проведение анализа.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Субстратная плазма	100 мкл
Контрольная плазма (исследуемая)	25 мкл
Инкубировать при 37 ⁰ С точно 1 минуту.	
Реагент 1	50 мкл
Инкубировать при 37 ⁰ С точно 2-3 минуты*.	
Раствор кальция хлорида 0.035M	50 мкл

***в зависимости от типа коагулологического анализатора.**

Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика используют контрольные плазмы с известными активностями гепарина (поставляются дополнительно, не входят в состав набора), указанными в паспорте. На оси ординат (Y) по логарифмической шкале отложить величины времени свертывания, полученные для каждой контрольной плазмы, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале отложить активность гепарина в анти-Ха единицах в мл плазмы. Используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца определить активность гепарина. Калибровочный график линеен в интервале активности гепарина от 0 до 0.8 анти-Ха ед/мл.

Интерпретация результатов.

Профилактическая область – 0,1 – 0,3анти-Ха ед/мл
 Терапевтическая область – 0,3 – 0,7анти-Ха ед/мл
 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 предварительном разведении исследуемой плазмы субстратной плазмой в 2 или 4 раза. При этом результат, считанный из калибровочного графика, должен быть умножен на 2 или 4 соответственно.

Меры предосторожности

Субстратная плазма предназначена только для диагностики in vitro. Каждая доза донорской крови, использованная для получения пула плазмы, проверена на отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В, на антитела к вирусу гепатита С, на антитела к ВИЧ1 и к ВИЧ2. Для получения пула использована только кровь, не содержащая этих агентов. Однако, ввиду невозможности доказать их полное отсутствие, плазма должна рассматриваться как потенциально инфицированная, способная сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В и С или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Учитывая это, при работе с плазмой необходимо соблюдать все необходимые меры безопасности.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по 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