

УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от « » 2008 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор НПО «РЕНАМ»
МБООИ «Общество больных
гемофилией»

А.Козлов
2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для определения активности
антитромбина III оптическим методом
(Реахром-АТ III)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов Реахром-АТ III предназначен для определения активности антитромбина III (далее – АТ III) - основного ингибитора тромбина, с целью диагностики наследственного и приобретенного дефицита этого физиологического антикоагулянта, приводящего к развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания и острых тромбозов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения активности АТ III основан на его способности нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. Активность АТ III определяют в плазме крови, добавляя к ней избыток тромбина; при этом происходит ингибирование тромбина комплексом АТ III-гепарин пропорционально количеству АТ III в плазме. Оставшееся количество тромбина катализирует отщепление паранитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при длине волны 405 нм, обратно пропорциональна активности АТ III в анализируемой пробе.

Реакция идет по следующей схеме:

АТ III + гепарин (избыток) $\Rightarrow$ АТ III-гепарин.

АТ III-гепарин + тромбин (избыток) $\Rightarrow$ АТ III-гепарин-тромбин + тромбин (остаток).

Субстрат-pNA + тромбин (остаток) $\Rightarrow$ Пептид + pNA (желтое окрашивание).

Директор
12.05.08г.

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты:

- буфер с гепарином концентрированный – 2 флакона (по 5,0 мл);
- тромбин человека, лиофильно высушенный – 2 флакона;
- плазма-калибратор, лиофильно высушенная – 1 флакон;
- хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 2 флакона.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В плазме крови здоровых лиц активность АТ III составляет 80-120%.

Коэффициент вариации не превышает 5%. Отклонение от линейности в диапазоне от 10 до 100% не превышает 5%. Допустимый разброс результатов при исследовании активности АТ III разными наборами одной серии не превышает 5%. Допустимое отклонение активности АТ III в плазме-калибраторе от аттестованного значения не превышает 5%. Чувствительность метода – не более 8%.

Антитромбин III (АТ III), или кофактор гепарина – основной антагонист тромбина при образовании этого фермента в крови. В отсутствие гепарина АТ III медленно и необратимо ингибирует тромбин и другие факторы свертывания и фибринолиза. В присутствии гепарина АТ III становится быстрым ингибитором этих ферментов. Наследственный и приобретенный дефицит АТ III в крови приводит к развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания и в некоторых случаях к развитию острых тромбозов. Сниженная концентрация АТ III наблюдается у больных с заболеваниями печени (при циррозе), с нефротическим синдромом в результате экскреции ингибитора с мочой. Концентрацию АТ III снижают оральные контрацептивы и инъекции гепарина.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

4.3. Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- спектрофотометр, длина волны 405 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм;
- баня водяная, поддерживающая температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- pH-метр;
- лабораторная центрифуга, позволяющая проводить центрифугирование со скоростью 1000-3000 об/мин;
- секундомер;
- колба мерная стеклянная вместимостью 50 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,1, 1,0 и 5,0 мл;
- пробирки центрифужные пластиковые или стеклянные силиконизированные вместимостью 10 мл;
- натрий цитрат, 3,8%;
- уксусная кислота, 50%;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- масштабно-координатная бумага Н1.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь смешать в пластиковой или в стеклянной силиконизированной пробирке с 3,8% (0,11 М) раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Сразу же провести центрифугирование цитратной крови в течение 7 мин при комнатной температуре ($+18-25^\circ\text{C}$) и при скорости вращения 1000 об/мин (240 g). Плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Немедленно после центрифугирования перенести плазму в другую пробирку.

Хранить плазму до анализа можно не более 2 ч в при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре $+2-8^\circ\text{C}$. Допускается однократное замораживание плазмы и хранение при температуре минус 20°C не более 2 мес.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление и стабильность реагентов

1. Рабочий буферный раствор

Буфер с гепарином концентрированный (5,0 мл) развести дистиллированной водой в 10 раз (1:9). Рабочий буферный раствор должен иметь $\text{pH}=8,40 \pm 0,05$. Готов к проведению анализа через 20 мин после разведения. Хранить при температуре $2-8^\circ\text{C}$ не более 10 сут.

2. Раствор тромбина

Во флакон с лиофильно высушенным тромбином внести 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 мин после приготовления.

3. Раствор плазмы-калибратора

Внести во флакон с лиофильно высушенной плазмой-калибратором 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при комнатной температуре (+18-25°C) и осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 мин после приготовления.

4. Раствор хромогенного субстрата

Во флакон с хромогенным субстратом внести 2,0 мл дистиллированной воды, оставить без перемешивания при комнатной температуре на 20 мин, затем содержимое флакона тщательно перемешать.

Стабильность реагентов

Реагенты	2-8°C	18-25°C	минус 18-20°C
Раствор тромбина	5 сут	2 сут	2 мес
Раствор хромогенного субстрата	14 сут	5 сут	2 мес
Раствор плазмы-калибратора	8 ч	8 ч	2 мес

7.2. Ход исследования

7.2.1. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика плазму-калибратор с известной активностью АТ III развести буферным раствором по схеме:

Пробирка №	1	2	3	4
Активность АТ III, %	1,0 А	0,5 А	0,25 А	0,125 А
Рабочий буферный раствор, мл	2,9	1,0	1,0	1,0
Плазма-калибратор, мл	0,1	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл	1,0	1,0	1,0	

А – активность АТ III в плазме-калибраторе указана в паспорте.

Во всех разведенных растворах плазмы-калибратора провести определение активности АТ III по методу, описанному ниже. На вертикальной оси (Y) по линейной шкале отложить величины оптической плотности (ед. опт. плотн.), по горизонтальной оси (X) по линейной шкале – активность АТ III (%). Калибровочный график должен представлять собой прямую линию, линейен в интервале активностей от 10 до 100%.

7.2.2. Проведение анализа

Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму крови рабочим буферным раствором в 30 раз (0,1 мл плазмы + 2,9 мл буфера).

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Исследуемая разведенная плазма	0,1 мл	-
Раствор тромбина	0,1 мл	-
Рабочий буферный раствор	-	1,3 мл
Перемешать и инкубировать при температуре 37 ⁰ С точно 180 сек		
Раствор хромогенного субстрата	0,1 мл	-
Перемешать и инкубировать при температуре 37 ⁰ С точно 120 сек		
50% уксусная кислота	1,0 мл	-

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности АТ III могут полностью нейтрализовать тромбин, что приводит к искажению результатов. Правильные значения активности для таких образцов получают при разведении исходной исследуемой плазмы пациента не в 30, а в 60 раз. Полученный результат умножают на 2.

Заниженные результаты получают при анализе плазмы пациентов с повышенным содержанием липидов или билирубина.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

После внесения в инкубационную смесь 50% уксусной кислоты, останавливающей реакцию, измерить оптическую плотность образца исследуемой плазмы против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭК) при длине волны 405 нм и кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Определение активности АТ III (%) провести по калибровочному графику зависимости активности АТ III (%) от оптической плотности раствора (ед. опт. плотн.), образовавшегося после взаимодействия АТ III с добавленным в плазму тромбином.

Активность АТ III обратно пропорциональна оптической плотности раствора.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты исследования активности АТ III в образцах плазмы пациентов учитывают в % от известной активности АТ III в плазме-калибраторе.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до 25°C не более 10 сут.

Срок годности наборов - 24 мес.

Раствор тромбина можно хранить при температуре 2-8°C не более 5 сут, при комнатной температуре (+18-25°C) не более 2 сут или при температуре минус 18-20°C не более 2 мес.

Раствор хромогенного субстрата можно хранить не более 14 сут при температуре 2-8°C, не более 5 сут при комнатной температуре и не более 2 мес в замороженном состоянии при температуре минус 18-20°C.

Раствор плазмы-калибратора можно хранить не более 8 ч при температуре 2-8°C или при комнатной температуре и не более 2 мес при температуре минус 18-20°C.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а, Гематологический научный центр РАМН, тел/факс (495) 614-90-57, e-mail: renam@blood.ru

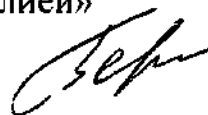
и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117241, г. Москва, Научный проезд, д. 14 а, тел.: (495) 120-60-96; 120-60-95.

Заведующий отделом производства НПО «РЕНАМ»

МБООИ «Общество больных гемофилией»

кандидат биологических наук



А.Л.Берковский

Научный руководитель лаборатории

клинической коагулологии

ГНЦ РАМН, д.м.н.



С.А.Васильев

