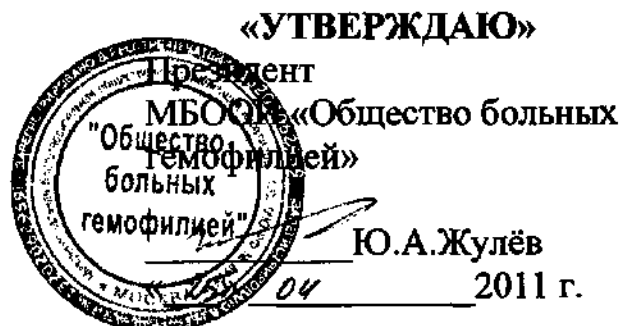


**УТВЕРЖДЕНА**  
приказом Росздравнадзора  
от «  »            2011 г.  
№                     



**ИНСТРУКЦИЯ**  
**по применению Набора реагентов для определения активности**  
**антитромбина III в плазме крови человека клоттинговым методом**  
**(«Реаклот АТ III тест»)**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

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

Набор предназначен для проведения 80 макро анализов или 160 микроанализов при расходе по 0,1 мл или по 0,01 мл растворов реагентов на одно определение, соответственно.

**2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

**2.1. Принцип метода**

В соответствии с клоттинговым методом, разработанным U. Abildgaard, в исследуемой плазме тепловой обработкой удаляют фибриноген, вносят стандартное количество тромбина, смесь инкубируют при температуре 37°C и затем определяют в ней остаточную (после взаимодействия с АТ III) активность тромбина.

Активность тромбина определяют по времени свертывания стандартного раствора фибриногена.

Чем выше активность АТ III в исследуемой плазме, тем ниже остаточная активность тромбина, и тем медленнее происходит образование сгустка.

**2.2. Состав набора**

1. Тромбин, лиофильно высушенный - 2 флакона
2. Фибриноген, лиофильно высушенный - 4 флакона
3. Дефибринированная плазма-калибратор, лиофильно высушенная - 1 флакон
4. Буфер имидазоловый концентрированный (5,0 мл) - 1 флакон.

## 2. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Коэффициент вариации при определении активности АТ III с помощью набора «Реаклот-АТ III» не более 10 %.

Отклонение от линейности в диапазоне от 25 до 100% не превышает 10 %.

Допустимый разброс результатов при исследовании активности АТ III разными наборами одной серии не превышает 10%. Допустимое отклонение активности АТ III в плазме-калибраторе от аттестованного значения не превышает 10 %. Чувствительность определения – 15%.

АТ III или кофактор гепарина – основной антагонист тромбина при образовании этого фермента в крови. В отсутствии гепарина АТ III медленно и необратимо ингибирует тромбин и другие факторы свертывания и фибринолиза. В присутствии гепарина процесс ингибирования тромбина АТ III ускоряется во много раз.

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

Наследственный и приобретенный дефицит АТ III 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 1.

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

- Коагулологический анализатор с набором пластиковых кювет;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,1, 1,0, 2,0 и 4,0 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- термостат ТW-2 для исследования гемокоагуляции;
- вода дистиллированная;
- колба мерная стеклянная вместимостью 100 мл;
- лабораторная центрифуга, позволяющая проводить центрифугирование со скоростью 1000-3000 об/мин;
- натрия цитрат, 3,8% раствор;

- масштабно-координатная бумага полулогарифмическаяч ПЛН1;
- пробирки центрифужные пластиковые или стеклянные силиконированные вместимостью 10 мл.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь смешать в пластиковой или в стеклянной силиконированной 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 и при скорости вращения 1000 об/мин (240 g). Плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Немедленно после центрифугирования перенести плазму в другую пробирку.

Хранить плазму до анализа не более 2 ч в при комнатной температуре (18-25°C) 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 в течение 2 мес.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Приготовление и стабильность реагентов

#### 1. Рабочий буферный раствор

Буфер имидазоловый концентрированный (5,0 мл) перенести количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл и долить до метки дистиллированной водой (разведение в 20 раз), тщательно перемешать. Рабочий буферный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 мес.

#### 2. Раствор тромбина

Во флакон с лиофильно высушенным тромбином внести 4,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании. Использовать через 15 мин после растворения.

#### 3. Раствор фибриногена

Во флакон с лиофильно высушенным фибриногеном внести 2,0 мл дистиллированной воды, аккуратно перемешать содержимое флакона и дать постоять не менее 15 мин. Раствор фибриногена использовать в течение рабочего дня.

#### 4. Дефибринированная плазма-калибратор.

Во флакон с плазмой-калибратором внести 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Использовать через 20 мин после растворения.

## 7.2. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика использовать дефибрированную плазму-калибратор. Плазму-калибратор развести рабочим буферным раствором по схеме:

| Номер пробирки                              | 1     | 2     | 3      |
|---------------------------------------------|-------|-------|--------|
| Активность АТ III, %                        | A*    | 0,5 A | 0,25 A |
| Плазма-калибратор, мл                       | 0,3   | -     | -      |
| Рабочий буферный раствор, мл                | 0,6   | 0,5   | 0,5    |
| Перемешать и перенести в следующую пробирку | 0,5 ↗ |       | 0,5 ↗  |

\*A - аттестованное значение АТ III в дефибрированной плазме-калибраторе, %.

Во всех 3 разведенных растворах дефибрированной плазмы-калибратора определить время свертывания по методу, описанному ниже (см. п. 7.4).

На вертикальной оси Y по логарифмической шкале отложить время свертывания, сек, а на горизонтальной оси X по линейной шкале отложить соответствующую активность АТ III, %.

Калибровочный график линеен в интервале активности АТ III от 25 до 100%.

## 7.3. Подготовка исследуемой плазмы пациента для анализа.

Плазму пациента с целью дефибрирования прогреть на водяной бане в течение 6 мин при температуре 56°C (перед анализами проверить температуру водяной бани), затем центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин (1200 g).

Надосадочную жидкость отобрать в пластиковую или стеклянную силиконизированную пробирку.

## 7.4. Проведение анализа

Исследуемую дефибрированную плазму перед анализом развести рабочим буферным раствором в 3 раза.

| В кювету коагулометра внести:                                                                             |  | Объем  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--------|
| Разведенная дефибрированная плазма (плазма-калибратор или исследуемая плазма пациента)                    |  | 0,1 мл |
| Раствор тромбина                                                                                          |  | 0,1 мл |
| Инкубировать при температуре 37°C точно 2 или 3 мин в зависимости от типа коагулологического анализатора. |  |        |
| Раствор фибриногена                                                                                       |  | 0,1 мл |
| Отметить на таймере коагулометра время образования сгустка                                                |  |        |

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя полученный на коагулометре результат времени свертывания исследуемой плазмы, сек, по калибровочному графику определить соответствующую активность АТ III, %.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности АТ III могут полностью нейтрализовать тромбин в системе, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности АТ III для таких образцов могут быть получены при разведении дефибринированной плазмы в 6 раз рабочим буферным раствором. При этом полученный результат необходимо умножить на 2.

Возможное присутствие в исследуемой плазме гепарина до 1 МЕ/мл не влияет на измерение активности АТ III за счет присутствия в тромбине инактиватора гепарина.

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Набор должен применяться согласно инструкции по применению.

Срок годности наборов – 24 мес со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

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.

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

Дефибринированный раствор плазмы-калибратора можно хранить не более 8 ч при температуре 2-8°C, не более 4 ч при комнатной температуре и не более 2 мес в замороженном состоянии при температуре минус 18-20°C.

Раствор фибриногена можно хранить не более 8 ч при температуре 2-8°C, не более 4 ч при комнатной температуре и не более 2 мес в замороженном состоянии при температуре минус 18-20°C.

Рабочий буферный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 мес.

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

По вопросам, касающимся качества набора «Реаклот АТ III тест», следует обращаться в МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу:

125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4, ФГБУ ГНЦ Минздравсоцразвития России, тел/факс (495) 614-90-57, e-mail: [renam@blood.ru](mailto:renam@blood.ru).

Заведующий отделом производства  
МБООИ «Общество больных гемофилией» к.б.н.

 А.Л.Берковский

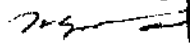
Зав. лаб. клинической коагулологии

ФГБУ ГНЦ Минздравсоцразвития России, д. м. н., профессор  С.А.Васильев



Пронумеровано  
и прошнуровано

Президент МБОУ  
больных гемофилией

  
Ю.А.Жулёв

