

МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ БЛАГОТВОРИТЕЛЬНАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ ИНВАЛИДОВ «ОБЩЕСТВО БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ»

УТВЕРЖДАЮ
Президент МБОУИ
«Общество больных гемофилией»



Ю.А. Жулёв
«15» октября 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для определения анти-Ха активности гепарина
хромогенным методом (Реахром-гепарин)
по ТУ 21.20.23-073-05595541-2021»

Номер по каталогу - ГП-1/1

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Предназначенное применение

Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения анти-Ха активности гепарина хромогенным методом (Реахром-гепарин) по ТУ 21.20.23-073-05595541-2021» (сокращенное наименование - Реахром-гепарин) предназначено для количественного определения анти-Ха активности низкомолекулярного гепарина (НМГ) в плазме крови хромогенным методом на автоматических коагулометрах с целью оценки эффективности антикоагулянтной терапии НМГ.

1.2 Предназначенный пользователь

Определение анти-Ха активности гепарина с помощью набора Реахром-гепарин может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

1.3 Диагностическая роль

Определение уровня анти-Ха активности гепарина в крови позволяет в первую очередь оценить эффективность антикоагулянтной терапии и в то же время не допустить геморрагических осложнений [1].

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

3 НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ АНАЛИТА

Гепарин значительно ускоряет инактивацию факторов свертывания Ха и тромбина в присутствии антитромбина III. По этой причине препараты НМГ широко используются в качестве терапевтических антикоагулянтов [1, 2, 3]. Определение анти-Ха активности НМГ является наиболее чувствительным тестом, позволяющим оценивать активность введенного гепарина непосредственно в плазме крови пациента.

4 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1 Состав набора

- Антитромбин III, лиофильно высушенный – 1,0 МЕ во флаконе – 2 флакона;
- Фактор Ха, лиофильно высушенный – 15,0 нкат во флаконе – 4 флакона;
- Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 3,0 мкМ во флаконе – 2 флакона;
- Буфер имидазоловый – 5,0 мл во флаконе – 1 флакон;
- Плазма-калибратор уровень 0, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;
- Плазма-калибратор уровень 1, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;
- Плазма-калибратор уровень 2, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;
- Плазма контрольная уровень 1, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон.
- Плазма контрольная уровень 2, лиофильно высушенная – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон.

Все компоненты набора расфасованы в стеклянные флаконы, укупоренные резиновыми пробками и снабженные полимерными резьбовыми колпачками.

Антитромбин III и фактор Ха получены из донорской плазмы, с добавлением буфера и стабилизатора.

Хромогенный субстрат представляет собой пептид Z-dArg-Gly-Arg-пара-нитроанилид с добавлением маннитола.

Буфер имидазоловый – «Буфер имидазоловый концентрированный («Буфер имидазоловый») по ТУ 9398-035-05595541-2011» (ФСР 2011/12508) производства МБООИ «Общество больных гемофилией», Россия.

Плазмы-калибраторы трех уровней и плазмы контрольные двух уровней с аттестованными анти-Ха активностями гепарина получены из донорской плазмы с добавлением различных количеств НМГ и стабилизированы HEPES-буфером.

4.2 Комплект поставки

- 1) Набор реагентов Реахром-гепарин;
- 2) инструкция по применению;
- 3) паспорт на серию набора реагентов Реахром-гепарин.

4.3 Число анализируемых проб биологического материала

Число определений с помощью набора Реахром-гепарин зависит от типа используемого коагулометра.

4.4 Принцип метода

Метод определения анти-Ха 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 длине волны 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.

5 МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ КАЛИБРАТОРАМ И КОНТРОЛЬНЫМ МАТЕРИАЛАМ

Анти-Ха активность гепарина в плазмах-калибраторах и контрольных плазмах устанавливают при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против 3-го Международного Стандарта низкомолекулярного гепарина, код 11/176, полученного из National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Значение активности гепарина в плазмах-калибраторах и плазмах контрольных указано в паспорте на каждую серию набора Реахром-гепарин.

6 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

6.1 Аналитическая специфичность

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

6.2 Влияние потенциально интерферирующих веществ

Следующие вещества не влияют на правильность определения анти-Ха активности гепарина: билирубин в концентрации до 0,2 г/л, свободный гемоглобин – до 2,0 г/л, триглицериды – до 10 г/л.

При превышении указанных концентраций возможно получение ложно заниженных результатов.

6.3 Точность

Анти-Ха активность гепарина в плазмах-калибраторах составляет:

уровень 0 – 0 МЕ/мл;

уровень 1 – 0,4 – 0,7 МЕ/мл;

уровень 2 – 0,8 – 1,2 МЕ/мл.

Анти-Ха активность гепарина в плазмах контрольных составляет:

уровень 1 – 0,4 – 0,7 МЕ/мл;

уровень 2 – 0,8 – 1,2 МЕ/мл.

Допустимое отклонение анти-Ха активности гепарина от аттестованного значения - не более 10%. Точное значение анти-Ха активности гепарина в плазмах-калибраторах и плазмах контрольных указано в паспорте на каждую серию набора Реахром-гепарин.

6.4 Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения анти-Ха активности гепарина, межфлаконная вариация - не более 5%. Допустимый разброс результатов при определении анти-Ха активности гепарина в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии - не более 5%.

6.5 Аналитическая чувствительность

Минимальная анти-Ха активность гепарина, определяемая с помощью набора Реахром-гепарин - не более 0,1 МЕ/мл.

6.6 Диапазон определяемых значений

Реахром-гепарин позволяет определять любое значение анти-Ха активности гепарина (с учетом соответствующего разведения), начиная от 0,1 МЕ/мл.

6.7 Значения анти-Ха активности, соответствующие нормальным

При введении НМГ в профилактических целях его анти-Ха активность в плазме крови должна составлять 0,3 – 0,7 МЕ/мл.

При введении НМГ в терапевтических целях его анти-Ха активность в плазме крови должна составлять 0,7 – 1,2 МЕ/мл.

6.8 Линейность

Линейность определения анти-Ха активности гепарина - в диапазоне от 0,1 до 1,2 МЕ/мл. Отклонение в тесте на «линейность» - не более 10%.

6.9 Тест на «открытие»

Отклонение в тесте на «открытие» - не более 10%.

6.10 Ограничения метода

Благодаря множеству факторов воздействие одинаковой дозы гепарина варьируется от пациента к пациенту. Поэтому результаты, полученные с помощью набора Реахром-гепарин, всегда должны рассматриваться в сочетании с историей болезни конкретного пациента, клиническими данными и другой значимой информацией.

Реахром-гепарин нельзя использовать для определения гепарина в образцах пациентов, находящихся на гепарин-нейтрализующей терапии (например протамина сульфатом), так как компоненты реагента будут компенсировать нейтрализующий эффект и приводить к ложным результатам.

7 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов Реахром-гепарин предназначен только для диагностики *in vitro*. Класс потенциального риска применения медицинского изделия - 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 с образцами крови следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: СП 2.1.3678-20 от 24.12.2020 «Санитарно-эпидемиологические требования к эксплуатации помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов, осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг» и СанПиН 3.3686-21 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

 Плазмы-калибраторы, плазмы контрольные, 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 с набором 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.

8 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр автоматический;
- пробирки пластиковые вместимостью 3-5 мл;
- дозаторы переменного объема от 100 до 1000 мкл и от 1,0 до 5,0 мл с наконечниками;
- цилиндр мерный объемом 100 мл;
- секундомер;
- вода дистиллированная;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 M) или
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

Примечание – Набор реагентов Реахром-гепарин совместим со всеми типами автоматических коагулометров с длиной волны 405 нм.

9 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

9.1 Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов Реахром-гепарин предназначен для определения анти-Ха активности гепарина в плазме крови. Образцы плазмы крови для анализа не должны иметь признаков гемолиза, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

9.2 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° С в течение 15 минут при 1500 g.

9.3 Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 2 часов при комнатной температуре и не более 8 часов в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре от минус 18 до минус 20 °С и хранение при этой температуре в морозильнике не более 2 месяцев.

9.4 Ограничения по использованию 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, так как при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

10 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1 Рабочий буферный раствор

Буфер имидазоловый концентрированный развести в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерный цилиндр, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать). Раствор готов к работе через 30 минут. Значение pH рабочего буферного раствора должно находиться в диапазоне от 7,35 до 7,45 ед. pH.

10.2 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. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

10.3 Рабочий раствор фактора Ха

Во флакон с лиофильно высушенным фактором Ха внести 5,0 мл дистиллированной воды и растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

10.4 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. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

10.5 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.

10.6 Плазмы 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.

Примечание - Время растворения лиофильно высушенных реагентов должно составлять не более 3 минут.

11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Примечание - Калибровочный график должен быть построен для каждой серии набора Реахром-гепарин, а также для каждого используемого прибора.

12 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 анти-Ха активности гепарина для таких образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы в 2 или 4 раза рабочим буферным раствором. При этом полученный результат должен быть умножен на 2 или 4 соответственно.

13 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Правильность и воспроизводимость определения активности гепарина следует контролировать с помощью плазм контрольных, входящих в состав набора Реахром-гепарин.

14 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 °С. Допускается хранение при температуре до плюс 25 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные и жидкие компоненты набора следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность реагентов после первого вскрытия флакона

Реагенты	Температура хранения, °С, в диапазоне		
	от плюс 2 до плюс 8	от плюс 18 до плюс 25	от минус 18 до минус 20
Рабочий раствор антитромбина III	14 суток	7 суток	2 месяца
Рабочий раствор фактора Ха	14 суток	3 суток	2 месяца
Раствор хромогенного субстрата	30 суток	14 суток	2 месяца
Растворы плазм-калибраторов	8 часов	4 часа	2 месяца
Растворы плазм контрольных	8 часов	4 часа	2 месяца
Рабочий буферный раствор	30 суток	5 суток	---

Допускается дробное использование приготовленных лиофильно высушенных реагентов путем розлива по аликвотам в пластиковые пробирки, укупоривания, однократного быстрого замораживания аликвот при температуре от минус 18 до минус 20 °С и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

Оттаивать замороженные аликвоты следует при температуре от плюс 35 до плюс 37 °С на водяной бане и использовать в течение 2 часов после оттаивания. Повторное замораживание не допускается. При размораживании плазм-калибраторов и плазм контрольных необходимо следить, чтобы полностью растворилась криоглобулиновая фракция.

Транспортирование наборов должно осуществляться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре от плюс 2 до плюс 8°С. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание наборов при транспортировании не допускается.

15 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора Реахром-гепарин требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных в ТУ.

16 МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» (СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021) отходы от работы с набором Реахром-

гепарин с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

В соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 реагенты из набора Реахром-гепарин, не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Б, за исключением Буфера имидазолового.

Отходы класса Б 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 для дальнейшей передачи в организации, имеющие соответствующую лицензию, с целью последующего уничтожения на специально оборудованных площадках в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

Буфер имидазоловый из набора Реахром-гепарин, не подлежащий использованию, с истекшим сроком годности, и не состоящий в контакте с плазмой крови пациентов, относится к отходам класса А. Отходы класса А собирают в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета, кроме желтого и красного, с надписью «Отходы. Класс А», утилизируют и транспортируют в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

17 ЛИТЕРАТУРА

1. Берковский, А.Л. Методы определения активности гепарина: учебно-методическое пособие / А.Л. Берковский и др. – 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. Antithrombin assay - the use of human or bovine thrombin and the observation of a second heparin cofactor / P. Friberger, et al. // Thrombosis Research – 1982 – Vol. 25 – P. 433-436.

18 ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

– ГОСТ Р 51088-2013. Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

– ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на 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 ИСО 18113-2-2015 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.

– ГОСТ ISO 17511-2011 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам.

– Приказ Минздрава России от 19.01.2017 г № 11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинских изделий».

19 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
	Объем восстановленного раствора

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 (804) 333-22-61, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru, сайт: www.renam.ru.

Директор НПО «РЕНАМ»

МБООИ «Общество больных гемофилией», к.б.н.

 А.Л. Берковский

Ведущий научный сотрудник

НКО ХТ с ДС ФГБУ НМИЦГ МЗ РФ, д. м. н.

 С.А. Васильев

Прошнуровано
и пронумеровано 12 листов
Президент МБОУ «Общество
больных гемофилией»
Ю.А. Жулёв

