

Набор реагентов для определения анти Ха активности гепарина оптическим методом.

Набор предназначен для определения анти Ха активности гепарина как не фракционированного, так и низкомолекулярного, в плазме пациентов. Основным ингибитором тромбина, активированного фактора Ха и других сериновых протеаз коагуляционного каскада является антитромбин 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 активности фактора Ха является наиболее чувствительным и информативным из всех способов определения активности гепарина в плазме крови.

Принцип метода.

Метод определения 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 паранитроанилина (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.

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

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

Буфер концентрированный (5мл) – 1фл.

Хромогенный субстрат, лиофильно высушенный (2мл) – 2фл

Приготовление реагентов.

- 1. Рабочий буферный раствор.** Буфер концентрированный (5 мл) развести дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь $pH=8,4 \pm 0,05$. Хранить при температуре 2-8⁰С не более 20 дней.
- 2. Рабочий раствор антитромбина III.** Во флакон с лиофильно высушенным антитромбином III внести 1 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.
- 3. 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.
- 4. 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.

Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8 ⁰ С	+18-22 ⁰ С	-18-20 ⁰ С
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.

Дополнительные реагенты.

Цитрат натрия 0.11М (3.8%) раствор.

Уксусная кислота 50% концентрации.

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 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.

Построение и использование калибровочного графика.

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

1. Развести исследуемую плазму или плазмы-калибраторы трех уровней рабочим буферным раствором в 2 раза по схеме:

0.1мл плазмы + 0.1мл рабочего буферного раствора. - **Раствор 1:**

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

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

Проведение анализа.

Анализ проводится в пластиковых пробирках, прогретых при 37⁰С.

Внести в пробирку:	Образец	Кювета сравнения
Рабочий раствор фактора Ха	200 мкл	-
Раствор 2	200 мкл	-
Рабочий буферный раствор	-	1000мкл
Инкубировать при 37 ⁰ С точно 5 минут.		
Раствор хромогенного субстрата	200 мкл	-
Инкубировать при 37 ⁰ С точно 5 минут.		
50%-ая уксусная кислота	400 мкл	-

Измерить оптическую плотность образца против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭКе) 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 линейен 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.

Интерпретация результатов.

Терапевтическая область 0,3-0,7 анти- Ха активности.

Профилактическая область 0,1-0,3 анти- Ха активности.

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 4 или в 8 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 больших:

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

Контроль качества.

Для построения и проверки правильности построения калибровочных прямых необходимо контролировать с помощью гепаринизированных плазм НПО РЕНАМ:

Плазма- калибратор

код ГП-3

Плазма контрольная

код ГП-4

Паспорт
Набора реагентов для определения активности гепарина
Реахром гепарина-тест
 Серия № 0405 Годен до: 12.06

№ п/п	Наименование показателя	По ТУ	Фактическое значение
1	Внешний вид антитромбина III	Пористая масса белого цвета	Соответствует
2	Внешний вид фактора Ха	Пористая масса, белого цвета	Соответствует
3	Внешний вид буфера концентрированного	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
4	Внешний вид хромогенного субстрата	Пористая масса белого цвета	Соответствует
5	Растворимость антитромбина III и фактора Ха, мин. не более	3	Соответствует
6	Растворимость хромогенного субстрата, мин. не более	3	Соответствует
7	Чувствительность, анти-Ха ед/мл, не более	0.02	Соответствует
8	Линейность в диапазоне активности 0-1.0 анти-Ха ед/мл, отклонение в % не более	10	Соответствует
9	Коэффициент вариации результатов определения, % не более	10	Соответствует

ОТК

Разработчик и изготовитель:
НПО "РЕНАМ" Общества больных гемофилией
 125167 Москва, Ново-Зыковский пр., 4а
 Тел. (095) 213-00-72, 212-51-03

