



Інструкція
з використання набору реагентів
для визначення активності антитромбіну III
АНТИТРОМБІН-ТЕСТ
(метод Abildgaard модифікований)

IN VITRO

Зберігати при 2-8°C

Тільки для професійного використання.

Принцип методу

АТ III з плазми, яку піддали тепловому дефібринуванню, інактивує α -тромбін. Тестують залишкову активність тромбіну через 2 min (хв) від початку інкубації дефібринованої плазми з тромбіном. За часом згортання оцінюється активність АТ III зразка. Активність АТ III, виражену у відсотках до норми, знаходять по калібрувальній кривій.

Призначення

Набір призначений для визначення активності антитромбіну III (АТ III) при діагностиці вродженого або набутого дефіциту цього антикоагулянту, діагностиці ДВЗ-синдрому і контролю за його лікуванням із застосуванням компонентів крові, при гепаринотерапії.

Склад набору

1. Буфер для розведення (концентрований 20:1 розчин, рН 7.4), 5 ml (мл) - 1 фл.
2. Стандарт-плазма (ліофільно висушена) - 2 фл.
3. Тромбін (ліофільно висушений, 150 од. NIH) - 1 фл.
4. Інструкція з використання.
5. Паспорт.

Аналітичні характеристики

Коефіцієнт варіації результатів визначення активності АТ III не перевищує 10%.

Допустимий розкид результатів визначення активності АТ III в одній пробі плазми крові різними наборами однієї серії не перевищує 10%.

Перелік необхідного устаткування

- центрифуга лабораторна;
- термобаня на 56°C;
- коагулометр, при відсутності коагулометра - секундомір і термобаня на 37°C;
- піпетки місткістю 0.1 ml (мл), 0.5 ml (мл), 0.2-1.0 ml (мл), 3.0 ml (мл);
- пробірки скляні;
- циліндр мірний місткістю 100 ml (мл);
- контрольна бідна тромбоцитами цитратна плазма (для тестування залишкової активності тромбіну - див. Підготовка реагентів, п. 1.2);
- фізіологічний (0.9%) розчин натрію хлориду;

Підготовка зразків

Кров для дослідження забирають з літкової вени в пластикову або силіконову пробірку, що містить 3.2% розчин натрію лимоннокислого трьох заміщеного (цитрату натрію), співвідношення об'ємів крові і цитрату натрію - 9:1. Кров центрифугують при 3000-4000 г/min (об/хв) (1200 g) протягом 15 min (хв). В результаті отримують бідну тромбоцитами плазму, яку переносять в іншу пробірку, де зберігають до проведення дослідження. Центрифугування має проводитися безпосередньо після взяття крові, а відбір плазми на дослідження - відразу ж після центрифугування. Не допускається аналіз плазми, що має згустки, гемоліз, надлишок цитрату натрію і отриманої більше ніж 2 h (год) тому, а також замороженої плазми крові.

Приготування дефібринованої плазми (досліджуваної і стандарт-плазми). В пробірку внести 1.0 ml (мл) досліджуваної плазми. Потім помістити пробірку в водяну баню і дефібринувати при температурі 56°C протягом 6 min (хв). Після дефібринації зразки плазми необхідно центрифугувати при 3000 г/min (об/хв) протягом 10 min (хв). Надосадову рідину відбирають і досліджують. Перед проведенням аналізу

надосадова рідина розводиться робочим розчином буфера в 2 рази (0.5 ml (мл) дефібринованої плазми + 0.5 ml (мл) робочого розчину буфера).

Підготовка реагентів

1. Розведення буфера.

Вміст флакона з концентрованим буфером перенести в мірний циліндр і довести об'єм дистильованою водою до 100 ml (мл). В результаті отримують робочий розчин буфера, який зберігають у закритому флаконі при температурі 2-8°C до 3 wk (тижд).

2. Плазма для тестування залишкової активності тромбіну.

У комплект набору не входить. Отримують від здорових людей за описаним вище способом (див. Підготовка зразків). Перед використанням плазма розводиться робочим розчином буфера в співвідношенні 1:1. З цією ж метою допускається використання свіжо приготованого розчину фібриногену з концентрацією коагулюючого білку 3.0-4.0 g/l (г/л).

3. Розведення стандарт-плазми і приготування калібрувальних розчинів.

У флакон з стандарт-плазмою внести 1.0 ml (мл) дистильованої води і розчинити вміст при кімнатній температурі і легкому погойдуванні протягом 3 min (хв). В результаті отримують стандарт-плазму з активністю АТ III, що дорівнює 100%. Розведену стандарт-плазму піддають дефібринуванню, як зазначено вище. Потім з неї готують розведення для побудови калібрувальної кривої відповідно до таблиці:

Номер розчину	Стандарт-плазма та її розведення	+	Буфер	Розведення	Активність АТ III
1	0.2 ml (мл)	+	0.2 ml (мл)	1:2	100%
2	0.2 ml (мл)	+	0.4 ml (мл)	1:4	50%
3	0.1 ml (мл)	+	0.4 ml (мл)	1:8	25%

4. Розведення тромбіну.

У флакон з тромбіном внести 3.0 ml (мл) фізіологічного розчину натрію хлориду і розвести вміст при кімнатній температурі і легкому погойдуванні протягом 2-3 min (хв). В результаті отримують маточний розчин тромбіну.

Для приготування робочого розчину тромбіну в день проведення дослідження змішати в пробірці **0.2 ml (мл)** маточного розчину тромбіну з **1.5 ml (мл)** робочого розчину буфера.

Перевірка активності робочого розчину тромбіну

1. У кювету коагулометра або в пробірку (при мануальному визначенні) внести 0.1 ml (мл) плазми калібрувального розчину № 1 (див. таблицю - приготування калібрувальних розчинів) і 0.1 ml (мл) робочого розчину тромбіну.

2. Інкубувати при температурі 37°C протягом 2 min (хв) (точно).

3. Додати 0.1 ml (мл) плазми для тестування залишкової активності тромбіну, що має кімнатну температуру, і почати відлік часу згортання. Отриманий робочий розчин тромбіну повинен мати активність 35-45 s (с). В разі необхідності до робочого розчину тромбіну додати невелику кількість робочого розчину буфера або маточного розчину тромбіну для отримання необхідної активності останнього. Робочий розчин тромбіну для збереження активності рекомендується готувати в пластиковій пробірці, та не прогрівати при температурі 37°C, а зберігати при кімнатній температурі не більше 2 h (год) або не більше 6 h (год) при температурі 2-8°C.

Побудова калібрувальної кривої

1. У кювету коагулометра або в пробірку (при мануальному визначенні) внести 0.1 ml (мл) калібрувального розчину № 1 і 0.1 ml (мл) робочого розчину тромбіну.

2. Інкубувати при температурі 37°C протягом 2 min (хв) (точно).

3. Додати 0.1 ml (мл) плазми для тестування залишкової активності тромбіну, що має кімнатну температуру, і почати відлік часу згортання.

4. Аналогічно визначити час згортання в калібрувальних розчинах № 2 і № 3.

Визначення рекомендується проводити двічі з кожним розведенням стандарт плазми.

За отриманими середніми (з двох визначень) даними побудувати калібрувальну криву, де по осі ординат зазначають час згортання (s (с)), а по осі абсцис - активність АТ-III (%) відповідно з калібрувальними розчинами стандарт плазми. Для побудови калібрувальної кривої можуть бути використані комерційні зразки плазми, атестовані за активністю АТ-III.

Проведення аналізу

1. У кювету коагулометру або в пробірку (при мануальному визначенні) внести 0.1 ml (мл) розведеної робочим розчином буфера дефібринованої досліджуваної плазми і 0.1 ml (мл) робочого розчину тромбіну.
2. Інкубувати при температурі 37°C протягом 2 min (хв) (точно).
3. Додати 0.1 ml (мл) плазми для тестування залишкової активності тромбіну, що має кімнатну температуру, і почати відлік часу згортання. Час згортання (в s (с)) переводять в активність АТ ІІІ (в%) по калібрувальному графіку. Система координат для побудови калібрувальної кривої приведена на малюнку.

Оцінка результатів

У нормі прогресивна активність АТ ІІІ становить 80-120%. При ряді варіантів спадкової тромбофілії, а також в процесі розвитку гострого ДВЗ-синдрому, при лікуванні L-аспарагіназою, пізніх гестозах, прийомі протизаплідних засобів, що містять естроген, важких ураженнях печінки, активність АТ ІІІ в плазмі часто знижується. Останнє може наступити і при тривалому застосуванні великих доз гепарину. З іншого боку, при дефіциті і певних аномаліях АТ ІІІ, що є плазмовим кофактором гепарину, антикоагулянтний ефект гепарину послаблюється. Тому при всіх перерахованих патологічних станах і лікарських впливах необхідний контроль за активністю АТ ІІІ в плазмі. Гепарин в концентрації до 1,0 од/мл не впливає на результати дослідження.

Зберігання та стабільність

Набір розрахований на проведення 120-240 визначень при витраті тромбіну по 0.1-0.05 ml (мл) на 1 визначення. Зберігання набору повинно проводитися при температурі 2-8°C протягом усього терміну придатності набору 24 mth (міс). Під час використання реагентів запобігати забруднення та потрапляння прямих сонячних променів. Заморожування не допускається. Час використання набору не повинно перевищувати 3-х wk (тижд) з моменту розкриття його компонентів. Маточний розчин тромбіну можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 wk (тижд). Робочий розчин тромбіну можна зберігати при кімнатній температурі 18-25°C не більше 3 h (год) або не більше 6 h (год) при температурі 2-8°C. Стандарт-плазму після розведення можна зберігати при кімнатній температурі не більше 3 h (год). Робочий розчин буфера можна зберігати при температурі 28°C не більше 3 wk (тижд).

Вимоги безпеки та утилізації

1. Уникати потрапляння в рот, очі та на шкіру. В разі потрапляння, промити великою кількістю води та звернутися за консультацією до лікаря.
2. Використовувати засоби індивідуального захисту при роботі з набором.
3. Знезараження та утилізація реагентів, сироваток, тестових слайдів чи скляних пластин проводити згідно з чинним законодавством.

Транспортування

Набори транспортують всіма видами закритого транспорту при температурі до 25°C. Допускається транспортування при середньодобової температурі 37°C не більше 72 h (год).

Гарантія виробника

1. Виробник гарантує відповідність якості наборів вимогам ТУ при додержанні споживачем умов зберігання.
2. Гарантійний термін зберігання становить 24 mth (міс) з дня виготовлення набору.




Література





1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушенной гемостаза. - М.: "Ньюдиамед-АО", 2008. – 292 с.
2. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. – СПб.: ФормаТ, 2006. – 208 с.



ТОВ «Лабораторія Гранум», Україна, 61001, м. Харків, вул. Франківська, 14,
тел/факс: (057) 752-32-31, електронна адреса: granumlab@gmail.com

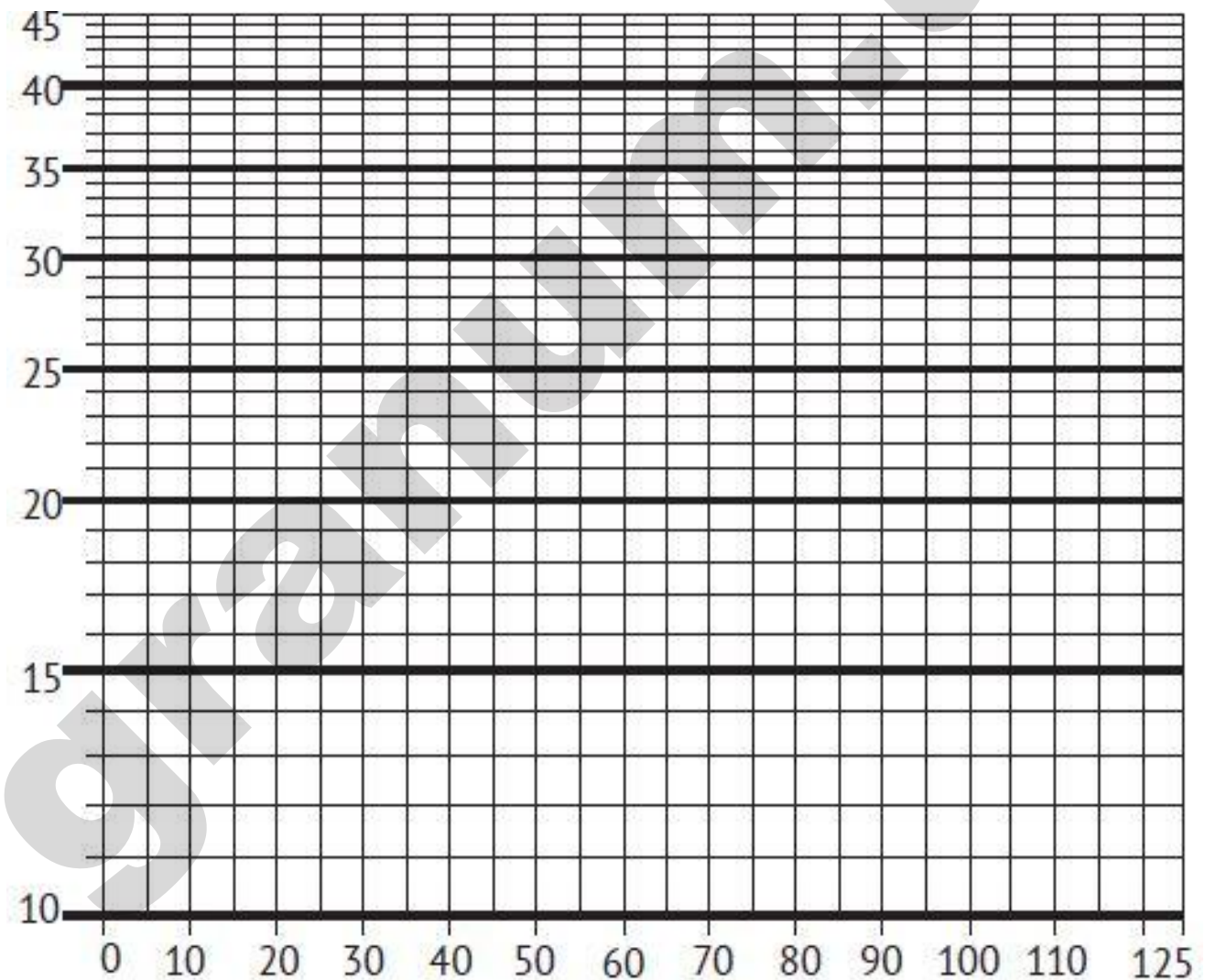
Символи на продукції

 Виробник **Виготовлено:** Дата виробництва **Придатно до:** Термін придатності **Серія:** Номер серії  Виріб медичний для діагностики in vitro  Консультуйтеся з інструкцією із використання

 Берегти від сонячного світла  Знак відповідності Технічним регламентам  Температурне обмеження  Засторога. Зверніться до інструкції з використання для отримання інформації щодо застережень, попереджень, запобіжних заходів

Калібрувальна сітка для визначення активності АТ ІІІ (в%)

Час згортання, s (с)



Активність тромбіну