



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения активности низкомолекулярного гепарина (Ренапарин-тест).

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения активности низкомолекулярного гепарина (далее Набор) предназначен для количественного определения анти Ха и анти Па активности в препаратах и субстанциях низкомолекулярного гепарина (НМГ) методом с хромогенными субстратами.

Тесты ингибирования активности факторов Ха и Па являются наиболее чувствительными и информативными для определения активности НМГ.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения активности НМГ основан на способности комплекса антитромбин III-гепарин (АТIII-НМГ) нейтрализовать активированные факторы Ха и Па.

Активность НМГ в препаратах и субстанциях определяют, добавляя к ним избыток антитромбина III и фактора Ха или Па. При этом происходит ингибирование факторов Ха или Па комплексом АТIII-НМГ пропорционально количеству НМГ в препарате или субстанции. Оставшееся количество фактора Ха или Па катализирует отщепление паранитроанилина (pNA) от синтетических хромогенных субстратов. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна анти Ха или анти Па активностям НМГ.

Процесс идет по следующим схемам:

1. При определении анти Ха активности НМГ
АТIII (избыток) + НМГ \Rightarrow АТIII-НМГ.
АТIII-НМГ + Ха (избыток) \Rightarrow АТIII-НМГ-Ха+Ха (остаток).
Ха (остаток) + ХаСубстрат-pNA \Rightarrow Пептид + pNA.

2. При определении анти Па активности НМГ
АТIII (избыток) + НМГ \Rightarrow АТIII-НМГ.
АТIII-НМГ + Па (избыток) \Rightarrow АТIII-НМГ-Па+Па (остаток).
Па (остаток) + ПаСубстрат-pNA \Rightarrow Пептид + pNA.

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты:

1. Антитромбин III (1 МЕ/фл), лиофильно высушенный для антиПа – 1 флакон.
2. Антитромбин III (1 МЕ/фл), лиофильно высушенный для антиХа – 2 флакона.
3. Фактор Ха (34 нкат/фл), лиофильно высушенный – 1 флакон.
4. Тромбин (фактор Па) (20 МЕ/фл), лиофильно высушенный – 1 флакон.
5. Хромогенный субстрат для фактора Ха, лиофильно высушенный – 2 флакона.
6. Хромогенный субстрат для тромбина, лиофильно высушенный – 2 флакона.
7. Рабочий Стандартный Образец НМГ – 1 флакон
8. Буферный раствор концентрированный (5 мл) – 1 флакон
9. Бычий сывороточный альбумин (1 г) – 1 флакон.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диапазон определяемых значений анти Ха активности НМГ составляет 0,04 - 0,2 МЕ/мл.

Диапазон определяемых значений анти Па активности НМГ составляет 0,006 - 0,05 МЕ/мл.

Коэффициент вариации результатов определения анти Ха и анти Па активности НМГ - не более 10%.

Чувствительность метода определения анти Ха активности - 0,01 антиХа ед/мл.

Чувствительность метода определения анти Па активности - 0,005 антиПа ед/мл.

Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии - не более 10%.

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. антитромбин III, фактор Ха и тромбин получены из плазмы крови человека, которую следует рассматривать как потенциально инфицированную, способную 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

- сканирующий спектрофотометр для прочтения 96 луночных планшетов типа Multiscan EX или равноценный;
- термощейкер для 96 луночных планшетов;
- рН-метр милливольтметр типа рН 340 или равноценный;
- весы аналитические;
- мешалка лабораторная типа Вортекс;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 50мкл; от 20 до 200мкл; от 200 до 1000мкл типа Ленпипет или равноценные;
- пипетки полуавтоматические многоканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 50мкл и от 20 до 200мкл типа Ленпипет или равноценные;
- мерная колба объемом 10мл класс точности 1-100-2 (ГОСТ 1770-74 Е);
- мерная колба объемом 25мл класс точности 1-100-2 (ГОСТ 1770-74 Е);
- мерная колба объемом 100мл класс точности 1-100-2 (ГОСТ 1770-74 Е);
- мерная колба объемом 250мл класс точности 1-100-2 (ГОСТ 1770-74 Е);
- пластиковые пробирки с крышками типа эппендорф объемом 1,5мл;
- пластиковые пробирки с крышками объемом 10мл;
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- кислота уксусная ледяная – хч;
- перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88);

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используют готовую лекарственную форму препарата НМГ или субстанцию НМГ, разведенную буфером для разведения образцов до активности приблизительно 0.1антиХа ед/мл и 0,05антиПа ед/мл.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагентов

Рабочий буферный раствор.

Буферный раствор концентрированный (5 мл) перенести в мерный стакан вместимостью 100 мл и долить дистиллированной водой до 80 мл, затем при перемешивании количественно перенести из флакона бычий сывороточный альбумин и тщательно перемешать до растворения. Довести объем до 100 мл дистиллированной водой и перемешать. рН рабочего буферного раствора 7,40±0,05. Рабочий буферный раствор хранить при температуре +2-8°С не более 7 дней.

70% раствор кислоты уксусной.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 70 мл кислоты уксусной ледяной (хч), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

Раствор антитромбина III для определения антиХа активности.

Во флакон с лиофильно высушенным АТ III внести 1,0 мл рабочего буферного раствора и растворить содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

Раствор антитромбина III для определения антиПа активности.

Во флакон с лиофильно высушенным АТ III внести 2,0 мл рабочего буферного раствора и растворить содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

Раствор тромбина.

Во флакон с лиофильно высушенным тромбином внести 9,0 мл рабочего буферного раствора, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха.

Во флакон с хромогенным субстратом для фактора Ха внести 6,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

Раствор хромогенного субстрата для тромбина.

Во флакон с хромогенным субстратом для тромбина внести 6,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

Раствор Рабочего Стандартного Образца НМГ.

Во флакон с Рабочим Стандартным Образцом низкомолекулярного гепарина внести 1 мл дистиллированной воды и растворить при осторожном покачивании. В результате получают раствор с антиХа и антиПа активностями, указанными в паспорте на набор. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

7.2. Стабильность реагентов

| Реагенты | 2-8°С | 18-22°С | -40°С |
|---------------------------------|----------|----------|-----------|
| Раствор антитромбина III | 3 суток | 1 сутки | 6 месяцев |
| Раствор фактора Ха | 3 суток | 1 сутки | 6 месяцев |
| Раствор тромбина | 3 суток | 1 сутки | 6 месяцев |
| Растворы хромогенных субстратов | 10 суток | 2 суток | 6 месяцев |
| Рабочий буферный раствор | 7 суток | 8 часов | - |
| 70% раствор кислоты уксусной | - | 3 месяца | - |

7.3. Приготовление серии разведений Рабочего Стандартного Образца низкомолекулярного гепарина.

В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл рабочего буферного раствора, 200 мкл раствора Рабочего Стандартного Образца низкомолекулярного гепарина, перемешивают и доводят рабочим буферным раствором до метки (раствор препарата сравнения S₁).

1 мл раствора S₁ помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S₂).

1 мл раствора S₂ помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S₃).

1 мл раствора S₃ помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S₄).

1 мл раствора S₄ помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S₅).

1 мл раствора S₅ помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S₆).

АнтиХа и антиПа активности в растворах препаратов сравнения S₁ – S₆ указаны в паспорте на набор.

Растворы S₁ – S₆ используют сразу после приготовления.

7.4. Приготовление серии разведений испытуемого препарата низкомолекулярного гепарина.

В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл дистиллированной воды, 100 мкл исследуемого препарата, перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки (раствора 1).

В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл дистиллированной воды, 100 мкл раствора 1, перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки (раствор 2).

200 мкл раствора 2 поместить в микропробирку, вместимостью 3 мл. Добавить 1,8 мл буферного раствора и перемешать (раствор испытуемой субстанции T₁, рассчитанная активность около 0,1 МЕ/мл);

1 мл раствора T₁ помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор T₂);

1 мл раствора T₂ помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора с и перемешивают (раствор T₃);

1 мл раствора T₃ помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор T₄).

Растворы T₁ – T₄ используют сразу после приготовления.

7.5. Ход анализа при определении антиХа активности НМГ.

Определения проводят в полистирольных планшетах, помещая их в термощейкере при 37°C.

- С помощью многоканальной пипетки, вносят по 20 мкл раствора антитромбина III для определения антиХа активности последовательно во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета.
- С помощью одноканальной пипетки буферный раствор для определения холостой амидолитической активности (В), соответствующие разведения стандартного образца низкомолекулярного гепарина ($S_1 - S_5$) и образца испытуемого препарата ($T_1 - T_4$) вносят в объеме 20 мкл согласно схеме распределения, представленной в нижеследующей таблице.

| Ряд | Номер лунки в ряду | | | | | | | | | | | | |
|-----|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|---|---|----|----|----|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| A | | B | S_2 | S_4 | T_1 | T_3 | | | | | | | |
| B | | B | S_2 | S_4 | T_1 | T_3 | | | | | | | |
| C | | B | S_2 | S_4 | T_1 | T_3 | | | | | | | |
| D | | B | S_2 | S_4 | T_1 | T_3 | | | | | | | |
| E | | S_1 | S_3 | S_5 | T_2 | T_4 | | | | | | | |
| F | | S_1 | S_3 | S_5 | T_2 | T_4 | | | | | | | |
| G | | S_1 | S_3 | S_5 | T_2 | T_4 | | | | | | | |
| H | | S_1 | S_3 | S_5 | T_2 | T_4 | | | | | | | |

- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по 40 мкл раствора фактора Ха и выдерживают в термощейкере при $37 \pm 0,5$ °C по секундомеру 2 мин.
- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по 100 мкл раствора хромогенного субстрата для фактора Ха и инкубируют ровно 4 мин при $37 \pm 0,5$ °C.
- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по по 40 мкл 70% раствора кислоты уксусной для остановки реакции. Порядок внесения реактивов представлен в Таблице 2.

Таблица 2.

| | |
|--|---------|
| Раствор антитромбина III для определения антиХа активности | 20 мкл |
| Образец препарата или стандарта | 20 мкл |
| Раствор фактора Ха | 40 мкл |
| Инкубация при 37°C и перемешивании 2 минуты | |
| Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха | 100 мкл |
| Инкубация при 37°C и перемешивании 4 минуты | |
| Кислота уксусная | 40 мкл |

7.6. Ход анализа при определении антиПа активности НМГ.

Определения проводят в полистирольных планшетах, помещая их в термощейкере при 37 °C.

- С помощью многоканальной пипетки, вносят по 20 мкл раствора антитромбина III для определения антиПа активности последовательно во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета.
- С помощью одноканальной пипетки буферный раствор для определения холостой амидолитической активности (В), соответствующие разведения стандартного образца низкомолекулярного гепарина ($S_2 - S_6$) и образца испытуемого препарата ($T_1 - T_4$) вносят в объеме 20 мкл согласно схеме распределения, представленной в нижеследующей таблице.

| Ряд | Номер лунки в ряду | | | | | | | | | | | | |
|-----|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|---|---|----|----|----|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| A | | B | S_3 | S_5 | T_1 | T_3 | | | | | | | |
| B | | B | S_3 | S_5 | T_1 | T_3 | | | | | | | |
| C | | B | S_3 | S_5 | T_1 | T_3 | | | | | | | |
| D | | B | S_3 | S_5 | T_1 | T_3 | | | | | | | |
| E | | S_2 | S_4 | S_6 | T_2 | T_4 | | | | | | | |
| F | | S_2 | S_4 | S_6 | T_2 | T_4 | | | | | | | |
| G | | S_2 | S_4 | S_6 | T_2 | T_4 | | | | | | | |
| H | | S_2 | S_4 | S_6 | T_2 | T_4 | | | | | | | |

- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по 40 мкл раствора тромбина и выдерживают в термощейкере при $37 \pm 0,5$ °C по секундомеру 2 мин.
- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по 100 мкл раствора хромогенного субстрата для тромбина и инкубируют ровно 4 мин при $37 \pm 0,5$ °C.
- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по по 40 мкл 70% раствора кислоты уксусной для остановки реакции. Порядок внесения реактивов представлен в Таблице 3.

Таблица 3.

| | |
|--|---------|
| Раствор антитромбина III для определения антиПа активности | 20 мкл |
| Образец препарата или стандарта | 20 мкл |
| Раствор фактора Па | 40 мкл |
| Инкубация при 37°C и перемешивании 2 минуты | |
| Раствор хромогенного субстрата для фактора Па | 100 мкл |
| Инкубация при 37°C и перемешивании 4 минуты | |
| Кислота уксусная | 40 мкл |

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измеряют оптическую плотность растворов при 405 нм с помощью Мультискана EX или аналогичного оборудования.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 При определении антиХа активности НМГ

Определяют среднее значение оптических плотностей (ОП) для параллельных проб разведений стандартного образца низкомолекулярного гепарина. В программе Microsoft Excel строят график, на котором по оси абсцисс (линейной) откладывают величины, соответствующие оптическим плотностям (ОП), а по оси ординат (логарифмической) – анти Ха активность стандартного образца низкомолекулярного гепарина. Проводят линию тренда в диапазоне активности 0,04 - 0,2 антиХа ед/мл. Коэффициент корреляции линии тренда не должен быть ниже 0,98.

Используя уравнение линии тренда по средним значениям оптических плотностей рассчитывают анти Ха активность испытуемого препарата с учетом разведений. Результаты расчета активности для каждого разведения испытуемого образца не должны различаться

между собой более чем на 10%. В этом случае за активность испытуемого препарата принимается среднее значение активностей, полученных для каждого разведения. В том случае, если для какого-либо разведения полученное значение активности отличается от остальных более чем на 10% его необходимо исключить из расчета среднего значения активности.

9.2 При определении антиПа активности НМГ

Определяют среднее значение оптических плотностей (ОП) для параллельных проб разведений стандартного образца низкомолекулярного гепарина. В программе Microsoft Excel строят график, на котором по оси абсцисс (линейной) откладывают величины, соответствующие оптическим плотностям (ОП), а по оси ординат (логарифмической) – анти Па активность стандартного образца низкомолекулярного гепарина. Проводят линию тренда в диапазоне активности 0,006 – 0,05 антиПа ед/мл. Коэффициент корреляции линии тренда не должен быть ниже 0,98.

Используя уравнение линии тренда по средним значениям оптических плотностей рассчитывают анти Па активность испытуемого препарата с учетом разведений. Результаты расчета активности для каждого разведения испытуемого образца не должны различаться между собой более чем на 10%. В этом случае за активность испытуемого препарата принимается среднее значение активностей, полученных для каждого разведения. В том случае, если для какого-либо разведения полученное значение активности отличается от остальных более чем на 10% его необходимо исключить из расчета среднего значения активности.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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.

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: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2. тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.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.

Образец паспорта
набора реагентов для определения активности
низкомолекулярного гепарина
Ренапарин-тест

| № 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 тромбина | | Пористая масса, белого цвета | Соответствует |
| 4 | Внешний вид хромогенного субстрата фактора Ха | | Пористая масса белого цвета | Соответствует |
| 5 | Внешний вид хромогенного субстрата тромбина | | Пористая масса белого цвета | Соответствует |
| 6 | Внешний вид рабочего стандартного образца НМГ | | Пористая масса белого цвета | Соответствует |
| 7 | Внешний вид буфера концентрированного | | Прозрачная бесцветная жидкость | Соответствует |
| 8 | Внешний вид бычьего сывороточного альбумина | | Пористая масса, серого цвета | Соответствует |
| 9 | Растворимость антитромбина III и фактора Ха, мин. не более | | 3 | Соответствует |
| 10 | Растворимость хромогенных субстратов, мин. не более | | 3 | Соответствует |
| 11 | Растворимость Рабочего Стандартного Образца НМГ, мин. не более | | 3 | Соответствует |
| 13 | Активность НМГ в Рабочем Стандартном Образце | анти Ха, ед/мл | 9 - 11 | 10.1 |
| | | анти Па, ед/мл | 2,5 – 3,5 | 3.1 |
| 14 | Чувствительность, не более | анти Ха, ед/мл | 0.01 | Соответствует |
| | | анти Па, ед/мл | 0,01 | Соответствует |
| 15 | Линейность в диапазоне активности 0,2 – 0,04 антиХа ед/мл, отклонение в % не более | | 10 | Соответствует |
| 16 | Линейность в диапазоне активности 0.05 - 0.015 антиПа ед/мл, отклонение в % не более | | 10 | Соответствует |
| 17 | Коэффициент вариации результатов определения, % не более | | 10 | Соответствует |

Активность НМГ в растворах препаратов сравнения

| № п/п | Разведения Рабочего Стандартного Образца | Анти Ха активность МЕ/мл | Анти Па активность МЕ/мл |
|-------|--|--------------------------|--------------------------|
| 1 | S ₁ | 0.202 | 0.06 |
| 2 | S ₂ | 0.1347 | 0.04 |
| 3 | S ₃ | 0.0898 | 0.0267 |
| 4 | S ₄ | 0.0599 | 0.0178 |
| 5 | S ₅ | 0.0399 | 0.0119 |
| 6 | S ₆ | 0.0266 | 0.0079 |