

«УТВЕРЖДАЮ»
Президент МБООИ
«Общество больных гемофилией»



Ю.А. Жулёв
_____ 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению медицинского изделия для диагностики in vitro
«Плазма субстратная, дефицитная по фактору VIII (Плазма субстратная VIII) по ТУ 9398-060-05595541-2016»

НАЗНАЧЕНИЕ

Медицинское изделие для диагностики in vitro «Плазма субстратная, дефицитная по фактору VIII (Плазма субстратная VIII) по ТУ 9398-060-05595541-2016» (далее по тексту – «Плазма субстратная VIII») предназначено для определения активности фактора VIII (ф. VIII) свертывания крови в плазме крови пациентов, в свежемороженой донорской плазме (СЗП) и криопреципитате одностадийным клоттинговым методом с целью диагностики гемофилии А и тромбофилии и определения качества СЗП и криопреципитата.

Реагент предназначен для работы ручным методом, а также на всех типах автоматических и полуавтоматических коагулометров.

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАГЕНТА

Состав

«Плазма субстратная VIII» приготовлена из свежемороженой донорской плазмы с искусственно сниженной активностью ф. VIII, с добавлением стабилизатора и консерванта азида натрия в концентрации 0,05 г/л. Выпускается в трех вариантах исполнения:

Вариант исполнения 1: Плазма субстратная VIII - 1 флакон.

Состав набора: Плазма субстратная VIII, лиофильно высушенная субстанция, полученная из 1,0 мл плазмы, во флаконе вместимостью 8 мл - 1 флакон в кювете из ленты полистирольной на три ячейки для флаконов, в картонной коробке 63x88x25 мм.

Вариант исполнения 2: Плазма субстратная VIII - 3 флакона.

Состав набора: Плазма субстратная VIII, лиофильно высушенная субстанция, полученная из 1,0 мл плазмы, во флаконе вместимостью 8 мл - 3 флакона в кювете из ленты полистирольной на три ячейки для флаконов, в картонной коробке 63x88x25 мм.

Вариант исполнения 3: Плазма субстратная VIII - 6 флаконов.

Состав набора: Плазма субстратная VIII, лиофильно высушенная субстанция, полученная из 1,0 мл плазмы, во флаконе вместимостью 8 мл - по 3 флакона в кювете из ленты полистирольной на три ячейки для флаконов, в картонной коробке 63x88x50 мм.

Номер по каталогу производителя для варианта исполнения 1: КМ-6/2.

Номер по каталогу производителя для варианта исполнения 2: КМ-6.

Номер по каталогу производителя для варианта исполнения 3: КМ-6/1.

Число анализируемых проб биологического материала

Один флакон предназначен для проведения 20 анализов при расходе 50 мкл раствора реагента на один анализ.

Принцип метода

При добавлении к разведенной исследуемой плазме пациента (или к разведенному образцу криопреципитата или СЗП) субстратной дефицитной по ф. VIII плазмы, содержащей все факторы свертывания, кроме ф. VIII, происходит коррекция активности всех разведенных факторов свертывания, кроме ф. VIII. Поэтому время свертывания в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) смеси разведенного исследуемого образца и субстратной дефицитной по ф. VIII плазмы зависит только от активности ф. VIII в исследуемом образце. Активность ф. VIII определяют по калибровочному графику разведений плазмы-калибратора с аттестованной активностью ф. VIII.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определения активности ф. VIII: билирубин в концентрации до 30 мг/л, свободный гемоглобин – до 100 мг/л, триглицериды – до 6,0 г/л. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно заниженных результатов.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения активности ф. VIII не превышает 10%. Межфлаконная вариация определения активности ф. VIII не превышает 10%.

Точность

Допустимое отклонение от аттестованного значения при определении активности ф. VIII в контрольной плазме не превышает 10%.

Линейность

В тесте на «линейность» в диапазоне от 100 до 1% отклонение не более 10%.

Продолжительность активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ)

Продолжительность АЧТВ в реагенте должна составлять от 80 до 120 секунд.

Чувствительность

Чувствительность определения активности ф. VIII не более 2%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Реагент предназначен для диагностики *in vitro*.

Медицинское изделие (МИ) «Плазма субстратная VIII» относится к классу потенциального риска применения 2а, так как это МИ с измерительной функцией, с нефиксированным перечнем выполняемых лабораторных исследований, при применении которого терапевтическое решение должно приниматься после проведения дальнейших исследований, это МИ с умеренным индивидуальным риском и низким риском для общественного здоровья (Приложение 2 к Приказу МЗ № 4н от 6 июня 2012 г.).



В состав реагента входит азид натрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводной системы с образованием потенциально взрывоопасных азидов металлов. В маркировку МИ внесен специальный знак предупреждения.

При работе с реагентом следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиН 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010); Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика ВИЧ-инфекции» (СП 3.1.5. 2826 от 11.01.2011).



При работе с исследуемыми образцами крови пациентов следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, т.к. 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.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная;
- секундомер (для ручного метода);
- термобаня, поддерживающая температуру плюс 37°C (для ручного метода);
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М) (Цитрат натрия) или
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);

- мерный цилиндр;
- набор для определения АЧТВ («Набор реагентов для определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ-тест)» или «Набор реагентов для выполнения коагуляционных тестов (Коагуло-тест)»);
- «Буфер имидазоловый концентрированный (Буфер имидазоловый)»;
- вода дистиллированная;
- «Плазма с аттестованным значением параметров свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем (МУЛЬТИКАЛИБРАТОР)»;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага масштабнo-координатная полулогарифмическая.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Реагент «Плазма субстратная VIII» предназначен для определения активности ф. VIII в венозной плазме крови человека, в СЗП и в лечебных препаратах криопреципитата.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

Образцы СЗП и криопреципитата должны иметь вид прозрачной жидкости желтоватого цвета.

Процедура получения биологического материала

Получение плазмы венозной крови

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 плюс (18-25)°С в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).

Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу по методу, описанному ниже, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками, замораживают и хранят при температуре не выше минус 20°С. При таких условиях образцы пригодны для анализа в течение 2 месяцев.

Подготовка СЗП для анализа

Образец СЗП разморозить, поместив мешок в водяную баню при температуре не выше плюс 37°С. Через 5-7 минут СЗП должна полностью растаять и приобрести вид прозрачного раствора желтоватого цвета. Для проведения анализа требуется 0,5 мл СЗП. Использовать СЗП для анализов не позднее 1 ч после оттаивания.

Подготовка криопреципитата для анализа

Замороженный криопреципитат привести в жидкое состояние, поместив мешок с криопреципитатом в водяную баню при температуре не выше плюс 37°C. Через 5-7 мин криопреципитат должен полностью растаять и приобрести вид прозрачного раствора желтоватого цвета. Для проведения анализа требуется 0,5 мл криопреципитата. Определить активность ф. VIII по методу, описанному ниже.

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре плюс (2-8)°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус (18-20)°C и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

Растворы СЗП и криопреципитата хранению не подлежат.

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, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление «Плазмы субстратной VIII»

Во флакон с «Плазмой субстратной VIII» внести 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Использовать через 20 мин после растворения.

Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре плюс (18-25°C) составляет не более трёх минут.

Все остальные выше перечисленные реагенты подготовить в соответствии с инструкциями.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения активности ф. VIII одностадийным клоттинговым методом;
- поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра;
- запустить программу построения калибровочной прямой (для каждой новой серии реагента);
- поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра;
- запустить программу измерения;

• считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом

Построение калибровочного графика

Использовать только пластиковые пробирки.

Приготовить следующие разведения «Мультикалибратора»:

Пробирка, №	1	2	3	4	5	6
Активность ф. VIII в «Мультикалибраторе», %	A*	0,5 A	0,25 A	0,125 A	0,0625 A	0,01 A
Рабочий буферный раствор, мл	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Раствор «Мультикалибратора», мл	0,2	-	-	-	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл	 0,5	 0,5	 0,5	 0,5	 0,5	 0,1

* A – активность ф. VIII в «Мультикалибраторе».

Во всех разведениях «Мультикалибратора» провести определение времени свертывания, сек, по методу, описанному ниже, и внести в память полуавтоматического коагулометра для построения калибровочного графика.

Для ручного метода на масштабнo-координационной полулогарифмической бумаге построить калибровочный график зависимости времени свертывания, сек, (ось Y) от активности ф. VIII, %, (ось X) в «Мультикалибраторе». График должен представлять собой прямую линию.

Калибровочный график также можно построить, используя программу Microsoft Excel.

Подготовка исследуемых образцов для анализа

Приготовление плазмы пациента

Учитывая, что содержание ф. VIII в исследуемой плазме пациента может быть, как низким (гемофилия), так и повышенным (тромбофилия), исследуемый образец плазмы пациента рекомендуется сначала развести рабочим буферным раствором в 5 раз и определить по калибровочному графику активность ф. VIII по методу, описанному ниже. Если активность ф. VIII более высокая и не удастся по графику определить активность, исследуемый образец следует развести в 10 или в 20 раз рабочим буферным раствором по схеме:

Ожидаемая активность ф. VIII, %	Разве- дение в раз	Объем плазмы, мл	Объем буфера, мл	Коэффициент разведения К
Больше 150	20	0,1	1,9	4
От 50 до 150	10	0,1	0,9	2
Меньше 50	5	0,1	0,4	1

Приготовление образца СЗП

После размораживания СЗП развести буферным раствором в 5 и 10 раз. Определить активность ф. VIII одностадийным клоттинговым методом, описанным ниже. Полученное значение следует умножить на коэффициент разведения К, соответствующий разведению исследуемого образца. Коэффициент разведения К для разведения в 5 раз – 1, в 10 раз – 2.

Приготовление образца криопреципитата

Учитывая, что криопреципитат является концентратом ф. VIII и его активность может варьировать у разных производителей, рекомендуется провести ориентировочное разведение криопреципитата в 20 и 40 раз и провести определение по калибровочному графику так, как описано ниже.

Если же активность ф. VIII в криопреципитате более высокая и полученное значение не попадает на калибровочный график, то криопреципитат следует развести в 40 и 80 раз и повторить исследование.

Полученное значение следует умножить на коэффициент разведения К, соответствующий разведению исследуемого образца. Коэффициент разведения К для разведения в 20 раз – 4; в 40 раз – 8; в 80 раз – 16.

Проведение анализа

Внести в кювету анализатора или пробирку:	Объем
Одно из разведений «Мультикалибратора» (исследуемого образца)	50 мкл
Раствор «Плазмы субстратной VIII»	50 мкл
АЧТВ-реагент из набора «АЧТВ-тест» (или кефалин- каолиновая смесь из набора «Коагуло-тест»)	50 мкл
Инкубировать при температуре плюс 37°C точно 3 мин	
Кальция хлорида 0,025 М раствор из набора «АЧТВ-тест» или «Коагуло-тест»	50 мкл

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрируют время от момента добавления кальция хлорида до момента образования сгустка.

Для полуавтоматических или автоматических коагулологических анализаторов следует воспользоваться программой Фактор VIII-тест соответствующего анализатора.

Для ручного метода, используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца, определить активность ф. VIII. Полученное значение следует умножить на коэффициент разведения К, соответствующий разведению исследуемого образца.

Интерпретация результатов

За единицу активности принимается активность ф. VIII, содержащаяся в пуле донорской плазмы, взятой не менее чем от 300 здоровых доноров мужчин. Активность ф. VIII выражается в международных единицах (МЕ) или в процентах, причем 1 МЕ/мл соответствует 100% активности.

Уровень активности ф. VIII в плазме в норме и патологии представлен в таблице.

Активность ф. VIII, %	Заболевание
Больше 150	Почечная недостаточность Диабет Тромбофилическое состояние Прием гормональных контрацептивов
От 50 до 150	Норма
От 25 до 49	Гемофилия А, скрытая форма
От 5 до 24	Гемофилия А, легкая форма
От 1 до 5	Гемофилия А средней тяжести
Меньше 1	Гемофилия А, тяжелая форма

Активность ф. VIII в СЗП не должна быть ниже 0,7 МЕ/мл, в криопреципитате не должна быть ниже 70 МЕ/дозе.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности ф. VIII следует контролировать с помощью «Плазмы контрольной» (код КМ-2).

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие реагента «Плазма субстратная VIII» требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности реагента – 24 месяца. Не использовать реагент после истечения срока годности!

Реагент стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде при температуре плюс (2-8)°С.

Растворенный реагент следует хранить в плотно укупоренном состоянии при температуре плюс (2-8)°С не более 8 ч и при температуре плюс (18-25)°С не более 4 ч. Растворенный реагент может быть однократно заморожен при температуре минус (18-20)°С и храниться при этой температуре не более 2 месяцев.

Оттаивать реагент следует при температуре плюс 37°C. Оттаявший реагент следует использовать в течение 2 ч.

Транспортирование реагента должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре плюс (2-8)°C.

Допускается транспортирование и хранение реагента при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание реагента допускается.

МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с реагентом «Плазма субстратная VIII» с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу Б.

Отходы 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. Обеззараживание и утилизация поступивших реагентов происходит на специально оборудованных площадках в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 наборы реагентов «Плазма субстратная VIII», не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Г. Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости («Отходы. Класс Г»). Диагностические средства собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного) в соответствии с требованиями нормативных документов в зависимости от класса опасности отходов. Вывоз отходов класса Г для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Г осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125167, г. Москва, Нарышкинская аллея, д. 5, стр. 2. тел/факс (499) 707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru.

Директор НПО «РЕНАМ»

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

Руководитель группы по гемостазу

НКО ХТ с ДС ФГБУ ГНЦ МЗ РФ, д. м. н.

А.Л. Берковский

С.А. Васильев

Пронумеровано
и прошнуровано 9 листов
Президент МБОУ «Общество
больных гемофилией»
Ю.А.Жулёв

