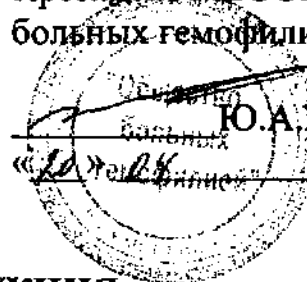


УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от « » 2009 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»
Президент МБООИ «Общество
больных гемофилией»


Ю.А. Жулев
2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для определения активности
VIII фактора свертывания крови
(Фактор VIII-тест)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Фактор VIII-тест предназначен для исследования активности ф. VIII в плазме крови человека, в антигемофильных лекарственных средствах и для выявления ингибиторов.

Набор предназначен для проведения 20 определений при расходе по 0,05 мл каждого реагента на 1 анализ.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Измерение активности ф. VIII проводят в разведенном исследуемом образце. Для нивелирования возможного влияния на результаты исследования вариабельности факторов свертывания в инкубационную среду вносят субстратную плазму, в которой практически отсутствует (менее 2%) активность ф. VIII, но сохранена активность всех других факторов свертывания. В такой системе продолжительность процесса свертывания зависит только от активности ф. VIII в исследуемом образце, которую определяют по калибровочному графику. Калибровочный график зависимости времени свертывания от активности ф. VIII строят по разведенным растворам плазмы-калибратора с аттестованной по Международному стандарту активностью ф. VIII.

2.2. Состав набора

- лиофильно высушенный эририд (аналог кефалина) - 1 флакон;
- суспензия каолина - 1 флакон (5,0 мл);
- 0,025 М раствор кальция хлористого - 1 флакон (5,0 мл);
- субстратная плазма, лиофильно высушенная - 1 флакон;
- плазма-калибратор, лиофильно высушенная - 1 флакон;
- концентрат имидазолового буфера - 1 флакон (5,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Ф. VIII в качестве кофактора участвует в процессе свертывания плазмы крови человека, и при его недостаточности развивается тяжелое наследственное заболевание – гемофилия А. Гемофилия А проявляется отсутствием или сниженным уровнем активности плазменного ф. VIII. Заболевание характеризуется спон-



танными, нередко смертельными кровотечениями, кровоизлияниями в суставы, ведущими к ранней инвалидности. Уже при снижении дефицитного фактора до 30% (норма – 50-200%) заболевание проявляется в скрытой форме и обнаруживается после оперативных вмешательств в виде профузных кровотечений. При тяжелой форме гемофилии происходят множественные поражения суставов и ранняя, до 12 лет, инвалидность, уже небольшая травма может привести к кровотечению и гибели больного.

Лечение больных гемофилией А проводится препаратом плазмы криопреципитатом и свежезамороженной плазмой (СЗП), в которых активность ф. VIII должна быть не ниже 70 МЕ в дозе и 0,7 МЕ/мл, соответственно.

Трудности терапии больных гемофилией связаны с возникновением у этих пациентов ингибиторов к ф. VIII. Определение ингибиторов проводят, инкубируя исследуемые образцы с плазмой с известным содержанием ф. VIII. Ф. VIII нейтрализуется ингибиторами, и по остаточной активности ф. VIII определяют количественно содержание ингибиторов.

Описаны формы тромбофилии, связанные с повышенным содержанием ф. VIII.

Набор реагентов Фактор ф. VIII-тест предназначен для диагностики гемофилии А и тромбофилии, наблюдения за результатами лечения, для контрольного тестирования антигемофильных лекарственных средств и для обнаружения в плазме крови больных гемофилией А ингибиторов к ф. VIII/

Активность ф. VIII в плазме-калибраторе - 80-110 % или 0,8-1,1 МЕ/мл.

Допустимое отклонение активности ф. VIII в плазме-калибраторе от аттестованного значения - не более 10%. Коэффициент вариации результатов определения - не более 10%.

Допустимый разброс результатов при определении активности ф. VIII в одной пробе разными наборами одной серии - не более 10%.

Чувствительность определения - 1,5 %.

Линейность определяемых значений активности ф. VIII в плазме крови человека в диапазоне разведений плазмы-калибратора - от 2 до 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Меры предосторожности – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемио-логических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа;
- центрифуга лабораторная медицинская, позволяющая провести центрифугирование со скоростью 2000 g (3000 об/мин);
- термобаня, поддерживающая температуру $37,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- пробирки центрифужные вместимостью 10 мл пластиковые или стеклянные, силиконизированные;
- полуавтоматические одноканальные пипетки переменного объема с объемом 40-200 мкл и дискретностью 1,0 мкл;
- полуавтоматические одноканальные пипетки переменного объема с объемом 200-1000 мкл и дискретностью 5,0 мкл;
- вода дистиллированная.
- натрия цитрат 3-замещенный 0,11 М раствор;
- мерная колба вместимостью 100 мл;
- мерная колба вместимостью 50 мл;
- бумага масштабнo-координатная полулогарифмическая;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Плазма пациента для исследования гемофилии А и тромбофилии

6.1.1. Смешать в пластиковой (или стеклянной силиконизированной) центрифужной пробирке 9 частей свежесобранной венозной крови пациента с 1 частью 0,11 М раствора цитрата натрия.

6.1.2. Центрифугировать в течение 15 мин при 3000 об/мин (2000 g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови.

6.1.3. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 1,0 мл плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 4 ч, при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ - не более 8 ч. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре -20°C и хранение в замороженном состоянии в течение 2 мес.

6.1.4. 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 (п. 7.4). 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 1:

Активность ф. VIII, %	Разведение в раз	Объем образца мл	Объем буфера мл	Коэффициент пересчета К
Меньше 50	5	0,1	0,4	1
От 50 до 150	10	0,1	0,9	2
Больше 150	20	0,1	1,9	4

6.2. Свежезамороженная плазма (СЗП)

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

6.2.2. После размораживания СЗП развести буферным раствором в 5 и 10 раз.

6.2.3. Определить активность ф. VIII по методу, описанному ниже (п. 7.4). Полученное значение следует умножить на коэффициент К, соответствующий разведению исследуемого образца. К для разведения в 5 раз – 1, в 10 раз – 2.

6.3. Криопреципитат

6.3.1. Замороженный криопреципитат привести в жидкое состояние, поместив мешок с криопреципитатом в водяную баню при температуре не выше 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.

6.3.2. Определить активность ф. VIII по методу, описанному ниже (п. 7.4).

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 (п. 7.4).

6.3.3. 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 К, соответствующий разведению исследуемого образца. К для разведения в 20 раз – 4; в 40 раз – 8; в 80 раз – 16.

6.4. Плазма пациента для исследования ингибиторов

6.4.1. Учитывая, что содержание ингибиторов к ф. VIII в исследуемой плазме пациента может быть различным, плазму для анализа развести рабочим буферным раствором по схеме 2:

Внести в кювету	Без разведения	Разведение плазмы (коэффициент пересчета К)					
		2	4	8	16	32	64
Раствор плазмы, мл	1,0 мл	-	-0	-	-	-	-
Раствор буфера, мл	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Перемешать и перенести в следующую кювету	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

6.4.2. Полученные разведения исследуемой плазмы пациента смешать с равным объемом плазмы-калибратора.

6.4.3. Плазму-калибратор развести в 2 раза рабочим буферным раствором.

6.4.4. Все подготовленные таким образом образцы плазмы пациента, содержащие ингибитор к ф. VIII, и разведенную плазму-калибратор, не содержащую ингибитора, прогреть в течение 2 ч при температуре 37°C с целью инактивации ф. VIII под действием ингибиторов.

6.4.5. Разведенную в 2 раза и прогретую плазму-калибратор использовать для построения калибровочного графика (п. 7.3).

6.4.6. Прогретье образцы разведенной плазмы пациента дополнительно развести в 5 раз буферным раствором (0,1 мл + 0,4 мл) и определить остаточную активность ф. VIII по методу, описанному ниже (п. 7.4).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагентов

7.1.1. Рабочий буферный раствор

Буфер имидазоловый концентрированный (5,0 мл) перелить в мерную колбу вместимостью 100 мл и долить до метки дистиллированной водой (разведение в 20 раз), тщательно перемешать. Рабочий буферный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 мес.

7.1.2. Кефалин-каолиновая смесь

Внести во флакон с эрилидом (кефалином) суспензию каолина. Кефалин-каолиновая смесь готова к проведению анализа через 30 минут после добавления каолина. Перед проведением анализа встряхивать.

7.1.3. Плазма субстратная

Во флакон с субстратной плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Использовать через 20 минут после растворения.

7.1.4. Плазма-калибратор.

Во флакон с плазмой-калибратором внести 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Использовать через 20 минут после растворения.

7.1.5. Кальция хлорида 0,025 М раствор.

Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть температуре 37°C. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

7.2. Стабильность реагентов

Реагенты	2-8°C	18-25°C	минус 18-20°C
Кефалин-каолиновая смесь	14 сут	1 сут	2 мес
Раствор плазмы-калибратора	8 ч	4 ч	2 мес
Раствор плазмы субстратной	8 ч	4 ч	2 мес

7.3. Построение калибровочных графиков

7.3.1. Для исследования в плазме и в антигемофильных лекарственных средствах плазму-калибратор с аттестованным значением активности ф. VIII развести буферным раствором в 5, 10, 20, 40, 80 и 480 раз.

Порядок разведения указан на схеме 3.

Внести в пробирку	Плазма-калибратор разведена буфером					
	в 5 раз	в 10 раз	в 20 раз	в 40 раз	в 80 раз	в 480 раз
Активность фактора VIII в плазме-калибраторе, %	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 плазмы-калибратора, мл	0,2	-	-	-	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	

*A – активность фактора VIII в плазме-калибраторе, указанная в паспорте.

7.3.2. Для исследования ингибиторов плазму-калибратор, разведенную имидазоловым буфером в 2 раза и прогретую 2 ч при температуре 37°C, развести в 5, 10, 20, 40 и 80 раз имидазоловым буфером в соответствии со схемой 3.

7.3.3. Для каждого разведения непрогретой плазмы-калибратора и для каждого разведения прогретой плазмы-калибратора определить время свертывания по методу, описанному ниже (п.7.4).

Каждое определение повторить 2 раза, рассчитать среднюю арифметическую величину (E, сек) по формуле (1):

$$E = \frac{\sum E_i}{n} \quad (1),$$

где: $\sum E_i$ - сумма результатов однократных измерений времени свертывания каждого разведения плазмы-калибратора, сек;
 n - число определений.

7.3.4. На полулогарифмической бумаге отложить:

- по вертикальной линейной оси ординат (Y) – продолжительность времени свертывания каждого разведения плазмы-калибратора (прогретой или непрогретой), сек;
- по горизонтальной логарифмической оси абсцисс (X) - активность ф. VIII, %.

7.3.5. При соединении нанесенных точек образуется 2 прямые линии калибровочных графиков. По одному графику, построенному по разведениям п. 7.3.1, определить активность ф. VIII в плазме пациента, в СЗП и криопреципитате. По второму графику, построенному по разведениям п. 7.3.2, определить остаточную активность ф. VIII плазме пациента после действия ингибиторов.

7.4. Ход исследования

Анализ провести в пластиковых кюветах или в силиконированных пробирках, термостатируемых при температуре 37°C.

Внести в кювету анализатора или пробирку:	Объем
Одно из разведений плазмы-калибратора (или исследуемый образец)	0,05 мл
Раствор плазмы субстратной	0,05 мл
Кефалин-каолиновая смесь	0,05 мл
Инкубировать при температуре 37°C точно 3 мин	
Кальция хлорида 0,025 М раствор	0,05 мл

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Зарегистрировать время свертывания, сек, от момента добавления кальция хлористого до момента образования сгустка фибрина.

8.2. Активность ф. VIII определить по калибровочному графику, %.

8.3. Полученное по калибровочному графику значение умножить на коэффициент К, соответствующий разведению исследуемого образца плазмы пациента, СЗП или криопреципитата.

Если значение активности ф. VIII в двух последовательных разведениях различается не более, чем на 10%, то за истинное значение активности принимают среднюю арифметическую величину между этими двумя измерениями.

Для пересчета в единицы МЕ/мл полученное значение активности ф. VIII, %, разделить на 100.

8.4. Активность ф. VIII во всей дозе криопреципитата рассчитать по формуле (3):

$$A_{\text{крио в дозе}} = A_{\text{крио}} \times V_{\text{дозы}} \quad (2),$$

где: $A_{\text{крио в дозе}}$ - активность ф. VIII во всей дозе криопреципитата, ME;
 $A_{\text{крио}}$ - активность ф. VIII в исходном криопреципитате, ME/мл;
 $V_{\text{дозы}}$ - объем дозы криопреципитата, мл.

8.5. Содержание ингибиторов к ф. VIII.

Остаточную активность ф. VIII в исследуемой плазме пациента определить по калибровочному графику, построенному по разведениям п. 7.3.2, при этом выбрать те разведения исследуемой плазмы, при которых остаточная активность находится в пределах 30-70%.

Содержание ингибиторов в единицах BU (Bethesda unit) определить по таблице 1.

Таблица 1. Пересчет значений остаточной активности ф. VIII в содержание ингибиторов в единицах BU/мл.

Остаточная активность ф. VIII, %	Содержание ингибиторов, BU/мл	Остаточная активность ф. VIII, %	Содержание ингибиторов, BU/мл	Остаточная активность ф. VIII, %	Содержание ингибиторов, BU/мл
25	2,0	42	1,25	59	0,76
26	1,94	43	1,22	60	0,74
27	1,89	44	1,18	61	0,71
28	1,84	45	1,15	62	0,69
29	1,79	46	1,12	63	0,67
30	1,74	47	1,09	64	0,64
31	1,69	48	1,06	65	0,62
32	1,64	49	1,03	66	0,60
33	1,60	50	1,00	67	0,58
34	1,56	51	0,97	68	0,56
35	1,51	52	0,94	69	0,54
36	1,47	53	0,92	70	0,51
37	1,43	54	0,89	71	0,49
38	1,40	55	0,86	72	0,47
39	1,36	56	0,84	73	0,45
40	1,32	57	0,81	74	0,43
41	1,29	58	0,79	75	0,42

Полученное по таблице значение активности ингибиторов следует умножить на коэффициент разведения К (схеме 2).

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Гемофилия тяжелой степени. Уровень ф. VIII менее 1%. Кровоизлияния в суставы, мышцы и другие органы случаются при минимальных или даже незаметных повреждениях.

Гемофилия средней степени. Уровень ф. VIII между 1-5%. Кровотечения возникают из-за явных незначительных повреждений, также после различных операций и удалений зубов.

Гемофилия легкой степени. Уровень ф. VIII между 6-30%. Кровоизлияния обычно следуют только за крупными повреждениями, хирургическими операциями или удалением зубов. Такая форма может быть не диагностирована до взрослого возраста или до проявления кровотечений после указанных ситуаций.

Тромбофилия. Уровень фактора VIII превышает 200%.

Уровень ф. VIII в СЗП – должен быть не менее 0,7 МЕ/мл (70%).

Уровень ф. VIII в криопреципитате – должен быть не ниже 70 МЕ в дозе.

Активность ингибиторов выразить в ВУ/мл.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Хранение набора должно проводиться при температуре 2-8° С в течение всего срока годности набора (12 мес). Допускается хранение при температуре до 25° С в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Раствор эрилида в каолине можно использовать для исследований в течение 2 недель при условии хранения при температуре 2-8° С.

После вскрытия флакона с раствором кальция хлористого последний может быть использован повторно при условии достаточной герметизации флакона. Раствор кальция хлористого, который подвергался прогреву при проведении тестов, повторному использованию не подлежит.

Суспензию каолина после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2-8° С в течение 5 дней.

Субстратную, плазму-калибратор и исследуемую плазму допускается использовать для анализов только в течение 2 ч после приготовления.

Раствор имидазолового буфера можно хранить при температуре 2-8° С не более 20 сут.

Калибровочный график необходимо строить ежедневно.

1 набор рассчитан на проведение 20 определений при расходе каждого реагента по 0,05 мл на 1 анализ.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества набора /Фактор VIII-тест, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а, телефон/факс (495) 614-9057, e-mail: renam@blood.ru и

в Лабораторный Центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117241, г. Москва, Научный проезд, д.14 а, тел.: 8-499-120-60-96.

Зав. производства НПО «РЕНАМ» к.б.н.

Зав. лаб. клинической коагулологии ГНЦ РАМН

д. м. н., профессор

А.Л.Берковский

С.А.Васильев

Пронумеровано
и прошнуровано
Президент
МБОУ «ОБГ»
Ю.А.Жулев

