

УТВЕРЖДЕНА

приказом Росздравнадзора
от «__» _____ 2011 г.
№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Президент
МБООИ «Общество больных
«Гемофилией»
больных
гемофилией»
Ю.А. Жулёв
2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Трансформирующего реагента для определения
гемоглобина
(«Трансформирующий реагент»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Трансформирующий реагент» предназначен для количественного определения гемоглобина гемиглобинцианидным методом на спектрофотометрах (СФ), фотоэлектроколориметрах (ФЭК) и гемоглобинометрах.

Один комплект реагента (10 флаконов по 1,25 г сухой смеси) предназначен для проведения 2000 определений.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАГЕНТА

2.1. Принцип действия

Принцип метода определения основан на образовании из гемоглобина крови стойкого при хранении соединения - гемиглобинцианида, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна количеству гемоглобина. Реакция проходит в 2 этапа. Сначала гемоглобин окисляется в метгемоглобин под действием калия железосинеродистого. Затем под действием цианида метгемоглобин преобразуется в гемиглобинцианид.

2.2. Состав комплекта реагента

«Трансформирующий реагент» - 10 флаконов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Гемиглобинцианидный метод определения гемоглобина в крови человека рекомендован Международным комитетом стандартизации в гематологии как оптимальный. Метод позволяет определять все производные гемоглобина, кроме сульфгемоглобина.

Для точного количественного определения гемоглобина и калибровки приборов (СФ, ФЭК, гемоглобинометр) требуется Набор калибровочных растворов гемиглобинцианида («Гемиглобинцианид»). Для проверки правильности определения гемоглобина рекомендуется использовать Набор контрольных растворов гемоглобина («Диагем К»).

Коэффициент вариации при определении гемоглобина в одной пробе крови - не более 2%. Чувствительность определения - 2,5 г/л.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения реагента – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с реагентом следует соблюдать «Правила 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.).

4.3. Реагент предназначен только для диагностики *in vitro*. При попадании на кожу и слизистые оболочки необходимо промыть пораженные участки большим количеством воды.

4.4. При работе с реагентом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как реагент предназначен для работы с кровью, которую следует рассматривать как потенциально инфицированную, способную длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- спектрофотометр (СФ), фотозлектроколориметр (ФЭК) или гемоглобинометр;
- кюветы с длиной оптического пути 10 мм;
- вода дистиллированная;
- пипетки полуавтоматические вместимостью 20 мкл и 5,0 мл, калиброванные;
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл;
- колба мерная вместимостью 1,0 л;
- Набор калибровочных растворов гемиглобинцианида «Гемиглобинцианид»;
- Набор контрольных растворов гемоглобина «Диагем К»;
- бумага масштабнo-координатная;
- игла-скарификатор;
- спирт этиловый;
- ватные тампоны;

- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Обработать мякоть пальца пациента спиртом и сделать прокол скарификатором. Удалить первую каплю крови ватным тампоном. Затем свободно выступающие капли крови отобрать полуавтоматической пипеткой вместимостью 20 мкл. Не допускать сильного давления на палец во избежание гемолиза.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

7.1. Приготовление трансформирующего раствора

Содержимое 1 флакона (1,25 г сухого трансформирующего реагента) растворить в 1,0 л дистиллированной воды для получения трансформирующего раствора. Для этого во флакон с сухим трансформирующим реагентом внести 8-10 мл дистиллированной воды, закрыть пленкой парафилома или пробкой и перемешать переворачиванием. Внести содержимое флакона в мерную колбу вместимостью 1,0 л. Промыть флакон 3 раза дистиллированной водой (8-10 мл) и внести промывные воды в ту же мерную колбу. Долить колбу до метки дистиллированной водой, закрыть пленкой парафилома или пробкой и перемешать переворачиванием.

Трансформирующий раствор стабилен при хранении в посуде из светозащитного стекла в течение 3 мес, при появлении осадка или при обесцвечивании раствор более не пригоден для применения.

7.2. Построение калибровочного графика.

Установить на используемом измерительном приборе (СФ, ФЭК, гемоглобинометр) длину волны 540 нм (520-560 нм для ФЭК), подготовить чистые и сухие кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

Температура измеряемых растворов должна быть в пределах комнатной (18-25°C).

Вскрыть ампулы из набора «Гемиглобинцианид» и измерить оптическую плотность раствора А с минимальной концентрацией гемиглобинцианида против трансформирующего раствора.

Вымыть и высушить кювету или сполоснуть ее раствором Б перед измерением оптической плотности раствора Б.

Аналогичным образом поступить при определении оптической плотности растворов В и Г.

Все измерения повторить 5 раз и рассчитать среднюю арифметическую величину (E , ед опт. плотн.) по формуле:

$$E = \frac{\sum E_i}{n},$$

где: $\sum E_i$ - сумма отдельных измерений оптической плотности каждого из 4 растворов гемиглобинцианида, ед. опт. плотн.;
 - n - число измерений.

На горизонтальной оси абсцисс (X) на масштабнo-координатной бумаге отложить концентрации гемоглобина, г/л, указанные в паспорте к набору «Гемиглобинцианид».

На вертикальной оси ординат (Y) отложить полученные на приборе средние арифметические значения оптической плотности, ед. опт. плотн.

По 4 точкам построить калибровочный график, который должен представлять собой прямую линию и проходить через точку нуля.

Если не удастся получить прямую линию, выходящую из начала координат, то это означает, что прибор требует ремонта и на нем нельзя работать.

Если же калибровочный график представляет прямую линию, то по нему можно непосредственно проводить определения гемоглобина в опытных пробах.

7.3. Определение концентрации гемоглобина в контрольных растворах гемоглобина

Прежде, чем приступать к количественному определению гемоглобина в пробах крови пациентов, целесообразно проверить правильность подготовки к работе. Нужно проверить, откалиброваны ли полуавтоматические пипетки, точен ли оператор в работе, точно ли соблюдается инструкция по применению, не спешит ли оператор измерять, не дождавшись 30 мин – времени выхода пробы на устойчивые показатели оптической плотности и другие возможные погрешности. Для контроля таких ошибок в работе предназначены контрольные растворы гемоглобина, приготовленные из донорской крови, стабилизированные и имеющие 3 диапазона концентраций: 80, 120, 160 г/л, т.е. позволяющие провести проверку во всем диапазоне исследуемых концентраций гемоглобина.

Последовательность работы с контрольными растворами следующая:

Приготовить 3 ряда по 5 пробирок. Внести в пробирки по 20 мкл каждого из контрольных растворов в следующем порядке:

- в 1 ряд - с концентрацией 70 - 90 г/л;
- во 2 ряд - с концентрацией 110 - 130 г/л;
- в 3 ряд - с концентрацией 140 - 180 г/л.

Добавить во все пробирки по 5,0 мл трансформирующего раствора, перемешать и через 30 минут измерить оптическую плотность всех растворов при длине волны 540 нм, в чистых кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Температура измеряемых растворов должна быть в пределах комнатной температуры (18-25°C). Измерения провести не позднее, чем в течение 4 ч после взятия пробы крови. Рассчитать среднюю арифметическую величину. По калибровочному графику определить содержание гемоглобина во всех контрольных растворах.

Если полученные значения попадают в аттестованный интервал, это означает, что работа проводится правильно и точно. Если же получаете значительно отклоняющиеся от аттестованного интервала значения, это указы-

вает на ошибки или неточности в работе, которые нужно выявить и исправить.

7.4. Определение гемоглобина в пробе крови

После того, как была проведена проверка работы приборов, построен калибровочный график, приготовлен трансформирующий раствор и проведена проверка точности работы с помощью контрольных растворов гемоглобина, можно приступить непосредственно к исследованию содержания гемоглобина в пробах крови пациентов. Целесообразно проводить все подготовительные работы в начале каждого рабочего дня.

Определение гемоглобина в пробе крови пациента сводится к следующим манипуляциям:

1. Приготовить чистые калиброванные полуавтоматические пипетки вместимостью 20 мкл и 5,0 мл, чистые пробирки вместимостью 10 мл, чистые сухие кюветы прибора.

2. Включить прибор и прогреть его в течение времени, указанному в паспорте на прибор.

3. Измерить температуру трансформирующего раствора, она не должна быть выше или ниже комнатной.

4. Пробу крови развести в 251 раз трансформирующим раствором. Для этого внести в пробирку 20 мкл крови и сразу же добавить 5,0 мл трансформирующего раствора, перемешать. Через 30 мин перелить содержимое пробирки в кювету СФ, ФЭК или гемоглобинометра. Измерить на приборе оптическую плотность раствора против раствора трансформирующего реагента. Повторить определение не менее 3 раз, рассчитать среднюю арифметическую величину.

5. По калибровочному графику определить содержание гемоглобина в пробе крови, г/л.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание гемоглобина в пробах крови определить по калибровочному графику зависимости оптической плотности, ед. опт. плотн., от концентрации гемоглобина, г/л, и зарегистрировать результаты исследования гемоглобина в крови пациента в г/л.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Содержание гемоглобина в крови здоровых людей колеблется в зависимости от возраста и составляет:

- мужчины - 150 ± 20 г/л
- женщины - 135 ± 15 г/л

Повышенное содержание гемоглобина наблюдается при:

- полицитемии;
- гемоконцентрации в результате дегидратации, ожогов, упорной рвоты, кишечной непроходимости;

- у заядлых курильщиков из-за образования функционально неполноценного карбоксигемоглобина (HbCO);
- вследствие пребывания на больших высотах и при чрезмерных физических нагрузках.

Ложное повышение может наблюдаться при наличии:

- гипертриглицеридемии;
- лейкоцитозе более 25×10^9 ;
- повышенном уровне гемоглобина С (Hb C) или сульфгемоглобина (Hb S);
- прогрессирующих заболеваниях печени;
- легко преципитирующихся глобулинов, например, при миеломной болезни или макроглобулинемии Вальденстрема.

Пониженное содержание гемоглобина наблюдается при:

- анемии, и при применении препаратов, вызывающих апластическую анемию или гемолиз;
- в случае дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы;
- под действием иммунного механизма.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ РЕАГЕНТА

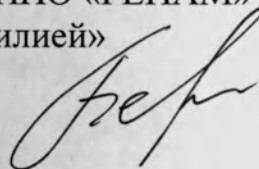
Хранение трансформирующего реагента при 2-8°C. Срок годности реагента – 24 мес

Раствор трансформирующего реагента стабилен в течение 3 мес при хранении во флаконе из темного стекла при комнатной температуре (18-25°C). При появлении осадка или при обесцвечивании трансформирующий раствор не пригоден для употребления.

Реагент используется только для лабораторной диагностики *in vitro*.

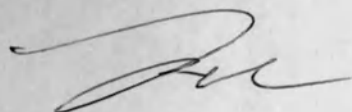
По вопросам, касающимся качества реагента, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4, телефон/факс (495) 614-9057, e-mail: renam@blood.ru

Заведующий отделом производства НПО «РЕНАМ»
МБООИ «Общество больных гемофилией»
кандидат биологических наук



А.Л.Берковский

Научный руководитель лаборатории
клинической коагулологии
ФГБУ ГНЦ МЗСР России
доктор медицинских наук



С.А.Васильев

Пронумеровано и прошнуровано 6 листов
Президент МБОУ «Общество
больных гемофилией»

Ю.А.Жулёв



2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ ИЗДЕЛИЯ

2.1. Назначение и области применения: «Трансформирующий реагент» предназначен для количественного определения гемоглобина гемиглобинцианидным методом на спектрофотометрах, фотоэлектроколориметрах и гемоглобинометрах. «Трансформирующий реагент» может быть использован как в клинико-диагностической практике, так и при научных исследованиях.

2.2. Состав изделия:

В состав набора входят: 10 флаконов по 1,25 г сухой смеси; инструкция по применению.

2.3. Нормированные технические характеристики изделия:

«Трансформирующий реагент» представляет собой порошок желтого цвета с вкраплением темных и оранжевых частиц (0,2 г калия железосинеродистого и 1 г натрия углекислого кислого). Растворимость «Трансформирующего реагента» в воде не более 5 мин. pH раствора «Трансформирующего реагента» в пределах 8,5-9,5. Чувствительность определения – 2,5 г/л. Тест на линейность в диапазоне концентраций 50-160 г/л, отклонение не более 2%. Тест на открытие – отклонение не более 2%. Коэффициент вариации результатов – не более 2%. Межфлаконная вариация результатов определения гемоглобина – не более 2%. Допустимый разброс результатов при параллельном определении гемоглобина в одной пробе разными комплектами реагента одной серии – не более 2%. Время выхода анализируемой пробы на устойчивые показатели оптической плотности – не более 30 мин.

2.4. Требования безопасности (в том числе в отношении остаточных рисков):

Потенциальный риск применения изделия – класс 2а. Для обеспечения безопасности и охраны окружающей среды при производстве наборов необходимо соблюдение «Правил техники безопасности, производственно-санитарного и санитарно-противоэпидемического режимов для предприятий по производству бактериальных и вирусных препаратов», утвержденных Минздравом СССР 29.06.78 г. При работе с готовыми наборами следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г. Все работы с набором в лаборатории следует проводить в защитных одноразовых резиновых или пластиковых перчатках. Анализируемые образцы человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов и другие возбудители вирусных и других гемотрансмиссивных инфекций. При утилизации отработанных проб необходимо руководствоваться официально утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.

3. ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Заявление о регистрации изделия медицинского назначения; нормативный документ изделия медицинского назначения; ТУ 9398-037-05595541-2011; справка о медицинском изделии; описание продукции; инструкция по применению.

4. УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ: (аналитическая система, в составе которой испытывались реагенты; климатические условия и т.д.)

Испытания проводили в лабораторном помещении с использованием спектрофотометра Beckman (США), модель DU-65, согласно инструкции по его применению, при температуре 22-24°C и относительной влажности 40-60%.

5. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

Испытания проводили с применением методов, предложенных изготовителем, и набора контрольных растворов гемоглобина производства МБООИ «Общество больных гемофилией», Россия (Серия № 7711, годен до 06/2013). Внешний вид компонентов набора исследовали

визуально. Контрольные образцы анализировали методом спектрофотометрии с использованием спектрофотометра Beckman (США), модель DU-65, согласно инструкции по его применению, при температуре 22-24°C и относительной влажности 40-60%.

6. ПРОГРАММА ИСПЫТАНИЙ

6.1. Идентификацию изделия осуществляли по соответствию наименования, маркировки на упаковке изделия с сопроводительной документацией: нормативным документом, описанием изделия и методическими рекомендациями по применению изделия.

6.2. Само испытание проводили с использованием спектрофотометра Beckman (США), модель DU-65, по следующей схеме: анализ внешнего вида компонентов набора; определение технических характеристик.

7. ИСПЫТАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

Наименование средства испытаний и измерений	Тип
Спектрофотометра (Beckman, США)	DU 65

8. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

8.1. Анализ внешнего вида компонентов набора.

Наименование показателя	Характеристика и норма	Результат испытаний	Методы контроля	Соотв. НД
Трансформирующий реагент	Порошок желтого цвета с вкраплением темных и оранжевых частиц	Порошок желтого цвета с вкраплением темных и оранжевых частиц	п. 4.1.	Соотв.

8.2. Определение технических характеристик.

Наименование показателя	Характеристика и норма	Результат испытаний	Методы контроля	Соотв.-е НД
Растворимость «Трансформирующего реагента» в воде не более, мин	5	4,5 ± 0,3	п. 4.2.2.	Соотв.
рН раствора «Трансформирующего реагента» в пределах 8,5-9,5.	8,5-9,5	9,0 ± 0,2	п. 4.2.3.	Соотв.
Чувствительность определения, г/л.	2,5	2,5	п. 4.2.4.	Соотв.
Тест на линейность в диапазоне концентраций 50-160 г/л, отклонение не более, %.	2	1,8	п. 4.2.5.	Соотв.
Тест на открытие, отклонение не более, %.	2	2	п. 4.2.6.	Соотв.
Коэффициент вариации результатов, не более, %.	2	2	п. 4.2.7.	Соотв.
Допустимый разброс результатов при параллельном определении гемоглобина в одной пробе разными комплектами реагента одной серии, не более, %.	2	2	п. 4.2.9.	Соотв.
Время выхода анализируемой пробы на устойчивые показатели оптической плотности, не более, мин.	30	26 ± 6	п. 4.2.10.	Соотв.

8.3. Соответствие результатов проведенных испытаний нормативному документу.

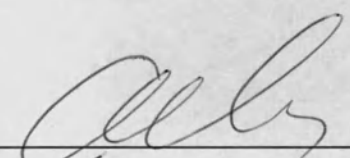
Нормативные технические требования	Результаты испытаний образцов		
	А	Б	В
Основные технические характеристики	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Состав изделия медицинского назначения	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Упаковка	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Маркировка	Соответствует	Соответствует	Соответствует

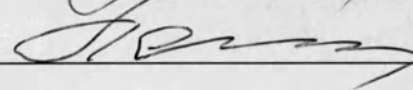
9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

9.1. Все образцы изделий технические испытания выдержали и соответствуют требованиям ГОСТ Р 51088-97, ГОСТ Р 51352-99, а также нормативного документа, описанию изделия и методическим рекомендациям по его применению.

Сведения об аналогах. На территории РФ в установленном порядке зарегистрирован аналог: Набор реагентов для определения гемоглобина («Диагем Т»). Производитель – МБООИ «Общество больных гемофилией», Россия. ФСР 2009/04595 от 01.04.2009 г.

Испытания проводили:

Ведущий по испытаниям  А.К. Мартынов

Испытатель  О.М. Панасенко

Пронумеровано
и прошнуровано

Президент МБОУ «Общество
больных гемофилией»


Ю.А.Жулёв

4 листов

Общество
больных
гемофилией