

МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ БЛАГОТВОРИТЕЛЬНАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНВАЛИДОВ «ОБЩЕСТВО БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ»

УТВЕРЖДАЮ
Президент МБОУИ
«Общество больных гемофилией»



Ю.А. Жулёв
январь 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для экспресс-определения Д-димеров методом латексной
агглютинации «РеДимер-латекс тест», по ТУ 21.20.23-061-05595541-2017»

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Предназначенное применение

Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для экспресс-определения Д-димеров методом латексной агглютинации «РеДимер-латекс тест», по ТУ 21.20.23-061-05595541-2017» (сокращенное наименование - «РеДимер-латекс тест») предназначено для качественного и полуколичественного определения *in vitro* продуктов деградации поперечно сшитого фибрина (XL-ПДФ) - Д-димеров в плазме крови человека методом латексной агглютинации.

1.2 Область применения

Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика, лабораторная диагностика нарушений гемостаза.

1.3 Предназначенный пользователь

Определение Д-димеров с помощью набора «РеДимер-латекс тест» может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

1.4 Диагностическая роль

Поддержка диагностики нарушений свертываемости крови и мониторинг состояния гемостаза. Повышенное содержание Д-димеров указывает на реактивный фибринолиз и позволяет предположить возможность тромбоза глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА), диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) и других серьезных нарушений свертывания крови. Метод может быть использован для определения Д-димеров у пациентов любого пола и возраста [1-4].

1.5 Научная обоснованность теста

Конечный этап свертывания крови – это превращение растворимого фибриногена под действием тромбина в нерастворимый фибрин. В начале процесса происходит полимеризация мономеров фибрина, затем - поперечная сшивка фибрина фактором XIIIa с формированием нерастворимого фибринового сгустка. При этом запускается образование плазмина - основного фермента, лизирующего сгусток. Фибриноген и фибрин расщепляются плазмином до образования продуктов деградации. Но только продукты деградации поперечно сшитого фибрина (XL-ПДФ) содержат Д-димеры, являющиеся специфическими маркерами фибринолиза [1-4].

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора

Набор поставляется в двух вариантах исполнения:

Вариант 1: «РеДимер-латекс тест» - 30-40 определений;

Вариант 2: «РеДимер-латекс тест» - 60-80 определений.

Для варианта исполнения «РеДимер-латекс тест» - 30-40 определений в состав набора входят:

- Латекс-реагент – 1,0 мл во флаконе-капельнице – 1 шт.
- Положительный контроль – 0,6 мл во флаконе-капельнице – 1 шт.
- Отрицательный контроль – 1,0 мл во флаконе-капельнице – 1 шт.;
- Буфер имидазоловый концентрированный – 5,0 мл во флаконе – 1 шт.;
- Пластины для агглютинации – 5 штук;
- Палочки для перемешивания – 40 штук.

Для варианта исполнения «РеДимер-латекс тест» - 60-80 определений в состав набора входят:

- Латекс-реагент – 2,0 мл во флаконе-капельнице – 1 шт.
- Положительный контроль – 0,6 мл во флаконе-капельнице – 1 шт.
- Отрицательный контроль – 1,0 мл во флаконе-капельнице – 1 шт.;
- Буфер имидазоловый концентрированный – 5,0 мл во флаконе – 1 шт.;
- Пластины для агглютинации – 10 штук;
- Палочки для перемешивания – 80 штук.

Номер по каталогу производителя для варианта исполнения «РеДимер-латекс тест» - 30-40 определений: Д-1/1.

Номер по каталогу производителя для варианта исполнения «РеДимер-латекс тест» - 60-80 определений: Д-1/2.

Латекс-реагент представляет собой суспензию латекса с присоединенными к поверхности частиц латекса мышинными моноклональными антителами к Д-димерам человека, с добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) и консерванта 0,1% азида натрия.

Положительный контроль представляет собой раствор, содержащий очищенные фрагменты Д-димеров, выделенные из плазмы крови человека, стабилизатор и консервант ProClin 300 в концентрации 0,5 мл/л.

Отрицательный контроль представляет собой Трис-HCl буфер, содержащий NaCl, БСА и консервант мертиолят (этилртутьтиосалицилат натрия) в концентрации 0,05 г/л.

«Буфер имидазоловый концентрированный («Буфер имидазоловый») по ТУ 9398-035-05595541-2011» (ФСР 2011/12508) производится МБООИ «Общество больных гемофилией».

Пластины для агглютинации - пластины из ламинированного картона черного цвета с восемью лунками.

Палочки для перемешивания белого цвета изготовлены из полиэтилена.

2.2 Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения от 30 до 40 определений (вариант исполнения 1) или от 60 до 80 определений (вариант исполнения 2) при расходе приблизительно 25 мкл Латекс-реагента на один анализ.

2.3 Принцип метода

Метод определения Д-димеров основан на его взаимодействии с моноклональными антителами против Д-димеров, конъюгированными с частицами латекса. При уровне Д-димеров в плазме выше 200 нг/мл происходит видимая глазом агглютинация частиц латекса [1-3].

3 МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ КОНТРОЛЬНОМУ МАТЕРИАЛУ

Каждая серия Положительного контроля аттестована против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован по набору для количественного определения Д-димеров, зарегистрированному в РФ (HemosIL D-Dimer, производства Instrumentation Laboratory S.P.A. Италия, ФСЗ 2011/09128) [6].

4 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1 Аналитическая специфичность

По данным [7-8] специфичность определения Д-Димеров в донорской крови составляет 95,3%.

Моноклональные антитела, содержащиеся в Латекс-реагенте, иммунологически специфично связываются только с продуктами деградации поперечно сшитого фибрина - Д-димерами. Моноклональные антитела не связываются с другими веществами, содержащимися в плазме крови, такими как билирубин в концентрации до 0,2 г/л, свободный гемоглобин – до 5 г/л, триглицериды – до 30 г/л, фибриноген – до 10 г/л [1-6].

4.2 Аналитическая чувствительность

Минимальная концентрация Д-димеров в плазме, при которой может наблюдаться агглютинация латекса, находится в диапазоне от 200 до 400 нг/мл [1].

4.3 Диапазон определяемых концентраций

«РеДимер-латекс тест» позволяет определять содержание Д-димеров в диапазоне от 200 нг/мл. Все пробы плазмы крови пациентов, содержащие Д-димеры в количестве, превышающем 200 нг/мл, будут вызывать агглютинацию [1].

4.4 Значения концентраций, соответствующих нормальным

В плазме здоровых лиц концентрация Д-димеров не превышает 200 нг/мл [1].

4.5 Ограничения метода

Вероятность получения ложноположительного результата теста по данным [7-8] составляет 4,7%. Клиническая диагностика не должна основываться только на результатах «РеДимер-латекс теста». При постановке диагноза должны быть рассмотрены клинические симптомы и другая значимая тестовая информация [5].

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов «РеДимер-латекс тест» предназначен только для диагностики in vitro.

Класс потенциального риска применения медицинского изделия - 2а.

При работе с набором и с образцами крови 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).

⚠ В состав Латекс-реагента, входящего в набор, включен консервант азид натрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводной системы с

образованием потенциально взрывоопасных азидов металлов. В маркировку медицинского изделия включен специальный знак предупреждения.



Следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, так как 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.

6 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Секундомер (таймер);
- рН-метр;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, от 20 до 200 мкл и от 200 до 1000 мкл;
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% трехзамещенным цитратом натрия двух водным (0,109 моль/л);
- мерный цилиндр;
- пробирки пластиковые вместимостью от 3 до 5 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

7 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

7.1 Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов «РеДимер-латекс тест» предназначен для определения Д-димеров в плазме человеческой крови. Образцы плазмы крови для анализа не должны иметь признаков гемолиза, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

7.2 Процедура получения биологического материала

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 от плюс 18 до плюс 25° С в течение 15 минут при 3000 оборотов/мин (1200 g).

Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками и замораживают.

7.3 Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 часов при комнатной температуре и не более 8 часов в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°С. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре от минус 18 до минус 20°С и хранение при этой температуре в морозильнике не более 2 месяцев.

7.4 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, так как при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1 Рабочий буферный раствор

Буфер имидазоловый концентрированный (20-кратный) развести в 20 раз (содержимое флакона количественно перенести в мерную емкость, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать). рН рабочего буферного раствора (однократного) должен составлять от 7,35 до 7,45.

Рабочий буферный раствор хранить в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C не более 1 месяца.

8.2 Остальные реагенты из набора

Латекс-реагент, Положительный контроль и Отрицательный контроль не требуют подготовки и готовы к использованию после выдерживания при комнатной температуре в течение, по меньшей мере, 10 минут.

9 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1 Качественный анализ

9.1.1 Перед применением выдержать реагенты при комнатной температуре не менее 10 минут и перемешать, покачивая флаконы, не допуская вспенивания.

9.1.2 На пластине для агглютинации промаркировать ячейки: для образца исследуемой плазмы пациента («тест»), для положительного контроля («+») и для отрицательного контроля («-»).

9.1.3 Добавить по одной капле (25 мкл) Латекс-реагента из флакона-капельницы во все ячейки на пластине для агглютинации. Флакон нужно держать вертикально при нанесении капель реагента. Внести каплю реагента в центр ячейки, не дотрагиваясь наконечником капельницы до поверхности ячейки.

9.1.4 Внести пипеткой 20 мкл исследуемой неразбавленной плазмы пациента в ячейку «тест» с Латекс-реагентом. Использовать новый наконечник для каждой пробы!

9.1.5 Внести одну каплю (25 мкл) Положительного контроля в ячейку Положительного контроля.

9.1.6 Добавить одну каплю (25 мкл) Отрицательного контроля в ячейку Отрицательного контроля.

9.1.7 Используя пластиковые палочки (содержащиеся в наборе), быстро перемешать содержимое каждой ячейки приблизительно в течение 3-5 секунд, обеспечивая полное перемешивание и распространение реагента от центра до стенок ячейки. Палочки для перемешивания вторично не использовать!

9.1.8 Включить секундомер.

9.1.9 В течение трех минут перемешивать содержимое ячеек, слегка покачивая пластину для агглютинации.

9.1.10 Ровно через три минуты под сильным источником света зафиксировать наличие агглютинации в каждой ячейке.

9.1.11 Используемую пластину для агглютинации повторно не применять!

Примечание – Если учет реакции выполнять позднее, чем через три минуты, латексная суспензия может высохнуть и показать ложную агглютинацию.

9.2 Полуколичественный анализ

Выполняется только с образцами плазмы, показавшими положительный результат при качественном анализе.

Приготовить серию разведений исследуемой плазмы по схеме, приведенной в таблице 1.

Таблица 1 – Разведение образцов плазмы

Пробирка, №	1	2	3	4
Разведение	Без разведения	в 2 раза	в 4 раза	в 8 раз
Рабочий буферный раствор, мкл	-	100	100	100
Исследуемая плазма, мкл	200	-	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мкл		 100	 100	 100

Тестировать каждое разведение плазмы, как описано при проведении качественного анализа.

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Качественный анализ

При отсутствии агглютинации в неразбавленной тестируемой плазме пациента уровень Д-димеров в ней составляет менее 200 нг/мл (0,2 мг/л). При положительном результате агглютинации уровень Д-димеров составляет более 200 нг/мл.

10.2 Полуколичественный анализ

Приблизительный уровень Д-димеров в исследуемом образце может быть определен, основываясь на данных, представленных в таблице 2.

Таблица 2 – Уровень Д-димеров в зависимости от разведения

Уровень Д-димеров, нг/мл (мг/л)	Разведение плазмы			
	без разведения	в 2 раза	в 4 раза	в 8 раз
200, менее 200 (0,2; менее 0,2)	-	-	-	-
200-400 (0,2-0,4)	+	-	-	-
400-800 (0,4-0,8)	+	+	-	-
800-1600 (0,8-1,6)	+	+	+	-
1600-3200 (1,6-3,2)	+	+	+	+

Примечание - Уровни Д-димеров свыше 3200 нг/мл (3,2 мг/л) можно определить путем дополнительного разведения исследуемого образца более 8 раз.

11 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

При проведении каждой серии анализов необходимо использовать Положительный и Отрицательный контроли, которые должны быть исследованы по той же схеме, что и плазма пациентов.

Агглютинация Латекс-реагента с Отрицательным контролем и отсутствие агглютинации с Положительным контролем указывает на непригодность данного Латекс-реагента для определения Д-димеров.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности! Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается хранение при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Латекс-реагент, Положительный контроль и Отрицательный контроль после первого вскрытия флаконов стабильны в течение двух месяцев при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Рабочий буферный раствор (однократный) следует хранить в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C не более одного месяца.

Транспортирование наборов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание не допускается.

13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеДимер-латекс тест» требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

14 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 набором «РеДимер-латекс тест» с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности 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.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 реагенты из набора «РеДимер-латекс тест», не подлежащие использованию, и с истекшим сроком годности, за исключением «Буфера имидазолового», пластин для агглютинации и палочек для перемешивания 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.

«Буфер имидазоловый», пластины для агглютинации и палочки для перемешивания, входящие в состав наборов «РеДимер-латекс тест», не подлежащих использованию, с истекшим сроком годности, и не состоящие в контакте с плазмой крови пациентов, относятся к отходам класса А. Отходы класса А собирают в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета, кроме желтого и красного, с надписью «Отходы. Класс А», утилизируют и транспортируют в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010.

15 ЛИТЕРАТУРА

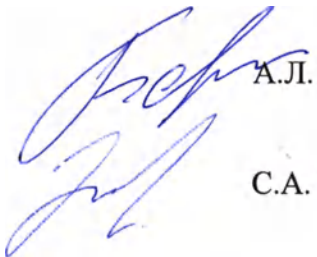
1. Гильманов, А.Ж. Д-димер. Что? Как? У кого? С какой целью? /А.Ж. Гильманов // Клинико-лабораторный консилиум. - 2009 - № 6 (31) - с. 38-46.

2. Зубаиров, Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования / Д.М. Зубаиров. - Казань: ФЭН, 2000 -364 с.

3. Папаян, Л.П. Д-димер в клинической практике: Пособие для врачей / Л.П. Папаян, Е.С. Князева - М.: ООО "Инсайтполиграфик", 2002 - 20 с.
4. Amiral, J. Molecular markers in thrombosis and hemostasis / J. Amiral // Clin Appl Thrombosis/Hemostasis. – 1997. – №3 – P.71-81
5. Janssen, M.C.H. Reliability of five rapid D-dimer assays compared to ELISA in the exclusion of deep venous thrombosis / M.C.H. Janssen [Et al.] // Thromb. Haemost. - 1997 - №77 – P. 262-266.
6. Reber, G. Standardization of D-dimer testing. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis / G. Reber, P. de Moerloose. - WILEY-BLACKWELL - 2009 - P. 99-109.
7. Rylatt, D.B. An Immunoassay for Human D-dimer using Monoclonal Antibodies. / D.B. Rylatt [Et al.] // Thromb. Res. -1983- Vol. 31, №6 – P.767-778.
8. Elms, M.J. Rapid Detection of Cross-Linked Fibrin Degradation Products in Plasma using Monoclonal Antibody-Coated Latex Particles. / M.J. Elms [Et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 1986- Vol.85, №3 – P.360-364.

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

Директор НПО «РЕНАМ»
МБООИ «Общество больных гемофилией», к.б.н.

 А.Л. Берковский

Руководитель группы по гемостазу
НКО ХТ с ДС ФГБУ ГНЦ МЗ РФ, д. м. н.

 С.А. Васильев

Прошнуровано
и пронумеровано 8 листов
Президент МБОУ «Общество
больных гемофилией»

Ю.А. Жулёв

