

УТВЕРЖДАЮ
Президент МБОУИ
«Общество больных гемофилией»



Ю.А. Жулёв
« 04 » сентября 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для экспресс-определения растворимых фибрин-
мономерных комплексов в плазме крови о-фенантролиновым методом
(РФМК-тест) по ТУ 21.20.23-067-05595541-2020»

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Предназначенное применение

Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для экспресс-определения растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме крови о-фенантролиновым методом (РФМК-тест) по ТУ 21.20.23-067-05595541-2020» (сокращенное наименование – «РФМК-тест») предназначено для качественного экспресс-определения растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) в плазме крови методом агглютинации под действием о-фенантролина [1,2].

1.2 Предназначенный пользователь

Определение РФМК в плазме крови о-фенантролиновым методом с помощью набора РФМК-тест может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

1.3 Диагностическая роль

Поддержка диагностики нарушений свертываемости крови и скрининг состояния гемостаза. О-фенантролиновый метод имеет большое диагностическое значение, так как РФМК являются маркерами тромбинемии как одного из основных признаков диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома), а также тромбозов и эмболий. Метод позволяет проводить динамический контроль содержания РФМК в плазме крови пациентов, в том числе при проведении антикоагулянтной терапии [2].

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

3 НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ АНАЛИТА

Конечным результатом свертывания крови является вызываемая тромбином трансформация фибриногена в фибрин, происходящая в несколько этапов. При внутрисосудистом свертывании крови процесс трансформации фибриногена в фибрин ограничивается на промежуточном этапе, а в кровотоке начинают циркулировать продукты деградации фибрина. Соединяясь с мономерами фибрина, фибриногеном, они образуют растворимые комплексы РФМК. Обнаружение в сосудистом русле РФМК указывает на присутствие в кровотоке активных белков – тромбина и плазмина, что свидетельствует о нарушении свертывания крови.

4 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1 Состав набора

Набор РФМК-тест поставляется в трех вариантах исполнения.

Вариант исполнения 1:

- О-фенантролин, сухой – 100 мг во флаконе – 4 флакона;
- Положительный контроль, лиофильно высушенный – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;
- Отрицательный контроль, лиофильно высушенный – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон.

Номер по каталогу производителя - ПГ-12.

Вариант исполнения 2:

- О-фенантролин, лиофильно высушенный – объем после восстановления 5,0 мл, во флаконе – 4 флакона;
- Положительный контроль, лиофильно высушенный – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;
- Отрицательный контроль, лиофильно высушенный – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон.

Номер по каталогу производителя - ПГ-12/1.

Вариант исполнения 3:

- О-фенантролин, лиофильно высушенный – объем после восстановления 3,0 мл, во флаконе – 4 флакона;
- Положительный контроль, лиофильно высушенный – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон;
- Отрицательный контроль, лиофильно высушенный – объем после восстановления 1,0 мл, во флаконе – 1 флакон.

Номер по каталогу производителя - ПГ-12/2.

В варианте исполнения 1 все компоненты набора РФМК-тест расфасованы в стеклянные флаконы, укупоренные резиновыми пробками и обжатые алюминиевыми колпачками.

В вариантах исполнения 2 и 3 все компоненты набора РФМК-тест расфасованы в стеклянные флаконы, укупоренные резиновыми пробками, с завинчивающимися пластмассовыми крышками.

Положительный контроль представляет собой лиофильно высушенную плазму крови человека, полученную пулированием донорской плазмы, с

добавлением РФМК, стабилизированную HEPES-буфером. Отрицательный контроль представляет собой лиофильно высушенную плазму крови человека, полученную пулированием донорской плазмы, стабилизированную HEPES-буфером.

4.2 Комплект поставки

- 1) РФМК-тест, в вариантах исполнения;
- 2) инструкция по применению;
- 3) паспорт медицинского изделия.

4.3 Число анализируемых проб биологического материала

Набор РФМК-тест предназначен для проведения 400 определений РФМК (вариант исполнения 1); 200 определений РФМК (вариант исполнения 2); 120 определений РФМК (вариант исполнения 3) при расходе 100 мкл раствора о-фенантролина на один анализ.

4.4 Принцип метода

Метод основан на оценке времени появления в исследуемой плазме хлопьев фибрина после добавления в нее о-фенантролина. Время их образования зависит от концентрации РФМК.

5 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

5.1 Время появления хлопьев фибрина

После добавления о-фенантролина к положительному контролю время образования хлопьев фибрина составляет не более 10 секунд. После добавления о-фенантролина к отрицательному контролю хлопья отсутствуют в течение не менее 120 секунд.

5.2 Чувствительность

Минимальная концентрация РФМК, определяемая набором РФМК-тест, составляет $3,5 \cdot 10^{-2}$ г/л [2].

5.3 Диапазон определяемых концентраций РФМК

С помощью набора РФМК-тест можно определить концентрацию РФМК в диапазоне от $3,5$ до $28 \cdot 10^{-2}$ г/л [2]. Таблица перевода результатов определения времени образования хлопьев в концентрацию РФМК в плазме крови приведена в разделе «Интерпретация результатов».

5.4 Значения концентраций РФМК, соответствующие нормальным

В нормальной плазме крови концентрация РФМК составляет от $3 \cdot 10^{-2}$ до $4 \cdot 10^{-2}$ г/л [2].

5.5 Влияние потенциально интерферирующих веществ

Следующие вещества не влияют на правильность определения РФМК: триглицериды в концентрации до 6 г/л. При превышении указанной концентрации возможно получение ложно завышенных результатов определения РФМК.

5.6 Ограничения метода

Клиническая диагностика не должна основываться только на результатах, полученных с помощью набора РФМК-тест. При постановке диагноза должны быть рассмотрены клинические симптомы и другая значимая тестовая информация.

6 ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

6.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность метода при определении РФМК с помощью набора РФМК-тест у здоровых доноров составляет:

Исследуемая группа	Число измеренных проб	Диагностическая специфичность, %	
		По результатам клинико-лабораторных испытаний	С ДВ* 95%
Здоровые доноры	50	94,0	94,2 – 100

*ДВ – доверительная вероятность

6.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность метода при определении РФМК с помощью набора РФМК-тест у разных групп пациентов составляет:

Исследуемая группа	Число измеренных проб	Диагностическая чувствительность, %	
		По результатам клинико-лабораторных испытаний	С ДВ* 95%
Пациенты с инфарктом	27	92,6	89,5 – 100
Пациенты с ДВС-синдромом	17	100	83,8 – 100
Пациенты с инсультом	18	100	84,7 – 100

*ДВ – доверительная вероятность

Примечание – значения диагностической чувствительности и диагностической специфичности рассчитаны по формуле, описывающей нижнюю границу интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности/специфичности с доверительной вероятностью $C = 95\%$:

$D\% = (1 - C/100)^{(1/n)} \cdot 100\%$, где n – число измеренных проб.

7 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

РФМК-тест предназначен только для диагностики *in vitro*.

Класс потенциального риска применения набора - 2а.

Набор РФМК-тест не является источником опасных излучений и не представляет рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

При работе с набором и образцами крови следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»

(СанПиН 2.1.3.2630-10 от 18.05.2010); Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика ВИЧ-инфекции» (СП 3.1.5.2826-10 от 11.01.2011).

⚠ В состав набора РФМК-тест входят отрицательный и положительный контроли, полученные из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее, не следует исключать остаточного минимального риска при работе с набором, поскольку плазма крови человека является потенциально опасным биологическим материалом.

При работе с набором РФМК-тест следует надевать защитную одежду (халат) и перчатки медицинские диагностические одноразовые, так как реагент используют при работе с образцами крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

⚠ О-фенантролин, входящий в состав набора РФМК-тест, токсичен при проглатывании. Не принимать пищу, не пить и не курить в процессе работы с реагентом. При случайном проглатывании следует прополоскать рот и немедленно обратиться в токсикологический центр или к врачу. О-фенантролин является токсичным для водной флоры и фауны с долговременными последствиями. Не сливать раствор о-фенантролина в водопроводные трубы!

8 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Центрифуга лабораторная;
- весы аналитические;
- секундомер;
- лампа с направленным лучом света;
- лупа с увеличением до 5 раз;
- дозатор одноканальный переменного объема вместимостью от 100 до 1000 мкл;
- наконечники для дозатора объемом от 100 до 1000 мкл;
- пробирки пластиковые;
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл;
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

9 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

9.1 Вид анализируемого биологического материала

Набор РФМК-тест предназначен для определения концентрации РФМК в плазме крови человека. Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

9.2 Процедура получения биологического материала

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) 5,5-водным цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) 2-водным цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре от плюс 18 до плюс 25°C в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).

9.3 Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 2 ч при комнатной температуре от плюс 18 до плюс 25°C и не более 4 часов при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Замораживание плазмы не допускается.

9.4 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.

10 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1 Раствор о-фенантролина

Для варианта исполнения 1 взвесить на аналитических весах 78 мг порошкообразного о-фенантролина и растворить в 10 мл дистиллированной воды при комнатной температуре и осторожном покачивании. Для вариантов исполнения 2 и 3 растворить при комнатной температуре содержимое флакона в 5,0 или 3,0 мл дистиллированной воды, соответственно. Время растворения о-фенантролина во всех случаях должно составлять не более 3 минут. Перед использованием раствор о-фенантролина нужно выдержать при комнатной температуре в течение 20 минут.

10.2 Положительный контроль

Внести во флакон 1,0 мл дистиллированной воды и растворить при комнатной температуре и осторожном покачивании. Время растворения лиофильно высушенного реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре – не более 3 минут. Раствор готов к проведению анализа через 15 минут после приготовления.

10.3 Отрицательный контроль

Внести во флакон 1,0 мл дистиллированной воды и растворить при комнатной температуре и осторожном покачивании. Время растворения лиофильно высушенного реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре – не более 3 минут. Раствор готов к проведению анализа через 15 минут после приготовления.

11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения анализа необходимо использовать стеклянные пробирки.

Внести в пробирку	Объем ,мкл
Раствор одного из контролей или исследуемая плазма	100
Рабочий раствор о-фенантролина	100

После внесения немедленно включить секундомер.

12 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проходящем свете на темном фоне при непрерывном покачивании пробирки регистрируют время от момента добавления о-фенантролина до начала появления первых хлопьев фибрина (для удобства наблюдения можно воспользоваться лупой).

13 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

13.1 Качественная оценка

В положительном контроле регистрируют появление «снежной бури» в течение первых 10 секунд после добавления о-фенантролина. В отрицательном контроле не должно наблюдаться появление хлопьев в течение первых 120 секунд после добавления о-фенантролина.

Появление в исследуемой плазме хорошо видимых хлопьев в течение первых 120 секунд свидетельствует о наличии в ней РФМК.

13.2 Количественная оценка

При анализе исследуемой плазмы регистрируют время от момента добавления о-фенантролина до начала появления первых хлопьев фибрина.

Количество РФМК может быть оценено по таблице перевода результатов времени появления хлопьев (с) в концентрацию РФМК ($\text{г/л} \cdot 10^{-2}$) [2].

Время, с	Концентрация РФМК, $\text{г/л} \cdot 10^{-2}$	Время, с	Концентрация РФМК, $\text{г/л} \cdot 10^{-2}$
5-6	28,0	21-23	10,0
7	26,0	24-25	9,0
8	24,0	26	8,5
9	22,0	27-28	8,0
10	21,0	29-31	7,5
11	19,0	32-33	7,0
12	17,0	34-36	6,5
13	16,0	37-40	6,0
14	15,0	41-45	5,5
15	14,0	46-54	5,0
16	13,0	55-69	4,5
17-18	12,0	70-87	4,0
19-20	11,0	88-120	3,5

Повышение концентрации РФМК характерно для активации свертывания крови. Чем выше концентрация РФМК, тем выше риск внутрисосудистого тромбообразования.

14 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.

Наличие агглютинации с отрицательным контролем и отсутствие агглютинации с положительным контролем указывает на непригодность набора РФМК-тест.

15 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

Срок годности набора РФМК-тест – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности!

РФМК-тест 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 набора при температуре до 25°C не более 10 суток. Замораживание допускается.

Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

Реагент	Температура хранения, °C, в диапазоне		
	плюс 2 - плюс 8	плюс 18 - плюс 25	минус 18 - минус 20
О-фенантролин	30 суток	30 суток	-
Положительный контроль	4 часа	2 часа	2 месяца
Отрицательный контроль	4 часа	2 часа	2 месяца

Раствор о-фенантролина, изменивший окраску на розовый цвет, применению не подлежит!

Допускается дробное использование положительного и отрицательного контролей из набора РФМК-тест путем розлива растворенных компонентов по аликвотам в пластиковые пробирки, однократного замораживания аликвот при температуре от минус 18 до минус 20 °C и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

Оттаивать замороженные компоненты следует при температуре плюс 37 °C и использовать в течение 2 ч после оттаивания. Повторное замораживание не допускается.

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 допускается.

16 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора РФМК-тест требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящими ТУ.

17 УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 09.12.2010) отходы от работы с набором РФМК-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу Б.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 наборы РФМК-тест, не подлежащие использованию, и с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Б.

Отходы класса Б 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.

Вывоз отходов осуществляется специализированными организациями для дальнейшей передачи в организации, имеющие соответствующую лицензию, с целью последующего уничтожения на специально оборудованных площадках в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

18 ЛИТЕРАТУРА

1. Алан, Г.Б. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам / Г.Б. Алан. – М.: Лабора, 2013. – 1280 с.
2. Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушения гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2008. – 292 с.

19 ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

– ГОСТ Р 51088-2013. Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

– ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.

– ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

– ГОСТ Р ИСО18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация. Предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

– ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.

– ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

– ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения.

– ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия.

– ГОСТ Р ЕН 13612-2010 Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.

– ГОСТ Р ЕН 13641-2010 Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro.

– Приказ Минздрава России от 19.01.2017 г №11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинских изделий».

20 СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Номер по каталогу
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Биологический риск
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

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 (804) 333-22-61, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru, сайт www.renam.ru.

Директор НПО «РЕНАМ»

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

А.Л. Берковский

Ведущий научный сотрудник

НКО ХТ с ДС ФГБУ НМИЦГ МЗ РФ, д.м.н.

С.А.Васильев

Пронумеровано
и прошнуровано 10 листов
Президент МБОУ «Общество
больных гемофилией»

Ю.А.Жулёв

