

«УТВЕРЖДАЮ»

Президент МБООИ

«Общество больных гемофилией»

Ю.А. Жулёв

ноябрь 2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению медицинского изделия для диагностики in vitro
«Аденозин 5'-дифосфат, индуктор агрегации тромбоцитов
(АДФ) по ТУ 9398-048-05595541-2014»**

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Предназначенное применение

Медицинское изделие для диагностики in vitro «Аденозин 5'-дифосфат, индуктор агрегации тромбоцитов (АДФ) по ТУ 9398-048-05595541-2014», сокращенное наименование – «АДФ», предназначено для исследования агрегации тромбоцитов в плазме крови человека методом оптической агрегатометрии и в цельной крови методом импедансной агрегатометрии с целью выявления активации или нарушения функций этих клеток для диагностики приобретенных и наследственных тромбоцитопатий.

1.2 Область применения

Область применения изделия – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

1.3 Предназначенный пользователь

Исследование агрегации тромбоцитов с помощью реагента «АДФ» может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

1.4 Диагностическая роль

Аденозин 5'-дифосфат (АДФ) используют в клинко-диагностических лабораториях как индуктор при рутинном анализе агрегации тромбоцитов для определения их дисфункции или активации.

При тромбоцитопатиях происходит изменение функциональной активности тромбоцитов, что по-разному отражается на их взаимодействиях под влиянием различных активаторов, и именно это свойство тромбоцитов лежит в основе диагностики этой группы заболеваний и синдромов.

Агрегация под действием АДФ отсутствует при:

- тромбастении Гланцмана,
- нарушении метаболизма арахидоновой кислоты,
- эссенциальной атромбии,
- передозировке аспирина (более 3000 мг).

Агрегация под действием АДФ снижена при:

- дефиците α -гранул (синдроме серых тромбоцитов),
 - использовании любых антиагрегантов, средств для наркоза, алкоголя.
- Отсутствует вторая волна агрегации при:
- дефиците плотных гранул,
 - нарушении в системе сигнальных путей тромбоцитов,
 - нарушении реакции «высвобождения» (аспириноподобном синдроме),
 - использовании аспирина, нестероидных противовоспалительных препаратов, блокаторов кальциевых каналов, при этом также может быть снижена и первая волна агрегации.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора

АДФ в буфере со стабилизаторами, лиофильно высушенный с концентрацией 1 мМ – 1,0 мл во флаконе; в вариантах исполнения: 1, 3 или 6 флаконов.

Номера по каталогу производителя для вариантов исполнения:

1 флакон - АГ-2/2; 3 флакона - АГ-2; 6 флаконов - АГ-2/1.

2.2 Число анализируемых проб биологического материала

Каждый флакон с лиофильно высушенным АДФ предназначен для проведения от 20 до 100 анализов в зависимости от используемой концентрации.

2.3 Принцип метода

При добавлении к обогащенной тромбоцитами плазме (далее – «ОТП») АДФ стимулирует изменение формы тромбоцитов и их агрегацию. Агрегация, вызванная экзогенным АДФ, называется первичной и является обратимой. Тромбоциты здоровых лиц в дальнейшем высвобождают эндогенный АДФ из своих гранул, что приводит к необратимой агрегации.

Агрегацию тромбоцитов определяют на оптических и импедансных агрегометрах. Оптические приборы основаны на регистрации агрегации тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме по изменению оптической плотности. Импедансные приборы регистрируют агрегацию в цельной крови по изменению электропроводности.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

Препараты-антиагреганты тромбо АСС, плавикс, аспирин, клапидогрель и другие понижают агрегационную активность тромбоцитов под действием АДФ.

3.2 Диапазон определяемых значений

Величина агрегационной активности тромбоцитов, %, при различных конечных концентрациях АДФ в ОТП должна быть установлена в каждой лаборатории самостоятельно.

Вводимые извне большие дозы АДФ (2×10^{-5} моль/л) приводят к слиянию первой и второй волн агрегации. Для достижения двухволновой агрегации обычно используется АДФ в конечной концентрации 4×10^{-6} моль/л. Более низкие концентрации АДФ используют для выявления сниженной активности тромбоцитов.

3.3 Воспроизводимость результатов

Прецизионность и воспроизводимость теста основаны на экспериментально установленном международном консенсусе и составляют $\pm 15\%$ [2].

3.4 Линейность определения в диапазоне определяемых концентраций

Агрегация тромбоцитов является не линейной тест-системой. Тест агрегации измеряет степень выраженности ответа (агрегационную активность) на индуктор, но не измеряет концентрацию реагирующих веществ.

3.5 Значения концентраций, соответствующие нормальным

Обычно у здоровых доноров агрегационная активность с АДФ при конечной концентрации 2×10^{-5} моль/л составляет 60-90%.

3.6 Ограничения метода

С целью контроля при исследовании ОТП пациента необходимо каждый раз параллельно проводить анализ ОТП нормальной плазмы от здорового донора с нормальной функцией тромбоцитов, который не принимал аспирин и нестероидные противовоспалительные препараты в течение 10 дней до кроводачи.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Реагент предназначен только для диагностики *in vitro*.

Реагент не предназначен для перорального приема и инъекций.

Реагент АДФ не токсичен, не взрывоопасен, не обладает аллергенным действием, при растворении в дистиллированной воде не выделяет токсичных продуктов.

Класс потенциального риска применения реагента – 2а.

При работе 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).

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.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Агрегометр любого типа;
- кюветы с мешалками к агрегометру;
- центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл;
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- вода дистиллированная;
- физиологический раствор (0,9% раствор натрия хлористого в дистиллированной воде);
- 3,8 % 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Вид анализируемого биологического материала

Реагент АДФ предназначен для исследования агрегации тромбоцитов в плазме человеческой крови и в цельной крови.

В течение 7-10 дней до исследования пациенты не должны принимать аспирин и нестероидные противовоспалительные препараты. За 12 ч до сбора проб крови пациенты должны воздерживаться от пищи, особенно жирной.

6.2 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.

Получение обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). ОТП получить центрифугированием при комнатной температуре (18-25°C) в течение 10 мин при 150-200 g. Для анализов достаточно 1,0 мл ОТП. Количество тромбоцитов в ОТП не должно превышать 500 ± 50 тыс/мм³.

Получение бедной тромбоцитами плазмы (БТП). Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получить центрифугированием цитратной крови в течение 20 мин при комнатной температуре и при 2500 g.

6.3 Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы и цельной крови до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре (от плюс 18 до плюс 25°C). Замораживание плазмы и цельной крови до анализа не допускается.

6.4 Ограничения по использованию биологического материала

Пробы крови пациентов не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, быть хилёзными, от пациентов с желтухой и липемией, содержать менее 75 тыс/мм^3 тромбоцитов и не должны иметь сниженный фибриноген.

6.5 Подготовка реагентов для исследования

Приготовление исходного раствора реагента

Лиофильно высушенный реагент АДФ перед растворением выдержать при комнатной температуре.

Внести во флакон с лиофильно высушенной АДФ 1,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при покачивании. Исходный раствор АДФ содержит 0,5 мг/мл (1×10^{-3} моль/л) АДФ. Раствор выдержать 20 мин при комнатной температуре.

Приготовление рабочих растворов для оптических агрегометров

Развести исходный раствор АДФ в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Приготовление рабочих растворов

Разведение исходного раствора	Объем исходного раствора АДФ, мл	Объем 0,9% р-ра NaCl, мл	Рабочая концентрация, мкМ/л (моль/л)	Конечная концентрация, мкМ/л (моль/л)	Тип агрегации
Исходный раствор	Лиофильно высушенный АДФ	1,0	1000 (1×10^{-3})	---	----
В 5 раз	0,20	0,80	200 (2×10^{-4})	20 (2×10^{-5})	Одноволновая необратимая
В 10 раз	0,10	0,90	100 (1×10^{-4})	10 (1×10^{-5})	Двухволновая или одноволновая необратимая
В 25 раз	0,10	2,40	40 (4×10^{-5})	4 (4×10^{-6})	Двухволновая или одноволновая необратимая
В 50 раз	0,05	2,45	20 (2×10^{-5})	2 (2×10^{-6})	Двухволновая или одноволновая обратимая (деагрегация)

Приготовление рабочих растворов для импедансных агрегометров

Рабочая концентрация 10^{-3} моль/л. (Использовать исходный раствор АДФ). Конечные концентрации АДФ в цельной крови $5-20 \times 10^{-6}$ моль/л.

7 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1 Последовательность проведения этапов исследования

До проведения анализа следует обязательно выдержать ОТП при комнатной температуре не менее 30 мин.

1. Для приготовления слепой пробы внести в кювету агрегометра 0,3 мл БТП.

2. Внести в другую кювету 0,3 мл ОТП и инкубировать эту кювету в течение 3 мин при температуре плюс 37°C, затем внести в эту кювету мешалку.

3. При необходимости установить 0 и 100% в соответствии с инструкцией к агрегометру.

4. В центр кюветы с ОТП внести 0,03 мл одной из рабочих концентраций АДФ.

5. В течение 5-10 мин наблюдать за процессом агрегации тромбоцитов. Время записи агрегатограммы (от 5 до 10 мин) зависит от активности тромбоцитов в исследуемой ОТП пациента.

При исследовании ОТП пациента необходимо каждый раз параллельно проводить анализ ОТП нормальной плазмы от здорового донора с нормальной функцией тромбоцитов, который не принимал аспирин и нестероидные противовоспалительные препараты в течение 10 дней до кроводачи.

7.2 Регистрация результатов

Провести запись агрегатограммы исследуемой плазмы пациента. Сравнить полученные результаты с данными контрольных анализов от здорового донора. По агрегатограмме определить % светопропускания при появлении первой волны агрегации и максимум светопропускания, %, за 5-10 мин агрегации.

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для проверки правильности работы агрегометров и правильности анализов с применением АДФ ежедневно параллельно с анализом образцов крови пациентов необходимо проводить контрольные измерения.

Контрольные образцы необходимо приготовить таким же способом, как опытные образцы.

Контролем должна служить обогащенная тромбоцитами плазма кадрового донора, который в течение 10 дней не принимал аспирин и нестероидные противовоспалительные препараты и имел нормальные функции тромбоцитов.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности лиофильно высушенного реагента – 24 месяца. Не использовать реагент после истечения срока годности! Леофильно высушенный реагент АДФ стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Реагент, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Исходный раствор АДФ можно хранить в плотно укупоренном состоянии при температуре от плюс 2 до плюс 8°C не более 10 суток.

Рабочие растворы АДФ предназначены для немедленного применения.

Транспортирование реагента 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.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

11 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 АДФ с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на $\frac{3}{4}$, 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 наборы реагентов «АДФ», 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.

12 ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев С.А. Клинико-лабораторная диагностика нарушений функции тромбоцитов / С.А. Васильев, А.Л. Берковский, А.Л. Мелкумян, А.В. Суворов, А.В. Мазуров, А.А. Козлов - Москва: ФГБУ Гематологический научный центр, МЗ РФ, Москва, 2013 - 76 с.

2. Newhouse P. The Variability of Platelet Aggregation. in Triplet DA ed. Platelet Function, Laboratory Evaluation and Clinical Application/ P. Newhouse , C. Clark - ASCP, Chicago, 1978- P. 69.

По вопросам, касающимся качества реагента, 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

Пронумеровано
и прошнуровано 8 листов
Президент МБОУ «Общество
больных гемофилией»

А.Жулёв

