

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения активности фактора VIII свертывания крови (Фактор VIII-тест) по ТУ 9398-020-05595541-2009»

НАЗНАЧЕНИЕ

Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения активности фактора VIII свертывания крови (Фактор VIII-тест) по ТУ 9398-020-05595541-2009» (далее по тексту – Фактор VIII-тест) предназначено для определения активности фактора VIII (ф. VIII) свертывания крови одностадийным клоттинговым методом в плазме крови пациентов с целью диагностики гемофилии А и тромбофилии, в свежемороженой донорской плазме (СЗП), криопреципитате и препаратах фактора VIII с целью определения их качества.

Фактор VIII-тест предназначен для работы ручным методом, а также на автоматических и полуавтоматических коагулометрах, способных регистрировать образование сгустка в присутствии каолина.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**Состав набора**

Эрилид, лиофильно высушенный аналог кефалина, - 1 флакон;
Каолин, суспензия в 0,9%-ом растворе натрия хлористого – 5,0 мл/флакон – 1 флакон;
0,025М раствор кальция хлористого - 5,0 мл/флакон – 1 флакон
Плазма субстратная VIII, лиофильно высушенная 1,0 мл/флакон - 1 флакон;
Плазма-калибратор лиофильно высушенная 1,0 мл/флакон - 1 флакон;
Буфер имидазольный концентрированный – 5,0 мл/флакон – 1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 20 анализов при расходе 50 мкл реагента на один анализ.

Принцип метода.

При добавлении к разведенной исследуемой плазме субстратной дефицитной плазмы происходит коррекция всех факторов свертывания кроме ф. VIII. Поэтому время свертывания в тесте АЧТВ смеси разведенной исследуемой и субстратной дефицитной по ф. VIII плазм зависит только от активности ф. VIII в исследуемой плазме. Активность ф. VIII определяют по калибровочному графику разведений плазмы-калибратора с установленной активностью ф. VIII.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения активности ф. VIII: билирубин в концентрации до 0,6 г/л, свободный гемоглобин – до 5 г/л, триглицериды – до 6 г/л и нефракционированный гепарин – до 1 МЕ/мл. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно заниженных результатов.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения активности ф. VIII не превышает 10%. Межфлаконная вариация определения активности ф. VIII не превышает 10%.

Точность

Допустимое отклонение от аттестованного значения при определении активности ф. VIII в контрольной плазме не превышает 10%.

Линейность

В тесте на «линейность» в диапазоне от 100 до 1% отклонение не более 10%.

Продолжительность АЧТВ

Продолжительность АЧТВ в Плазме субстратной VIII должна составлять не менее 80 - 150 секунд, в зависимости от используемого АЧТВ-реагента.

Чувствительность

Чувствительность определения ф. VIII не более 2%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор Фактор VIII-тест предназначен для диагностики *in vitro*.

Медицинское изделие (МИ) Набор Фактор VIII-тест относится к классу потенциального риска применения 2а, так как это МИ с измерительной функцией, с нефиксированным перечнем выполняемых лабораторных исследований, при применении которого терапевтическое решение должно приниматься после проведения дальнейших исследований, это МИ с умеренным индивидуальным риском и низким риском для общественного здоровья (Приложение 2 к Приказу МЗ № 4н от 6 июня 2012 г.).

⚠ В состав реагентов набора входит азид натрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводной системы с образованием потенциально взрывоопасных азидов металлов. В маркировку МИ внесен специальный знак предупреждения.

При работе с реагентом 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).

⚠ При работе с исследуемыми образцами крови пациентов следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, т.к. 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.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Коагулометр, способный регистрировать образование сгустка в присутствии каолина с набором пластиковых кювет;
– центрифуга лабораторная;
– секундомер (для ручного метода);
– термобаня, поддерживающая температуру плюс 37°C (для ручного метода);
– пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
– пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М) или

- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- мерный цилиндр;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага масштабно-координатная полугрифмическая.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**Вид анализируемого биологического материала**

Набор Фактор VIII-тест предназначен для определения активности ф. VIII в венозной плазме крови человека, в СЗП и в лечебных препаратах криопреципитата.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

Образцы СЗП и криопреципитата должны иметь вид прозрачной жидкости желтоватого цвета.

Процедура получения биологического материала**Получение плазмы венозной крови**

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 плюс (18-25)°С в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу по методу, описанному ниже, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками, замораживают и хранят при температуре не выше минус 20°С. При таких условиях образцы пригодны для анализа в течение 2 месяцев.

Подготовка СЗП для анализа

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

Подготовка криопреципитата для анализа

Замороженный криопреципитат привести в жидкое состояние, поместив мешок с криопреципитатом в водяную баню при температуре не выше плюс 37°С. Через 5-7 мин криопреципитат должен полностью растаять и приобрести вид прозрачного раствора желтоватого цвета. Для проведения анализа требуется 0,5 мл криопреципитата. Определить активность ф. VIII по методу, описанному ниже.

Условия хранения биологического материала

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

Растворы СЗП и криопреципитата хранению не подлежат.

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, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочий буферный раствор. Буфер имидазольный концентрированный развести в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерный цилиндр, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать).

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.

Плазма субстратная VIII. Во флакон с Плазмой субстратной VIII внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре плюс (18-25°С) составляет не более трех минут. Использовать через 20 минут после растворения.

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

Кальция хлорида 0,025 М раствор. Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть при 37°С. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ**Проведение анализа на автоматическом коагулометре**

- Выбрать на коагулометре программу для определения активности фактора VIII одностадийным клоттинговым методом;
- поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра;
- запустить программу построения калибровочной прямой (для каждой новой серии реагентов);
- поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра;
- запустить программу измерения;
- считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом**Построение калибровочного графика**

Использовать только пластиковые пробирки. Приготовить следующие разведения Плазмы-калибратора:

Пробирка, №	1	2	3	4	5	6
Активность фактора VIII в Плазме-калибраторе, %	A*	0,5A	0,25A	0,125A	0,0625A	0,01A
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						

*A – активность фактора VIII в Плазме-калибраторе, указанная в паспорте на набор. Во всех разведениях Плазмы-калибратора провести определение времени свертывания, сек, по методу, описанному ниже, и внести в память полуавтоматического коагулометра для построения калибровочного графика.

Для ручного метода на масштабно-координатной полулогарифмической бумаге построить калибровочный график зависимости времени свертывания, сек, (ось Y) от активности ф. VIII, %, (ось X) в Плазме-калибраторе. График должен представлять собой прямую линию.

Калибровочный график также можно построить, используя программу Microsoft Excel.

Подготовка исследуемых образцов для анализа

Приготовление плазмы пациента

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. Если активность ф. VIII более высокая и не удается по графику определить активность, исследуемый образец следует развести в 10 или в 20 раз рабочим буферным раствором по схеме:

Ожидаемая активность ф VIII в %	Разведение в раз	Объем плазмы мл	Объем буфера мл	Коэффициент К
Больше 150	20	0.1	1.9	4
От 50 до 150	10	0.1	0.9	2
Меньше 50	5	0.1	0.4	1

Приготовление образца СЗП

После размораживания СЗП развести буферным раствором в 5 и 10 раз. Определить активность ф. VIII одностадийным клоттинговым методом, описанным ниже. Полученное значение следует умножить на коэффициент разведения К, соответствующий разведению исследуемого образца. Коэффициент разведения К для разведения в 5 раз – 1, в 10 раз – 2.

Приготовление образца криопреципитата

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.

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

Приготовление образца препарата фактора VIII

Препарат фактора VIII развести и проанализировать согласно фармакопейной статье на препарат.

Проведение анализа

Внести в кювету анализатора или пробирку:	Объем
Одно из разведений плазмы-калибратора (исследуемой)	50мкл
Раствор плазмы субстратной дефицитной	50мкл
Кефалин-каолиновая смесь	50мкл
Инкубировать при 37°C, точно 3 минуты.	
Кальция хлорида 0,025 М раствор	50 мкл

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрируют время от момента добавления кальция хлорида до момента образования сгустка.

Для полуавтоматических или автоматических коагулологических анализаторов следует воспользоваться программой Фактор VIII-тест соответствующего анализатора. Для ручного метода, используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца, определить активность ф. VIII. Полученное значение следует умножить на коэффициент разведения К, соответствующий разведению исследуемого образца.

Интерпретация результатов

За единицу активности принимается активность фактора VIII, содержащегося в пуле донорской плазмы, взятой не менее чем от 300 здоровых доноров мужчин. Активность фактора VIII выражается в международных единицах (МЕ) или в процентах, причем 1МЕ/мл соответствует 100% активности.

Уровень активности фактора VIII в плазме в норме и патологии.

Активность фактора VIII в %	Заболевание
Больше 150	Почечная недостаточность, диабет, тромбофилическое состояние, прием гормональных контрацептивов
От 50 до 150	Норма
От 25 до 49	Гемофилия А, скрытая форма
От 5 до 24	Гемофилия А, легкая форма
От 1 до 5	Гемофилия А средней тяжести
Меньше 1	Гемофилия А, тяжелая форма

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности фактора VIII в плазме пациентов следует контролировать с помощью Плазмы контрольной, код КМ-2. Высокую активность фактора VIII в криопреципитате следует контролировать с помощью Патоплазмы VIII код КМ-8/9.

Мультикалибратор, код КМ-16 может быть использован для построения калибровочного графика.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

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

Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде при температуре плюс (2-8)°С.

Растворенные реагенты следует хранить в плотно укупоренном состоянии

Стабильность приготовленных реагентов

Реагенты	+2-8°C	+18-25°C	-18-20°C
Кефалин-каолиновая смесь	14 суток	1 сутки	2 месяца
Раствор плазмы-калибратора	8 часов	4 часа	2 месяца
Раствор плазмы субстратной дефицитной	8 часов	4 часа	2 месяца

Раствор кальция хлорида стабилен при комнатной температуре в течение всего срока хранения.

Оттаивать замороженные реагенты следует при температуре плюс 37°C. Оттаявшие реагенты следует использовать в течение 2 ч.

Транспортирование набора Фактор VIII-тест должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре плюс 2-8°C.

Допускается транспортирование и хранение набора при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

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 Фактор VIII-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу 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. Обеззараживание и утилизация поступивших реагентов происходит на специально оборудованных площадках в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 наборы реагентов «Плазма субстратная VIII», 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.

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
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

Дата утверждения инструкции 20 апреля 2009 г.

ЛИТЕРАТУРА И НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., «НьюДиамед», 2001.- 285 с.
- Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000.- 360 с.
- Г.А.Яровая, Е.А.Нешкова, А.Л.Берковский, Е.В.Сергеева, А.В.Суворов, А.Л.Мелкумян. Внутренний путь свертывания крови : учебно-методическое пособие - М.: ФГБОУ ДПО РМАПО, 2017. – 83 с.
- Turi DC, and Peerschke EI. Sensitivity of Three Activated Partial Thromboplastin Time Reagents to Coagulation Factor Deficiencies. Am J. Clin. Pathol. 1986; 85:43-49.
- 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 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
- Приказ Минздрава России от 19.01.2017 г №11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинских изделий».

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125167, г. Москва, Нарышкинская аллея, д. 5, стр. 2. тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru.