

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Реагент для определения активированного частичного тромбoplastинового времени клоттинговым методом (АЧТВ-кремний-реагент) по ТУ 21.20.23-063-05595541-2017»

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение

Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Реагент для определения активированного частичного тромбoplastинового времени клоттинговым методом (АЧТВ-кремний-реагент) по ТУ 21.20.23-063-05595541-2017» (сокращенное наименование – «АЧТВ-кремний-реагент») предназначено для определения активированного частичного тромбoplastинового времени (далее – «АЧТВ») в плазме крови с целью выявления широкого диапазона коагуляционных нарушений и мониторинга гепаринотерапии [1-5]. АЧТВ-кремний-реагент предназначен для работы на всех типах полуавтоматических и автоматических коагулометров.

Предназначенный пользователь

Определение продолжительности АЧТВ с помощью АЧТВ-кремний-реагента может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Реагент предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

Диагностическая роль

Определение АЧТВ является одним из наиболее распространенных и чувствительных скрининговых тестов для выявления широкого диапазона коагуляционных нарушений. Укорачивание АЧТВ свидетельствует о тромбофилии, тромбозомболии и тромбозах [3]. Удлинение АЧТВ связано с наследственным или приобретенным дефицитом фибриногена, протромбина, факторов V, VIII, IX, X, XI, XII, факторов контакта, присутствия специфических ингибиторов свертывания, при приеме пероральных антикоагулянтов и лечении гепарином и гирудином, при наличии волчаночного антикоагулянта и ДВС-синдрома [3].

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

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

НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ ТЕСТА

Значения АЧТВ зависят от суммарной активности факторов внутреннего и внешнего путей свертывания крови. Именно поэтому тест АЧТВ применяется для скрининга с целью выявления патологии этих факторов. АЧТВ-кремний-реагент обладает достаточной чувствительностью к гепарину. При применении нефракционированного гепарина (НФГ) АЧТВ-кремний-реагент используется для мониторинга антикоагулянтного действия НФГ.

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАГЕНТА

Состав комплексов реагента

АЧТВ-кремний-реагент поставляется в 4 вариантах исполнения:

Вариант исполнения 1:

АЧТВ-кремний-реагент, лиофильно высушенный – объем после восстановления 5,0 мл, во флаконе - 1 флакон.

Номер по каталогу производителя - ПГ-8/1.

Вариант исполнения 2:

АЧТВ-кремний-реагент, лиофильно высушенный – объем после восстановления 5,0 мл, во флаконе - 10 флаконов.

Номер по каталогу производителя - ПГ-8/2.

Вариант исполнения 3:

АЧТВ-кремний-реагент, жидкий – 5,0 мл во флаконе - 1 флакон.

Номер по каталогу производителя - ПГ-8/3.

Вариант исполнения 4:

АЧТВ-кремний-реагент, жидкий – 5,0 мл во флаконе - 10 флаконов.

Номер по каталогу производителя - ПГ-8/4.

АЧТВ-кремний-реагент представляет собой смесь фосфолипидов, полученных из мозга кроликов, и силикагеля в HEPES-буфере с добавлением бычьего сывороточного альбумина, стабилизаторов и консерванта азида натрия в концентрации 0,05 г/л.

Число анализируемых проб биологического материала

Один флакон реагента предназначен для проведения 100 анализов плазмы крови при расходе по 50 мкл реагента на один.

Принцип метода

Метод основан на определении времени свертывания исследуемой плазмы крови в присутствии активатора внутреннего пути свертывания и фосфолипидов. В качестве активатора (отрицательно заряженной поверхности) используется силикагель. При проведении теста используют фосфолипиды животного происхождения и ионы кальция для рекальцификации плазмы.

Инкубация плазмы с поверхностным активатором приводит к активации факторов контакта и последовательной активации факторов внутреннего и общего путей свертывания крови на поверхности фосфолипидных везикул. В процессе измерения АЧТВ регистрируют время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка [1-4]. С целью стандартизации реакцию проводят при постоянной температуре плюс 37°C.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

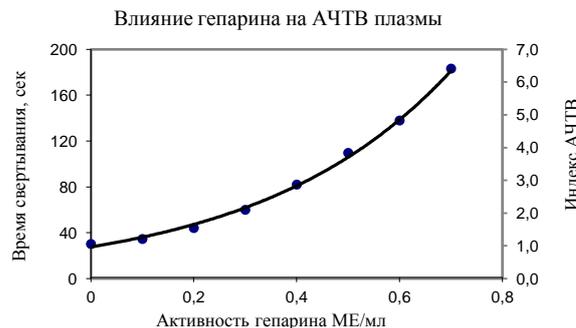
Аналитическая специфичность

Результаты определения АЧТВ могут зависеть от назначаемых препаратов. Эстрогены у мужчин и оральные контрацептивы у женщин снижают значения АЧТВ. Препараты дифенина, гепарина, варфарина, гирудина и других прямых ингибиторов тромбина могут повышать АЧТВ. На результаты определения АЧТВ влияет выбор антикоагулянта и соблюдение точного соотношения антикоагулянт:кровь [1-4].

Следующие вещества не влияют на правильность определение АЧТВ: билирубин в концентрации до 0,2 г/л; гемоглобин (свободный) – до 1,0 г/л; триглицериды – до 1,2 г/л. Уменьшение активности факторов внутреннего пути свертывания ниже 50% приводит к увеличению АЧТВ до патологических значений [1-2].

Аналитическая чувствительность

АЧТВ-кремний-реагенты чувствительны к присутствию гепарина с минимальной активностью, равной 0,1 МЕ/мл [1], что позволяет использовать этот реагент для мониторинга гепаринотерапии. Влияние гепарина на продолжительность АЧТВ представлено на графике.



Значения АЧТВ, соответствующие нормальным

Диапазон нормальных значений АЧТВ, полученных при определении АЧТВ с помощью АЧТВ-кремний-реагентов у 50 - 100 здоровых доноров, указан в паспорте для каждой серии реагента.

Ограничения метода

Метод определения АЧТВ не является линейным и зависит от активности большого числа факторов свертывания. Поэтому для уточнения причины удлинения или укорачивания АЧТВ рекомендуется проводить дополнительные исследования.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения АЧТВ в одной пробе плазмы одним набором не превышает 5%. Коэффициент вариации результатов определения АЧТВ в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 5%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

АЧТВ-кремний-реагенты предназначены только для диагностики *in vitro*.

Класс потенциального риска применения медицинского изделия - 2а.

АЧТВ-кремний-реагент не является источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляет рисков, связанных с возможностью возгорания.

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).

При работе с реагентом и исследуемыми образцами 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.

В состав АЧТВ-кремний-реагента входит смесь фосфолипидов, полученных из мозга кроликов, являющегося потенциально инфицированным биологическим материалом. Безопасность каждой партии биологического материала при производстве АЧТВ-кремний-реагента подтверждается ветеринарным сертификатом и удостоверением о качестве изготовителя мозга кроликов. Тем не менее, не следует исключать остаточного минимального риска при работе с реагентом.

АЧТВ-кремний-реагент содержит консервант азид натрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводной системы с образованием потенциально взрывоопасных азидов металлов.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Автоматический или полуавтоматический коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная, позволяющая проводить центрифугирование со скоростью 1000-3000 об/мин;
- термобаня, поддерживающая температуру плюс $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$;
- секундомер (для определения АЧТВ на полуавтоматическом коагулометре);
- пробирки центрифужные пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М);
- дозаторы механические или полуавтоматические одноканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости от 50 до 200 мкл и от 1 до 5 мл;
- наконечники одноразовые для дозаторов;
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 М);
- «Плазма контрольная (пул здоровых доноров) (Плазма Н) по ТУ 9398-004-05595541-2009» (ФСР 2009/05361 от 25.10.2016 г.) производства МБООИ «Общество больных гемофилией»;
- «Реагент для рекальцификации цитратной плазмы и цитратной крови (Кальций хлористый) по ТУ 9398-039-05595541-2011» (ФСР 2012/13122 от 01.08.2016 г.) производства МБООИ «Общество больных гемофилией»;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

АЧТВ-кремний-реагенты предназначены для определения активированного частичного тромбoplastинового времени в плазме крови. Образцы плазмы крови для анализа не должны иметь признаков гемолиза, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

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 г).

После первого центрифугирования плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. Немедленно после центрифугирования перенести верхний слой плазмы (не более половины объема) в пластиковую пробирку. Остаточное содержание тромбоцитов в плазме не должно превышать 1000/мкл плазмы.

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.

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 дегградация белковых веществ.

При скрининге пациентов на присутствие неспецифических ингибиторов свертывания (волчаночный антикоагулянт) тромбоциты или тромбоцитарные фрагменты в исследуемой плазме влияют на результаты анализа, маскируя нарушения коагуляционных тестов, вызванных присутствием волчаночного антикоагулянта. Для исследования необходимо использовать плазму крови, лишенную тромбоцитов, полученную двойным центрифугированием.

Плазму, содержащую нефракционированный гепарин, следует центрифугировать не позднее, чем через один час после получения крови, хранить при комнатной температуре и анализировать не позднее, чем через 4 часа после получения.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

АЧТВ-кремний-реагент, лиофильно высушенный (ПГ-8/1, ПГ-8/2)

Во флакон с лиофильно высушенным АЧТВ-кремний-реагентом внести 5 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Время растворения АЧТВ-кремний-реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре от 18 до 25°С должно составлять не более 3 минут. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после растворения.

АЧТВ-кремний-реагент, жидкий (ПГ-8/3, ПГ-8/4)

Готов к использованию и не требует специальной подготовки для проведения анализа.

Кальций хлористый 0,025 М раствор

Реагент готов для проведения анализа. Перед анализом прогреть реагент при температуре плюс 37°С в течение 5 минут, повторно не прогревать.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения АЧТВ.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу измерения.
- Считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре

Анализ проводят по следующей схеме:

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма контрольная (исследуемая), мкл	50
АЧТВ-кремний-реагент, мкл	50
Инкубировать при 37°С точно 3 мин.	
Кальций хлористый 0,025 М раствор, мкл	50

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе измерения АЧТВ регистрировать время от момента добавления в кювету коагулометра раствора кальция хлорида до момента образования сгустка.

Результаты измерения активированного частичного тромбопластинового времени пациента должны включаться в отчет как «АЧТВ в секундах». Эти результаты должны соотноситься с нормальным диапазоном значений АЧТВ, принятым в лаборатории для данного реагента, который также должен быть включен в отчет.

Значения АЧТВ контрольной плазмы никогда не должны использоваться в качестве нормального диапазона.

АЧТВ-кремний-реагенты чувствительны к присутствию гепарина, поэтому их возможно использовать в качестве реагентов, позволяющих проводить мониторинг гепарино-терапии.

При мониторинге гепарино-терапии следует учитывать, что:

- Время от взятия образца крови до проведения анализа должно быть не более 1 часа, так как период полураспада нефракционированного гепарина составляет около 1,5 ч.
- Образец крови для анализа должен быть отобран таким образом, чтобы предотвратить агрегацию и активацию тромбоцитов с последующим выбросом фактора PF4, инактивирующего гепарин.
- Когда возможно, следует до начала терапии гепарином установить базовые показатели АЧТВ пациента.
- Полученные значения выражают как индекс АЧТВ (отношение АЧТВ гепаринизированной плазмы пациента к АЧТВ нормальной плазмы).
- Значения АЧТВ могут меняться в зависимости от используемых методик, оборудования, партий реагента и гепарина, поэтому каждой лаборатории следует принять собственные терапевтические диапазоны, и проверять их при изменении одного из перечисленных факторов.

АЧТВ-кремний-реагенты можно использовать при определении активностей факторов внутреннего пути свертывания.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения АЧТВ следует контролировать с помощью реагента «Плазма контрольная (пул здоровых доноров) (Плазма Н) по ТУ 9398-004-05595541-2009» производства МБООИ «Общество больных гемофилией», номер по каталогу КМ-1.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности АЧТВ-кремний-реагентов – 24 месяца. Не использовать реагенты после истечения срока годности!

Жидкий и лиофильно высушенный реагенты стабильны в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°С. Допускается хранение реагентов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание жидкого АЧТВ-кремний реагента не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат! Раствор лиофильно высушенного реагента следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность приготовленного АЧТВ-реагента

Вариант исполнения	Температура хранения °С, в диапазоне	
	+2-8	+18-25
АЧТВ-кремний-реагент, лиофильно высушенный, реконструированный	14 суток	1 сутки
АЧТВ-кремний-реагент, жидкий	14 суток	1 сутки

Допускается дробное использование как приготовленного раствора лиофильно высушенного реагента, так и готового жидкого реагента в соответствии с указанными выше условиями хранения.

Транспортирование АЧТВ-кремний-реагентов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авто-рефрижераторах с использованием термоиндикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование реагентов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток, замораживание АЧТВ-кремний-реагента лиофильно высушенного при транспортировании допускается, замораживание АЧТВ-кремний-реагента жидкого при транспортировании не допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие АЧТВ-кремний-реагентов требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

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 АЧТВ-кремний-реагентами 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 АЧТВ-кремний-реагенты, не подлежащий использованию и с истекшим сроком годности, относится 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 07.июня.2018.

ЛИТЕРАТУРА И НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

- Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. - М.: Ньюдиамед, 2001. - 285 с.
- Берковский, А.Л. Скрининговые тесты плазменного гемостаза. Методы исследования / А.Л. Берковский, Е.В. Сергеева., Т.М. Простакова, А.Л. Мелкумян, А.В.Суворов. - М., 2016. - 70 с.
- Берковский, А.Л. Методы определения активности гепарина (учебно-методическое пособие) / А.Л. Берковский и др. - М., 2015. - 64 с.
- Долгов, В.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В.В. Долгов, П.В. Свирин. - М., 2005 - 227 с.
- Langdell, R.D. Effect of anti-hemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage anti-hemophilic factor assay procedure / R.D. Langdell, R.H. Wagner, K.M. Brinhous. // J. Lab. Clin. Med. - 1953 - Vol. 41 - P. 637-647.
- 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.
- ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
- 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: 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