



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения активности VIII фактора свертывания крови (Фактор VIII – тест).

НАЗНАЧЕНИЕ

Фактор VIII – это гликопротеид с молекулярной массой приблизительно 280000 дальтон, локализованный кроме плазмы в печени, селезенке и лимфоцитах. В плазме фактор VIII циркулирует в нековалентно связанном комплексе с фактором фон Виллебранда. Фактор VIII активируется тромбином и фактором Ха, и является кофактором фактора IXa в процессе активации фактора X в присутствии фосфолипидов и ионов кальция.

Набор предназначен для измерения активности фактора VIII одностадийным клоттинговым методом в:

- в плазме человеческой крови;
- в лечебных препаратах криопреципитата.

Набор реагентов предназначен для работы на всех типах полуавтоматических коагулометров, имеющих механическую и оптико-механическую систему регистрации сгустка.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

Эририд (кефалин) (1 мл) – 1 флакон;
Каолин 0,5% суспензия (5 мл) – 1 флакон;
Кальция хлорида 0,025 М раствор (5 мл) – 1 флакон;
Буфер имидазоловый концентрированный (5 мл) – 1 флакон;
Плазма субстратная дефицитная по фактору VIII (1 мл) – 1 флакон;
Плазма-калибратор (1 мл) – 1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала

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

Принцип метода.

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определения активности фактора 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.

Чувствительность

В зависимости от чувствительности коагулометра метод позволяет определять 1 – 2% активности фактора VIII.

Воспроизводимость

Допустимое отклонение активности фактора VIII в плазме-калибраторе от аттестованного значения не более 10%.

Коэффициент вариации результатов определения не превышает 10%. Допустимый разброс результатов определения активности фактора VIII в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Точные значения активности фактора VIII в плазме-калибраторе устанавливаются при аттестации каждой серии и указывают в паспорте.

Линейность

Линейность определения от 1% до 100% активности.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*. Класс опасности 2а.

При работе с набором реагентов следует соблюдать правила, описанные в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Инструкция утверждена Минздравом СССР в 1991 г.).

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, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная;
- 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);
- вода дистиллированная;
- мерный цилиндр;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов Фактор VIII-тест предназначен для определения активности фактора VIII в плазме человеческой крови и в лечебных препаратах криопреципитата.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, 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 (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 г).

Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками, замораживают и хранят при температуре не выше -20°C. При таких условиях образцы пригодны для анализа в течение 2-х месяцев.

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 2 ч при комнатной температуре (18-25°C) и не более 4 ч при температуре 2-8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

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 имидазоловый концентрированный развести в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерный цилиндр, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать). Рабочий буферный раствор хранить при температуре +2-8°C не более 1 месяца.

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 дефицитная по фактору VIII. Во флакон с субстратной дефицитной плазмой внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. 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°C. 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

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.

Проведение анализа

Непосредственно перед проведением анализа исследуемую плазму развести рабочим буферным раствором по следующей 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

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.

При построении калибровочного графика вручную значения активности фактора VIII в разведениях плазмы-калибраторов, % отложить на оси X полулогарифмической координатной сетки (скачать с сайта www.renam.ru). На оси Y отложить значения времени свертывания каждого разведенного образца плазмы-калибратора, сек. Через полученные точки провести калибровочный график, который должен представлять собой прямую линию.

Используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца определить активность фактора VIII. Полу-

ченное значение следует умножить на коэффициент 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 следует контролировать с помощью Плазмы контрольной, код КМ-2 и патоплазмы VIII код КМ-8/9.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде при температуре 2-8°C. Растворенные компоненты набора 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.

Транспортирование наборов должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание наборов 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 реагентов Фактор VIII-тест 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.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по 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

