

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для исследования агрегационной активности тромбоцитов (АГРЕНАМ) по ТУ 9398-277-05595541-2008»

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение. Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для исследования агрегационной активности тромбоцитов (АГРЕНАМ) по ТУ 9398-277-05595541-2008», сокращенное наименование – «АГРЕНАМ» предназначено для исследования агрегационной функции тромбоцитов крови человека методом агрегатометрии.

Предназначенный пользователь. Исследование агрегации тромбоцитов с помощью набора АГРЕНАМ может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

Диагностическая роль. Набор АГРЕНАМ, состоящий из индукторов агрегации аденозин 5'-дифосфата, коллагена и ристоцетина, предназначен для исследования агрегационной активности тромбоцитов с целью выявления активации или нарушения функций этих клеток для диагностики приобретенных и наследственных тромбоцитопатий.

Область применения. Область применения изделия – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

НАУЧНАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ ТЕСТА

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

АДФ локализуется в плотных гранулах тромбоцитов, с помощью АДФ тромбоцит активирует сам себя, тем самым способствуя изменению формы, деагрегации и агрегации.

Коллаген используется для исследования агрегации тромбоцитов с целью диагностики тромбастении Гланцмана, синдрома Вискотта-Олдрича, дефектов рецепторов коллагена GpVI и GpIIa, дефицита пулов хранения.

Ристоцетин (ристомин) используется для исследования агрегации тромбоцитов с целью диагностики болезни Виллебранда.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

АДФ, лиофильно высушенный с концентрацией 0,2 мМ/л – 2 флакона;
Коллаген, лиофильно высушенный с концентрацией 0,2% – 2 флакона;
Ристоцетин, лиофильно высушенный с концентрацией 1,5% – 2 флакона.

Число анализируемых проб биологического материала

Каждый флакон с лиофильно высушенными индукторами агрегации предназначен для проведения от 10 до 20 анализов в зависимости от используемого анализатора и концентрации.

Принцип метода. *In vivo* тромбоциты участвуют в первичном гемостазе вначале приликая, а затем агрегируя в месте повреждения сосуда. *In vitro* агрегация тромбоцитов может быть инициирована добавлением различных индукторов: АДФ, коллаген, ристоцетин, тромбин, адреналин, арахидоновая кислота, которые позволяют проводить дифференциальную диагностику тромбоцитопатий. Индукторы, добавленные к обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП), вызывают адгезию тромбоцитов. При этом нормальные тромбоциты изменяют свою форму, высвобождают эндогенный АДФ и агрегируют. Исследование агрегации тромбоцитов проводят в оптическом или импедансном агрегатометре. Оптические приборы регистрируют изменение пропускания света через кювету с ОТП в процессе агрегации тромбоцитов под действием индуктора агрегации, импедансные приборы регистрируют агрегацию в цельной крови по изменению электропроводности.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Растворимость АДФ и ристоцетина в воде при комнатной температуре (18-25°C) не более 30 сек, коллагена не более 3 мин.

Аналитическая специфичность

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

Диапазон определяемых значений

В обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП) здоровых доноров агрегационная активность приблизительно составляет с: АДФ – 50-80%, с коллагеном – 50-80%; с ристоцетином – 55-90%.

Величина агрегационной активности тромбоцитов, %, в ОТП с каждым индуктором агрегации должна быть установлена в каждой лаборатории самостоятельно.

Воспроизводимость результатов

Прецизионность и воспроизводимость теста основаны на экспериментально установленном международном консенсусе и составляют $\pm 15\%$ [2]. Коэффициент вариации и межфлаконная вариация при исследовании агрегации тромбоцитов под действием индукторов не выше 15%.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор АГРЕНАМ предназначен только для диагностики *in vitro*. Класс потенциального риска применения набора – 2а.

Реагент, входящие в состав набора не токсичны, не взрывоопасны, не обладает аллергенным действием, при растворении в дистиллированной воде не выделяет токсичных продуктов.

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.

В состав набора АГРЕНАМ входит коллаген, полученный из тканей крупного рогатого скота, являющихся потенциально инфицированным биологическим материалом. Безопасность каждой партии биологического материала подтверждается ветеринарным сертификатом изготовителя. Тем не менее, не следует исключать остаточного минимального риска при работе с реагентом.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Агрегометр любого типа;
- кюветы с мешалками к агрегометру
- 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;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор АГРЕНАМ 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.

Процедура получения биологического материала

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) 3-замещенным 5,5-водным цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) 3-замещенным 2-водным 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.

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.

Ограничения по использованию биологического материала

Пробы крови пациентов не должны быть гемолизованы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, быть хилезными, от пациентов с желтухой и липемией, содержать менее 75 тыс/мм³ тромбоцитов и не должны иметь сниженный фибриноген.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка реагентов для исследования

Лиофильно высушенные реагенты перед растворением выдержать при комнатной температуре.

Приготовление рабочих растворов АДФ.

Внести во флакон с лиофильно высушенным АДФ 1,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое флакона при покачивании.

Концентрация АДФ в растворе равна 0,2 мМ/л (2×10^{-4} моль/л = 200 мкМ/л).

Одноволевая агрегация, рабочая концентрация АДФ - 200 мкМ/л.

Конечная концентрация АДФ в ОТП - 2×10^{-5} моль/л = 20 мкМ/л

Бивольновая агрегация, рабочая концентрация АДФ - 10×10^{-5} моль/л.

Конечная концентрация АДФ в ОТП - 10×10^{-6} моль/л

Развести исходный раствор АДФ в 2 раза физиологическим раствором

(1 объем раствора АДФ + 1 объем физиологического раствора).

Бивольновая агрегация, рабочая концентрация АДФ - 2×10^{-5} моль/л.

Конечная концентрация АДФ в ОТП - 2×10^{-6} моль/л

Развести исходный раствор АДФ в 10 раз физиологическим раствором (0,10 мл раствора АДФ + 0,9 мл физиологического раствора).

Приготовление рабочих растворов коллагена.

Внести во флакон с лиофильно высушенным коллагеном 1,0 мл дистиллированной воды, дать регидратироваться содержимому флакона в течение 3-5 минут и тщательно перемешать пипетированием. Концентрация коллагена в растворе равна 2 мг/мл.

Для получения раствора коллагена с концентрацией 1 мг/мл к 1 объему исходного раствора добавить равный объем физиологического раствора NaCl.

Приготовление рабочих растворов ристоцетина.

Внести во флакон с лиофильно высушенным ристоцетином 0,5 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при покачивании. Полученный раствор содержит 1,5% (15 мг/мл) ристоцетина – рабочий раствор.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 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 раствора соответствующего индуктора агрегации.
5. В течение 5 - 15 мин наблюдать за процессом агрегации тромбоцитов.

Определение агрегации тромбоцитов от каждого пациента необходимо проводить 2-3 раза и рассчитывать среднее арифметическое значение полученного результата.

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Провести запись агрегатограммы исследуемой плазмы пациента. Сравнить полученные результаты с данными контрольных анализов от здорового донора и от пациента, принимающего аспирин.

По агрегатограмме определить лаг-фазу, % светопропускания при появлении первой волны агрегации и максимум светопропускания, %, за 5 - 10 мин агрегации.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

В нормальной плазме здоровых лиц уровень агрегационной активности тромбоцитов под действием АДФ составляет 50-80%;

Агрегация под действием АДФ отсутствует при тромбастении Гланцмана, снижена при синдроме Вискотта-Олдрича, отсутствует вторая волна агрегации при дефиците пулов хранения. Аспирин в дозе 0.25 г/сутки полностью блокирует агрегацию-реакцию выброса (отсутствует вторая волна агрегации).

В нормальной плазме здоровых лиц уровень агрегационной активности тромбоцитов под действием коллагена составляет 50-80%;

Агрегация тромбоцитов под действием коллагена резко снижена или полностью отсутствует при тромбастении Гланцмана, синдроме Вискотта-Олдрича, дефектах рецепторов коллагена, дефиците пулов хранения, при нарушении метаболизма арахидоновой кислоты.

В нормальной плазме здоровых лиц уровень агрегационной активности тромбоцитов под действием ристоцетина составляет 55-90%;

Агрегация под действием ристоцетина отсутствует или снижена при синдроме Бернара-Сулье или болезни Виллебранда I или III типов. Агрегация в 1,5-2 раза выше нормы может наблюдаться при синдроме Виллебранда тромбоцитарного типа

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольный материал для ежедневного контроля нормы должен состоять из свежесобранной обогащенной тромбоцитами плазмы, полученной от кадрового донора, который имеет нормальную функцию тромбоцитов и не принимал аспирин и нестероидные противовоспалительные препараты в течение 10 дней до анализа.

Контрольный материал для контроля патологии должен состоять из свежесобранной обогащенной тромбоцитами плазмы, полученной от пациента, регулярно принимающего аспирин в дозе 100 мг/сутки.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Срок годности набора – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности! Лиофильно высушенные индукторы агрегации стабильны в течение всего срока годности набора при условии хранения в укупоренном виде при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается хранение при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание наборов допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, использованию не подлежат!

Растворы реагентов можно хранить в плотно укупоренном состоянии при температуре от плюс 2 до плюс 8°C не более 3 суток, в замороженном состоянии при температуре от минус 18 до минус 24°C не более 2 месяцев.

Транспортирование наборов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в термоконтейнерах, содержащих хладозлементы, 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.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора Реахром-АТIII требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.







МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» отходы от работы с набором АГРЕНАМ 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.

Наборы реагентов АГРЕНАМ, 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
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

Дата утверждения инструкции 1 октября 2008 г.

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.

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.
- 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».

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