

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов на основе хромогенного субстрата (далее – набор реагентов) предназначен для количественного определения фактора VIII хромогенным методом в плазме крови человека.

2 ПРИНЦИП МЕТОДА

Дефицит фактора VIII вызывает тяжелое нарушение свертываемости крови, гемофилию А. Тяжесть этого нарушения свертываемости крови обратно пропорциональна концентрации фактора VIII. Пациенты с гемофилией А обычно классифицируются в соответствии с активностью фактора VIII на три категории:

<0,01 МЕ / мл = тяжелая,

0,01-0,04 МЕ / мл = умеренная и

0,05-0,25 МЕ / мл = легкая гемофилия.

В присутствии Ca^{2+} и фосфолипидов фактор X активируется до фактора Ха фактором IXa. Данная активация зависима от фактора VIII, который действует как кофактор фактора IXa в этой реакции. При использовании оптимальных количеств Ca^{2+} , фосфолипидов, фактора IXa и избытка фактора X, скорость активации фактора X линейно связана с количеством фактора VIII.

Фактор Ха гидролизует хромогенный субстрат, освобождая, таким образом, хромофорную группу – пара-нитроанилин (pNA). Абсорбция свободного пара-нитроанилина (pNA) считывается фотометрически при 405 нм. Генерируемый фактор Ха и, следовательно, интенсивность цвета пропорциональны активности фактора VIII в образце. Гидролиз хромогенного субстрата тромбином предотвращается добавлением синтетического ингибитора тромбина вместе с субстратом.

3 КОМПЛЕКТНОСТЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В комплект поставки набора реагентов входят инструкция по применению и следующие компоненты набора реагентов:

- хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 1 флакон;
- фактор IXa + X, лиофильно высушенный – 4 флакона;
- раствор кальция хлорида 0,025 моль/л 6,0 мл – 1 флакон;
- раствор фосфолипидов 2 мл – 1 флакон;
- буфер 20 мл – 1 флакон.

4 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Содержание и эксплуатация зданий и помещений, в которых осуществляется производство набора реагентов, должны соответствовать требованиям санитарных норм и правил «Специфические санитарно-эпидемиологические требования к содержанию и эксплуатации организаций здравоохранения, иных организаций и индивидуальных предпринимателей, которые осуществляют медицинскую, фармацевтическую деятельность», утвержденными постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 3 марта 2020 г. № 130.

Персонал, использующий набор реагентов, должен быть обеспечен в установленном порядке средствами индивидуальной защиты и спецодеждой, должен соблюдать правила личной гигиены и асептики, принятые в медицинских учреждениях в отношении препаратов крови, в соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь. Меры предосторожности при выполнении работ с условно-патогенным биологическим материалом должны выполняться в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 февраля 2013 г. № 11.

Утилизация брака и отходов от набора реагентов после его использования проводится в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. № 14.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Следующее оборудование, материалы и реактивы не входят в комплектность набора реагентов и для работы с набором реагентов должны быть приобретены отдельно:

- плазма-калибратор (нормальная плазма человека, полученная, по меньшей мере, от 20 здоровых доноров и калиброванная по Международному стандарту фактора свертывания VIII);
- контрольная плазма с известным количеством фактора свертывания VIII;
- уксусная кислота 20% или лимонная кислота 2 %;
- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках микропланшет при длине волны 405 нм;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкость от 5 до 1000 мкл;
- термостат суховоздушный ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$);
- вортекс со сменной скоростью вращения;
- секундомер;
- мерный цилиндр;
- пробирки и флаконы пластиковые;
- микропланшет пластиковый плоскодонный (не использовать микропланшет предназначенный для нанесения покрытия);
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага масштабно-координатная полулогарифмическая;
- вода дистиллированная.

Допускается использование аналогичного оборудования и материалов других изготовителей с метрологическими и техническими характеристиками или показателями качества не хуже указанных выше.

6 ТРЕБОВАНИЯ К ИССЛЕДУЕМЫМ ОБРАЗЦАМ

На один анализ требуется 25 мкл плазмы крови человека.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью. Образцы плазмы крови должны иметь вид прозрачной жидкости желтоватого цвета без взвешенных частиц.

Образцы СЗП и криопреципитата подготовить к анализу согласно инструкций по применению к ним и использовать для анализа не позднее 30 минут после оттаивания.

Калибровочные и контрольные образцы плазмы подготовить к анализу согласно инструкций по применению к ним и использовать для анализа в течение 30 минут.

Время хранения исследуемых образцов плазмы до анализа не более 4 часов при комнатной температуре и не более 8 часов при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20 °С и хранение при этой температуре не более 2 недель. Растворы СЗП и криопреципитата хранению не подлежат.

7 ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа вскрыть упаковку набора реагентов, извлечь все компоненты. При дробном использовании набора реагентов после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть резиновыми пробками и закручивающимися крышками. Флаконы с реагентами поместить в холодильник и хранить при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.1 Раствор кальция хлорида 0,025 моль/л готов к использованию. В соответствии с числом используемых лунок отобрать в чистый пластиковый флакон необходимое количество раствора кальция хлорида 0,025 моль/л.

Хранение: открытый оригинальный флакон стабилен в течение 3 месяцев при температуре 2-8 °С.

7.2 Раствор фосфолипидов готов к использованию. Осторожно встряхнуть перед использованием. В соответствии с необходимым количеством фактора-реагента отобрать необходимое количество раствора фосфолипидов.

Хранение: открытый оригинальный флакон стабилен в течение 3 месяцев при температуре 2-8 °С.

7.3 Буфер 20 мл готов к использованию. В соответствии с необходимым количеством рабочего буферного раствора отобрать в чистый пластиковый флакон необходимое количество буфера. Рабочий буферный раствор следует готовить перед каждой новой серией анализов набором реагентов.

Хранение: открытый оригинальный флакон стабилен в течение 3 месяцев при температуре 2-8 °С.

7.4 Подготовка хромогенного субстрата

Во флакон с лиофилизированным хромогенным субстратом внести 12,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре составляет не более трех минут. Готов к проведению анализа через 10 минут после растворения. В соответствии с числом используемых лунок отобрать в чистый пластиковый флакон необходимое количество хромогенного субстрата.

Внимание! Если раствор субстрата выглядит желтым, откажитесь от его хранения и дальнейшего использования.

Хранение: восстановленный хромогенный субстрат стабилен в течение 1 месяца при температуре 2-8 °С в оригинальном флаконе.

7.5 Подготовка фактора IXa + X

Во флакон с лиофилизированным фактором IXa + X внести 3,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре составляет не более трех минут. Использовать через 10 минут после растворения. В соответствии с необходимым количеством фактор-реагента отобрать необходимое количество фактора IXa + X.

Хранение: восстановленный фактор IXa + X стабилен 12 часов при температуре 2-8 °С, 2 недели при температуре -30 °С или 1 месяц при температуре -70 °С в оригинальном флаконе. Избегать хранения при температуре -20 °С.

7.6 Приготовление рабочего буферного раствора

Рабочий буферный раствор приготовить разведением исходного буфера в 10 раз, смешав 1 объем исходного буфера с 9 объемами дистиллированной воды в пластиковом флаконе. Получившийся раствор пометить как рабочий буферный раствор.

Хранение: неиспользованный рабочий буферный раствор хранению не подлежит.

7.7 Приготовление фактор-реагента

Фактор-реагент приготовить в чистом пластиковом флаконе, в соответствии с числом используемых лунок в анализе, смешав 5 объемов фактора IXa + X с 1 объемом раствора фосфолипидов.

Хранение: смесь стабильна в течение 4 часов при температуре 2-8 °С или 12 часов на льду.

8 КАЛИБРОВКА

Калибровочный график требуется для каждой новой серии анализов набором реагентов. При определении активности фактора VIII в плазме, для построения калибровочного графика используют плазму-калибратор (нормальная плазма человека, полученная, по меньшей мере, от 20 здоровых доноров).

Для получения стандартных калибровочных разведений следует разбавить плазму-калибратор рабочим буферным раствором, предварительно охлажденным до температуры 2-8 °С, до следующих соотношений (таблица 1). Разведения осторожно перемешать. При уровне фактора VIII ниже 20 % (пациенты с гемофилией А) следует использовать разведения, соответствующие низкому диапазону содержания фактора VIII (1 – 20 %).

По международной номенклатуре 1 МЕ активности фактора VIII – количество фактора VIII содержащееся в 1 мл плазмы 100% активности этого фактора.

Прописанные процентные значения стандартных разведений в таблице 1 соответствуют плазме-калибратору, содержащей 1,0 МЕ фактора VIII/мл. В случае, если содержание фактора VIII в плазме-калибраторе отличается от этого значения, следует использовать соответствующий поправочный коэффициент.

Данные оптической плотности стандартных калибровочных разведений для калибровочного графика получить по схеме, описанной в пункте 8.

ПРИМЕЧАНИЕ: испытание должно быть выполнено в течение 30 минут после приготовления стандартных калибровочных разведений.

Таблица 1 – Схема получения стандартных разведений

Активность фактора VIII, %	Первичное разведение		Вторичное разведение	
	Плазма-калибратор, мкл	Рабочий буферный раствор, мкл	Плазма-калибратор первичного разведения, мкл	Рабочий буферный раствор, мкл
Нормальный диапазон активности фактора VIII (21 – 150 %)				
150	0	0	25	3000
120	200	50	25	3000
100	100	50	25	3000
75	100	100	25	3000
50	50	100	25	3000
21	50	300	25	3000
Низкий диапазон активности фактора VIII (1 – 20 %)				
20	50	200	25	2000
15	50	260	25	2000
10	50	400	25	2000
5	25	400	25	2000
1	25	2000	25	2000

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Набор реагентов рассчитан на 240 определений методом микропланшет. Все стадии анализа должны проводиться строго в пластиковом материале.

Перед проведением анализа исследуемые/контрольные образцы следует развесить в отдельной пластиковой пробирке, смешав 25 мкл исследуемого/контрольного образца и 3000 мкл (21-150 %) / 2000 мкл (1-20 %) рабочего буферного раствора. Хранить при температуре 2-8 °С. Анализ должен быть выполнен в течение 30 минут после разбавления из-за лабильности фактора VIII.

Внести в лунку микропланшета 25 мкл исследуемого/контрольного образца, 50 мкл фактор-реагента, перемешать осторожным покачиванием микропланшета и инкубировать 4-5 минут в термостате при температуре 37 °С.

Далее в каждую лунку добавить 25 мкл раствора кальция хлорида 0,025 моль/л, предварительно разогретого до температуры 37 °С, перемешать осторожным покачиванием микропланшета и инкубировать в термостате при температуре 37 °С 5 минут (21 – 150 %) / 10 минут (1 – 20 %).

По окончании инкубации к реакционной смеси в лунки микропланшета добавить 50 мкл хромогенного субстрата, перемешать осторожным покачиванием микропланшета и инкубировать в термостате при температуре 37 °С 10 минут (21 – 150 %) / 10 минут (1 – 20 %).

Остановить реакцию с помощью добавления в реакционную смесь 25 мкл уксусной кислоты 20 % / лимонной кислоты 2 %, перемешать осторожным покачиванием микропланшета и инкубировать 2 минуты в термостате при температуре 37 °С.

Проведение измерений

Через 2-3 минуты после остановки реакции измерить оптическую плотность исследуемого/контрольного образца с помощью спектрофотометра при длине волны 405 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 минут.

Краткая схема проведения анализа с помощью Набора реагентов на основе хромогенного субстрата для количественного определения фактора VIII

№ п/п	Наименование добавляемого компонента/ наименование операции	Диапазон активности фактора VIII	
		21-150 %	1-20 %
1	25 мкл исследуемого/контрольного образца	+ 3000 мкл рабочего буферного раствора	+ 2000 мкл рабочего буферного раствора
2	Исследуемый/контрольный образец	25 мкл	25 мкл
	Фактор-реагент	50 мкл	50 мкл
	Перемешать и инкубировать при температуре 37 °С	4-5 мин	4-5 мин
3	Раствор кальция хлорида 0,025 моль/л	25 мкл	25 мкл
	Перемешать и инкубировать при температуре 37 °С	5 мин	10 мин
4	Хромогенный субстрат	50 мкл	50 мкл
	Перемешать и инкубировать при температуре 37 °С	10 мин	10 мин
5	Уксусная кислота 20 % или лимонная кислота 2 %	25 мкл	25 мкл
	Перемешать и инкубировать при температуре 37 °С	2 мин	2 мин
6	Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра при длине волны 405 нм		

10 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам измерений вычислить средние арифметические значения оптических плотностей в лунках с исследуемыми/контрольными/калибровочными образцами.

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности, А, (ось ординат) от активности фактора VIII, %, (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого можно использовать бумагу масштабнo-координатную полулогарифмическую либо Microsoft Excel или его аналоги (OpenOffice Calc и др).

По калибровочному графику определить активность фактора VIII в анализируемых образцах.

Если активность фактора VIII в анализируемом образце превышает 150 % или 20 %, образец следует дополнительно развести рабочим буферным раствором в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

- соотношение оптических плотностей (ОП) калибровочных образцов: $ОП_1 < ОП_5 < ОП_{10} < ОП_{15} < ОП_{20}$ и $ОП_{21} < ОП_{50} < ОП_{75} < ОП_{100} < ОП_{120} < ОП_{150}$;
- $ОП_{100} \geq 0,75$ единицы оптической плотности (о.е.);
- $ОП_0 < 0,125$ о.е.;
- вычисленное по калибровочному графику значение концентрации фактора VIII в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке или в паспорте контрольного образца.

11 СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев. Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Набор реагентов стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С. Замораживание набора реагентов не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат. Растворенные компоненты набора реагентов следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Транспортирование набора реагентов должно осуществляться при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термоминдикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование набора реагентов при температуре до плюс 25 °С не более 1 суток. Замораживание не допускается.

13 ЮРИДИЧЕСКИЙ АДРЕС ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий)

220053, Республика Беларусь, г. Минск, Долгиновский тракт, 160

УНП 190572781, ОКПО 37652513

Тел.: (8-017) 289-01-06

Факс: (8-017) 289-87-45

E-mail: rnpc@blood.by; <http://blood.by/>