

УТВЕРЖДЕНА

приказом Росздравнадзора
от « » 2012 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»

Президент МБООИ «Общество
больных гемофилией»


Ю.А.Жулёв
«20» нояб 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Плазмы субстратной, дефицитной по фактору XI
(Плазма субстратная XI)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент Плазма субстратная XI разработан для определения в плазме крови человека активности фактора XI с целью выяснения причины удлинение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), для диагностики дефицита факторов при наследственных или приобретенных состояниях, для дифференцирования между диспротеинемией и синтезом неактивных факторов свертывания.

Один комплект реагента предназначен для проведения 60 или 120 определений при расходе по 0,05 мл раствора реагента на 1 анализ.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Измерение активности ф. XI проводят в разведенном исследуемом образце плазмы крови пациента. Для нивелирования возможного влияния на результаты исследования вариабельности факторов свертывания в инкубационную среду вносят субстратную плазму, в которой практически отсутствует (менее 1%) активность ф. XI, но сохранена активность всех других факторов свертывания. В такой системе продолжительность процесса свертывания зависит только от активности ф. XI в исследуемом образце.

2.2. Состав набора

1. Плазма субстратная XI с активностью ф. XI менее 1%, лиофильно высушенная – 3 или 6 флаконов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Плазма субстратная XI представляет собой пулированную плазму крови доноров со сниженной методом иммунной адсорбции активностью ф. XI, стабилизированную буфером HEPES и лиофильно высушенную.

В нормальной плазме здоровых лиц активность ф. XI составляет 70-120%. Коэффициент вариации, межфлаконная вариация и допустимый разброс при использовании для анализа разных комплектов реагента одной се-

рии не более 10%, линейность в диапазоне активности от 3 до 100%, чувствительность определения 3%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения реагента Плазма субстратная XI – класс 1.

4.2. При работе с реагентом Плазма субстратная XI следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3. При работе с реагентом Плазма субстратная XI следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- Набор реагентов для определения активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ-тест) или
- Набор реагентов для выполнения коагуляционных тестов (Коагуло-тест);
- человеческая плазма, аттестованная по ф. XI;
- центрифуга лабораторная;
- пробирки вместимостью 10 мл пластиковые;
- полуавтоматические одноканальные пипетки переменного объема с объемом 40-200 мкл;
- полуавтоматические одноканальные пипетки переменного объема с объемом 200-1000 мкл;
- устройство для взятия крови;
- вода дистиллированная;
- Буфер имидазоловый концентрированный или
- Буфер трис-HCl концентрированный;
- цитрат натрия трехзамещенный 0,109 М (3,2% 2-водной соли или 3,8% 5,5-водной соли);
- мерная колба вместимостью 100 мл;
- бумага масштабн-координатная билогарифмическая;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку или вакуумную систему, содержащую 0,109 моль/л трехзамещенного цитрата натрия в соотношении кровь : цитрат = 9:1.

Центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в другую пластиковую пробирку.

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 2 ч при комнатной температуре и не более 8 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.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагента Плазма субстратная XI

Внести в один флакон с лиофильно высушенным реагентом Плазма субстратная XI 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании, избегать образования пены. Выдержать растворенную плазму в течение 20 мин при комнатной температуре. Перед употреблением растворенную плазму следует осторожно перемешать покачиванием.

7.2. Приготовление АЧТВ-реагента из набора АЧТВ-тест

Внести в один флакон с АЧТВ-реагентом 4,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (18-25°C) и осторожном покачивании. Перед использованием раствор реагента необходимо выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 мин.

7.3. Приготовление человеческой плазмы, аттестованной по ф. XI

Приготовить в соответствии с инструкцией к реагенту.

7.4 Приготовление рабочего буферного раствора

Буфер имидазоловый концентрированный (5,0 мл) или буфер трис-HCl концентрированный (5,0 мл) перелить в мерную колбу вместимостью 100 мл и долить до метки дистиллированной водой (разведение в 20 раз), тщательно перемешать.

7.5. Приготовление кефалин-каолиновой смеси из набора Коагуло-тест.

Внести во флакон эрилидом (кефалином) суспензию каолина. Кефалин-каолиновая смесь готова к проведению анализа через 30 мин после добавления каолина. Перед проведением анализа встряхивать.

7.6. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика Стандартную человеческую плазму с аттестованным значением ф. XI развести рабочим буферным раствором так, как это указано на схеме.

Пробирка №	1	2	3	4	5	6
Активность ф. XI в человеческой плазме, %	A*	0,5 A	0,25 A	0,125 A	0,0625 A	0,01 A
Рабочий буферный раствор, мл	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Человеческая плазма с аттестованным значением ф. XI, мл	0,2	-	-	-	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	

*А–активность ф. XI в человеческой плазме указана в паспорте.

В каждом разведении провести определение АЧТВ по методу, описанному ниже (см п. 7.6).

На масштабно-координатной бумаге отложить: по вертикальной логарифмической оси ординат (Y) – продолжительность времени свертывания каждого разведения человеческой плазмы, сек; по горизонтальной логарифмической оси абсцисс (X) - активность ф. XI,%. При соединении нанесенных точек образуется прямая линия калибровочного графика, по которому определить активность ф. XI в плазме пациента (см п. 7.6.).

7.7. Ход исследования

Анализ провести в пластиковых кюветах, термостатируемых при температуре 37°C. Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму пациента в 5 раз рабочим буферным раствором: 0,1 мл плазмы + 0,4 мл рабочего буферного раствора.

Внести в кювету анализатора	Объем
Одно из разведений человеческой плазмы (или исследуемой плазмы пациента, разведенной в 5 раз)	50 мкл
Раствор плазмы субстратной, дефицитной по фактору XI	50 мкл
Раствор АЧТВ-реагента или каолин-кефалиновая смесь	50 мкл
Инкубировать при температуре 37°C точно 3 мин	
Раствор 0,025 М кальция хлористого	50 мкл

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отметить время свертывания, сек, от момента добавления кальция хлористого до момента образования сгустка фибрина. Активность ф. XI определить по калибровочному графику, %.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности ф. XI необходимо исследовать при разведении исходной плазмы рабочим буферным раствором не в 5, а в 10 раз, и полученный результат умножить на 2.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение реагента в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание реагента допускается.

Срок годности реагента Плазма субстратная XI – 24 мес.

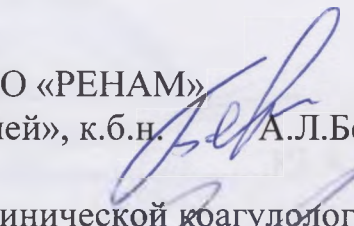
Стабильность разведенных растворов реагентов

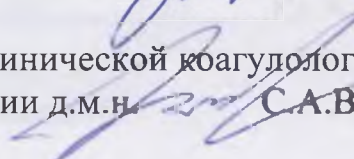
Реагенты	2-8°C	18-25°C	-18-20°C
Плазма субстратная XI	4 ч	2 ч	14 сут.
Раствор АЧТВ-реагента	14 сут	1 сут	-
Рабочий буферный раствор	1 мес	-	-
Кефалин-коалиновая смесь	14 сут	2 сут	2 мес.
0,025 М раствор кальция хлористого	В плотно укупоренном виде - 24 мес		-

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению реагента.

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

125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4, тел/факс (495) 614-90-57, e-mail: info@renam.ru

Заведующий отделом производства НПО «РЕНАМ»
МБООИ «Общество больных гемофилией», к.б.н.  А.Л.Берковский

Научный руководитель лаборатории клинической коагулологии
ФГБУ ГНЦ Минздравсоцразвития России д.м.н.  С.А.Васильев

Пронумеровано и прошнуровано 5 листов
Президент МБОУ «Общество
больных гемофилией»

Ю.А.Жулёв

