

УТВЕРЖДЕНА

приказом Росздравнадзора
от «___» _____ 2012 г.
№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Президент МБООИ «Общество
больных гемофилией»


Ю.А.Жулёв
«___» _____ 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент Плазма субстратная X разработан для определения в плазме крови человека активности фактора X одностадийным методом с применением тромбопластина с целью диагностики наследственного или приобретенного дефицита этого фактора, мониторинга терапии при введении препаратов протромбинового комплекса или оральных антикоагулянтов, а также для оценки функций печени.

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. X 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. X, но сохранена активность всех других факторов свертывания. В такой системе продолжительность процесса свертывания зависит только от активности ф. X в исследуемом образце.

2.2. Состав набора

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В 1996 г. была описана мутация гена протромбина G20210A, при которой в 3 раза повышается риск возникновения венозных тромбозов, в частности тромбоза глубоких вен. Риск возникновения тромбозов при наличии этой мутации возрастает в сотни раз при беременности и при приеме оральных контрацептивов. В нормальной плазме здоровых лиц активность ф. X составляет 70-120%, при наличии мутации G20210A активность ф. X повышена.

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

Коэффициент вариации, межфлаконная вариация и допустимый разброс при использовании для анализа разных комплектов реагента одной серии 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 X – класс 1.

4.2. При работе с реагентом Плазма субстратная X следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического 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 X 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;
- Тромбопластин (из головного мозга кролика) для определения протромбинового времени (Ренампластин);
- человеческая плазма, аттестованная по ф. X;
- 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 масштабнo-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 X

Внести в один флакон с лиофильно высушенным реагентом Плазма субстратная X 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 раствора Ренампластина

В один флакон с Ренампластином внести 8,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при покачивании. Перед проведением анализа раствор Ренампластина прогреть при температуре 37°C в течение 30 мин.

7.3. Приготовление человеческой плазмы, аттестованной по ф. X

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. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика реагент Стандартная человеческая плазма с аттестованным значением ф. X развести рабочим буферным раствором в 10, 20, 40, 80 и 160 раз. Порядок разведения указан на схеме.

Пробирка №	1	2	3	4	5
Активность ф. X в человеческой плазме, %	A*	0,5 A	0,25 A	0,125 A	0,0625 A
Рабочий буферный раствор, мл	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5
Человеческая плазма с аттестованным значением ф. X, мл	0,1	-	-	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл	0,5 ↑	0,5 ↑	0,5 ↑	0,5 ↑	

*A – активность ф. X в человеческой плазме указана в паспорте.

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

На масштабнo-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. X, %. При соединении нанесенных точек образуется прямая линия калибровочного графика, по которому определить активность ф. X в плазме пациента (см п. 7.6.).

7.6. Ход исследования

Анализ провести в пластиковых кюветах, термостатируемых при температуре 37°C. Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму пациента в 10 раз рабочим буферным раствором: 0,1 мл плазмы + 0,9 мл рабочего буферного раствора.

Внести в кювету анализатора	Объем
Одно из разведений человеческой плазмы (или исследуемую плазму пациента, разведенную в 10 раз)	50 мкл
Раствор плазмы субстратной	50 мкл
Инкубировать при температуре 37°C точно 2 мин	
Раствор Ренампластина	100 мкл

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности ф. X необходимо исследовать при разведении исходной плазмы рабочим буферным раствором не в 10, а в 20 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 X – 24 мес.

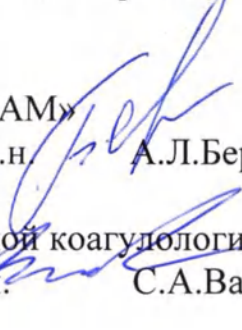
Стабильность разведенных растворов реагентов

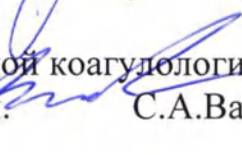
Реагенты	2-8°C	18-25°C	-18-20°C
Плазма субстратная X	4 ч	2 ч	14 сут.
Раствор Ренампластина	7 сут	2 сут	3 мес.
Рабочий буферный раствор	1 мес	-	-

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

