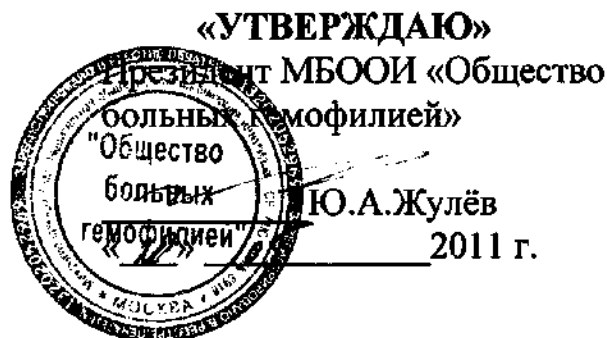


УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от «___» _____ 2011 г.
№ _____



ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для определения
резистентности ф. V к протейну С
(РеаЛейден-тест)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов РеаЛейден-тест предназначен для установления резистентности активированного ф. V плазмы крови пациента к действию физиологического антикоагулянта протеина С, что повышает риск возникновения тромбозов периферических вен, инфарктов миокарда, тромбоэмболии легочной артерии, тромбозов вен сетчатки глаза.

Набор предназначен для проведения 20 макро или 40 микро определений при расходе по 0,1 или по 0,05 мл каждого реагента на один анализ, соответственно.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Инкубация плазмы крови с активатором протеина С вызывает удлинение времени свертывания в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Без добавления активатора АЧТВ этой же плазмы не изменено.

В плазме пациентов с дефицитом системы протеина С или при наличии мутантного фактора V (Лейден) удлинение АЧТВ при добавлении активатора менее выражено, чем в норме.

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты:

- АЧТВ - реагент лиофильно высушенный - 1 флакон;
- АЧТВ-реагент с активатором протеина С лиофильно высушенный - 1 флакон;
- Плазма-калибратор лиофильно высушенная – 1 флакон;
- Плазма субстрат дефицитная по фактору V – 4 флакона;
- 0,025 М раствор кальция хлористого - 1 флакон (5,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Противосвертывающая система протеина С (протеин С, протеин S, тромбомодулин, тромбин, ингибитор протеина С) осуществляет функцию регуляции свертывающей активности плазмы крови путем ингибирования активности факторов VIIIa и Va и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1).

Наследственные и приобретенные нарушения в системе протеина С препятствуют снижению свертывающего потенциала плазмы крови и вызывают тромбозы различной локализации. При наследственной тромбофилии, в основе которой лежит наличие у пациентов мутантного фактора V (Лейден), имеет место резистентность к действию активированного протеина С, что приводит к повышению свертывания крови по внутреннему и внешнему механизмам и вызывает тромбозы периферических вен, инфаркты миокарда, тромбоэмболию легочной артерии, тромбозы вен сетчатки глаза и др.

При проведении анализа с помощью набора РеаЛейден-тест исследуемую плазму пациента разводят в 4 раза субстратной плазмой, дефицитной по ф. V, с целью снижения действия факторов плазмы пациента и повышения зависимости результатов анализа от активности ф. V. Если в плазме пациента содержится мутантный ф. V Лейден, то процесс свертывания не будет снижен под влиянием активированного протеина С.

Активацию эндогенного протеина С проводят с помощью природного активатора протеина С.

С целью минимизации влияния коагулометров принято результаты представлять в виде нормализованного отношения (НО), и результаты свертывания плазмы крови пациента в смеси с субстратной плазмой по тесту АЧТВ сравнивать с результатами аналогичного анализа плазмы-калибратора с установленным НО - НОк.

При проведении анализа определяют 4 показателя:

1. АЧТВ смешанной плазмы-калибратора без активатора;
2. АЧТВ смешанной плазмы-калибратора с активатором;
3. АЧТВ смешанной плазмы пациента без активатора;
4. АЧТВ смешанной плазмы пациента с активатором.

Полученные результаты вносят в формулу расчета НО (см п. 8).

Аналитические параметры набора РеаЛейден-тест следующие:

- НОк плазмы-калибратора – 0,8-1,4;
- коэффициент вариации результатов определения НОк – не более 10%;
- допустимое отклонение НОк в плазме-калибраторе от аттестованного значения – не более 10%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

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

4.3. Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение «Правил 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.).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная, развивающая ускорение 2000 g (3000 об/мин);
- полуавтоматические пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,025; 0,05; 0,1, 1,0 и 2,0 мл;
- пробирки центрифужные пластиковые или стеклянные силиконированные вместимостью 10 мл;
- раствор цитрата натрия 0,11 М (3,8%);
- вода дистиллированная;
- перчатки пластиковые или резиновые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь отобрать в силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку с 3,8% (0,11 М) цитратом натрия (9:1). Центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 7 мин при 1000 об/мин (240 g). Плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).

Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после повторного центрифугирования перенести плазму в другую пластиковую пробирку.

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

Образцы плазмы с повышенным содержанием гепарина должны быть исключены из исследования.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагентов

Раствор АЧТВ-реагента

Внести во флакон с АЧТВ-реагентом 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании при комнатной температуре (18-25°C) и выдержать в течении 30 мин при комнатной температуре.

Полученный раствор АЧТВ-реагента можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 сут или при комнатной температуре (18-25°C) не более 2 сут. Не замораживать.

Раствор АЧТВ-реагента с активатором

Внести во флакон с АЧТВ-реагентом с активатором 2,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при осторожном покачивании при комнатной температуре и выдержать в течении 30 мин при комнатной температуре.

Полученный раствор АЧТВ-реагента с активатором можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 сут или при комнатной температуре не более 2 сут. Не замораживать.

Раствор плазмы-калибратора

Внести во флакон с плазмой-калибратором 1,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое и выдержать перед анализом в течение 20-30 мин при комнатной температуре.

Полученный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 2 ч или при комнатной температуре не более 8 ч.

Допускается однократное замораживание плазмы-калибратора при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Раствор плазмы субстрат дефицитной по ф. V.

Внести во флакон с плазмой субстрат дефицитной 1,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое и выдержать перед анализом в течение 20-30 мин при комнатной температуре.

Полученный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 2 ч или при комнатной температуре не более 8 ч.

Допускается однократное замораживание плазмы-калибратора при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Подготовка раствора кальция хлорида

Перед использованием прогреть 0,025 М раствор кальция хлористого при температуре 37° С в течение 15 мин. Прогретый раствор использовать в течение 8 ч.

7.2. Ход исследования

1. Перед анализом смешать исследуемую плазму пациента (или плазму-калибратор) с плазмой субстрат дефицитной по фактору V в соотношении 1:4 (25 мкл исследуемой плазмы + 100 мкл субстрат дефицитной плазмы).

2. Приготовить 2 кюветы (А и Б), внести в них по 0,05 мл смешанной исследуемой плазмы пациента.
3. Внести в кювету А 0,05 мл раствора АЧТВ-реагента с активатором, в кювету Б внести 0,05 мл АЧТВ-реагента без активатора.
4. Инкубировать обе кюветы в течение 3 мин при температуре 37° С.
5. Добавить в обе кюветы по 0,05 мл 0,025 М раствора кальция хлористого, прогретого при температуре 37° С.
5. После добавления кальция хлористого отметить по таймеру прибора время образования сгустка.
6. В кювете А, куда добавляли активатор, время свертывания определено как АЧТВа (АЧТВ активированное), в кювете Б, без активатора, - как АЧТВ.
7. Каждое определение провести 2 раза, рассчитать среднюю арифметическую величину.
8. Аналогичным образом (см п. 1-7) определить АЧТВа и АЧТВ для смешанной плазмы-калибратора.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выразить результаты анализов в виде нормализованного отношения (НО, усл. ед.) по формуле :

$$НО = \frac{(АЧТВ_a / АЧТВ)_п}{(АЧТВ_a / АЧТВ)_кал} \times НО_к,$$

где: АЧТВа - АЧТВ смешанной плазмы пациента с активатором, сек;
 АЧТВ - АЧТВ смешанной плазмы пациента без активатора, сек;
 (АЧТВа/АЧТВ)п – отношение активированного АЧТВ пациента к АЧТВ того же пациента без активации, усл. ед.;
 (АЧТВа/АЧТВ)кал - отношение активированного АЧТВ смешанной плазмы-калибратора к АЧТВ смешанной плазмы-калибратора без активации, усл.ед.;
 НОк - нормализованное отношение плазмы-калибратора (указывается в паспорте на набор).

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

У здоровых лиц НО составляет $1,1 \pm 0,3$ усл. ед.

Значение НО ниже 0,8 свидетельствует о возможном наличии мутантного фактора V (Лейден), резистентного к действию активированного протеина С.

Ложноположительные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных:

- с повышенным содержанием гепарина;
- с наличием системной красной волчанки;
- при использовании антикоагулянтов непрямого действия (МНО выше 3,0).

Окончательное подтверждение наличия мутации Лейдена может быть сделано ПЦР-диагностикой.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре 2-8°C в течение всего срока годности (24 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 10 сут.

Раствор АЧТВ-реагента и раствор АЧТВ-реагента с активатором можно использовать при температуре 2-8°C не более 7 сут или при комнатной температуре (18-25°C) не более 2 сут; перед анализом не прогревать.

Раствор плазмы-калибратора и раствор плазмы субстратной можно использовать при комнатной температуре не более 2 ч или при температуре 2-8°C не более 8 ч.

Раствор кальция хлористого после прогрева можно использовать не более 8 ч.

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

По вопросам, касающимся качества набора РеаЛейден-тест, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу:

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

Зав. производства МБООИ

«Общество больных гемофилией», к.б.н.



А.Л.Берковский

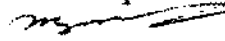
Зав. лаб. клинической коагулологии ФГБУ ГНЦ

Минздравсоцразвития России, д. м. н., профессор



С.А.Васильев

Пронумерованно
и прошнуровано 6 листов
Президент МБОУИ «Общество
больных гемофилией»


Ю.А.Жулёв

