

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____

№ _____



УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО фирмы

«Технология-Стандарт»

_____ А.П. Момот

августа 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения резистентности фактора Va к активированному протеину С (Фактор V-PC-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Фактор V-PC-тест предназначен для определения резистентности фактора Va к активированному протеину С.

Набор рассчитан на исследование 40 образцов плазмы при использовании мануальной техники определений. При использовании ряда автоматических и полуавтоматических коагулометров число определений возрастает до 80.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Протеин С - витамин К-зависимый гликопротеин, который синтезируется в печени и циркулирует в крови в виде профермента. Под действием активатора щитомордника протеин С активируется и действует как антикоагулянт через протеолиз факторов Va и VIIIa. При резистентности фактора Va к протеину С антикоагулянтное действие протеина С снижено, что может быть причиной тромбофилии. В данном методе, в результате добавления активатора протеина С к смеси нормальной и дефицитной по фактору V плазмы, происходит удлинение времени свертывания. При резистентности фактора Va к действию протеина С (в смеси плазмы больного и дефицитной по фактору V плазмы) удлинение времени свертывания выражено в меньшей степени.

Состав набора:

1. Активатор протеина С (лиофильно высушенный) - 2 фл.
2. АПТВ-реагент (смесь фосфолипидов и эллаговой кислоты) - 4 фл.
3. Дефицитная по фактору V плазма (лиофильно высушенная) - 4 фл.
4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М) - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Коэффициент вариации результатов определения нормализованного отношения не превышает 10%.

Допустимый разброс результатов определения нормализованного отношения в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2 а (ГОСТ Р 51609-2000).

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

Меры предосторожности – 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» (М., 1981 г.).

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

Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ:

- Коагулометр с механическим типом регистрации результатов, при отсутствии коагулометра – секундомер;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °C (можно использовать термостат коагулометра);
- центрифуга лабораторная;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,05 мл, 0,1 мл, 1,0 мл, 5,0 мл;
- герметично закрывающиеся стеклянные или пластиковые (полистироловые) пробирки;
- физиологический раствор хлорида натрия (0,9%);
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8% раствор натрия лимоннокислого 3-замещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия – 9:1. Кровь центрифугируют при 1000 об./мин (240 g) при комнатной температуре (18-25 °C) в течение 7 мин. Богатую тромбоцитами плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют при 3000 об./мин (1200 g) при комнатной температуре в течение 15 мин.

Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу после завершения повторного центрифугирования. Не допускается анализ плазмы крови, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1.1. Разведение активатора протеина С

В один из флаконов с активатором протеина С внести указанный в Паспорте к набору объем дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 1 мин. В результате получают раствор активатора протеина С.

1.2. Разведение АПТВ-реактента

В один флакон с лиофильно высушенным АПТВ-реактентом внести 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и покачивании в течение 2 мин, после чего для гомогенизации пропипетировать полученную суспензию 10-12 раз без образования пены. Перед использованием разведенный АПТВ-реактент должен быть выдержан при комнатной температуре в течение 15 мин. Непосредственно перед применением разведенный АПТВ-реактент встряхнуть.

1.3. Приготовление рабочего раствора кальция хлорида

В день исследования, в соответствии с потребностью, концентрированный раствор кальция хлорида развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды). Расход рабочего раствора реактента на 1 пациента - не более 0,5 мл.

1.4. Разведение дефицитной по фактору V плазмы

Во флакон с дефицитной по фактору V плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 3 мин.

Разведенную плазму разлить по 0,4-0,5 мл в пластиковые или стеклянные флаконы, которые затем закрыть и заморозить при $-16... -20^{\circ}\text{C}$. Другие флаконы с дефицитной по фактору V плазмой использовать аналогично первому флакону по необходимости. Разведенную плазму можно хранить при комнатной температуре не более 2 ч или не более 1 мес. при температуре $-16... -20^{\circ}\text{C}$.

В день проведения исследования использовать свежеразведенную дефицитную плазму или дефицитную по фактору V плазму, размороженную при комнатной температуре.

1.5. Подготовка контрольной плазмы

Для этой цели необходимо смешать (примерно в равных объемах) 3-4 образца свежеприготовленной (см. раздел «Приготовление анализируемых образцов») бедной тромбоцитами плазмы здоровых людей.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

2.1. Разведение образцов плазмы

Перед анализом контрольную плазму и исследуемые образцы плазмы развести физиологическим (0,9%) раствором хлорида натрия (1+3), для чего в каждом случае смешать в пробирке 0,1 мл плазмы с 0,3 мл физиологического раствора.

2.2. Исследование контрольной плазмы

1. К 0,05 мл дефицитной по фактору V плазмы, взятой в кювету коагулометра, добавить 0,05 мл дистиллированной воды.

2. Провести инкубацию содержимого кюветы в термостате коагулометра при 37°C .

3. Через 4 мин инкубации в кювету последовательно добавить 0,1 мл разведенной (см. п. 2.1) контрольной плазмы и 0,1 мл АПТВ-реагента.

4. Провести инкубацию содержимого кюветы в термостате коагулометра при 37°C .

5. Через 3 мин инкубации в кювету добавить 0,1 мл рабочего раствора кальция хлорида, имеющего температуру 37°C , и зарегистрировать время свертывания.

Результат обозначить как $C(1)$.

1. К 0,05 мл дефицитной по фактору V плазмы, взятой в кювету коагулометра, добавить 0,05 мл активатора протеина C.

2. Провести инкубацию содержимого кюветы в термостате коагулометра при 37°C .

3. Через 4 мин инкубации в кювету последовательно добавить 0,1 мл разведенной (см. п. 2.1) контрольной плазмы и 0,1 мл АПТВ-реагента.

4. Провести инкубацию содержимого кюветы в термостате коагулометра при 37°C .

5. Через 3 мин инкубации в кювету добавить 0,1 мл рабочего раствора кальция хлорида, имеющего температуру +37 °С, и зарегистрировать время свертывания.

Результат обозначить как $C(2)$.

Примечание: рекомендуется проводить исследования на механическом коагулометре (КС Амелунг; Минилаб 701, Юнимед; Thrombostat, Behnk Elektronik и др.), что, в сравнении с мануальным определением, значительно уменьшает разброс результатов.

2.3. Исследование плазмы больного

Выполняется аналогично исследованию контрольной плазмы (см. п. 2.2), включает в себя определение времени свертывания в смеси плазмы больного с дистиллированной водой - $B(1)$ и в смеси плазмы больного с активатором протеина С - $B(2)$.

3. ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По полученным данным рассчитывают нормализованное отношение (HO):

$$HO = \frac{C(1) \times B(2)}{B(1) \times C(2)}$$

где: $C(1)$ и $C(2)$ - время свертывания в контрольной плазме с добавлением соответственно дистиллированной воды и активатора протеина С;

$B(1)$ и $B(2)$ - время свертывания в плазме больного с добавлением соответственно дистиллированной воды и активатора протеина С;

В контрольной плазме время $C(1)$ составляет примерно 45-80 с (в зависимости от типа коагулометра), а $C(2)$ - превышает 95 с.

HO в норме превышает 0,8. Все значения HO ниже 0,8 свидетельствуют о резистентности фактора Va к действию протеина С.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Хранение набора должно проводиться при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора (24 мес.). Допускается хранение при температуре до 25 °С в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Время использования набора не должно превышать 2 недели с момента вскрытия его компонентов.

Раствор активатора протеина С можно хранить при комнатной температуре (18-25 °С) не более 6 ч или при температуре 2-8 °С - не более 5 сут.; не замораживать.

Разведенный АПТВ-реагент можно хранить при комнатной температуре (18-25 °С) не более 6 ч и не более 7 сут. - при температуре 2-8 °С.

Концентрированный раствор кальция хлорида после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 мес.

Рабочий раствор кальция хлорида можно хранить при температуре 37 °С не более 6 ч, при комнатной температуре - не более 1 сут. или в герметично закрытом флаконе - не более 2 сут. при 2-8 °С. Не допускается сливание остатков этого раствора после дня работы с хранящимся при температуре 2-8 °С.

Разведенную дефицитную по фактору V плазму можно хранить при комнатной температуре не более 2 ч или не более 1 мес. - замороженной при температуре -16... -20 °С.

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

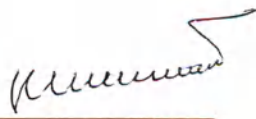
По вопросам, касающимся качества набора Фактор V-РС-тест, следует обращаться:

1. ООО фирму «Технология-Стандарт» по адресу: 656037, г. Барнаул, а/я 1351; тел.: (3852) 22-99-37, 22-99-38, 22-99-39 или

2. Испытательный лабораторный центр ФГУ «НИИ ФХМ» ФМБА России по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а; тел.: (499) 246-44-01; 246-44-09.

Директор ООО фирмы

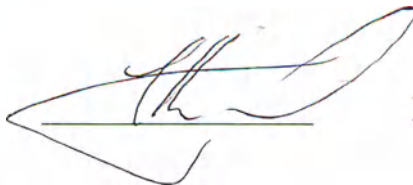
«Технология-Стандарт» д.м.н., проф.



А.П. Момот

Зам. директора ООО фирмы

«Технология-Стандарт» к.м.н., доц.



И.И. Шахматов

Мед. испытания проведены:

Главный врач НУЗ Отделенческая

клиническая больница на ст. Барнаул

ОАО «РЖД» к.м.н.




А.Г. Зальцман

Прошито, пронумеровано и скреплено
печатью 6 (шестю) листов
Руководитель В.А. Мещеряков
И.А. Мещеряков
«22» сентября 2012 г.

