

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения резистентности фактора V к протеину С (РеаЛейден-тест) по ТУ 9398-034-05595541-2011».

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение. Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения резистентности фактора V к протеину С (РеаЛейден-тест) по ТУ 9398-034-05595541-2011» (сокращенное наименование – «РеаЛейден-тест») предназначено для определения резистентности активированного фактора V (фактор V Leiden) к действию активированного Протеина С в плазме крови человека клоттинговым методом на всех типах коагулометров.

Область применения. Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

Предназначенный пользователь. Определение резистентности с помощью набора РеаЛейден-тест может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

Диагностическая роль. Противосвертывающая система протеина С (протеин С, протеин S, тромбомодулин, тромбин, ингибитор протеина С) осуществляет важную функцию регуляции свертывающей активности плазмы крови. Действие системы направлено преимущественно на ингибирование факторов VIIIa и Va и на инактивацию ингибитора активатора плазминогена (PAI-1). Нарушения в системе вызывают тромбозы различной локализации. Охарактеризована новая форма наследственной тромбофилии, в основе которой лежит наличие у пациентов так называемого V фактора Leiden. Суть этой формы заключается в том, что V фактор Leiden (мутантный фактор V свертывающей системы крови) обладает резистентностью к действию активированного протеина С, что приводит к повышению свертывания крови по внутреннему и внешнему механизмам и повышает частоту тромбозов: тромбозы периферических вен, инфаркты миокарда, тромбозы легочной артерии, тромбозы вен сетчатки глаза и др.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора:

АЧТВ - реагент лиофильно высушенный – 2 мл/флакон – 1 шт.;
АЧТВ-реагент с активатором протеина С лиофильно высушенный – 2 мл/флакон – 1 шт.;
Плазма-калибратор лиофильно высушенная – 1 мл/флакон – 1 шт.;
Плазма субстратная дефицитная по фактору V – 1 мл/флакон – 4 шт.;
0,025 М раствор кальция хлорида - 5 мл/флакон – 1 шт.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 20 определений на всех типах коагулометров.

Принцип метода.

Инкубация нормальной плазмы с активатором (ядом щитомордника Agkistrodon contortrix) вызывает активацию эндогенного протеина С и протеина S, что удлиняет время свертывания нормальной плазмы 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.

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ КАЛИБРАТОРУ

Плазма-калибратор, входящая в набор РеаЛейден-тест аттестована по Нормализованному Отношению против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против пула донорской плазмы, взятого от 100 здоровых доноров.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность выявления наличия резистентности фактора V к протеину С: билирубин в концентрации до 0,2 г/л; гемоглобин (свободный) – до 1 г/л; триглицериды – до 1,2 г/л.

Результаты определения могут зависеть от назначаемых препаратов. Эстрогены у мужчин и оральные контрацептивы у женщин снижают значения АЧТВ. Препараты дифенина, гепарина, варфарина, гирудина и других прямых ингибиторов тромбина могут повышать АЧТВ.

На результаты определения АЧТВ влияет выбор антикоагулянта и соблюдение точного соотношения антикоагулянт:кровь.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения Нормализованного Отношения в одной пробе плазмы одним набором не превышает 10%. Коэффициент вариации результатов определения Нормализованного Отношения в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Значения, соответствующие нормальным

Нормальный диапазон значений Нормализованного Отношения, полученный при определении у не менее 100 здоровых доноров, составляет 0,8 – 1,4.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов РеаЛейден-тест предназначен только для диагностики *in vitro*. Класс потенциального риска применения набора –2а.

Набор реагентов РеаЛейден-тест не является источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляет рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

При работе с набором и образцами крови следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиН 2.1.3.2630-10 от 30.09.2010); Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика ВИЧ-инфекции» (СП 3.1.5.2826 от 11.01.2011).

При работе следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита человека ВИЧ1 и ВИЧ2, вирусы гепатита В и гепатита С или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Плазма-калибратор и плазма субстратная дефицитная по фактору V получены из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее их следует рассматривать как потенциально вирус-опасные.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр открытого типа с любой системой регистрации результатов реакции.
- центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- термостат, поддерживающий температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М) или
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- мерный цилиндр вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов РеаЛейден-тест предназначен для определения резистентности активированного фактора V к действию активированного Протеина С в плазме крови человека. Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

Процедура получения биологического материала

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре от плюс 18 до плюс 25°C в течение 15 минут при 3000 об/мин (1200g).

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 часов при комнатной температуре от плюс 18 до плюс 25°C и не более 8 часов при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре от минус 18 до минус 20°C и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

Ограничения по использованию биологического материала

При работе с кровью общим правилом является немедленное отделение плазмы от форменных элементов, так как некоторые вещества могут поглощаться и инактивироваться эритроцитами и лейкоцитами.

Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белков.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

АЧТВ-реагент. Во флакон с АЧТВ-реагентом внести 2 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

АЧТВ-реагент с активатором протеина С. Во флакон с АЧТВ-реагентом с активатором внести 2 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

Плазма-калибратор. Во флакон с лиофильно высушенной плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

Плазма субстратная дефицитная по фактору V. Во флакон с лиофильно высушенной плазмой внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после приготовления.

Время растворения лиофильно высушенных реагентов при комнатной температуре не превышает 3 минуты.

0,025 М раствор кальция хлорида. Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть при 37°C. Повторно прогревать вскрытый флакон не рекомендуется.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Смешанная плазма для анализа. Перед анализом смешать исследуемую плазму (или плазму-калибратор) с плазмой субстратной дефицитной по фактору V в соотношении 1:4 (25 мкл исследуемой плазмы + 100 мкл субстратдефицитной плазмы).

При проведении анализа определить 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.

Проведение анализа

АЧТВ-реагенты перед анализами не прогревать при температуре 37°C.

В кювету коагулометра внести	АЧТВ актив	АЧТВ
Смешанная исследуемая плазма	50 мкл	50 мкл
АЧТВ - реагент	-	50 мкл
АЧТВ-реагент с активатором протеина С	50 мкл	-
Инкубировать 3 мин при 37° С		
0,025М раствор кальция хлорида	50 мкл	50 мкл

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе измерения АЧТВ зарегистрировать время от момента добавления в кювету коагулометра раствора кальция хлорида до момента образования сгустка.

РАСЧЕТЫ

Результаты теста принято выражать в виде Нормализованного Отношения (НО):

$$НО = \frac{(АЧТВ_{актив} / АЧТВ)_{пациент}}{(АЧТВ_{актив} / АЧТВ)_{к}} \times НО_{к}$$

где: НО_к – Нормализованное Отношение плазмы-калибратора, указано в паспорте на набор.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

У здоровых лиц НО составляет 1.1 ± 0.3 (M ± 2σ). 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 волчаночного антикоагулянта;
при использовании антикоагулянтов непрямого действия (МНО выше 3,0).
Окончательное подтверждение наличия мутации Лейдена может быть сделано ПЦР-диагностикой.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения Нормализованного Отношения следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ: Плазма контрольная с нормальным и со сниженным уровнем протеина С (Плазма-Протеин С) по ТУ 9398-006-055 95541-2011, код ПФА-6/7

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности!

Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается хранение при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

Реагенты	+2-8°C	+18-25°C	-18-20°C
АЧТВ-реагент	7 дней	2 дня	-
АЧТВ-реагент с активатором протеина С	7 дней	2 дня	-
Раствор плазмы-калибратора	8 часов	2 часа	2 месяца
Раствор плазмы субстратдефицитной по фактору V	8 часов	2 часа	2 месяца
0,025 М кальций хлористый	24 месяца		-

0,025 М кальций хлористый следует хранить при температуре плюс 37°C не более 8 часов.

Транспортирование наборов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в термоконтейнерах, содержащих хладоземельные, или в авто-рефрижераторах с использованием термоиндикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание не допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора РеаЛейден-тест требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.







МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с набором РеаЛейден-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на три четверти, завязывают, маркируют надписью: «Отходы. Класс Б», наносят на бирку название организации, дату и ФИО исполнителя и помещают на участок временного хранения до вывоза транспортом специального подразделения к месту обеззараживания и утилизации.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 наборы реагентов РеаЛейден-тест, не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Г. Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости («Отходы. Класс Г»). Диагностические средства собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного) в соответствии с требованиями нормативных документов в зависимости от класса опасности отходов. Вывоз отходов класса Г для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Г осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Номер по каталогу
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Биологический риск
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

Дата утверждения инструкции 20 мая 2011 г.

ЛИТЕРАТУРА И НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., «Ньюдиамед», 2001.- 285 с.
2. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000.- 360 с.
3. Яровая Г.А., Нешкова Е.А., Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Мелкумян А.Л. Внутренний путь свертывания крови. Учебно-методическое пособие. М. ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2017.- 83 с.
4. Kraus M, Zander N, Fickenscher K. Coagulation assay with improved specificity to factor V mutants insensitive to activated Protein C. Thromb Res 1995; 80: 255-64.
5. ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
6. ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
7. ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
8. Приказ Минздрава России от 19.01.2017 г №11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинских изделий».

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2
тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru