



ИНСТРУКЦИЯ **по применению набора реагентов для** **определения резистентности фактора Va** **к активированному протеину С**

НАЗНАЧЕНИЕ

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

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Протеин С - витамин К-зависимый гликопротеин, который синтезируется в печени и циркулирует в крови в виде профермента. Под действием активатора из яда 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 тромбозов. 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 высушенный¹) - 2 фл.
2. АПТВ-реагент (смесь фосфолипидов и эллаговой кислоты, лиофильно высушенная), на 2 мл - 4 фл.
3. Дефицитная по фактору V плазма (лиофильно высушенная), на 1 мл - 4 фл.
4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М), 2 мл - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ **ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

Коэффициент вариации результатов определения не превышает 10 %.

Тест не чувствителен к присутствию гепарина в плазме до 0,3 ед./мл.

МЕРЫ **ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

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

Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения *in vitro*.

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

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

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

ОБОРУДОВАНИЕ, **МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ**

- Центрифуга лабораторная;
- коагулометр с механическим принципом регистрации результатов;
- пипетки вместимостью 0,05, 0,1, 1,0 и 5,0 мл;
- герметично закрывающиеся стеклянные или пластиковые (полистироловые) пробирки;
- пробирки стеклянные;
- вода дистиллированная;
- физиологический раствор хлорида натрия (0,9%);
- секундомер;
- перчатки резиновые хирургические.

Каталожный номер набора: 200

ООО фирма "Технология-Стандарт"

656037, Барнаул, а/я 1351, тел./факс (3852) 22-99-37, 22-99-38, 22-99-39, 27-13-00

¹ Патент РФ №2184976, приоритет от 30.11.2000.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8 % раствор натрия лимоннокислого трёхзамещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1.

Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолиз, избыток цитрата натрия и полученной более 2 ч назад.

Возможно исследование предварительно замороженных образцов плазмы (хранение при -16... -20 °C не более 1 мес).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1.1. Разведение активатора протеина С

В один из флаконов с активатором внести *указанный в Паспорте к набору* объём дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18... +25 °C) и легком покачивании в течение 1 мин. В результате получают раствор активатора протеина С.

1.2. Разведение АПТВ-реагента

В один флакон с лиофильно высушенным АПТВ-реагентом 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-реагент должен быть выдержан при комнатной температуре в течение 15 мин. Непосредственно перед применением разведенный АПТВ-реагент 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 объём концентрированного раствора + 19 объемов воды). Расход рабочего раствора реагента на 1 больного - не более 0,5 мл.

1.4. Разведение дефицитной по фактору V плазмы

Во флакон с дефицитной по фактору V плазмы внести **1,0 мл** дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18... +25 °C) и легком покачивании в течение 3 мин. Разведенную плазму разлить по 0,4-0,5 мл в пластиковые или стеклянные флаконы, которые затем закрывают и замораживают при -16... -20 °C. Другие флаконы с дефицитной по фактору V плазмой использовать аналогично первому по необходимости. Разведенную плазму можно хранить при комнатной температуре не более 2 ч или не более 1 мес при температуре -16... -20 °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 долях) 3-4 образца свежеприготовленной (*см. раздел «Приготовление образцов плазмы»*) 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 **0,1 мл** плазмы с **0,3 мл** физиологического раствора.

2.2. Исследование контрольной плазмы

А) 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)**.

Б) 1. К 0,05 мл дефицитной по фактору V плазмы, взятой в кювету коагулометра, добавить 0,05 мл *активатора протеина С*.

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(2)**.

Примечание: рекомендуется проводить исследования на механическом коагулометре (КС Амелунг; Минилаб 701, Юни-мед; 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, включает в себя определение времени свертывания в смеси плазмы больного с дистиллированной водой - **Б(1)** и в смеси плазмы больного с активатором протеина С - **Б(2)**.

ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По полученным данным рассчитывают нормализованное отношение (**НО**):

$$НО = \frac{C(1) \times Б(2)}{Б(1) \times C(2)}$$

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

Б(1) и **Б(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**.

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

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на исследование **40-80 образцов** плазмы при расходе активатора протеина С по 0,05-0,025 мл на анализ.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2... +8 °C в течение всего срока годности набора (**24 мес**). Допускается транспортировка при температуре до +25 °C в течение 30 сут.

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

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

Разведенный АПТВ-реагент можно хранить при комнатной температуре не более 6 ч и не более 1 недели - при температуре +2... +8 °C.

Концентрированный раствор кальция хлорида после вскрытия флакона можно хранить при температуре +2... +8 °C не более 2 месяцев.

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

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 °C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. - М.: "Ньюдиамед-АО", 2008. - 292 с.

2. Баркаган З.С., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н. Способ диагностики тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора V к активированному протеину С. Патент РФ №2129282 от 20.04.1999 г.

3. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинко-лабораторной диагностики. - СПб.: ФормаТ, 2006. - 208 с.