МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения
Республики Беларусь

_____Б.Н. Андросюк
«____»_____20___ г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VII ХРОМОГЕННЫМ МЕТОДОМ

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
РУП «Центр экспертиз
и испытаний в здравоохранении»

_____М.И. Злотникова
«____»_____20___ г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «Республиканский
научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских
биотехнологий»

_____Ф.Н. Казаченко
«29» 03 2021 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач
УЗ «Минская областная
клиническая больница»

_____А.А. Линкевич
«____»_____20___ г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «Республиканский научно-
практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

_____А.В. Солнцева
«26» 11 2021 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач
УЗ «Минский клинический
консультативно-диагностический центр»

_____Н.М. Предко
«25» 11 2021 г.

2021

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов для количественного определения фактора свертывания крови VII хромогенным методом (далее – набор реагентов) предназначен для количественного определения фактора свертывания крови VII в плазме крови человека, продуктах крови и лекарственных средствах хромогенным методом «in vitro».

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа в дубликатах 24 неизвестных проб и 6 калибровочных проб, всего – 30 определений.

1.2 Зимоген FVII представляет собой гликопротеин, состоящий из 406 остатков и молекулярной массой 48 000 Д. Приблизительно 99 % FVII циркулирует в плазме в качестве неактивного зимогена и лишь 1% – в активной форме FVIIa, проявляя при этом очень небольшую протеолитическую активность. Полностью активным FVIIa становится только в комплексе с его обязательным кофактором, тканевым фактором и катионами, главным образом Ca^{2+}. Соединяясь в месте повреждения сосуда с тканевым фактором ТФ комплекс ТФ-FVIIa генерирует дополнительное образование FVIIa из зимогена FVII и активирует фактор свертывания крови X (FX) и FIX, участвующие в генерации тромбина в инициирующей фазе свертывания крови. Уникальным свойством комплекса ТФ-FVIIa среди других ферментных комплексов свертывания является то, что фосфолипиды не являются обязательным требованием для сборки комплекса. Однако ферментативная активность комплекса напрямую зависит о наличия липидной поверхности, которая обеспечивается закрепленным на мембране ТФ. Такой комплекс повышает эффективность катализируемых реакций FVIIa в 5-10 раз. Основное проявление дефицита FVII – кровотечения и кровоизлияния, возникающие спонтанно или вследствие травмы. Геморрагический синдром наиболее часто представлен кровотечениями из слизистых оболочек, в том числе из слизистых ЖКТ, гематомами мягких тканей различных локализаций, гемартрозами и тяжелыми менструальными кровотечениями. Кровоизлияния в ЦНС регистрируются у 3-10 % пациентов с дефицитом FVII.

2 ПРИНЦИП МЕТОДА

Хромогенный метод количественного определения активности фактора VII рассчитан на определение активности фактора VII в плазме, продуктах крови и лекарственных средствах. В основу метода положен двух стадийный фотометрический метод. На первой стадии, которого фактор FVII в комплексе с тромбопластином (ТП) и катионами Ca^{2+} активируется и переходит в активную форму FVIIa, которая в свою очередь активирует фактор X (FX) и переводит его в активную форму FXa. На второй стадии, активированный фактор X (FXa) селективно расщепляет хромогенный субстрат метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-n-нитроанилид-ацетат с образованием n-нитроанилина. Исследование образца проводят фотометрическим методом при длине волны 405 нм. Значение оптической плотности (или увеличение поглощения) прямо пропорционально количеству фактора VII.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1-я стадия

а) фактор VII $\xrightarrow{\text{тканевый фактор, } Ca^{2+}}$ фактор VIIa

б) фактор X $\xrightarrow[\text{тканевый фактор, фосфолипид}]{\text{фактор VIIa, } Ca^{2+}}$ фактор Xa

2-я стадия

хромогенный субстрат $\xrightarrow{\text{фактор Xa}}$ пептид + хромофор

3 КОМПЛЕКТНОСТЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 В комплект поставки набора реагентов входят инструкция по применению и следующие компоненты набора реагентов:

– микропланшет стрипованный (8×12) – 1 шт.;

– хромогенный субстрат (лиофилизированный препарат) – 1 флакон;

– стандарт фактора VII (лиофилизированный препарат), откалиброван относительно международного стандарта EPRS (Batch 2,2) – 2 флакона;

– фактор X (лиофилизированный препарат) – 2 флакона;

– тромбопластин (лиофилизированный препарат) – 2 флакона;

– концентрат буферного раствора для разведения, 12 мл – 1 флакон;

– раствор хлорида кальция, 1,5 мл – 1 флакон;

– 20 % раствор уксусной кислоты, 3,5 мл – 1 флакон.

4 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Содержание и эксплуатация зданий и помещений, в которых осуществляется производство набора реагентов, должны соответствовать требованиям санитарных норм и правил «Специфические санитарно-эпидемиологические требования к содержанию и эксплуатации организаций здравоохранения, иных организаций и индивидуальных предпринимателей, которые осуществляют медицинскую, фармацевтическую деятельность», утвержденными постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 3 марта 2020 г. № 130.

Персонал, использующий набор реагентов, должен быть обеспечен в установленном порядке средствами индивидуальной защиты и спецодеждой, должен соблюдать правила личной гигиены и асептики, принятые в медицинских учреждениях в отношении препаратов крови, в соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь. Меры предосторожности при выполнении работ с условно-патогенным биологическим материалом должны выполняться в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 февраля 2013 г. № 11.

Утилизация брака и отходов от набора реагентов после его использования проводится в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г № 14.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

– универсальный автоматический фотометр BioTek ELx800 (8-ми канальный ридер для микропланшет), позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 405 нм;

– вихревой смеситель типа VORTEX TTS 2;

– магнитная мешалка типа MAG HS 7;

– термостат суховоздушный типа ТС 80 М2;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,35; 0,5; 1,0 и 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования, «Ленпипет», Россия;

– штатив для пробирок;

– вода дистиллированная;

– перчатки хирургические резиновые;

– пробирки одноразовые с пробками;

– стакан стеклянный вместимостью 300 мл.

6 ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа компоненты набора реагентов и исследуемые образцы плазмы крови необходимо выдержать при комнатной температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

6.1 Приготовление рабочего буферного раствора: внести в стакан вместимостью 300 мл 228 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом буферного раствора для разведения и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

Приготовленный рабочий буферный раствор может храниться в течение 4 недель при температуре (2-8) °С.

6.2 Приготовление рабочего раствора хромогенного субстрата: во флакон, содержащий хромогенный субстрат, внести 3,5 мл дистиллированной воды. Через 30 мин тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

При вскрытии и растворении содержимого флакона необходимо следить, чтобы на пробке флакона не осталось сухого вещества.

Приготовленный рабочий раствор хромогенного субстрата может храниться в течение 1месяца при температуре (2-8) °С.

6.3 Приготовление рабочего раствора фактора X: во флакон, содержащий фактор X, внести 5,0 мл дистиллированной воды. Через 30 мин тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

При вскрытии и растворении содержимого флакона необходимо следить, чтобы на пробке флакона не осталось сухого вещества.

Приготовленный рабочий раствор фактора X может храниться в течение 7 дней при температуре (2-8) °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.4 Приготовление рабочего раствора тромбопластина: во флакон, содержащий тромбопластин, внести 0,5 мл дистиллированной воды. Через 30 мин тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

При вскрытии и растворении содержимого флакона необходимо следить, чтобы на пробке флакона не осталось сухого вещества.

Приготовленный рабочий раствор тромбопластина может храниться в течение 7 дней при температуре (2-8) °С.

6.5 Приготовление раствора стандарта фактора VII: во флакон, содержащий стандарт фактора VII, внести 0,5 мл дистиллированной воды. Через 30 мин тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

При вскрытии и растворении содержимого флакона необходимо следить, чтобы на пробке флакона не осталось сухого вещества.

Приготовленный раствор стандарта фактора VII может храниться в течение 2 ч при температуре (2-8) °С.

7 ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

7.1 Получение плазмы венозной крови.

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 (18-25) °С в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200g). Пробы крови пациентов не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов.

7.2 Подготовка свежезамороженной плазмы (СЗП) для анализа.

Образец СЗП разморозить, поместив мешок в водяную баню при температуре не выше плюс 37 °С. Через 5-7 минут СЗП должна полностью растаять и приобрести вид прозрачного раствора желтоватого цвета. Для проведения анализа требуется 0,5 мл СЗП. Использовать СЗП для анализов не позднее 1 ч после оттаивания.

7.3 Условия хранения биологического материала.

Время хранения исследуемой плазмы до анализа – не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре (2-8) °С. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус (18-20) °С и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

7.4 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 белковых веществ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Подготовка калибраторов.

Пробирки поместить в штатив и промаркировать следующим образом:

– P_{10}; P_{100} – для предварительного разведения стандарта фактора VII;

– B_0; B_1; B_2; B_3; B_4; B_5 – для приготовления калибровочных растворов.

Приготовление разведений стандарта фактора VII:

– в пробирку с маркировкой P_{10} внести 100 мкл раствора из флакона, содержащего раствор стандарта фактора VII, и 900 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 10 раз);

– в пробирку с маркировкой P_{100} внести 100 мкл раствора из пробирки с маркировкой P_{10} и 900 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 100 раз).

Приготовление калибровочных растворов:

– в пробирку с маркировкой B_5 внести 100 мкл раствора из пробирки с маркировкой P_{100} и 900 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя;

– в пробирку с маркировкой B_4 внести 200 мкл раствора из пробирки с маркировкой B_5 и 200 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 2 раза);

– в пробирку с маркировкой B_3 внести 200 мкл раствора из пробирки с маркировкой B_4 и 200 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 4 раза);

– в пробирку с маркировкой B_2 внести 200 мкл раствора из пробирки с маркировкой B_3 и 200 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 8 раз);

– в пробирку с маркировкой B_1 внести 200 мкл раствора из пробирки с маркировкой B_2 и 200 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 16 раз);

– в пробирку с маркировкой B_0 внести 200 мкл рабочего буферного раствора (нулевая активность фактора VII).

Таким образом, получают калибровочные пробы с различной активностью фактора VII в диапазоне 0,01-1,5 МЕ/мл. Для пробирки с маркировкой B_5 активность фактора VII соответствует указанной на флаконе.

Для пробирок с маркировками B_4; B_3; B_2 и B_1 точное значение активности фактора VII в полученных калибровочных пробах определяют, разделив активность фактора VII, указанную на флаконе, на коэффициент разведения 2, 4, 8 и 16 соответственно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.2 Подготовка исследуемых образцов.

Пробирки поместить в штатив и промаркировать следующим образом:

$X_{i\text{-}10}$, $X_{i\text{-}100}$, $X_{i\text{-}1000}$ – для предварительного разведения исследуемых образцов.

Приготовление исследуемых образцов:

– в пробирку с маркировкой $X_{i\text{-}10}$ внести 100 мкл исследуемого образца и 900 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 10 раз);

– в пробирку с маркировкой $X_{i\text{-}100}$ внести 100 мкл раствора из пробирки с маркировкой $X_{i\text{-}10}$ и 900 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 100 раз);

– в пробирку с маркировкой $X_{i\text{-}1000}$ внести 100 мкл раствора из пробирки с маркировкой $X_{i\text{-}100}$ и 900 мкл рабочего буферного раствора, тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя (разведение в 1000 раз).

Для продуктов крови и лекарственных средств, в которых предполагаемая активность фактора VII выше 2 МЕ/мл, необходимо дополнительное разведение образцов.

8.3 Процедура анализа.

8.3.1 Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом:

B_0 – B_5 – калибровочные пробы;

X_i – исследуемые пробы.

8.3.2 Схема анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема анализа

1 Внесение реагентов	Во все лунки микропланшета внести по 25 мкл калибровочных растворов и исследуемых проб
2 Инкубация	Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 4-5 мин
3 Приготовить комбинированный реагент: Фактор X – 5,0 мл Тромбопластин – 0,2 мл Хлорид кальция ($CaCl_2$) – 0,5 мл	
4 Внесение комбинированного реагента	Во все лунки микропланшета внести по 150 мкл раствора комбинированного реагента
5 Инкубация	Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 20 мин
6 Внесение хромогенного субстрата	Во все лунки микропланшета внести по 50 мкл раствора хромогенного субстрата
7 Инкубация	Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 15 мин
8 Остановка реакции	Во все лунки микропланшета внести по 50 мкл 20 %раствора уксусной кислоты
9 Измерение	Встряхнуть микропланшет и измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 405 нм

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.3.3 Отобрать из пробирок маркированных B_1; B_2; B_3; B_4; B_5 по 25 мкл раствора и внести в соответствующие лунки микропланшета.

Отобрать 25 мкл рабочего буферного раствора и внести в лунки микропланшета, маркированные B_0 (нулевая проба, не содержащая фактор VII).

Отобрать из пробирок маркированных $X_{i\text{-}1000}$ по 25 мкл раствора и внести в соответствующие лунки X_i.

8.3.4 Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 4-5 мин.

8.3.5 *Приготовление комбинированного реагента (**готовят непосредственно перед использованием**):* во флакон, содержащий рабочий раствор фактор X внести 200 мкл рабочего раствора тромбопластина и 500 мкл раствора хлорида кальция. Смесь осторожно перемешать, избегая образования пены.

8.3.6 Отобрать из флакона с комбинированным реагентом по 150 мкл и внести во все лунки микропланшета.

8.3.7 Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 20 мин.

8.3.8 Отобрать из флакона с хромогенным субстратом по 50 мкл и внести во все лунки микропланшета.

8.3.9 Микропланшет аккуратно встряхнуть и инкубировать при температуре 37 °С в течение 15 мин.

8.3.10 Остановить реакцию добавлением 50 мкл 20 % раствора уксусной кислоты.

8.3.11 Встряхнуть микропланшет и измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 405 нм. Измерения провести не позднее 20 мин после остановки реакции.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок микропланшета. В соответствии с маркировкой лунок получить значения величин оптической плотности (B_0-B_5). Вычесть значение оптической плотности калибровочной пробы, не содержащей активность фактора VII (B_0 – фоновый сигнал) из значений оптической плотности для калибровочных проб (B_1-B_5) соответственно ($B_i – B_0$).

9.2 Построить калибровочную кривую в линейных координатах, откладывая по оси ординат значения оптической плотности после вычитания фонового сигнала ($B_i – B_0$), а по оси абсцисс – значения активности фактора VII (МЕ/мл) в соответствующих калибровочных пробах.

9.3 Определить по калибровочной кривой активность фактора VII (МЕ/мл) в исследуемых образцах. В случаях, когда активность фактора VII в анализируемом образце плазмы превышает 2 МЕ/мл, образец следует дополнительно развести рабочим буферным раствором и повторить измерение.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

10.1 Чувствительность – минимальная активность фактора VII, определяемая набором реагентов, рассчитанная на основании значения 2 SD (среднее квадратичное отклонение) от среднего арифметического значения $\overline{B}$ (МЕ/мл).

Минимальная активность фактора VII, определяемая с помощью набора реагентов, составляет 0,01 МЕ/мл.

10.2 Воспроизводимость результатов – коэффициент вариации результатов определения активности фактора VII в лунках микропланшета с двукратным разведением стандарта фактора VII (%).

Коэффициент вариации результатов определения (n=10) активности фактора VII в образцах плазмы крови с использованием набора реагентов не должен превышать 10 %.

10.3 Продолжительность анализа – 1,5 ч.

10.4 Диапазон определяемой активности фактора VII – (0,01-1,5) МЕ/мл.

11 СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов – 1 год от даты его изготовления. Не использовать набор реагентов после окончания срока годности.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1 Условия транспортирования набора реагентов должны соответствовать условиям его хранения.

12.2 Набор реагентов транспортируют всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта.

12.3 Набор реагентов должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение всего срока годности.

Допускается хранение набора реагентов при более высокой температуре до 25 °С – не более одних суток. Замораживание набора реагентов не допускается.

13 ЮРИДИЧЕСКИЙ АДРЕС ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий)

220053, Республика Беларусь, г. Минск, Долгиновский тракт, 160

УНП 190572781, ОКПО 37652513

Тел.: (8-017) 289-01-06

Факс: (8-017) 289-87-45

E-mail: rnpc@blood.by; http://blood.by/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru