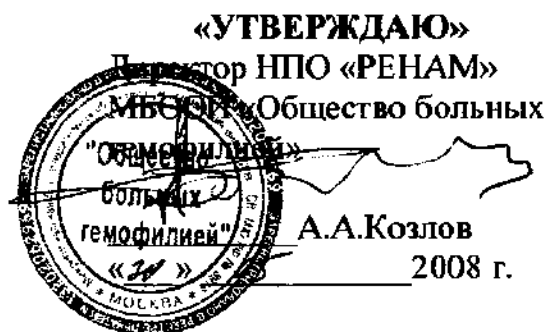


УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от «___» _____ 2008 г.
№ _____



ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для определения активности
протеина С оптическим методом
(Реахром-Протеин С)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов Реахром-Протеин С предназначен для определения активности протеина С оптическим методом с хромогенным субстратом с целью диагностики врожденной и приобретенной недостаточности этого физиологического антикоагулянта, приводящей к инфарктам, тромбоэмболии легочной артерии и тромбозам различной локализации.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения активности протеина С в образце плазмы крови основан на способности активированного протеина С гидролизовать пептидный хромогенный субстрат. Количество высвобождаемого при этом паранитроанилина (pNA) прямо пропорционально активности протеина С в анализируемом образце плазмы. Протеин С плазмы активируется при добавлении к ней очищенного активатора.

Процесс идет по следующей схеме:

протеин С + активатор (избыток) $\Rightarrow$ активированный Протеин С
активированный Протеин С + пептид-pNA $\Rightarrow$ пептид + pNA (желтый)

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты:

1. буфер концентрированный – 1 флакон (2,0 мл);
2. активатор Протеина С, лиофильно высушенный – 2 флакона;
3. плазма-калибратор, лиофильно высушенная – 1 флакон;
4. хромогенный субстрат, лиофильно высушенный – 2 флакона.

Инициалы
28.05.08г.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Отклонение от линейности в диапазоне активностей от 15% до 100% не превышает 10%.

Чувствительность метода определения – 12%.

Коэффициент вариации результатов определения - не более 10%.

Допустимый разброс результатов при измерении активности протеина С разными наборами одной серии - не более 10%.

Допустимое отклонение активности протеина С от аттестованного значения в плазме-калибраторе не превышает 10%.

В нормальной плазме здоровых лиц активность протеина С составляет 70-130%.

Противосвертывающая система протеина С включает тромбомодулин, протеин С, протеин S, тромбин как активатор протеина С, ингибитор протеина С.

Действие системы протеина С направлено на ингибирование факторов свертывающей системы крови: фактора VIIIa и фактора Va, а также на инактивацию ингибитора тканевого активатора плазминогена - PAI-1.

Гомозиготная недостаточность протеина С приводит к развитию фульминантной пурпуры у детей (несовместимой с жизнью). Гетерозиготный дефицит протеина С или протеина S проявляется ранними тромбозами: инфарктом миокарда, тромбоэмболией системы легочной артерии, тромбозами глубоких и поверхностных вен нижних конечностей, рецидивирующими тромбозами различной локализации и др.

Лечение тромбозов непрямыми антикоагулянтами (варфарином, пелентаном и др.) на фоне гетерозиготного дефицита протеина С может приводить к нарастанию клиники тромбозов или сопровождаться развитием острых некрозов кожных покровов различной локализации, так называемых «кумариновых некрозов».

Приобретенный дефицит протеина С наблюдается при печеночной недостаточности, острых ДВС-синдромах, септических состояниях, утяжеляет течение основного заболевания и, в свою очередь, требует медикаментозной и трансфузионной коррекции.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2a.

4.2. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы 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

- Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, длина волны 405 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм;
- рН-метр;
- центрифуга лабораторная, развивающая ускорение 2000 g (3000 об/мин);
- пробирки центрифужные, пластиковые или стеклянные силиконизированные;
- липетки полуавтоматические одноканальные переменного или фиксированного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,05; 0,2; 0,4; 1,0 и 2,0 мл;
- баня водяная, поддерживающая температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- колба мерная вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- цитрат натрия, 0,11 М (3,8%);
- кислота уксусная, 50%;
- бумага масштабнo-координатная Н-1;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь отобрать в силиконизированную стеклянную или пластиковую пробирку с 3,8% (0,11 моль/л) цитратом натрия (9:1). Центрифугировать при комнатной температуре ($18-25^\circ\text{C}$) в течение 7 мин при 1000 об/мин (240 g), плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать при комнатной температуре в течение 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 при комнатной температуре - не более 2 ч, при температуре $2-8^\circ\text{C}$ - не более 8 ч. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус $18-20^\circ\text{C}$ и хранение при этой температуре не более 2 мес.



7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагентов

Рабочий буферный раствор.

Буфер концентрированный (2,0 мл) развести дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь $pH=8,25\pm0,05$. Готов к проведению анализа через 20 мин после разведения. Хранить при температуре $2-8^{\circ}C$ не более 10 сут.

Раствор активатора Протеина С.

В один флакон с лиофильно высушенным активатором Протеина С внести 5,0 мл рабочего буферного раствора, перемешать покачиванием. Реагент готов к проведению анализа через 20 мин после растворения.

Раствор хромогенного субстрата.

В один флакон с хромогенным субстратом внести 2,0 мл дистиллированной воды, перемешать покачиванием. Реагент готов к проведению анализа через 20 мин после растворения.

Раствор плазмы-калибратора. В один флакон с плазмой-калибратором внести 1,0 мл дистиллированной воды, перемешать покачиванием. Раствор Плазмы-калибратора готов к проведению анализа через 20 мин после растворения.

7.2. Стабильность реагентов

Реагенты	$2-8^{\circ}C$	$18-25^{\circ}C$	$-18-20^{\circ}C$
Раствор активатора Протеина С	5 сут	2 сут	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	7 сут	2 сут	2 мес.
Раствор плазмы-калибратора	8 ч	2 ч	2 мес.

7.3. Построение и использование калибровочного графика

Приготовить серию разведений раствора плазмы-калибратора с известной активностью (А) протеина С (указанной в паспорте) в следующей последовательности:



Пробирка №	1	2	3	4
Разведение в	Без разведения	В 2 раза	В 4 раза	В 8 раз
Активность Протеина С, %	A	0,5 A	0,25 A	0,125 A
Рабочий буферный раствор, мл	-	0,2	0,2	0,2
Раствор плазмы-калибратора, мл	0,4	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл	0,2  0,2  0,2 			

Во всех разведенных образцах раствора плазмы-калибратора провести определение оптической плотности по методу, описанному ниже (см. п. 7.3).

На вертикальной оси Y отложить величины оптической плотности (ед. опт. плотн.), полученные для каждого разведения раствора плазмы-калибратора, а на горизонтальной оси X – соответствующую активность протеина С (%).

Калибровочный график должен представлять собой прямую линию, линейен в интервале активности протеина С от 15 до 100%.

7.3. Проведение анализа

Для анализа использовать неразведенную плазму крови пациента.

Анализ провести в пластиковых кюветах, термостатируемых при температуре 37°C.

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Раствор активатора Протеина С	0,4 мл	-
Исследуемая плазма	0,05 мл	-
Рабочий буферный раствор	-	1,0 мл
Перемешать и инкубировать при температуре 37°C точно 5 мин		
Раствор хромогенного субстрата	0,2 мл	-
Перемешать и инкубировать при температуре 37°C точно 5 мин		
Уксусная кислота, 50%	0,4 мл	-

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

После внесения в инкубационную смесь 50% уксусной кислоты, останавливающей реакцию, измерить оптическую плотность образца исследуемой плазмы против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭК) при длине волны 405 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Определение активности протеина С (%) провести по калибровочному графику зависимости активности протеина С (%) от оптической плотности раствора (ед. опт. плотн.).

Активность протеина С прямо пропорциональна оптической плотности раствора.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Результаты исследования активности протеина С в образцах плазмы крови пациентов учитывают в % от известной активности протеина С в плазме-калибраторе.

Образцы с высоким уровнем активности протеина С могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов, поэтому точные значения активности протеина С для таких образцов могут быть получены при разведении исходной плазмы в 2 раза. При этом результат, полученный по калибровочному графику, должен быть умножен на 2.

Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазмы крови пациентов:

- с повышенным содержанием липидов;
- с повышенным содержанием билирубина.

В нормальной плазме крови здоровых лиц активность протеина С составляет 70-130%.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до 25°C не более 10 сут.

Срок годности наборов - 24 мес.

Рабочий буферный раствор можно хранить при температуре 2-8 не более 10 сут.

Раствор активатора протеина С можно хранить не более 2 сут при комнатной температуре (18-25°C), не более 5 сут при температуре 2-8°C и не более 2 мес при температуре минус 18-20°C.

Раствор хромогенного субстрата можно хранить не более 2 сут при комнатной температуре (18-25°C), не более 7 сут при температуре 2-8°C и не более 2 мес при температуре минус 18-20°C.

Раствор плазмы-калибратора можно хранить не более 2 ч при комнатной температуре, не более 8 ч при температуре 2-8°C и не более 2 мес при температуре минус 18-20°C.

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

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

125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а, Гематологический научный центр РАМН, тел/факс (495) 614-90-57, e-mail: renam@blood.ru

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117241, г. Москва, Научный проезд, д. 14 а, тел.: (495) 120-60-96; 120-60-95.

Заведующий отделом производства НПО «РЕНАМ»

МБООИ «Общество больных гемофилией»

кандидат биологических наук



А.Л.Берковский

Заведующий клинико-диагностической лабораторией

ГУ РНЦХ им. В.Б.Петровского РАМН



Ю.Е.Михайлов

