

УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от «___» _____ 2009 г.
№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор НПО «РЕНАМ»
МБООИ «Общество больных
гемофилией»

«03» _____ 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для скрининговой оценки
нарушений в системе протеина С
(Протеин С-скрининг тест)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Протеин С-скрининг тест предназначен для выявления врожденной или приобретенной недостаточности противосвертывающей системы протеина С (протеин С, протеин S, тромбомодулин, тромбин, ингибитор протеина С), которая приводит к тромбозам различной локализации.

Набор предназначен для проведения 40 макро или 80 микро определений при расходе по 0,1 или по 0,05 мл каждого реагента на один анализ, соответственно.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Инкубация нормальной плазмы с активатором протеина С 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 удлинение АЧТВ при добавлении активатора менее выражено, чем в норме.

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты:

1. АЧТВ-реагент, лиофильно высушенный - 2 фл.;
2. АЧТВ-реагент с активатором, лиофильно высушенный - 2 фл.;
3. плазма-калибратор, лиофильно высушенная - 1 фл.;
4. 0,025 М раствор кальция хлористого - 1 фл. (5,0 мл).



3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Продолжительность АЧТВ в контрольной плазме без активатора в диапазоне 25-35 сек.

Продолжительность АЧТВ в контрольной плазме с активатором в диапазоне 75-130 сек.

Коэффициент вариации определений АЧТВ в контрольной плазме без активатора или с активатором не более 10%.

Допустимый разброс результатов при определении АЧТВ в контрольной плазме без активатора или с активатором разными наборами одной серии - не более 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, тромбозом 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 и S 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 2а.

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

- коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная, развивающая ускорение 2000 g (3000 об/мин);
- секундомер;
- полуавтоматические пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,05; 0,1, 1,0 и 2,0 мл;
- пробирки центрифужные пластиковые или стеклянные силиконированные вместимостью 10 мл;
- раствор цитрата натрия 0,11М (3,8%);
- вода дистиллированная;
- перчатки пластиковые или резиновые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь отобрать в силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку с 3,8% (0,11 моль/л) цитратом натрия (9:1). Центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) 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°C - не более 8 ч. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагентов

Раствор АЧТВ-реагента

Внести во флакон с АЧТВ-реагентом 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании при комнатной температуре (18-25°C) и выдержать в течении 60 мин при комнатной температуре.

Полученный раствор АЧТВ-реагента можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 сут или при комнатной температуре (18-25°C) не более 3 сут. Не замораживать.

Раствор АЧТВ-реагента с активатором

Внести во флакон с АЧТВ-реагентом с активатором 2,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при осторожном покачивании при комнатной температуре и выдержать в течении 60 мин при комнатной температуре.

Полученный раствор АЧТВ-реагента с активатором можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 сут или при комнатной температуре не более 3 сут. Не замораживать.

Раствор плазмы-калибратора

Внести во флакон с плазмой-калибратором 1,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое и выдержать перед анализом в течение 20-30 мин при комнатной температуре.

Полученный раствор можно хранить при температуре +2-8°C не более 4 ч или при комнатной температуре не более 2 ч.

Подготовка раствора кальция хлорида

Перед использованием прогреть 0,025 М раствор кальция хлористого при температуре 37° С в течение 15 мин.

Раствор кальция хлористого после вскрытия флакона и прогрева хранению не подлежит.

7.2. Ход исследования

1. Приготовить 2 кюветы (А и Б), внести в них по 0,1 мл исследуемой плазмы пациента.

2. Внести в кювету А 0,1 мл раствора АЧТВ-реагента с активатором, в кювету Б внести 0,1 мл АЧТВ-реагента без активатора.

3. Инкубировать обе кюветы в течение 3 мин при температуре 37° С.

4. Добавить в обе кюветы по 0,1 мл 0,025 М раствора кальция хлористого, прогретого при температуре 37° С.

5. После добавления кальция хлористого отметить по секундомеру прибора время образования сгустка.

6. В кювете А, куда добавляли активатор, время свертывания определено как АЧТВа (АЧТВ активированное), в кювете Б, без активатора, - как АЧТВ.

7. Каждое определение провести 2 раза, рассчитать среднюю арифметическую величину.

8. Аналогичным образом (см п. 1-7) определить АЧТВа и АЧТВ для плазмы-калибратора, входящей в состав набора.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выразить результаты анализа в виде нормализованного отношения (НО, усл. ед.) по формуле:

$$НО = \frac{(АЧТВ_a / АЧТВ)_п}{(АЧТВ_a / АЧТВ)_{кал}} \times НО_k,$$

где: АЧТВ_а - АЧТВ плазмы с активатором, сек;

АЧТВ - АЧТВ плазмы без активатора, сек;

(АЧТВ_а/АЧТВ)_п – отношение активированного АЧТВ пациента к АЧТВ того же пациента без активации, усл. ед.;

(АЧТВ_а/АЧТВ)_{кал} - отношение активированного АЧТВ плазмы-калибратора к АЧТВ плазмы-калибратора без активации, усл.ед.;

НО_к - нормализованное отношение плазмы-калибратора, коэффициент пересчета активности протеина С для лиофильно высушенной плазмы-калибратора (указывается в паспорте на набор).

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

У здоровых лиц НО составляет 0,7 – 1,3 усл. ед.

Значение НО ниже 0,7 свидетельствует о значительных нарушениях в системе протеина С (функциональная неполноценность, сниженный синтез протеина С, протеина S) или о наличии фактора Va, резистентного к действию протеина С.

Образцы плазмы пациентов с повышенным содержанием гепарина должны быть исключены из исследования.

Прием антикоагулянтов непрямого действия и наличие у пациентов волчаночного антикоагулянта могут приводить к ложноположительным результатам определения активности системы протеина С.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре 2-8°C в течение всего срока годности (24 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 10 сут.

Раствор АЧТВ-реагента и раствор АЧТВ-реагента с активатором можно использовать не более 7 сут при условии хранения при температуре 2-8°C или не более 3 сут при комнатной температуре (18-25°C); перед анализом не прогревать.

Раствор плазмы-калибратора можно использовать только в течение времени не более 2 ч после приготовления при хранении при комнатной температуре или в течение времени не более 4 ч при температуре 2-8°C.

Раствор кальция хлористого хранению не подлежит.

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.: (499) 120-60-96; 120-60-95.

Зав. производства НПО «РЕНАМ» к.б.н.



А.Л.Берковский

Зав. лаб. клинической коагулологии ГНЦ РАМН,
д. м. н., профессор



С.А.Васильев

