

УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от « » 2011 г.
№



ИНСТРУКЦИЯ
по применению Плазмы контрольной с нормальным и со сниженным
уровнем протеина С
(Плазма-Протеин С)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов Плазма-Протеин С предназначен для контроля правильности проведения анализов активности системы протеина С и резистентности ф. V к протеину С.

Набор предназначен для проведения 120 определений при расходе по 50 мкл реагента на один анализ, соответственно.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Реагент Плазма-Протеин С с аттестованной активностью протеина С (нормальной или сниженной) анализируют одновременно с исследуемой плазмой пациента при выполнении соответствующего теста. Полученные данные нормы или патологии должны укладываться в диапазон аттестованных значений.

2.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты:

- Плазма контрольная с нормальным уровнем активности протеина С лиофильно высушенная - 3 флакона;
- Плазма контрольная со сниженным уровнем активности протеина С лиофильно высушенная - 3 флакона.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Противосвертывающая система протеина С (протеин С, протеин S, тромбомодулин, тромбин, ингибитор протеина С) осуществляет функцию регуляции свертывающей активности плазмы крови путем ингибирования активности факторов VIIIa и Va и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1).

Наследственные и приобретенные нарушения в системе протеина С препятствуют снижению свертывающего потенциала плазмы крови и вызывают тромбозы различной локализации. При наследственной тромбофилии, в основе которой лежит наличие у пациентов мутантного фактора V (Лейден), имеет место резистентность к действию активированного протеина С, что приводит к повышению свертывания крови по внутреннему и внешнему механизмам и вызывает тромбозы периферических вен, инфаркты миокарда, тромбоэмболию легочной артерии, тромбозы вен сетчатки глаза и др.

Плазма контрольная с нормальным уровнем протеина С используется для контроля у пациентов с нормальным уровнем активности протеина С, а плазма со сниженным уровнем – у пациентов с низким уровнем активности протеина С.

Исследование активности системы протеина С проводят с помощью набора реагентов Протеин С скрининг тест, исследование резистентности фактора V к протеину С – с помощью набора РеаЛейден-тест.

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 или при наличии мутантного фактора V (Лейден) удлинение АЧТВ при добавлении активатора менее выражено, чем в норме.

С целью минимизации влияния коагулометров принято результаты анализа АЧТВ с активатором и без активатора представлять в виде нормализованного отношения (НО) этих величин, и результаты свертывания плазмы крови пациента (или контрольной плазмы) сравнивать с результатами аналогичного анализа плазмы-калибратора с установленным НО - НОк.

Аналитические параметры набора Плазма-Протеин С следующие:

- НО реагента Плазма-Протеин С с нормальным уровнем активности протеина С – в диапазоне от 0,7 до 1,1;
- НО реагента Плазма-Протеин С со сниженным уровнем активности протеина С – в диапазоне от 0,3 до 0,6.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

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

ях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

1. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- набор реагентов Протеин С-скрининг тест;
- набор реагентов РеаЛейден-тест;
- центрифуга лабораторная, развивающая ускорение 2000 g (3000 об/мин);
- полуавтоматические пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,025; 0,05; 0,1, 1,0 и 2,0 мл;
- пробирки центрифужные пластиковые или стеклянные силиконированные вместимостью 10 мл;
- раствор цитрата натрия 0,11 М (3,8%);
- вода дистиллированная;
- перчатки пластиковые или резиновые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь отобрать в силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) цитратом натрия (9:1) или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) цитратом натрия.

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 центрифугирования перенести плазму в другую пластиковую пробирку.

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 2 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре 2-8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагента Плазма-Протеин С

Внести в один флакон с реагентом с нормальным уровнем активности протеина С и в один флакон с пониженной активностью протеина С по 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при покачивании, избегая образования пены. Перед анализом выдержать полученные растворы при комнатной температуре в течение 20 мин.

Приготовленные растворы можно хранить во флаконе изготовителя не более 4 ч при температуре 2-8°C, не более 2 ч при комнатной температуре или при температуре минус 18-20°C в течение 2 недель.

7.2. Приготовление реагентов из набора Протеин С-скрининг тест.

Раствор АЧТВ-реагента

Внести во флакон с АЧТВ-реагентом 2,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при осторожном покачивании при комнатной температуре, выдержать перед анализом в течении 30 мин при комнатной температуре.

Полученный раствор АЧТВ-реагента можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 сут или при комнатной температуре не более 2 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 30 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 2 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.

Допускается однократное замораживание плазмы-калибратора при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Подготовка раствора кальция хлористого

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

Раствор кальция хлористого после вскрытия флакона и прогрева хранению не подлежит, использовать не более 8 ч.

7.3. Приготовление реагентов из набора РеаЛейден-тест

Раствор АЧТВ-реагента

Внести во флакон с АЧТВ-реагентом 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании при комнатной температуре, выдержать перед анализом в течении 30 мин при комнатной температуре.

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

Допускается однократное замораживание плазмы-калибратора при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Раствор плазмы субстрат дефицитной по ф. V

Внести во флакон с плазмой субстрат дефицитной 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 2 ч или при комнатной температуре не более 8 ч.

Допускается однократное замораживание плазмы-калибратора при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Подготовка раствора кальция хлористого

Перед использованием прогреть 0,025 М раствор кальция хлористого при температуре 37°C в течение 15 мин. Прогретый раствор хранению не подлежит, использовать не более 8 ч.

7.4. Ход исследования с набором Протеин С-скрининг тест

1. Приготовить 8 кювет (А, А1, А2, А3 и Б, Б1, Б2, Б3), внести в кюветы А и Б по 0,05 мл исследуемой плазмы пациента, в кюветы А1 и Б1 по 0,05 мл раствора реагента Плазма-Протеин С с нормальным уровнем протеина С, в кюветы А2 и Б2 по 0,05 мл раствора реагента Плазма-Протеин С со сниженным уровнем протеина С, в кюветы А3 и Б3 по 0,05 мл раствора плазмы-калибратора.

2. Внести в кюветы А, А1, А2, А3 по 0,05 мл раствора АЧТВ-реагента с активатором, в кюветы Б, Б1, Б2, Б3 внести по 0,05 мл АЧТВ-реагента без активатора.

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

4. Добавить во все кюветы по 0,05 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 кюветах А, А1, А2, А3, куда добавляли активатор, время свертывания определено как АЧТВа (АЧТВ активированное), в кюветах Б, Б1, Б2, Б3 без активатора - как АЧТВ.

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

7.5. Ход исследования с набором РеаЛейден-тест

1. Перед анализом смешать исследуемую плазму пациента, плазму-калибратор и реагент Плазма-Протеин С с нормальным и с пониженным уровнем протеина С с плазмой субстрат дефицитной по фактору V в соотношении 1:4 (25 мкл исследуемой плазмы + 100 мкл субстрат дефицитной плазмы).

2. Приготовить 8 кювет (А, А1, А2, А3 и Б, Б1, Б2, Б3), внести в кюветы А и Б по 0,05 мл смешанной исследуемой плазмы пациента, в кюветы А1 и Б1 по 0,05 мл смешанного исследуемого реагента Плазма-Протеин С с нормальной активностью протеина С, в кюветы А2 и Б2 по 0,05 мл смешанного исследуемого реагента Плазма-Протеин С со сниженной активностью про-

теина С, в кюветы А3 и Б3 по 0,05 мл смешанного раствора плазмы-калибратора.

3. Внести в кюветы А, А1, А2, А3 по 0,05 мл раствора АЧТВ-реагента с активатором, в кюветы Б, Б1, Б2, Б3 внести по 0,05 мл АЧТВ-реагента без активатора.

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

5. Добавить во все кюветы по 0,05 мл 0,025 М раствора кальция хлористого, прогретого при температуре 37° С.

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

6. В кюветах А, А1, А2, А3, куда добавляли активатор, время свертывания определено как АЧТВа (АЧТВ активированное), в кюветах Б, Б1, Б2, Б3 без активатора, - как АЧТВ.

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

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: АЧТВа - АЧТВ исследуемой плазмы пациента и реагента (Плазма-Протеин С с нормальной и с пониженной активностью) с активатором, сек;

АЧТВ - АЧТВ исследуемой плазмы пациента и реагента (Плазма-Протеин С с нормальной и с пониженной активностью) без активатора, сек;

(АЧТВа/АЧТВ)п – отношение активированного АЧТВ пациента и реагента (Плазма-Протеин С с нормальной и с пониженной активностью) к АЧТВ того же пациента и реагента без активации, усл. ед.;

(АЧТВа/АЧТВ) кал - отношение активированного АЧТВ плазмы-калибратора к АЧТВ плазмы-калибратора без активации, усл.ед.;

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

НО реагента Плазма-Протеин С с нормальным и с пониженным уровнем протеина С должно укладываться в диапазон аттестованных значений. Если полученные значения выходят за диапазон аттестованных значений НО, это указывает на ошибки в проведении анализов.

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 (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 10 сут.

Приготовленный раствор реагента Плазма-Протеин С можно хранить во флаконе изготовителя не более 4 ч при температуре 2-8°C, не более 2 ч при комнатной температуре (18-25°C) или в при температуре минус 18-20°C в течение 14 сут.

Раствор АЧТВ-реагента и раствор АЧТВ-реагента с активатором можно использовать при температуре 2-8°C не более 7 сут или при комнатной температуре не более 2 сут; перед анализом не прогревать.

Раствор плазмы-калибратора и раствор плазмы субстратной можно использовать при комнатной температуре не более 2 ч или при температуре 2-8°C не более 8 ч.

Раствор кальция хлористого после прогрева можно использовать не более 8 ч.

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

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

125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4, ФГБУ ГНЦ Минздравсоцразвития России, тел/факс (495) 614-90-57, e-mail: renam@blood.ru

Зав. производства МБООИ

«Общество больных гемофилией», к.б.н.



А.Л.Берковский

Зав. лаб. клинической коагулологии ФГБУ ГНЦ

Минздравсоцразвития России, д. м. н., профессор



С.А.Васильев

Пронумеровано
и прошнуровано 7
Президент МБОУ «
больных гемофилией»
Ю.А.Жулёв

листов
Общество



Эти документы являются

не являются документами, содержащими сведения, составляющие государственную тайну

и не подлежат передаче за пределы Российской Федерации

и не подлежат передаче за пределы Российской Федерации