

**ИНСТРУКЦИЯ**

По применению медицинского изделия для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения активности протеина С оптическим методом (Реахром-Протеин С) по ТУ 9398-019-05595541-2008».

**НАЗНАЧЕНИЕ**

**Предназначенное применение.** Медицинское изделие для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения активности протеина С оптическим методом (Реахром-Протеин С) по ТУ 9398-019-05595541-2008» (сокращенное наименование – «Реахром-Протеин С») предназначено для определения активности протеина С в плазме крови методом с хромогенным субстратом как вручную, так и на всех типах анализаторов, имеющих оптический канал регистрации при длине волны 405 нм.

**Область применения.** Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

**Предназначенный пользователь.** Определение активности протеина С с помощью набора Реахром-Протеин С может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

**Диагностическая роль.** Противосвертывающая система протеина С (протеин С, протеин S, тромбомодулин, тромбин, ингибитор протеина С) осуществляет важную функцию регуляции свертывающей активности плазмы крови. Действие системы направлено преимущественно на ингибирование факторов VIIa и Va и на инактивацию ингибитора активатора плазминогена (PAI-1). Нарушения в системе вызывают тромбозы различной локализации. Гомозиготная недостаточность протеина С приводит к развитию фульминантной пурпуры у детей (практически несовместимой с жизнью). Гетерозиготный дефицит протеина С или протеина S проявляется ранними тромбозами: инфарктом миокарда, тромбозом легочной артерии, тромбозы глубоких и поверхностных вен нижних конечностей, рецидивирующие тромбозы различной локализации и др. Кроме того, 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 и утяжеляет течение основного заболевания и, в свою очередь, требует медикаментозной и трансфузионной коррекции.

**ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА****Состав набора:**

Активатор протеина С лиофильно высушенный - 5 мл/флакон – 2 шт.;  
Плазма-калибратор лиофильно высушенная - 1 мл/флакон – 1 шт.;  
Хромогенный субстрат лиофильно высушенный - 2мл/флакон – 2шт.;  
Буфер концентрированный - 2 мл/флакон – 1шт.

**Число анализируемых проб биологического материала**

Один набор предназначен для проведения 20 – 100 определений в зависимости от типа используемого анализатора.

**Принцип метода.**

Метод определения активности протеина С в образце плазмы основан на способности активированного протеина С гидролизовать пептидный хромогенный субстрат. Количество высвобождаемого при этом пара-нитроанилина (pNA) прямо пропорционально активности протеина С в образце плазмы. Протеин С плазмы активируется при добавлении к ней очищенного экстракта яда Agkistrodon contortrix contortrix.

Процесс идет по следующей схеме:

Протеин С + активатор (избыток) ⇒ Активир.ПрС

Активир.ПрС + Пептид-pNA ⇒ Пептид + pNA (желтый)

**МЕТОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАНЫХ КАЛИБРАТОРУ**

Активность протеина С в плазме-калибраторе устанавливают при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против 2-го Международного Стандарта Протеина С в плазме, код 02/342, полученного из National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Значения активности протеина С в плазме-калибраторе указано в паспорте медицинского изделия.

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения протеина С: билирубин в концентрации не более 0,2 г/л, свободный гемоглобин – не более 2 г/л, триглицериды – не более 10 г/л. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно положительных результатов.

**Чувствительность**

Минимальная активность протеина С, определяемая набором Реахром-Протеин С - не более 10%.

**Воспроизводимость**

Активность протеина С в плазме-калибраторе составляет 80-120%. Допустимое отклонение активности протеина С в плазме-калибраторе от аттестованного значения не более 5%. Коэффициент вариации результатов определения активности протеина С не превышает 5%.

Допустимый разброс результатов определения активности протеина С в одной пробе крови разными наборами одной серии не превышает 5%.

**Линейность определения в диапазоне определяемых активностей**

Линейность определения активности протеина С зависит от модели коагулометра. Отклонение от линейности в диапазоне активности протеина С от 10 до 100% не более 5%.

**Значения активности, соответствующие нормальным**

Нормальный диапазон значений протеина С, полученный при определении набором Реахром-Протеин С у не менее 100 здоровых доноров, составляет 70-140%, что соответствует биологическому референтному интервалу [1].

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Набор реагентов Реахром-Протеин С предназначен только для диагностики in vitro. Класс потенциального риска применения набора – 2а.

Набор реагентов Реахром-Протеин С не является источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляет рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

При работе с набором и образцами крови следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиН 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010); Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика ВИЧ-инфекции» (СП 3.1.5. 2826 от 11.01.2011).

При работе следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита человека ВИЧ1 и ВИЧ2, вирусы гепатита В и гепатита С или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Плазма-калибратор получена из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее их следует рассматривать как потенциально вирус-опасные.

**ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

- Автоматический коагулометр открытого типа с оптической системой регистрации результатов реакции.
- спектрофотометр, ФЭК, биохимический, коагулологический или любой другой анализатор, имеющий длину волны для регистрации 405 нм;
- центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- термостат, поддерживающий температуру 37±1°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М) или
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- мерный цилиндр вместимостью 100 мл;
- уксусная кислота 50% концентрации;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

**АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ****Вид анализируемого биологического материала**

Набор реагентов Реахром-Протеин С предназначен для определения активности протеина С в плазме крови. Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянной поверхностью.

**Процедура получения биологического материала**

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 от плюс 18 до плюс 25°C в течение 15 минут при 3000 об/мин (1200g).

**Условия хранения биологического материала**

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 часов при комнатной температуре от плюс 18 до плюс 25°C и не более 8 часов при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре от минус 18 до минус 20°C и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

**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 белков.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Рабочий буферный раствор.** Буфер концентрированный (2 мл) развести дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь pH=8,25±0,05.

**Активатор Протеина С.** Во флакон с лиофильно высушенным Активатором Протеина С внести 5 мл рабочего буферного раствора и растворить содержимое осторожным покачиванием. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

**Раствор хромогенного субстрата.** Во флакон с хромогенным субстратом внести 2 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

**Раствор плазмы-калибратора.** Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

**ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ****Проведение анализа на автоматическом анализаторе**

- Выбрать на анализаторе программу для определения протеина С хромогенным методом.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки анализатора.
- Запустить программу Calibrate, калибровка прибора.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу определения протеина С.
- Читать результаты.

## Проведение анализа ручным методом и на полуавтоматическом коагулометре

### Построение калибровочного графика

Использовать только пластиковые пробирки. Приготовить следующие разведения плазмы-калибратора:

Пробирка №	1	2	3	4
Разведение в	Без разведения	2 раза	4 раза	8 раз
Активность Протеина С в %	A*	0.5A	0.25A	0.125A
Рабочий буферный раствор, мл	-	0.2	0.2	0.2
Плазма-калибратор, мл	0.4	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл		0.2	0.2	0.2

\*A - активность протеина С в плазме-калибраторе, указана в паспорте на набор.

С каждым разведенным раствором плазмы-калибратора с установленной активностью протеина С, %, провести определение оптической плотности по методу, описанному ниже. На оси ординат (Y) по линейной шкале отложить величины оптической плотности (ед. опт. плотн.), полученные для каждого разведения плазмы-калибратора, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале отложить соответствующую активность протеина С (%). Калибровочный график должен представлять собой восходящую прямую линию. Калибровочный график должен быть построен для каждой серии реагентов.

### Проведение анализа.

Для анализа используется неразведенная плазма пациента.

Анализ проводится в пластиковых кюветках, термостабируемых при 37°C.

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Активатор Протеина С, мкл	400	-
Исследуемая плазма (или плазма калибратор), мкл	50	-
Рабочий буферный раствор, мкл	-	1000
Перемешать и инкубировать при 37°C точно 5 мин		-
Раствор хромогенного субстрата, мкл	200	-
Перемешать и инкубировать при 37°C точно 5 мин		-
50% уксусная кислота, мкл	400	-

Измерить оптическую плотность образца против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм.

## РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

### При проведение анализа на автоматическом анализаторе

Автоматический анализатор регистрирует скорость нарастания оптической плотности при расщеплении хромогенного субстрата.

### При проведение анализа ручным методом и на полуавтоматическом коагулометре

Измерить оптическую плотность исследуемого образца против кюветы сравнения в оптическом канале анализатора или на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм. По калибровочному графику определить активность протеина С, %.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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, считанный из калибровочного графика должен быть умножен на 2.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности протеина С следует контролировать с помощью реагента Плазма контрольная по ТУ 9398-026-05595541-2009, код КМ-2.

## УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности!

Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается хранение при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

### Стабильность приготовленных реагентов

Реагенты	+2-8°C	+18-22°C	-18-20°C
Активатор Протеина С	5 дней	2 дня	2 мес.
Раствор хромогенного субстрата	7 дней	2 дня	2 мес.
Раствор плазмы – калибратора	8 часов	4 часа	2 мес.
Рабочий буферный раствор	2 мес.	5 дней	-

Транспортирование наборов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание не допускается.

## ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора Реахром-Протеин С требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

## МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с набором Реахром-Протеин С с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на три четверти, завязывают, маркируют надписью: «Отходы. Класс Б», наносят на бирку название организации, дату и ФИО исполнителя и помещают на участок временного хранения до вывоза транспортом специального подразделения к месту обеззараживания и утилизации.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 наборы реагентов Реахром-Протеин С, не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Г. Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости («Отходы. Класс Г»). Диагностические средства собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного) в соответствии с требованиями нормативных документов в зависимости от класса опасности отходов. Вывоз отходов класса Г для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Г осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

## СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Номер по каталогу
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Биологический риск
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

Дата утверждения инструкции 30 мая 2008 г.

## ЛИТЕРАТУРА И НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

- Алан, Г.Б. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам / Г.Б. Алан. – М.: Лабора, 2013. – 1280 с.
- Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушения гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2008. – 292 с.
- Яровая Г.А., Нешкова Е.А., Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Мелкумян А.Л. Внутренний путь свертывания крови: учебно-методическое пособие – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2017. – 83 с.
- Vinazzer H, Pangraz U. Protein C: comparison of different assays in normal and abnormal plasma samples. Thromb Res. 1987; 46: 1-8
- Sturk A, Morrien-Salmons WM, Huismans MV, et al. Analytical and clinical evaluation of commercial protein C assays. Clin Chim Acta. 1987; 165: 263-70
- ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
- ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
- Приказ Минздрава России от 19.01.2017 г №11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинских изделий».

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2 тел/факс (499) 707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: [info@renam.ru](mailto:info@renam.ru)