

Набор реагентов для определения активности протеина С оптическим методом.

Противосвертывающая система протеина С включает в себя: тромбомодулин, протеин С, протеин S, тромбин как активатор протеина С, ингибитор протеина С. Конечное действие системы протеина С направлено преимущественно 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 (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. Комплект реагентов РеаХром-Протеин С предназначен для определения активности протеина С в плазме крови человека с целью диагностики ее врожденной и приобретенной недостаточности.

Принцип метода.

Метод определения активности протеина С в образце плазмы основан на способности активированного протеина С гидролизовать пептидный хромогенный субстрат. Количество высвобождаемого при этом паранитроанилина (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.Пр.С
Активир.Пр.С + Пептид-pNA ⇒ Пептид + pNA (желтый)

Состав набора:

Буфер концентрированный (2 мл) – 1 фл.
 Активатор Протеина С лиофильно высушенный (5 мл) – 2 фл.
 Плазма-калибратор лиофильно высушенная (1 мл) – 1 фл.
 Хромогенный субстрат лиофильно высушенный (2мл) – 2 фл

Приготовление реагентов:

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. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения. Хранить при температуре 2-8°C не более 10 дней.

Активатор Протеина С. Во флакон с лиофильно высушенным Активатором Протеина С внести 5 мл рабочего буферного раствора. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после растворения.

Раствор хромогенного субстрата. Во флакон с хромогенным субстратом внести 2 мл дистиллированной воды. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после растворения.

Раствор плазмы-калибратора. Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды. Плазма-калибратор готова к проведению анализа через 20 минут после растворения.

Стабильность 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	2 часа	2 мес.

Дополнительные реагенты:

1. Цитрат натрия 0.11M (3.8%) раствор.
2. Уксусная кислота 50% концентрации.

Получение исследуемой плазмы для анализа.

Венозную кровь взять в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку на 3,8% (0.11моль/л) цитрате натрия (9:1), центрифугировать 7 мин при 1000 об/мин (240g), плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8°C не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C.

Построение и использование калибровочного графика.

Для проведения анализа необходимо использовать пластиковые пробирки. Приготовить серию разведенной плазмы-калибратора в следующей последовательности:

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
Раствор плазмы-калибратора, 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.

Для построения калибровочного графика используют плазму-калибратор с известной активностью протеина С (A). На оси Y отложить величины оптической плотности, полученных для каждого разведения плазмы-калибратора, а на оси X - активность протеина С в %. Калибровочный график линеен в интервале активности протеина С от 10 до 100%. Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определить активность протеина С.

Проведение анализа.

Для анализа используется неразведенная плазма пациента. Анализ проводится в пластиковых кюветах, термостатируемых при 37°C.

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

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

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.

Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных:

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

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

Меры предосторожности.

Все компоненты данного набора предназначены только для диагностики *in vitro*. Компоненты набора следует рассматривать, как потенциально биологически опасные вещества, при работе с которыми необходимо соблюдать все меры предосторожности.

При работе с исследуемыми образцами следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита ВИЧ1 и ВИЧ2, гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Контроль качества.

Нормальные и патологические значения Протеина С следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ:

Плазма контрольная – 11 параметров код КМ-2

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*

