

**Набора реагентов для определения активности системы протеина С плазмы крови**

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 ингибицию 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, тромбоэмболией системы легочной артерии, тромбозы глубоких и поверхностных вен нижних конечностей, рецидивирующие тромбозы различной локализации и др. Кроме того, лечение тромбозов непрямыми антикоагулянтами (варфарин, 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. Набор Протеин С-тест предназначен для выявления врожденной или приобретенной недостаточности системы протеина С, а также для обнаружения мутантного фактора V (Лейден), резистентного к протеину С.

**Принцип метода.**

Активация эндогенного протеина С происходит под действием фракции яда щитомордника (*Agkistrodon contortrix contortrix*), что удлиняет время свертывания плазмы в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). В плазме больных с дефицитом системы протеина С или при наличии мутантного фактора V (Лейден) удлинение АЧТВ при добавлении активатора менее выражено, чем в норме.

**Состав набора:**

- АЧТВ-реагент- 2 флакона;
- АЧТВ-реагент с активатором протеина С - 2 флакона;
- Плазма-калибратор – 1 флакон;
- 0,025 М раствор кальция хлорида (5 мл) -1 флакон.

**Приготовление реагентов:**

- 1. АЧТВ-реагент.** Во флакон с АЧТВ-реагентом внести 2мл дистиллированной воды. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после разведения.
- 2. АЧТВ-реагент с активатором Протеина С.** Во флакон с АЧТВ-реагентом с активатором внести 2 мл дистиллированной воды. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после разведения.
- 3. Раствор плазмы-калибратора.** Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.
- 4. 0,025 М раствор кальция хлорида.** Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть при 37°С. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

**Стабильность реагентов.**

Реагенты	+2-8°С	+18-22°С	-18-20°С
АЧТВ-реагент	7 дней	1 день	-
АЧТВ-реагент с активатором Протеина С	7 дней	1 день	-
Раствор плазмы – калибратора	8 часов	2 часа	2 мес.

**Получение исследуемой плазмы для анализа.**

Венозную кровь взять в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку на 3,8% (0.11 моль/л) цитрате натрия (9:1), цен

трифугировать 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. Время хранения исследуемой плазмы до анализа при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8°С не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°С.

**Проведение анализа.**

При проведении анализа определяют 4 показателя:  
 АЧТВ плазмы-калибратора без активатора;  
 АЧТВ плазмы-калибратора с активатором;  
 АЧТВ плазмы больного без активатора;  
 АЧТВ плазмы больного с активатором.

В кювету коагулометра внести	АЧТВ актив.	АЧТВ
Раствор плазма-калибратора (больного)	50 мкл	50 мкл
АЧТВ-реагент	-	50 мкл
АЧТВ-реагент с активатором Протеина С	50 мкл	-
Инкубировать 3 мин при 37°С		
0,025М раствор кальция хлорида	50 мкл	50 мкл
Зафиксировать время свертывания в секундах на коагулометре.		

Результаты определения активности системы протеина С принято выражать в виде Нормализованного Отношения (НО):

$$НО = \frac{(АЧТВ_{актив} / АЧТВ)_{больн}}{(АЧТВ_{актив} / АЧТВ)_{калибр}} \times НО_{калибр}$$

где: НО калибр – Нормализованное Отношение плазмы-калибратора, указано в паспорте на набор.

**Интерпретация результатов.**

У здоровых лиц НО составляет 1,0 ± 0,3 (M ± 2σ). Значение НО ниже 0,7 свидетельствует о значительных нарушениях в Системе протеина С (функциональная неполноценность, сниженный синтез протеина С, протеина S) или о наличии мутантного фактора V (Лейден), 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.

**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 Нормализованного Отношения следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ:

Плазма контрольная с нормальным уровнем противосвертывающей системы (НО = 0,7-1,1) и со сниженным уровнем противосвертывающей системы (НО = 0,3-0,6) протеина С код ПФА-6/7

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)

