

Набор реагентов для определения резистентности фактора V к действию протеина С.

Противосвертывающая система протеина С (протенин 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. Охарактеризована новая форма наследственной тромбофилии, в основе которой лежит наличие у пациентов так называемого V фактора Leiden. Суть этой формы заключается в том, что V фактор Leiden (мутантный фактор V свертывающей системы крови) обладает резистентностью к действию активированного протеина С, что приводит к повышению свертывания крови по внутреннему и внешнему механизмам и повышает частоту тромбозов: тромбозы периферических вен, инфаркты миокарда, тромбозы легочной артерии, тромбозы вен сетчатки глаза и др.

РеаЛейден - тест – набор реагентов, предназначенных для определения резистентности активированного фактора V (фактор V Leiden) к действию активированного Протеина С.

Принцип метода.

Инкубация нормальной плазмы с активатором (ядом шитомордника *Agkistrodon contortrix*) 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 больных с дефицитом системы протеина С или при наличии мутантного фактора V (Лейден) удлинение АЧТВ при добавлении активатора менее выражено, чем в норме.

Набор

РеаЛейден-тест

код ПФА-4

Состав набора:

АЧТВ - реагент лиофильновысушенный - 1 флакон;
 АЧТВ-реагент с активатором протеина С лиофильновысушенный - 1 флакон;
 Плазма-калибратор лиофильновысушенная – 1 флакон;
 Плазма субстратдефицитная по фактору V – 4 флакона;
 0,025 М раствор кальция хлорида, (5 мл) -1 флакон.

Приготовление реагентов.

1. АЧТВ-реагент. Во флакон с АЧТВ-реагентом внести 2 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при осторожном покачивании и выдержать 30 минут при комнатной температуре.
АЧТВ-реагент с активатором протеина С. Во флакон с АЧТВ-реагентом внести 2 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при осторожном покачивании и выдержать 30 минут при комнатной температуре.

2. Плазма-калибратор. Растворить содержимое флакона с плазмой в 1 мл дистиллированной воды.

3. Плазма субстратдефицитная по фактору V. Растворить содержимое флакона с плазмой в 1 мл дистиллированной воды.

4. 0,025М раствор кальция хлорида. Перед использованием прогреть при температуре 37°C. Прогретый раствор использовать в течение 8 часов.

Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8°C	+18-22°C	-18-20°C
АЧТВ-реагент	7 дня	2 дня	-
АЧТВ-реагент с активатором протеина С	7 дня	2 дня	-
Раствор плазмы-калибратора	8 часов	2 часа	2 мес.
Раствор плазмы субстратдефицитной по фактору V	8 часов	2 часа	2 мес.

Получение плазмы для анализов.

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

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

Проведение анализа.

Смешанная плазма для анализа. Перед анализом смешать исследуемую плазму (или плазму-калибратор) с плазмой субстратдефицитной по фактору V в соотношении 1:4 (25мкл исследуемой плазмы + 100мкл субстратдефицитной плазмы).

При проведении анализа определяют 4 показателя:

1. АЧТВ смешанной плазмы-калибратора без активатора;
2. АЧТВ смешанной плазмы-калибратора с активатором;
3. АЧТВ смешанной плазмы больного без активатора;
4. АЧТВ смешанной плазмы больного с активатором.

Схема анализа

АЧТВ-реагенты не прогревать при 37°C перед анализами.

В кювету коагулометра внести	АЧТВ актив	АЧТВ
Смешанная исследуемая плазма	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
После добавления кальция хлорида отметить по таймеру время образования сгустка.		

Расчеты.

Результаты теста принято выражать в виде Нормализованного Отношения (НО):

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

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

Интерпретация результатов.

У здоровых лиц НО составляет 1.1 ± 0.3 ($M \pm 2\sigma$). Значение НО ниже 0,8 свидетельствует о возможном наличии мутантного фактора V (Лейден), резистентного к действию активированного протеина С. Ложноположительные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных:

- с повышенным содержанием гепарина;
- с наличием красной системной волчанки;
- при использовании антикоагулянтов непрямого действия (МНО выше 3,0).

Окончательное подтверждение наличия мутации Лейдена может быть сделано ПЦР-диагностикой.

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-Протеин С, плазма контрольная с нормальным уровнем противосвертывающей системы и со сниженным уровнем противосвертывающей системы 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*