

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 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, 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 привести 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 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.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) – 2фл

Приготовление реагентов:

1. **Рабочий буферный раствор.** Буфер концентрированный (2 мл) развести дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь рН=8,25±0,05. Хранить при температуре 2-8⁰С не более 2 месяцев.

2. **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.

3. **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.

4. **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.

Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8 ⁰ С	+18-22 ⁰ С	-18-20 ⁰ С
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 0.11М (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, плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализа достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8⁰С не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20⁰С.

Построение и использование калибровочного графика.

Для проведения анализа необходимо использовать пластиковые пробирки. Приготовить серию разведений 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
Плазма-калибратор, мл	0.4	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл		0.2 ↑	0.2 ↑	0.2 ↑

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

Построение и использование калибровочного графика.

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

Проведение анализа.

Для анализа используется неразведенная плазма пациента.

Анализ проводится в пластиковых кюветках, термостатируемых при 37⁰С.

Внести в кювету:	Образец	Кювета сравнения
Активатор Протеина С	400 мкл	-
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор)	50 мкл	-
Рабочий буферный раствор	-	1000 мкл
Перемешать и инкубировать при 37 ⁰ С точно 5 мин		-
Раствор хромогенного субстрата	200 мкл	-
Перемешать и инкубировать при 37 ⁰ С 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 больших:

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

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

Контроль качества.

Нормальные и патологические значения Нормализованного Отношения следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ:

Плазма контрольная – 11 параметров код КМ-2

Плазма контрольная патологическая – 11 параметров код КМ-4

**Паспорт
Набора реагентов для определения активности протеина С
РеаХром-Протеин С тест**

Серия № 1204

Годен до: 04.06

№ п/п	Наименование показателя	По ТУ	Фактическое значение
1	Внешний вид Активатор Протеина С	Пористая масса белого цвета	Соответствует
2	Внешний вид буфера концентрированного	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
3	Внешний вид плазмы-калибратора	Пористая масса желтого цвета	Соответствует
4	Внешний вид хромогенного субстрата	Пористая масса белого цвета	Соответствует
5	Растворимость активатора протеина С и плазмы-калибратора, мин. не более	3	Соответствует
6	Растворимость хромогенного субстрата, мин. не более	3	Соответствует
5	Активность протеина С в плазме-калибраторе серии 4505, %	70 - 140	87
6	Допустимое отклонение активности протеина С в плазме-калибраторе от аттестованного значения, % не более	10	Соответствует
7	Чувствительность, % не более	10	Соответствует
8	Линейность в диапазоне активности 10-100 %, отклонение в % не более	10	Соответствует
9	Коэффициент вариации результатов определения, % не более	10	Соответствует

ОТК

**Разработчик и изготовитель:
МБОУИ Общества больных гемофилией
НПО РЕНАМ
125167 Москва, Ново-Зыковский пр., 4а
Тел. (095) 213-00-72, 212-51-03**

