

Protein C (Chromogenic)



REF 5543



Helena Biosciences Europe, Queensway South, Team Valley Trading Estate, Gateshead, Tyne and Wear, NE11 OSD, United Kingdom
 Tel: +44 (0)191 482 8440
 Fax: +44 (0)191 482 8442
 Email: info@helena-biosciences.com
 Web: www.helena-biosciences.com

HL-2-1677P 2016/01 (7)

Protein C (Chromogenic) Instructions for use

INTENDED PURPOSE

The Protein C (Chromogenic) kit is intended for carrying out chromogenic based haemostasis assays.

Protein C is a vitamin K dependent protein which plays an important role in the regulation of anticoagulant mechanisms. It can be synthesized by inactivating factors Va and VIII or when activated, can stimulate fibrinolysis. Protein C circulates as a zymogen, and is converted to an active serine protease by the action of thrombin in the presence of thrombomodulin. Both hereditary and acquired Protein C deficiencies have been shown to be a risk factor for development of venous thrombosis. Protein C in plasma is activated by a specific fraction from the *Agkistrodon contortrix* snake venom. The amount of activated protein C (APC) is determined by monitoring the rate of hydrolysis of a protein C specific chromogenic substrate. The release of pNA is measured at 405 nm and is proportional to the protein C level. The Helena Biosciences Europe Protein C (Chromogenic) assay is intended for the quantitative determination of protein C in human plasma using a chromogenic assay method.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for *in vitro* diagnostic use only – DO NOT INGEST. Wear appropriate personal protective equipment when handling all kit components. Refer to the product label for appropriate hazard and precautionary statements where applicable. Dispose of components in accordance with local regulations.

COMPOSITION

Component	Content	Description	Preparation
Protein C Substrate	6 x 2 mL	Each vial contains 2.75 µmol lyophilised pyro-Glu-Pro-Arg-pNA.HCl.	Reconstitute each vial with 2 mL of Protein C Diluent. If cloudy, warm at 37°C for a few minutes.
Protein C Activator	6 x 2 mL	Each vial contains 0.8 units of activator from snake venom (Protac [®]).	Reconstitute each vial with 2 mL deionised water.
Protein C Diluent	3 x 5 mL	Each vial contains tris buffer with sodium Azide as a preservative.	Ready for use.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Coagulation instrument or spectrophotometer operable at 405 nm.
- REF 5185 Calibration Plasma.
- Glacial acetic acid.
- 37°C water bath or dry bath.
- Laboratory timer

STORAGE, SHELF-LIFE AND STABILITY

Unopened reagents are stable until the given expiry date when stored under conditions indicated on the vial or kit label.

Protein C Substrate	Reconstituted reagent is stable for 1 week at 2–8°C or one month at -20°C.
Protein C Activator	Reconstituted reagent is stable 1 week at 2–8°C or one month at -20°C.
Protein C Diluent	Store at 2–8°C.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Plastic or siliconised glass should be used throughout. Blood (9 parts) should be collected into 3.2% or 3.8% sodium citrate anticoagulant (1 part). Separate plasma after centrifugation at 1500 x g for 15 minutes. Plasma should be kept at 2–8°C or 15–25°C. Testing should be completed within 4 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for 6 months. Thaw quickly at 37°C prior to testing. Do not keep at 37°C for more than 5 minutes. Erroneous results may be caused by contamination with tissue fluids or stasis. Avoid agitation, air bubbles or foaming. For the effects of commonly administered drugs, refer to Young, *et al.*

PROCEDURE

Prepare plasma standards (REF 5185) and patients' plasma samples as follows:

Important: Use only 0.85% NaCl solutions for dilutions.

Standard %	Plasma	Buffer
100%	100 µL Calibration Plasma	+ 300 µL saline
50%	50 µL Calibration Plasma	+ 350 µL saline
0%	400 µL saline only	+ 300 µL saline
0%	100 µL plasma	+ 300 µL saline

A. End Point Method Assay

- To a glass or plastic test tube:
 - Add 100 µL standard or patients' plasma dilution.
 - Incubate at 37°C for 2 minutes.
 - Add 200 µL Protein C Activator and mix.
 - Incubate at 37°C for 5 minutes.
 - Add 200 µL Protein C Substrate and mix.
 - Incubate at 37°C for 10 minutes
 - Add 200 µL acetic acid and mix.
 - * Add 200 µL water (optional).

* Some spectrophotometers require a minimum of 1 mL volume in the cuvette.

- Read absorbance at 405 nm in a 1 cm semi-micro cuvette against a blank prepared with deionised water. As many as ten determinations can be performed simultaneously with the same spot watch by staggering pipetting steps at five second intervals.

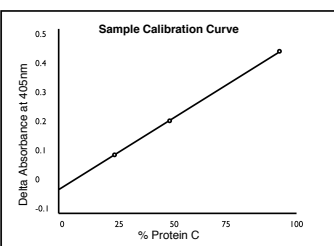
B. Kinetic Method

Automated analyser required. Refer to the appropriate Instrument Operator Manual for detailed instructions or contact Helena Biosciences Europe for instrument-specific application guides. Example table:

Reagent	Volume	Time
Sample	75 µL	3:00
Protein C Activator	75 µL	5:00
Protein C Substrate	75 µL	5:00

Calibration Curve

Plot the absorbance obtained for each of the protein C standards against protein C % on linear graph paper. The protein C concentration in patients' plasma specimens can be determined by interpolation from the calibration curve. If a commercial protein C standard is used, the protein C concentration in the patient's specimen should be adjusted for the protein C concentration in the standard. The calibration curve shown below is an example only. A calibration curve must be obtained each time the assay is performed.



INTERPRETATION OF RESULTS

Protein C deficiencies, either congenital or acquired, may lead to serious thrombotic events such as thrombophlebitis, deep vein thrombosis, or pulmonary embolism. Approximately 2-8% of all patients with venous thrombosis under the age of 40-45 years have Protein C deficiencies. Patients with hereditary deficiencies generally present with venous thrombosis in young adulthood. The first episode is usually spontaneous and associated with trauma or stress to the haemostasis mechanism. The prevalence of Protein C deficiencies is one case per 300 people or approximately 0.33%.

Acquired Deficiencies

Decreased levels of protein C are observed in the following cases:

- Hepatic disorders: hepatitis, cirrhosis.
- DIC.
- Oral anticoagulant therapies, in which cases the interpretation of test results is difficult if the patients have had a history of thromboses and are receiving oral anticoagulant treatments.

Congenital Deficiencies

Two types of deficiencies can be observed:

- Quantitative type I, in which the functional and antigenic levels are simultaneously decreased.
- Qualitative or type II, characterised by a decreased functional level and by a normal or subnormal immunological level.

LIMITATIONS

Icteric, haemolysed or hyperlipemic specimens interfere with absorbance readings, thus requiring the use of plasma blanks for accurate results. Plasma blanks are also needed on patients when contact factor activation is suspected, such as DIC patients, or from individuals on oral contraceptives where clot activation may occur. Blanks are obtained by substituting saline for the Protein C Activator in the test reaction. Subtract the sample blank activity from the sample test activity. The naturally-occurring activator of protein C is thrombin in the presence of thrombomodulin. The possible existence of clinical protein C abnormalities not detectable by reactivity with the snake venom activator or with the chromogenic substrate used in this kit should not be precluded. To assure accurate, reproducible results, use accurate pipetting devices and observe recommended procedures with particular emphasis on incubation times and incubation temperature.

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish a quality control program. Normal and abnormal control plasmas should be tested prior to each batch of patient samples, to ensure satisfactory instrument and operator performance. If controls do not perform as expected, Helena Biosciences Europe supply the following controls available for use with this product:

REF 5301	Speciality Assayed Control N
REF 5302	Speciality Assayed Control A

REFERENCE VALUES

Reference values can vary between laboratories depending on the techniques and systems in use. For this reason each laboratory should establish its own normal range. Protein C activity values are usually expressed in relative percentages compared to a pooled normal plasma standard. Bertina *et al.* reported a range of 65-145% in healthy individuals with diminished levels found following anticoagulant therapy. There is apparently no difference in protein C between healthy males and females. The following reference values have been determined by Helena Biosciences Europe or their representatives using a photo-optical coagulation instrument, using 17 plasmas of presumed healthy men and women.

Protein C activity %	SD	Range
105%	26.6	61.2-162.9%

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Helena Biosciences Europe or their representatives have determined the following performance characteristics as a guideline. Each laboratory should establish its own performance data.

Specificity

In studies where recovery of protein C plasma was determined after addition of various amounts of protein C to protein C deficient plasma, the expected recovery was obtained.

Reproducibility

n	Intra-assay precision		Inter-assay precision	
	Protein C	CV (%)	n	Protein C CV (%)
10	68.5	2.5	18	45.3 2.6

BIBLIOGRAPHY

- Walker FJ (1981) Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation, *J Biol Chem*, **256**: 11128-31
- Taylor FB, Lockhart MS (1985) A new function for activated protein C: activated protein C prevents inhibition of plasminogen activators by release from mononuclear leucocytes-platelet suspensions stimulated by phorbol diester, *Thromb Res*, **37**(1): 155-64
- Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS (1984) Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V, **63**(2): 486-9
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th edn. CLSI: H21-A5
- Young DS *et al.* Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed. AC&C Press, Washington, D.C., 1990
- Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-Van Es C, Van Wijngaarden A (1984) The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency, *Thromb Haemostas*, **51**: 1-5
- Pabinger-Fasching I, Bertina RM, Lechner K, Nieser H, Korninger C (1983) Protein C Deficiency in Two Austrian Families, *Throm Haemostas*, **50**: 810-3

Protein C (Chromogenic) Fiche technique

fr

UTILISATION

Le kit Protein C (Chromogenic) est destiné à la réalisation des analyses chromogènes de l'hémostase.

La protéine C est une protéine vitamine K dépendante qui joue un rôle important dans la régulation des mécanismes d'anticoagulation. Elle peut inhiber la coagulation en inactivant les facteurs Va[®] et VIII[®] ou stimuler la fibrinolyse lorsqu'elle est activée[®]. Elle circule sous la forme d'un zymogène et se transforme en sérine-protéase active sous l'action de la thrombine en présence de thrombomoduline. Il a été démontré qu'un déficit en protéine C, qu'il soit héréditaire ou acquis, constitue un facteur de risque de développement d'une thrombose veineuse. La protéine C du plasma est activée par une fraction spécifique provenant de venin de serpent *Agkistrodon contortrix* (Protac[®]). La quantité de protéine C activée est déterminée en évaluant le taux d'hydrolyse d'un substrat chromogénique spécifique de la protéine C. La formation de pNA est mesurée à 405 nm et est proportionnelle au taux de protéine C. Le dosage Protein C (Chromogenic) Helena Biosciences Europe utilise pour la détermination quantitative de la protéine C dans le plasma humain en utilisant une méthode de dosage chromogénique.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostique *in vitro* uniquement – NE PAS INGÉRER. Porter un équipement de protection individuelle approprié lors de la manipulation de tous les composants du kit. Consulter la fiche de données de sécurité du produit pour obtenir le lien vers les phrases de risque et les conseils de prudence le cas échéant. Éliminer les composants conformément aux réglementations locales.

COMPOSITION

Composant	Contient	Description	Préparation
Protein C Substrate	6 x 2 mL	Chaque flacon contient 2,75 µmol de pyro-Glu-Pro-Arg-pNA.HCl lyophilisé.	Reconstituer chaque flacon en ajoutant 2,0 mL de Diluant Protéine C. S'il est troublé, le chauffer quelques minutes à 37°C.
Protein C Activator	6 x 2 mL	Chaque flacon contient 0,8 unités d'activateur provenant de venin de serpent (Protac [®]).	Reconstituer l'activateur en ajoutant 2,0 mL d'eau déionisée.
Protein C Diluent	3 x 5 mL	Chaque flacon contient un tampon tris concentré additionné d'azide de sodium comme conservateur.	Prêt à l'emploi.

Chaque kit contient une fiche technique.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Spectrophotomètre fonctionnant à 405 nm.
- REF 5185 Calibration Plasma.
- Acide acétique glacial.
- Bain sec ou bain-marie à 37°C.
- Chronomètre de laboratoire.

CONSERVATION, DURÉE DE VIE UTILE ET STABILITÉ

Les flacons de réactif non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée s'ils sont conservés dans les conditions indiquées sur l'étiquette du kit ou du flacon.

Protein C Substrate	Le réactif reconstitué est stable une semaine entre 2–8°C ou un mois à -20°C.
Protein C Activator	Le réactif reconstitué est stable une semaine entre 2–8°C ou un mois à -20°C.
Protein C Diluent	Conserver entre 2–8°C.

PRÉLEVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre siliconé. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 1500 x g pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre 2–8°C ou 15–25°C. Les tests doivent être effectués dans les 4 heures suivant le prélèvement de l'échantillon; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20°C ou 6 mois à -70°C. Décongeler rapidement à 37°C avant de réaliser l'analyse. Ne pas laisser à 37°C plus de 5 minutes. Il est possible d'obtenir des résultats erronés en cas de contamination avec du liquide tissulaire ou en cas de stase. Éviter de faire des bulles d'air ou de l'écume. Se référer à Young, *et al.* pour connaître les effets des médicaments couramment administrés.

PROCÉDURE

Préparer des étalons de plasma (REF 5185) et des échantillons de plasma du patient de la manière suivante :

Important: Utiliser uniquement des solutions de NaCl à 0,85% pour les dilutions.

Étalon %	Plasma	Tampon
100%	100 µL de Calibration Plasma	+ 300 µL de solution physiologique
50%	50 µL de Calibration Plasma	+ 350 µL de solution physiologique
0%	400 µL de solution physiologique uniquement	+ 300 µL de solution physiologique
0%	100 µL de plasma	+ 300 µL de solution physiologique

A. Dosage en point final

- Dans un tube à essai en verre ou en plastique:
 - Ajouter 100 µL de dilution de plasma patient ou étalon.
 - Incuber 2 minutes à 37°C.
 - Ajouter 200 µL d'activateur et mélanger.
 - Incuber 5 minutes à 37°C.
 - Ajouter 200 µL de substrat Protéine C et mélanger.
 - Incuber 10 minutes à 37°C.
 - * Ajouter 200 µL d'acide acétique et mélanger.
 - * Ajouter 200 µL d'eau (en option).

* Certains spectrophotomètres exigent un volume minimum de 1 mL dans la cuvette.

- Lire l'absorbance à 405 nm dans une cuvette semi-micro (1 cm) par rapport à un blanc préparé avec de l'eau déionisée. Il est possible de réaliser jusqu'à dix déterminations simultanément avec le même chronomètre en échelonnant les étapes de pipetage à des intervalles de cinq secondes.

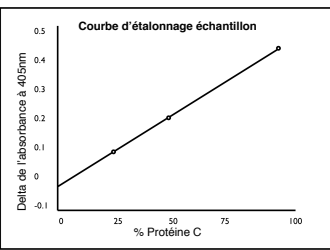
B. Méthode cinétique

Méthode d'analyse nécessaire. Consulter le manuel d'utilisation de l'instrument approprié pour obtenir des instructions détaillées ou contacter Helena Biosciences Europe pour obtenir des notes d'application spécifiques à l'instrument. Tableau d'exemple :

Réactif	Volume	Temps
Échantillon	75 µL	3:00
Protein C Activator	75 µL	5:00
Protein C Substrate	75 µL	5:00

Tracer de étalonnage

Tracer une courbe, point par point, représentant l'absorbance obtenue avec chacun des étalons de protéine C en fonction du % de protéine C sur du papier millimétré. Il est possible de déterminer la concentration en protéine C des échantillons patients par interpolation à partir de la courbe d'étalonnage. Si un étalon de protéine C industriel est utilisé, la concentration en protéine C de l'échantillon patient doit être ajustée en fonction de la concentration en protéine C de l'étalon. La courbe d'étalonnage ci-dessous n'est indiquée qu'à titre d'exemple. Tracer une courbe d'étalonnage chaque fois que le dosage est réalisé.



INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un déficit en protéine C, congénital ou acquis, peut conduire à des complications thrombotiques graves comme une thrombophlébite, une thrombose veineuse profonde ou une embolie pulmonaire. Entre 2 et 8% de l'ensemble des patients souffrant d'une thrombose veineuse avant l'âge de 40-45 ont un déficit en protéine C. Les patients ayant un déficit héréditaire présentent en général des thromboses veineuses au début de l'âge adulte. Le premier épisode est le plus souvent spontané et associé à une anomalie ou une agression des mécanismes de l'hémostase. Le taux de prévalence du déficit en protéine C est d'un cas pour 300 habitants, soit environ 0,33%.

Déficits acquis

Une diminution du taux de protéine C est observée dans les cas suivants:

- Troubles hépatiques: hépatite, cirrhose,
- CIVD.
- Thérapie avec anticoagulants oraux; dans ce cas, l'interprétation des résultats est problématique si les patients ont des antécédents de thromboses et reçoivent un traitement avec anticoagulants oraux.

Déficits congénitaux

- Il est possible d'observer deux types de déficits:
 - Déficit quantitatif ou de type I, dans lequel il y a une diminution simultanée des taux fonctionnel et antigénique.
 - Déficit qualitatif ou de type II, caractérisé par une diminution du taux fonctionnel et par un taux immunologique normal ou légèrement au-dessous de la normale.

LIMITES

Les échantillons icteriques, hémolysés et hyperlipémiques interfèrent avec les mesures de l'absorbance, si bien qu'il est nécessaire d'utiliser des blancs préparés avec du plasma pour avoir des résultats exacts. Il faut aussi utiliser ces blancs de plasma pour les patients chez qui on soupçonne une activation du facteur de contact, comme en cas de CIVD, ou chez ceux qui sont sous contraceptifs oraux où il est possible qu'il se produise une activation par le froid. Ils sont produits en substituant l'activateur par de la solution physiologique dans la réaction de l'analyse. Soustraire l'activité du blanc d'échantillon de l'activité de l'échantillon analysé. La thrombine, en présence de thrombomoduline, est l'activateur naturel de la protéine C. L'existence potentielle d'anomalies cliniques de la protéine C, non détectables lors de la réaction avec l'activateur de venin de serpent ou avec le substrat chromogénique utilisés dans ce kit, n'est pas à exclure. Afin de garantir la reproductibilité des résultats, utiliser des dispositifs de pipetage précis et observer les procédures recommandées en respectant tout particulièrement la température et la durée d'incubation.

CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité. Les plasmas de contrôle, normaux et anormaux, doivent être testés avant chaque lot d'échantillons patients afin de s'assurer que l'instrument et l'opérateur offrent des performances satisfaisantes. S'ils ne donnent pas les résultats prévus, les résultats du patient doivent être considérés comme non valables. Helena Biosciences Europe distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit :

REF 5301	Speciality Assayed Control N
REF 5302	Speciality Assayed Control A

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les valeurs de référence peuvent varier d'un laboratoire à l'autre suivant les techniques et les systèmes utilisés. C'est pour cette raison qu'il appartient à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs usuelles. Le taux d'activité de la protéine est en général exprimé en pourcentage relatif par rapport à un pool de plasma normal. Bertina *et al.* a signalé des valeurs usuelles de 65-145% chez les individus sains et une diminution du taux chez les patients sous anticoagulants. Il n'y a apparemment pas de différence entre les femmes et les hommes sains[®]. Helena Biosciences Europe ou ses mandataires ont déterminé les valeurs de référence suivantes en utilisant un instrument de coagulation photo-optique, en utilisant 17 plasmas provenant de femmes et d'hommes vraisemblablement sains.

Activité de la protéine C	Écart-type	Valeurs usuelles
105%	26,6	61,2-162,9%

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

Helena Biosciences Europe ou ses représentants ont déterminé à titre indicatif les performances suivantes. Chaque laboratoire doit établir ses propres données de performance.

Spécificité

Dans des études servant à déterminer la récupération de la protéine C après l'ajout de diverses quantités de protéine C à un plasma déficient en protéine C, la récupération attendue a été obtenue.

Reproductibilité

n	Précision intra-série		Précision inter-séries	
	Protéine C	CV (%)	n	Protéine C CV (%)
10	68.5	2.5	18	45.3 2.6

BIBLIOGRAPHIE

- Walker FJ (1981) Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation, *J Biol Chem*, **256**: 11128-31
- Taylor FB, Lockhart MS (1985) A new function for activated protein C: activated protein C prevents inhibition of plasminogen activators by release from mononuclear leucocytes-platelet suspensions stimulated by phorbol diester, *Thromb Res*, **37**(1): 155-64
- Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS (1984) Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V, **63**(2): 486-9
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th edn. CLSI: H21-A5
- Young DS *et al.* Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed. AC&C Press, Washington, D.C., 1990
- Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-Van Es C, Van Wijngaarden A (1984) The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency, *Thromb Haemostas*, **51**: 1-5
- Pabinger-Fasching I, Bertina RM, Lechner K, Nieser H, Korninger C (1983) Protein C Deficiency in Two Austrian Families, *Throm Haemostas*, **50**: 810-3

Protein C (Chromogenic) Anleitung

VERWENDUNGSZWECK

Das Protein C (Chromogenic)-Kit ist für chromogene Gerinnungstests vorgesehen.

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, das in der Regulierung der Antikoagulant-Mechanismen eine wichtige Rolle spielt. Es kann durch Inaktivierung der Faktoren Va[®] und VIII[®] die Koagulation hemmen oder, wenn aktiviert, die Fibr

Protein C (Chromogenic)

Istruzioni per l'uso

SCOPO PREVISTO

Il kit Protein C (Chromogenic) è concepito per l'esecuzione di dosaggi di emostasi mediante test cromogenico.

La proteina C è una proteina vitamina K-dipendente, che svolge un importante ruolo nella regolazione dei meccanismi anticoagulanti. Questa proteina è in grado di inibire la coagulazione inattivando i fattori Va e VIII^a oppure, se attivata, può stimolare la fibrinolisi¹. La proteina C circola come zimogeno e viene trasformata in una sieroproteasi attiva dall'azione della trombina in presenza di trombomodulina. Le carenze di proteina C, siano esse ereditarie o acquisite, sono risultate essere un fattore di rischio per lo sviluppo di trombosi venosa. La proteina C nel plasma viene attivata da una frazione specifica proveniente dal siero del serpente *Akistrodon contortrix*. La quantità di proteina C attivata (APC) viene determinata monitorando il tasso di idrolisi di un substrato cromogenico specifico per la proteina C. Il rilascio di pNA, che viene misurato a 405 nm, è proporzionale al livello di proteina C. Dosaggio di Protein C (Chromogenic) di Helena Biosciences Europe è stato formulato per la determinazione quantitativa della proteina C in plasma umano utilizzando un metodo di dosaggio cromogenico.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica *in vitro* - NON INGERIRE. Indossare un'adeguata attrezzatura protettiva personale durante la manipolazione di tutti i componenti del kit. Per conoscere i relativi simboli precauzionali e di pericolo, leggere attentamente, fare riferimento alla dichiarazione di sicurezza del prodotto. Sminuire i componenti conformemente alle normative locali vigenti.

COMPOSIZIONE

Componente	Contiene	Descrizione	Preparazione
Protein C Substrate	6 x 2 mL	Ogni flacone contiene 2,75 µmol di pyro-Glu-Pro-Arg-pNA-HCl liofilizzato.	Ricostituire ogni flacone con 2,0 mL di diluente della proteina C. Se risulta torbido, riscaldare a *37°C per alcuni minuti.
Protein C Activator	6 x 2 mL	Ogni flacone contiene 0,8 unità di attivatore Acetilator.	Ricostituire l'attivatore con 2,0 mL di acqua deionizzata.
Protein C Diluent	3 x 5 mL	Ogni flacone contiene tampone tris con sodio azide come conservante.	Pronto per l'uso.
Ogni kit contiene un Istruzioni per l'uso.			

MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE

- Spettrofotometro funzionante a 405 nm.
- REF 5185 Calibration Plasma.
- Acido acetico glaciale.
- Bagnomaria o bagno secco a *37°C.
- Timer da laboratorio.

CONSERVAZIONE, VITA UTILE E STABILITÀ

I reagenti non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati nelle condizioni riportate sul flacone o sull'etichetta del kit.

Protein C Substrate Il reagente ricostituito è stabile per una settimana a *2–*8°C o per un mese a -20°C.

Protein C Activator Il reagente ricostituito è stabile per una settimana a *2–*8°C o per un mese a -20°C.

Protein C Diluent Conservare a *2–*8°C.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro silicizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodo citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 1500 x g per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a *2–*8°C o *18–*24°C. Il test devono essere completati entro 4 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per 6 mese. Degelare rapidamente a *37°C prima di eseguire i test. Non conservare a *37°C per oltre 5 minuti¹. La contaminazione con liquidi tissutali o la stasi possono dare luogo a risultati erranei. Evitare l'agitazione, le bolle d'aria o la formazione di schiuma. Per gli effetti dei farmaci comunemente somministrati fare riferimento a Young *et al.*²

PROCEDURA

Preparare gli standard di plasma (REF 5185) e i campioni di plasma del paziente come illustrato di seguito:

Importante: Per le diluizioni utilizzare esclusivamente soluzioni di NaCl allo 0,85%.

Standard %	Plasma	Tampone
100%	100 µL di Calibration Plasma	+ 300 µL di soluzione fisiologica
50%	50 µL di Calibration Plasma	+ 350 µL di soluzione fisiologica
0%		400 µL di sola soluzione fisiologica
Paziente	100 µL di plasma	+ 300 µL di soluzione fisiologica

A. Dosaggio con metodo end-point

- In una provetta di prova in vetro o plastica:
 - Aggiungere 100 µL di diluizione di plasma standard o del paziente.
 - Incubare a *37°C per 2 minuti.
 - Aggiungere 200 µL di attivatore e miscelare.
 - Incubare a *37°C per 5 minuti.
 - Aggiungere 200 µL di substrato per proteina C e miscelare.
 - Incubare a *37°C per 10 minuti.
 - Aggiungere 200 µL di acido acetico e miscelare.
 - Aggiungere (facoltativamente) 200 µL di acqua.

* Alcuni spettrofotometri richiedono un volume minimo di 1 mL nella cuvetta.

2. Leggere l'assorbanza a 405 nm in una cuvetta semi-micro di 1 cm rispetto ad un blank preparato con acqua deionizzata. Alcuni spettrofotometri richiedono un volume minimo di 1ml nella cuvetta. Con lo stesso cronometro possono essere eseguite contemporaneamente fino a 10 misurazioni, distanziando le fasi di pipettaggio ad intervalli di 5 secondi.

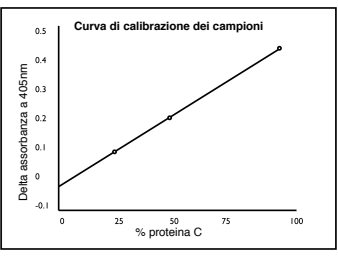
B. Metodo cinetico

Richiesto analizzatore automatico. Fare riferimento al manuale utente dello strumento appropriato per istruzioni dettagliate oppure contattare Helena Biosciences Europe per le note applicative specifiche dello strumento. Tabella esemplificativa:

Reagente	Volume	Tempo
Campioni	75 µL	3:00
Protein C Activator	75 µL	5:00
Protein C Subtrate	75 µL	5:00

Curva di calibrazione

Tracciare l'assorbanza ottenuta per ciascuno degli standard per proteina C rispetto alla % proteina C utilizzando una carta per grafici lineari. La concentrazione di proteina C nei campioni di plasma del paziente può essere determinata per interpolazione della curva di calibrazione. Se viene utilizzato uno standard per proteina C disponibile in commercio, la concentrazione di proteina C nei campioni dei paziente deve essere adeguata in base alla concentrazione di proteina C presente nello standard. La curva di calibrazione sotto rappresentata viene fornita a titolo puramente esemplificativo. È necessario ricavare una curva di calibrazione ogniqualvolta viene eseguito il dosaggio.



INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le carenze di proteina C, siano esse congenite o acquisite, possono portare a gravi eventi trombotici quali tromboflebiti, trombosi delle vene profonde o embolia polmonare. Circa il 2-8% di tutti i pazienti colpiti da trombosi venosa al di sotto dei 40-45 anni di età presenta carenza di proteina C. I pazienti con carenze ereditarie presentano generalmente una trombosi venosa nella giovane età adulta. Il primo episodio è solitamente spontaneo ed associato a trauma o stress legato al meccanismo emostatico. La prevalenza di carenza di proteina C è pari ad un caso su 300 individui ovvero allo 0,33% circa.

Carenze acquisite

I livelli ridotti di proteina C si osservano nei seguenti casi:

- Disordini epatici: epatite, cirrosi.
- DIC.
- Terapie anticoagulanti orali, in cui l'interpretazione dei risultati del test appare difficoltosa se i pazienti presentano un'anamnesi di trombosi e sono in trattamento con farmaci anticoagulanti orali.

Carenze congenite

Possono essere osservati due tipi di carenze:

- Carenze quantitative o di tipo I, in cui i livelli funzionali e antigenici si riducono simultaneamente.
- Carenze qualitative o di tipo II, caratterizzate da un minore livello funzionale e da un livello immunologico normale o subnormale.

LIMITAZIONI

I campioni literei, emolizzati o iperlipemici interferiscono con le letture dell'assorbanza, richiedendo pertanto l'uso di blank plasmatici per l'ottenimento di risultati precisi. I blank plasmatici sono necessari anche nei pazienti in cui si sviluppa un'attivazione del fattore per contatto, come i pazienti con DIC, oppure nei soggetti che assumono contraccettivi orali e in cui si potrebbe verificare l'attivazione a freddo. I blank vengono ottenuti sottraendo alla soluzione salina con l'attivatore nella reazione del test. Verificare l'attività del blank campione dall'attività del test campione. L'attivatore naturale della proteina C è la trombina in presenza di trombomodulina. Non è da escludere la possibile esistenza di anomalie cliniche della proteina C non rilevabili dalla reattività con l'attivatore del veneno di serpente o con il substrato cromogenico utilizzato in questo kit. Per garantire risultati accurati e riproducibili, utilizzare dispositivi di pipettaggio precisi e rispettare le procedure raccomandate, prestando particolare attenzione ai tempi e alla temperatura di incubazione.

CONTROLLO QUALITÀ

Ogni lotto deve definire un programma di controllo qualità. I plasmi di controllo normale e anormali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che l'operatore. Quando i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi. Helena Biosciences Europe mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

REF 5301 Speciality Assayed Control N

REF 5302 Speciality Assayed Control A

VALORI DI RIFERIMENTO

I valori di riferimento possono variare tra i singoli laboratori in funzione delle tecniche e dei sistemi utilizzati. Per tale motivo ciascun laboratorio dovrà elaborare un proprio range normale. I valori di attività della proteina C vengono solitamente espressi in percentuali relativi rispetto ad uno standard di plasma normale in pool. Bertina *et al.* hanno segnalato un range di 65-145% in soggetti sani con livelli ridotti riscontrati in seguito a terapia anticoagulante. Apparentemente non vi è alcuna differenza in termini di proteina C tra individui sani di sesso maschile e femminile. Le seguenti valori di riferimento sono state determinate da Helena Biosciences Europe o dai propri rappresentanti con l'utilizzo di uno strumento di coagulazione foto-ottico, con 17 plasmi di uomini e donne ritenuti sani.

Attività della proteina C	DS	Range
105%	26,6	61,2-162,9%

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena Biosciences Europe o dai propri rappresentanti a titolo di linee guida. Ciascun laboratorio dovrà pertanto elaborare i propri dati prestazionali.

Specificità

Negli studi in cui è stato determinato il ripristino dei livelli plasmatici di proteina C in seguito all'aggiunta di varie quantità di proteina C in plasma carente, è stato ottenuto il ripristino previsto.

Riproducibilità

n	Precisione intra-dosaggio	CV (%)	n	Precisione tra i dosaggi	CV (%)
	<i>Protein C</i>			<i>Protein C</i>	
10	68,5	2,5	18	45,3	2,6

BIBLIOGRAFIA

- Walker FJ (1981) Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation, *J Biol Chem*, **256**: 11128-31
- Taylor FB, Lockhart MS (1985) A new function for activated protein C: activated Protein C prevents inhibition of plasminogen activators by releaseate from mononuclear leukocytes–platelet suspensions stimulated by phorbol diester, *Thromb Res*, **37**(1): 155-64
- Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS (1984) Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V, **63**(2): 486-9
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th edn. CLSI: H21-A5
- Young DS *et al.* Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed., AACCP Press, Washington, D.C., 1990
- Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-Van Es C, Van Wijngaarden A (1984) The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency, *Thromb Haemostas*, **51**: 1-5
- Pabinger-Fasching I, Bertina RM, Lechner K, Niesser H, Korninger C (1983) Protein C Deficiency in Two Austrian Families, *Throm Haemostas*, **50**: 810-3

Protein C (Chromogenic)

Instrucciones de uso

USO PREVISTO

El uso previsto del kit Protein C (Chromogenic) es realizar ensayos de hemostasia basados en la cromogenia.

La proteína C es una proteína dependiente de la vitamina K que desempeña un papel importante en la regulación de los mecanismos anticoagulantes. Puede inhibir la coagulación inactivando los factores Va y VIII^a o, cuando se activa, puede estimular la fibrinólisis¹. La proteína C cirula como zimógeno y se convierte en la serina activa mediante la acción de la trombina en presencia de trombomodulina. Se ha demostrado que las deficiencias de proteína C tanto hereditarias como adquiridas son un factor de riesgo para el desarrollo de trombosis venosa. La proteína C en el plasma es activada por una fracción específica del veneno de serpiente *Akistrodon contortix*. La cantidad de proteína C activada (PCA) se determina controlando la tasa de hidrólisis de un sustrato cromógeno específico de la proteína C. La liberación de pNA se mide a 405 nm y es proporcional al nivel de proteína C. El ensayo de Protein C (Chromogenic) de Helena Biosciences Europe está diseñado para la determinación cuantitativa de la proteína C en el plasma humano usando un método de ensayo cromógeno.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos que contiene este kit son sólo para uso de diagnóstico *in vitro*: NO INGERIR. Lleve el equipo de protección personal adecuado cuando utilice todos los componentes del kit. Consulte la declaración de seguridad del producto para saber más sobre las indicaciones adecuadas de advertencia y riesgo. Desachar los componentes de conformidad con las normativas locales.

COMPOSICIÓN

Componente	Contiene	Descripción	Preparación
Protein C Substrate	6 x 2 mL	Cada vial contiene 2,75 µmol de pyro-Glu-Pro-Arg-pNA-HCl liofilizada.	Reconstituir cada vial con 2,0 mL de disolvente de proteínas C. Si queda turbio, caliente a *37°C durante unos minutos.
Protein C Activator	6 x 2 mL	Cada vial contiene 0,8 unidades de activador de veneno de serpiente (Protac [®]).	Reconstituir el activador con 2,0 mL de agua desionizada.
Protein C Diluent	3 x 5 mL	Cada vial contiene tampón tris con azida de sodio como conservante.	Listo para su uso.
Cada kit contiene instrucciones de uso.			

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Espectrofotómetro que funcione a 405 nm.
- REF 5185 Calibration Plasma.
- Acido acetico glaciale.
- Baño seco o baño maría a *37°C.
- Cronómetro de laboratorio.

ALMACENAMIENTO, CADUCIDAD Y ESTABILIDAD

Los reactivos no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se conservan en las condiciones indicadas en el vial o en la etiqueta del kit.

Protein C Substrate El reactivo reconstituido permanece estable durante una semana a *2–*8°C o un mes a -20°C.

Protein C Activator El reactivo reconstituido permanece estable durante una semana a *2–*8°C o un mes a -20°C.

Protein C Diluent Guardar a *2–*8°C.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Debe usarse siempre plástico o vidrio silicizado. Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% o al 3,8% (1 parte). Separar el plasma de la centrifugación a 1500 x g durante 15 minutos. El plasma debe conservarse a *2–*8°C o *18–*24°C. Las pruebas deberían terminarse en 4 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20°C durante 2 semanas o -70°C durante 6 mese. Desgelar rápidamente a *37°C antes de realizar la prueba. No conservar a *37°C durante más de 5 minutos¹. Pueden producirse resultados erróneos por contaminación con líquidos tisulares o estasia. Evitar la agitación, las burbujas de aire o la formación de espuma. Para comprobar los efectos de los fármacos que se suelen administrar, consultar Young, *et al.*²

PROCEDIMIENTO

Preparar estándares de plasma (REF 5185) y muestras de plasma del paciente como sigue:

Importante: Usar sólo soluciones con NaCl al 0,85% para las diluciones.

Estándares %	Plasma	Tampón
100%	100 µL Calibration Plasma	+ 300 µL solución salina
50%	50 µL Calibration Plasma	+ 350 µL solución salina
0%		400 µL solución salina sólo
Paciente	100 µL plasma	+ 300 µL solución salina

A. Ensayo del método del punto final

- A un tubo de ensayo de vidrio o plástico:
 - Añadir 100 µL de dilución de plasma de paciente o estándar.
 - Incubar a *37°C durante 2 minutos.
 - Añadir 200 µL de activador y mezclar.
 - Incubar a *37°C durante 5 minutos.
 - Añadir 200 µL de sustrato de proteína C y mezclar.
 - Incubar a *37°C durante 10 minutos.
 - Añadir 200 µL de ácido acético y mezclar.
 - * Añadir 200 µL de agua (opcional).

* Algunos espectrofotómetros requieren un mínimo de volumen de 1 mL en la cubeta.

- Leer la absorbancia a 405 nm en una cubeta semi-micro de 1 cm frente a un blanco preparado con agua desionizada. Se pueden realizar hasta diez determinaciones simultáneamente con el mismo cronómetro, escalando los pasos de pipeteado en intervalos de cinco segundos.

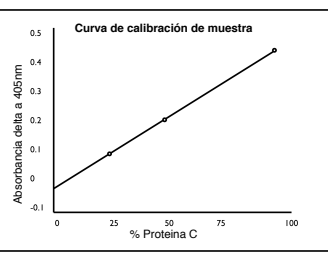
B. Método cinético

Se requiere el uso de un analizador automatizado. Consulte el manual del usuario del instrumento adecuado para instrucciones detalladas o póngase en contacto con Helena Biosciences Europe para notas de aplicación específicas del instrumento. Tabla de ejemplos:

Reactivo	Volume	Tempo
Muestra	75 µL	3:00
Protein C Activator	75 µL	5:00
Protein C Subtrate	75 µL	5:00

Curva de calibración

Representar la absorbancia obtenida para cada uno de los estándares de la proteína C frente al % de proteína C en papel milimetrado lineal. La concentración de proteina C en las muestras de plasma del paciente puede determinarse mediante interpolación a partir de la curva de calibración. Si se usa un estándar comercial de proteina C, la concentración de proteina C en la muestra del paciente debe ajustarse para la concentración de proteina C en el estándar. La curva de calibración que se muestra a continuación es sólo un ejemplo. Se debe obtener una curva de calibración cada vez que se realiza el estudio.



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las deficiencias de proteina S, congénitas o adquiridas, pueden llevar a acontecimientos tromboticos graves, como tromboflebitis, trombosis venosa profunda o embolia pulmonar. Aproximadamente el 2-8% de todos los pacientes con trombosis venosa de edad inferior a 40-45 años tienen deficiencias en proteina C. Los pacientes con deficiencias hereditarias generalmente presentan trombosis venosas al principio de la edad adulta. El primer episodio suele ser espontáneo y se asocia a traumatismo o ataque sobre el mecanismo de la hemostasia. La prevalencia de deficiencias de proteina C es de un caso por 300 personas o aproximadamente al 0,33%.

Deficiencias adquiridas

Se aprecian niveles más bajos de proteina C en los siguientes casos:

- Trastornos hepáticos: hepatitis, cirrosis.
- DIC.
- Tratamientos anticoagulantes orales, en cuyo caso, la interpretación de los resultados de las pruebas es difícil si los pacientes han tenido antecedentes de trombosis y están recibiendo tratamientos anticoagulantes orales.

Deficiencias congénitas

Se pueden apreciar dos tipos de deficiencias:

- Tipo cuantitativo, I, en el que disminuyen simultáneamente los niveles funcionales y antigenicos.
- Cualitativo o tipo II, caracterizado por un nivel funcional más bajo y un nivel inmunológico normal o subnormal.

LIMITACIONES

Las muestras ictericas, hemolizadas o hiperlipémicas interfieren con las lecturas de absorbancia, precisando así el uso de blancos de plasma para obtener resultados exactos. Se necesitan tambien blancos de plasma sobre los pacientes cuando se sospecha activación del factor por contacto, como los pacientes con CID o de los individuos que reciben anticonceptivos orales en los que puede producirse activación por frio. Los blancos se realizan sustituyendo el activador por solución salina en la reacción de prueba. Hasta la actividad del blanco de muestra de la actividad de la prueba de muestra. El activador natural de la proteina C es la trombina en presencia de la trombomodulina. No debe excluirse la posible existencia de anomalías clinicas de la proteina C no detectables por la reactividad con el activador del veneno de serpiente o con el sustrato cromógeno empleado en este kit. Para garantizar resultados reproducibles precisos, utilizar dispositivos de pipetado precisos y seguir los procedimientos recomendados con especial atención a los tiempos y temperatura de incubación.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad. Los controles normales y anormales deben estudiarse antes de cada lote de muestras del paciente, para asegurar un funcionamiento adecuado del instrumento y el operador. Si los controles no se realizan como se esperaba, los resultados del paciente deben considerarse inválidos.

Helena Biosciences Europe suministra los siguientes controles disponibles para usar con este producto:

REF 5301 Speciality Assayed Control N

REF 5302 Speciality Assayed Control A

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por este razón, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal. Los valores de actividad de la proteina C suelen expresarse en porcentajes relativos en comparación con un estándar de plasma normal acumulado. Bertina *et al.* comunicaron un intervalo del 65-145% en individuos sanos en los que se encuentran niveles reducidos después del tratamiento anticoagulante. Aparentemente, no hay diferencia en la proteina C entre varones y mujeres sanos¹. Las siguientes valores de referencia han sido determinados por Helena Biosciences Europe o sus representantes usando un instrumento de coagulación foto-óptico, usando 17 plasmas de varones y mujeres presuntamente sanos.

Actividad de la proteina C	DE	Intervalo
105%	26,6	61,2-162,9%

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Helena Biosciences Europe o sus representantes han determinado las siguientes características de rendimiento como directiv. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de rendimiento.

Especificidad

En estudios en los que se determinó la recuperación de proteina C del plasma después de la adición de diversas cantidades de Proteina C a plasma deficiente en proteina C, se obtuvo la recuperación esperada.

Reproducibilidad

n	Precisione intra-ensayo	CV (%)	n	Precisione inter-ensayo	CV (%)
	<i>Protein C</i>			<i>Protein C</i>	
10	68,5	2,5	18	45,3	2,6

BIBLIOGRAFÍA

- Walker FJ (1981) Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation, *J Biol Chem*, **256**: 11128-31
- Taylor FB, Lockhart MS (1985) A new function for activated protein C: activated Protein C prevents inhibition of plasminogen activators by releaseate from mononuclear leukocytes–platelet suspensions stimulated by phorbol diester, *Thromb Res*, **37**(1): 155-64
- Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS (1984) Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V, **63**(2): 486-9
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th edn. CLSI: H21-A5
- Young DS *et al.* Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed., AACCP Press, Washington, D.C., 1990
- Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-Van Es C, Van Wijngaarden A (1984) The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency, *Thromb Haemostas*, **51**: 1-5
- Pabinger-Fasching I, Bertina RM, Lechner K, Niesser H, Korninger C (1983) Protein C Deficiency in Two Austrian Families, *Throm Haemostas*, **50**: 810-3

Тест-система «Хромогенный Протеин С»

инструкция

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплек «Хромогенный Протеин С» предназначен для выполнения анализа гемостаза на хромогенной основе.

Протеин С – это витамин-К-зависимый протеин, который играет важную роль в регулировании механизмов антикоагуляции. Он может ингибировать коагуляцию путем инактивации факторов Va и VIII^a либо в случае активации может стимулировать фибринолиз¹. Протеин С циркулирует как префермент и из-за воздействия тромбина в присутствии тромбомодулина преобразуется в активную сериновую протеазу. Как было установлено, и врожденный, и приобретенный дефицит протеина С является фактором риска развития венозного тромбоза. Протеин С в плазме активируется особой фракцией из макроглобулинового шимотромбина (*Akistrodon contortix*). Количество активированного протеина С