

## **Chromogenic Protein C**

Instructions For Use

REF 5543

**Protéine C Chromogénique**

**Fiche technique**

**Chromogenes Protein C**

**Anleitung**

**Proteina C Cromogenica**

**Istruzioni per l'uso**

**Proteína C Cromógena**

**Instrucciones de uso**

### **Contents**

|                |    |
|----------------|----|
| English .....  | 1  |
| Français ..... | 6  |
| Deutsch .....  | 12 |
| Italiano ..... | 18 |
| Español .....  | 24 |





**INTENDED USE**

The Helena BioSciences Chromogenic Protein C assay is intended for the quantitative determination of protein C in human plasma using a chromogenic assay method.

Protein C is a vitamin K dependent protein which plays an important role in the regulation of anticoagulant mechanisms. It can inhibit coagulation by inactivating factors Va<sub>1</sub> and VIIIa<sub>2</sub> or, when activated, can stimulate fibrinolysis.<sup>3</sup> 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.

**WARNINGS AND PRECAUTIONS**

The reagents contained in this kit are for In-Vitro diagnostic use only - **DO NOT INGEST**. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheets for risk and safety phrases and disposal information.

**COMPOSITION****1. Protein C Substrate**

Each vial contains 2.75  $\mu$ mol lyophilised pyro-Glu-Pro-Arg-pNA.HCl.

**Preparation for Use:** Reconstitute each vial with 2.0ml of Protein C Diluent. If cloudy, warm at 37°C for a few minutes.

**2. Protein C Activator**

Each vial contains 0.8 units of activator from snake venom (Protac®).

**Preparation for Use:** Reconstitute each vial with 2ml deionised water.

**3. Protein C Diluent**

Each vial contains tris buffer with sodium azide as a preservative. Ready for use.

**4. Other kit components**

Each kit contains instructions for use.

**STORAGE AND SHELF LIFE**

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

**1. Protein C Substrate**

Reconstituted reagent is stable for 1 week at 2...6°C or one month at -20°C.

AC-4 POS 27@37°C=6hrs

**2. Protein C Activator**

Reconstituted reagent is stable 1 week at 2...6°C or one month at -20°C. AC-4 POS 30@RT = 6hrs.

**3. Protein C Diluent**

Store at 2...6°C.

**ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

Cat. No. 5185 SARP reference plasma

Coagulation analyser or spectrophotometer capable of reading to 405 nm.

Glacial acetic acid and timer for manual technique

## 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 2000-3000 x g for 15 minutes. Plasma should be kept at 2...6°C. Testing should be completed within 2 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for one month. 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. Use only 0.85% NaCl solutions for plasma dilutions.

## STEP BY STEP PROCEDURE

Prepare plasma standards and patient's plasma samples as follows:

| Standard % | Plasma          | Buffer              |
|------------|-----------------|---------------------|
| 100%       | 100 µl S.A.R.P. | + 300µl saline      |
| 50%        | 50 µl S.A.R.P.  | + 350µl saline      |
| 0%         |                 | + 400µl saline only |
| Patient    | 100 µl plasma   | + 300µl saline      |

**IMPORTANT:** Use only 0.85% NaCl solutions for dilutions.

### Automated Methods, AC-4. (5543 x 250 samples)

Refer to the appropriate AC-4 Operators Manual for detailed instructions.

Prepare all reagents as instructed under 'composition'

|              |              |                      |  |   |
|--------------|--------------|----------------------|--|---|
| START=33s    | METHOD=Chrom | MIX=0                | PATIENT (Pat)<br>vol=12µL<br>pos=35 (CP) | Def. Plasma (DP)<br>Vol=0µL             |
| INCUB=300s   | MATH=lin     | CLEAN=Y              | BUFFER (saline)<br>Vol=36µL<br>Pos=39    | PC Activator (R1)<br>Vol=48µL<br>Pos=30 |
| RUNTIME=180s | SENS=0       | T-CORR=0<br>S-CORR=0 | CLEAR (CLR)<br>Vol=0µL                   | PC Substrate (R2)<br>Vol=48µL<br>Pos=27 |

### End Point Method Assay

- To a glass or plastic test tube:  
Add 100 µl standard or patient's plasma dilution  
Incubate at 37°C for 2 minutes  
Add 200 µl 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 (optional) 200µl water
- Read absorbance at 405 nm in a 1cm semi-micro cuvette against a blank prepared with deionised water. Some spectrophotometers require minimum 1ml volume in cuvette. As many as ten determinations can be performed simultaneously with the same stop watch by staggering pipetting steps at five second intervals.

**Kinetic Method**

Automated analyser required. Refer to Operators Manual for detailed instructions.

Example table:

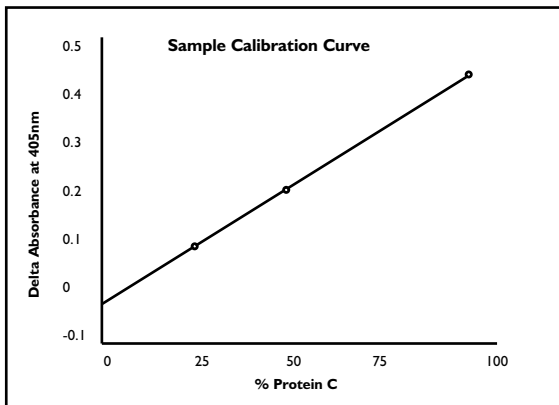
| Reagent             | Volume     | Time |
|---------------------|------------|------|
| Sample              | 75 $\mu$ l | 3:00 |
| Activator           | 75 $\mu$ l | 5:00 |
| Protein C Substrate | 75 $\mu$ l | 5:00 |

**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 patient's 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.

## 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, patient results should be considered invalid.

Helena BioSciences supply the following controls available for use with this product:

Cat. No. 5301 SAC 1

Cat. No. 5302 SAC 2

## 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 cold activation may occur. Blanks are done by substituting saline for the 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.

## 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.<sup>5</sup> 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.<sup>6</sup> Helena BioSciences tested 17 plasmas of presumed healthy men and women using the Helena AC-4 with the following data.

|                     |
|---------------------|
| X = 105%            |
| SD = 26.6           |
| range = 61.2-162.9% |

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

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

**I. 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. **II.**

**Precision**

Within Run: Precision was run on a control in replicate, resulting in the following data:

|           |
|-----------|
| n = 10    |
| X = 68.5  |
| SD = 1.7  |
| CV% = 2.5 |

Between Run: Precision was run on a control in replicate. The data from 3 consecutive runs was combined, and gave the following results:

|           |
|-----------|
| n = 18    |
| X = 45.3  |
| SD = 1.2  |
| CV% = 2.6 |

**BIBLIOGRAPHY**

1. Walker, F.J., J Biol Chem 256:11128-11131, 1981.
2. Taylor, F.B. and Lockhart, M.S., Thrombin Res 27:115-164, 1985.
3. Fulcher, C.A., et al., Blood 63:486-489, 1981.
4. Young, D.S. et al., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed., AACC Press, Washington, D.C., 1990
5. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. 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, 1984.
6. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Throm Haemostas, 50:810-813, 1983.

## UTILISATION

Le dosage chromogénique Protéine C Helena BioSciences utilisé pour la détermination quantitative de la protéine C dans le plasma humain en utilisant une méthode de dosage chromogénique.

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<sup>1</sup> et VIIIa<sup>2</sup> ou stimuler la fibrinolyse lorsqu'elle est activée<sup>3</sup>. 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. La quantité de protéine C activée (PCa) 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.

## PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostique in vitro uniquement. **NE PAS INGÉRER.** Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

## COMPOSITION

### 1. Substrat Protéine C

Chaque flacon contient 2,75µmol de pyro-Glu-Pro-Arg-pNA.HCl lyophilisé.

**Préparation :** Reconstituer chaque flacon en ajoutant 2,0ml de Diluant Protéine C. S'il est trouble, le chauffer quelques minutes à 37°C.

### 2. Activateur Protéine C

Chaque flacon contient 0,8 unités d'activateur provenant de venin de serpent (Protac®).

**Préparation :** Reconstituer l'activateur en ajoutant 2ml d'eau désionisée.

### 3. Diluant Protéine C

Chaque flacon contient un tampon tris concentré additionné d'azide de sodium comme conservateur. Prêt à l'emploi.

### 4. Autres composants du kit

Chaque kit contient une fiche technique.

## STOCKAGE ET CONSERVATION

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.

### 1. Substrat Protéine C

Le réactif reconstitué est stable une semaine entre 2...6°C ou un mois à -20°C.

AC-4 POS 27@37°C=6hrs

### 2. Activateur Protéine C

Le réactif reconstitué est stable une semaine entre 2...6°C ou un mois à -20°C.

AC-4 POS 30@RT = 6hrs.

### 3. Diluant Protéine C

Conserver entre 2...6°C.



**MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS**

Réf. 5185 Plasma de référence SARP

Réf. 1471 Analyseur PACKS-4 ou spectrophotomètre pouvant réaliser des mesures à 405 nm

Acide acétique glacial et chronomètre pour la technique manuelle

**PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS**

Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre silicé. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 2000 - 3000 x g pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre 2...6°C. L'analyse doit être terminée dans les 2 heures suivant le prélèvement de l'échantillon ; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20°C ou un 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 de stase. Éviter d'agiter ou de former des bulles d'air ou d'écume. Se référer à Young, et al.<sup>4</sup> pour connaître les effets des médicaments couramment administrés. Utiliser uniquement des solutions de NaCl à 0,85% pour les dilutions de plasma.

**MÉTHODOLOGIE**

Préparer des étalons de plasma et des échantillons de plasma du patient de la manière suivante :

| Étalon % | Plasma           | Tampon                                       |
|----------|------------------|--|
| 100%     | 100 µl de SARP   | + 300µl de solution physiologique            |
| 50%      | 50 µl de SARP    | + 350µl de solution physiologique            |
| 0%       |                  | + 400µl de solution physiologique uniquement |
| patient  | 100 µl de plasma | + 300 µl de solution physiologique           |

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

**Méthodes automatisées, AC-4. (5543 x 250 échantillons)**

Se conformer au manuel d'utilisation de AC-4 correspondant pour avoir des instructions détaillées.

Préparer tous les réactifs en suivant les indications du paragraphe Composition

|              |              |                      |  |   |
|--------------|--------------|----------------------|--|---|
| START=33s    | METHOD=Chrom | MIX=0                | PATIENT (Pat)<br>vol=12µL<br>pos=35 (CP) | Def. Plasma (DP)<br>Vol=0µL             |
| INCUB=300s   | MATH=lin     | CLEAN=Y              | BUFFER (saline)<br>Vol=36µL<br>Pos=39    | PC Activator (R1)<br>Vol=48µL<br>Pos=30 |
| RUNTIME=180s | SENS=0       | T-CORR=0<br>S-CORR=0 | CLEAR (CLR)<br>Vol=0µL                   | PC Substrate (R2)<br>Vol=48µL<br>Pos=27 |

**Dosage en point final**

- Dans un tube à essai en verre ou en plastique :  
Ajouter 100µl de dilution de plasma patient ou étalon.  
Incuber 2 minutes à 37°C.

Ajouter 200 $\mu$ l d'activateur et mélanger.  
 Incuber 5 minutes à 37°C.  
 Ajouter 200 $\mu$ l de substrat Protéine C et mélanger.  
 Incuber 10 minutes à 37°C.  
 Ajouter 200 $\mu$ l d'acide acétique et mélanger.  
 Ajouter 200 $\mu$ l d'eau (en option).

2. Lire l'absorbance à 405nm dans une cuvette semi-micro (1cm) par rapport à un blanc préparé avec de l'eau désionisée. Pour certains spectrophotomètres, il est nécessaire d'avoir un volume d'au moins 1 ml dans la cuvette. 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.

### Méthode cinétique

Automate d'analyse nécessaire. Consulter le manuel d'utilisation pour avoir des instructions détaillées.

Tableau d'exemple :

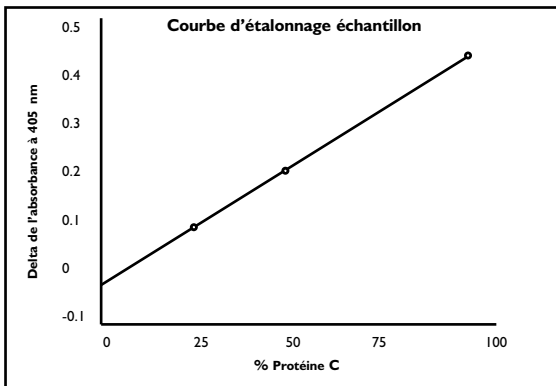
| Réactif             | Volume     | Temps |
|---------------------|------------|-------|
| Échantillon         | 75 $\mu$ l | 3:00  |
| Activateur          | 75 $\mu$ l | 5:00  |
| Substrat Protéine C | 75 $\mu$ l | 5:00  |

### Courbe d'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 spontanée et associé à un traumatisme 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.

### **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 distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit :

Réf. 5301 SAC1

Réf. 5302 SAC2

### **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.

## 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 un pourcentage relatif par rapport à un pool de plasma normal. Bertina, et al.<sup>5</sup> 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<sup>6</sup>.

Helena a analysé 17 plasmas provenant de femmes et d'hommes vraisemblablement sains en utilisant le Helena AC-4 et a obtenu les données suivantes :

$X = 105\%$   
Écart-type = 26,6  
Valeurs usuelles = 61,2 – 162,9%

## PERFORMANCES

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

### I. 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.

### II. Précision

**Intra-analyse** : La précision a été déterminée par des analyses répétées d'un contrôle et a donné les résultats suivants :

$n = 10$   
 $X = 68,5$   
Écart-type = 1,7  
CV% = 2,5

**Inter-analyse** : L'étude précédente a été répétée. Les résultats combinés des trois analyses sont les suivants :

$n = 18$   
 $X = 45,3$   
Écart-type = 1,2  
CV% = 2,6

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Walker, F. J., J Biol Chem 256 : 11128-11131, 1981.
2. Taylor, F. B. et Lockhart, M. S., Thrombin Res 27 : 115-164, 1985.
3. Fulcher, C. A., et al., Blood 63 : 486-489, 1981.
4. Young, D. S. et al., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3<sup>e</sup> éd., AACC Press, Washington, D.C., 1990.
5. Bertina, R. M., Broekmans, A. W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. 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, 1984.
6. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R. M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Throm Haemostas, 50 : 810-813, 1983.

## VERWENDUNGSZWECK

Der Test Chromogenes Protein C der Firma Helena BioSciences ist zur quantitativen Bestimmung von Protein C in Humanplasma mittels einer chromogenen Testmethode bestimmt.

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, das in der Regulierung der Antikoagulanzen-Mechanismen eine wichtige Rolle spielt. Es kann durch Inaktivierung der Faktoren Va<sup>1</sup> und VIIIa<sup>2</sup> die Koagulation hemmen oder, wenn aktiviert, die Fibrinolyse stimulieren<sup>3</sup>. Protein C zirkuliert als Zymogen im Blutkreislauf und wird durch Thrombin in Anwesenheit von Thrombomodulin in eine aktive Serinprotease umgewandelt. Sowohl der hereditäre als auch der erworbene Protein C-Mangel hat sich bei der Entstehung von Venenthrombosen als Risikofaktor erwiesen.

Das Protein C im Plasma wird durch eine aus dem Gift der Schlange Agkistrodon contortrix gewonnene spezifische Fraktion aktiviert. Die Menge an aktiviertem Protein C (APC) wird durch Überprüfen der Hydrolyse-Geschwindigkeit eines Protein C-spezifischen chromogenen Substrats bestimmt. Die Freisetzung von pNA wird bei 405nm gemessen und ist zum Protein C-Wert proportional.

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Reagenzien dieses Kits sind nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. – **NICHT EINNEHMEN.** Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Siehe die Sicherheitsdatenblätter mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie Informationen zur Entsorgung.

## INHALT

### 1. Protein C-Substrat

Jedes Fläschchen enthält 2,75 µmol lyophilisiertes pyro-Glu-Pro-Arg-pNA.HCl.

**Vorbereitung für den Gebrauch:** Jedes Fläschchen mit 2ml Protein C-Verdünnungspuffer rekonstituieren. Bei Trübung einige Minuten bei 37°C anwärmen.

### 2. Protein C-Aktivator

Jedes Fläschchen enthält 0,8 Einheiten Aktivator aus Schlangengift (Protac®).

**Vorbereitung für den Gebrauch:** Aktivator mit 2ml entionisiertem Wasser rekonstituieren.

### 3. Protein C-Verdünnungspuffer

Jedes Fläschchen enthält Tris-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

### 4. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung.

## LAGERUNG UND STABILITÄT

Ungeöffnete Reagenzien sind unter den auf Verpackung oder Fläschchen angegebenen Lagerbedingungen bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

### 1. Protein C-Substrat

Rekonstituiertes Reagenz ist bei 2...6°C eine Woche oder bei -20°C einen Monat stabil.

AC-4 POS 27@37°C=6hrs

### 2. Protein C-Aktivator

Rekonstituiertes Reagenz ist bei 2...6°C eine Woche oder bei -20°C einen Monat stabil.

AC-4 POS 30@RT = 6hrs.

### 3. Protein C-Verdünnungspuffer

Bei 2...6°C lagern.

**NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL**

Kat. Nr. 5185 SARP Referenzplasma

Kat. Nr. 1471 PACKS-4 Analysengerät oder Spektralphotometer mit einer Wellenlänge von 405nm.

Bei manueller Technik Eisessig und Stoppuhr.

**PROBENTNAHME UND VORBEREITUNG**

Nur Plastik oder Silikonglas verwenden. Blut (9 Teile) sollte in 3,2% oder 3,8% Natriumcitrat als Antikoagulanzen (1 Teil) entnommen werden. 15 Minuten bei 2000-3000 g zentrifugieren und Plasma abpipettieren. Plasma bei 2...6°C lagern. Nach Entnahme sollte Plasma innerhalb von 2 Stunden verarbeitet oder tiefgefroren bei -20°C für 2 Wochen oder -70°C für einen Monat gelagert werden. Vor dem Testen schnell bei 37°C auftauen. Nicht länger als 5 Minuten bei 37°C belassen.

Fehlerhafte Resultate können durch Kontamination mit Gewebeflüssigkeit oder Stase verursacht werden. Schütteln, Luftblasen oder Schaum vermeiden. Für die Auswirkungen häufig verabreichter Medikamente siehe Young u. a.<sup>4</sup> Plasma-Verdünnungen nur mit 0,85% NaCl-Lösung herstellen.

**SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE**

Plasma-Standards und Patientenproben wie folgt vorbereiten:

| Standards % | Proben         | Puffer               |
|-------------|----------------|----------------------|
| 100%        | 100µl S.A.R.P. | + 300µl Kochsalz     |
| 50%         | 50µl S.A.R.P.  | + 35µl Kochsalz      |
| 0%          |                | + 400µl nur Kochsalz |
| Patient     | 100µl Plasma   | + 300µl Kochsalz     |

**WICHTIG:** Für die Verdünnungen nur 0,85% Kochsalz-Lösung verwenden.**Automatisierte Methoden, AC-4. (5543 x 250 Proben)**

Siehe Bedienungsanleitung des verwendeten Geräts für eine genaue Anleitung.

Alle Reagenzien wie unter "Inhalt" beschrieben vorbereiten.

|              |              |                      |  |   |
|--------------|--------------|----------------------|--|---|
| START=33s    | METHOD=Chrom | MIX=0                | PATIENT (Pat)<br>vol=12µL<br>pos=35 (CP) | Def. Plasma (DP)<br>Vol=0µL             |
| INCUB=300s   | MATH=lin     | CLEAN=Y              | BUFFER (saline)<br>Vol=36µL<br>Pos=39    | PC Activator (R1)<br>Vol=48µL<br>Pos=30 |
| RUNTIME=180s | SENS=0       | T-CORR=0<br>S-CORR=0 | CLEAR (CLR)<br>Vol=0µL                   | PC Substrate (R2)<br>Vol=48µL<br>Pos=27 |

**Endpunkt-Methode**

1. In ein Glas- oder Plastikröhrchen:  
100µl Standard- oder Patientenplasma-Verdünnung zufügen.  
Bei 37°C 2 Minuten inkubieren.  
200µl Aktivator zugeben und mischen.  
Bei 37°C 5 Minuten inkubieren.  
200µl Protein C-Substrat zugeben und mischen.

Bei 37°C 10 Minuten inkubieren.  
200µl Eisessig zugeben und mischen.  
200µl Wasser zufügen (optional).

2. Die Extinktion bei 405nm in einer 1cm Halbmikroküvette gegen einen Leerwert aus entionisiertem Wasser ablesen. Einige Spektralphotometer benötigen 1ml Volumen in der Küvette. Es können mit derselben Stoppuhr bis zu 10 Bestimmungen gleichzeitig gestartet werden, indem die Pipettierschritte im Abstand von fünf Sekunden ausgeführt werden.

### Kinetische Methode

- z. Automatisches Analysegerät erforderlich. PACKS-4 Siehe Bedienungsanleitung des verwendeten Geräts für genaue Anleitung.

Beispiel-Tabelle:

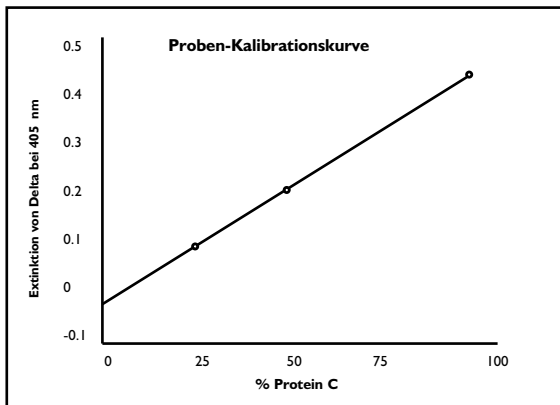
| Reagenz            | Volumen | Zeit |
|--------------------|---------|------|
| Probe              | 75µl    | 3:00 |
| Aktivator          | 75µl    | 5:00 |
| Protein C-Substrat | 75µl    | 5:00 |

### Kalibrationskurve

Die Extinktionen der einzelnen Protein C-Standards gegen Protein C % auf einem linearen Millimeterpapier auftragen.

Die Protein C-Konzentration in dem Patientenplasma kann durch Interpolation aus der Kalibrationskurve abgelesen werden. Wird ein kommerzieller Protein C-Standard verwendet, sollte die Protein C-Konzentration in der Patientenprobe auf die Protein C-Konzentration des Standards eingestellt werden.

Die Kalibrationskurve in der Abbildung unten dient lediglich als Beispiel. Es muss für jeden Testlauf eine Kalibrationskurve erstellt werden.





**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

Protein C-Mangel, entweder angeboren oder erworben, kann zu schwerwiegenden thrombotischen Ereignissen führen wie Thrombophlebitis, tiefe Venenthrombose oder Lungenembolie. Ungefähr 2-8% aller Patienten unter 40-45 Jahren mit einer Venenthrombose wiesen einen Protein C-Mangel auf. Bei Patienten mit hereditären Mangelerkrankungen treten Venenthrombosen in der Regel im frühen Erwachsenenalter auf. Die erste Episode ereignet sich für gewöhnlich spontan und ist mit Trauma oder Stressauswirkung auf den Gerinnungsmechanismus verbunden. Die Prävalenz des Protein C-Mangels beträgt 1 Fall auf 300 oder ungefähr 0,33%.

**Erworbenen Mangelzustände**

Ein verminderter Protein C-Spiegel wird in folgenden Fällen beobachtet:

- Lebererkrankungen: Hepatitis, Zirrhose.
- DIC
- Orale Antikoagulantien, bei denen sich die Interpretation der Testergebnisse als schwierig erweist, wenn die Patienten schon in der Anamnese Thrombosen aufwiesen und daher mit oralen Antikoagulantien behandelt werden.

**Angeborene Mangelzustände**

Zwei Arten von Mangelzuständen können beobachtet werden:

- quantitativ oder Typ I, bei dem die Antigen- und funktionalen Werte gleichzeitig vermindert sind.
- qualitativ oder Typ II, der durch verminderte funktionale Werte und normale oder subnormale immunologische Werte charakterisiert wird.

**QUALITÄTSKONTROLLE**

Jedes Labor muss für eine eigene Qualitätskontrolle sorgen. Vor jeder Testreihe mit Patientenproben müssen normale und abnormale Kontrollplasmen getestet werden, um eine zufrieden stellende Geräteleistung und Bedienung zu gewährleisten. Liegen die Kontrollen außerhalb des Normbereichs, sind die Patientenergebnisse nicht zu verwenden.

In Verbindung mit diesem Produkt bietet Helena BioSciences die folgenden Kontrollen an:

Kat. Nr. 5301 SAC 1

Kat. Nr. 5302 SAC 2

**EINSCHRÄNKUNGEN**

Ikterische, hämolytische oder hyperlipämische Proben stören das Ablesen der Extinktionen und benötigen daher für korrekte Ergebnisse Proben-Leerwerte. Proben-Leerwerte sind auch bei Patienten erforderlich, bei denen man eine Oberflächenfaktor-Aktivierung vermutet (z. B. Patienten mit Verbrauchskoagulopathie) oder bei Personen, die orale Verhütungsmittel einnehmen, bei denen eine Kälteaktivierung auftreten kann. Beim Testansatz der Leerwerte wird der Aktivator durch Kochsalz ersetzt. Die Leerwert-Aktivität von der Proben-Aktivität abziehen.

Der natürlich vorkommende Protein C-Aktivator ist Thrombin in Anwesenheit von Thrombomodulin. Ein mögliche Existenz klinischer Protein C-Abnormalitäten, die durch Reaktion mit dem Schlangengift-Aktivator oder mit dem Chromogen-Substrat in diesem Kit nicht nachzuweisen sind, darf nicht ausgeschlossen werden.

Zum Erhalt richtiger, reproduzierbarer Ergebnisse Präzisionspipetten verwenden und die empfohlenen Vorgehensweisen, ganz besonders im Hinblick auf Inkubationszeiten und Inkubationstemperatur, einhalten.

## REFERENZWERTE

Referenzwerte können je nach Technik und verwendetem System von Labor zu Labor unterschiedlich sein. Aus diesem Grund sollte jedes Labor seinen eigenen Normalwertbereich erstellen. Die Werte der Protein C-Aktivität werden in der Regel als relative Prozentsätze im Vergleich mit einem gepoolten, normalen Plasma-Standard ausgedrückt. Bertina u. a.<sup>5</sup> berichten von einem Bereich zwischen 65-145% bei gesunden Personen mit verminderten Werten nach einer Antikoagulanzen-Therapie.<sup>6</sup> Es gibt anscheinend in Bezug auf Protein C keinen Unterschied zwischen Männern und Frauen.<sup>6</sup> Die Fa. Helena testete mit dem Helena AC-4 17 Plasmen anscheinend gesunder Männer und Frauen mit den folgenden Ergebnissen:

$\bar{X} = 105 \%$   
 $s = 26,6$   
Bereich = 61,2-162,9 %

## LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die folgenden Leistungseigenschaften wurden von Helena BioSciences oder in ihrem Auftrag als **Richtlinien ermittelt**: Jede Labor muss seine eigenen Werte ermitteln.

### I. Spezifität

Bei Studien, in denen eine Wiederfindung des Protein C-Plasmas nach Zugabe verschiedener Mengen Protein C zu Protein C-Mangelplasma bestimmt wurde, konnten die erwartete Wiederfindung erreicht werden.

### II. Präzision

Innerhalb eines Laufs: Die Präzision wurde an einer Kontrolle im Doppelansatz durchgeführt mit folgenden Werten:

$n = 10$   
 $\bar{X} = 68,5$   
 $s = 1,7$   
VK % = 2,5

Zwischen den Läufen: Die Studie oben wurde wiederholt. Die zusammengenommenen Daten der drei Ansätze waren wie folgt:

$n = 18$   
 $\bar{X} = 45,3$   
 $s = 1,2$   
VK % = 2,6

**LITERATUR**

1. Walker, F.J., J Biol Chem 256:11128-11131, 1981.
2. Taylor, F.B. and Lockhart, M.S., Thrombin Res 27:115-164, 1985.
3. Fulcher, C.A., et al., Blood 63:486-489, 1981.
4. Young, D.S. et al., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed., AACC Press, Washington, D.C., 1990
5. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. 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, 1984.
6. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Throm Haemostas, 50:810-813, 1983.

## USO PREVISTO

Dosaggio di proteina C cromogenica di Helena BioSciences è stato formulato per la determinazione quantitativa della proteina C in plasma umano utilizzando un metodo di dosaggio 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<sup>1</sup> e Villa<sup>2</sup> oppure, se attivata, può stimolare la fibrinolisi<sup>3</sup>. La proteina C circola come zimogeno e viene trasformata in una serinproteasi 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 veleno del serpente Agkistrodon 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.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica in vitro - **NON INGERIRE**. Indossare i guanti durante la manipolazione di tutti i componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

## COMPOSIZIONE

### 1. Substrato per proteina C

Ogni flacone contiene 2,75µmol di pyro-Glu-Pro-Arg-pNA.HCl liofilizzato.

**Preparazione per l'uso:** Ricostituire ogni flacone con 2,0ml di diluente della proteina C. Se risulta torbido, riscaldare a 37°C per alcuni minuti.

### 2. Attivatore della proteina C

Ogni flacone contiene 0,8 unità di attivatore proveniente da veleno di serpente (Protac(r)).

**Preparazione per l'uso:** Ricostituire l'attivatore con 2ml di acqua deionizzata.

### 3. Diluente della proteina C

Ogni flacone contiene tampone tris con sodio azide come conservante. Pronto per l'uso.

### 4. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene un foglio procedurale.

## CONSERVAZIONE 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.

### 1. Substrato per proteina C

Il reagente ricostituito è stabile per una settimana a 2...6°C o per un mese a -20°C.

AC-4 POS 27@37°C=6hrs.

### 2. Attivatore della proteina C

Il reagente ricostituito è stabile per una settimana a 2...6°C o per un mese a -20°C.

AC-4 POS 30@RT = 6hrs.

### 3. Diluente della proteina C

Conservare a 2...6°C.

**MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE**

Cod. N. 5185 Plasma di riferimento SARP

Cod. N. 1471 Analizzatore PACKS-4 o spettrofotometro in grado di effettuare letture a 405 nm

Acido acetico glaciale e timer per la tecnica manuale

**RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro siliconizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodio citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 2000-3000 x g per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a 2...6°C. I test devono essere completati entro 2 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per un mese. Decongelare rapidamente a 37°C prima di eseguire i test. Non conservare a 37°C per oltre 5 minuti.

La contaminazione con liquidi tissutali o la stasi possono dare luogo a risultati erronei. 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'. Per le diluizioni del plasma utilizzare esclusivamente soluzioni di NaCl allo 0,85%.

**PROCEDURA**

Preparare gli standard di plasma e i campioni di plasma del paziente come illustrato di seguito:

| Standard % | Plasma            | Tampone                               |
|------------|-------------------|---------------------------------------|
| 100%       | 100µl di S.A.R.P. | + 300µl di soluzione fisiologica      |
| 50%        | 50µl di S.A.R.P.  | + 350µl di soluzione fisiologica      |
| 0%         |                   | + 400µl di sola soluzione fisiologica |
| Paziente   | 100µl di plasma   | + 300µl di soluzione fisiologica      |

**Importante:** Per le diluizioni utilizzare esclusivamente soluzioni di NaCl allo 0,85%.**Metodi automatici, AC4. (5543 x 250 campioni)**

Fare riferimento al manuale utente dello AC-4 appropriato per conoscere le istruzioni dettagliate

Preparare tutti i reagenti secondo le istruzioni riportate nel paragrafo COMPOSIZIONE.

|              |              |                      |  |   |
|--------------|--------------|----------------------|--|---|
| START=33s    | METHOD=Chrom | MIX=0                | PATIENT (Pat)<br>vol=12µL<br>pos=35 (CP) | Def. Plasma (DP)<br>Vol=0µL             |
| INCUB=300s   | MATH=lin     | CLEAN=Y              | BUFFER (saline)<br>Vol=36µL<br>Pos=39    | PC Activator (R1)<br>Vol=48µL<br>Pos=30 |
| RUNTIME=180s | SENS=0       | T-CORR=0<br>S-CORR=0 | CLEAR (CLR)<br>Vol=0µL                   | PC Substrate (R2)<br>Vol=48µL<br>Pos=27 |

**Dosaggio con metodo end-point**

1. In una provetta di prova in vetro o plastica:

Aggiungere 100µl di diluizione di plasma standard o del paziente.

Incubare a 37°C per 2 minuti.

Aggiungere 200µl di attivatore e miscelare.

Incubare a 37°C per 5 minuti.

Aggiungere 200µl di substrato per proteina C e miscelare.

Incubare a 37°C per 10 minuti.

Aggiungere 200µl di acido acetico e miscelare.

Aggiungere (facoltativamente) 200µl di acqua.

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

### Metodo cinetico

Richiesto analizzatore automatico. Per conoscere le istruzioni dettagliate fare riferimento al manuale utente.

Tabella esemplificativa:

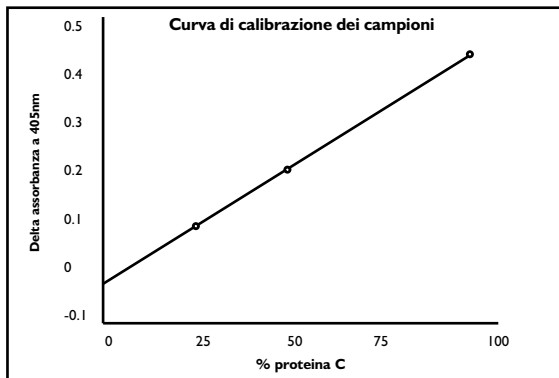
| Reagente                 | Volume | Tempo |
|--------------------------|--------|-------|
| Campione                 | 75µl   | 3:00  |
| Attivatore               | 75µl   | 5:00  |
| Substrato per proteina C | 75µl   | 5:00  |

### 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 dalla curva di calibrazione. Se viene utilizzato uno standard per proteina C disponibile in commercio, la concentrazione di proteina C nel campione del 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 tromboflebite, 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 carenze 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 delle carenze 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.

## **CONTROLLO QUALITÀ**

Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmi di controllo normali e anomali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che per l'operatore. Qualora i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi.

Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

Cod. N. 5301 SAC 1

Cod. N. 5302 SAC 2

## **LIMITAZIONI**

I campioni itterici, emolizzati o iperlipemici interferiscono con le letture dell'assorbanza, richiedendo pertanto l'utilizzo di blank plasmatici per l'ottenimento di risultati precisi. I blank plasmatici sono necessari anche nei pazienti in cui si sospetta un'attivazione del fattore per contatto, come i pazienti con DIC, oppure nei soggetti che assumono contraccettivi orali e in cui si potrebbe verificare un'attivazione a freddo. I blank vengono ottenuti sostituendo la soluzione salina con l'attivatore nella reazione del test. Sottrarre 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 veleno 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.

## 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 relative rispetto ad uno standard di plasma normale in pool. Bertina et al.<sup>5</sup> 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.<sup>6</sup>

Presso Helena sono stati testati, con l'ausilio del Helena AC-4, 17 plasmi di uomini e donne ritenuti sani e sono stati ottenuti i seguenti dati:

|  |
|--|
| $X = 105\%$<br>$DS = 26,6$<br>$range = 61,2-162,9\%$ |
|--|

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

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

### I. 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 al plasma carente, è stato ottenuto il ripristino previsto.

### II. Precisione

**Entro la serie:** La precisione è stata analizzata su un controllo in replicato, da cui sono emersi i seguenti dati:

|  |
|--|
| $n = 10$<br>$X = 68,5$<br>$DS = 1,7$<br>$CV\% = 2,5$ |
|--|

**Tra le serie:** Il suddetto studio è stato ripetuto. I dati combinati delle 3 serie sono stati i seguenti:

|  |
|--|
| $n = 18$<br>$X = 45,3$<br>$SD = 1,2$<br>$CV\% = 2,6$ |
|--|



**BIBLIOGRAFIA**

1. Walker, F.J., J Biol Chem 256:11128-11131, 1981.
2. Taylor, F.B. and Lockhart, M.S., Thrombin Res 27:115-164, 1985.
3. Fulcher, C.A., et al., Blood 63:486-489.
4. Young, D.S. et al., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed., AACC Press, Washington D.C., 1990
5. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. 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, 1984.
6. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Throm Haemostas, 50:810-813, 1983.

## USO PREVISTO

El ensayo de Proteína C cromógena de Helena BioSciences está diseñado para la determinación cuantitativa de la proteína C en el plasma humano usando un método de ensayo cromógeno.

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<sup>1</sup> y Villa<sup>2</sup> o, cuando se activa, puede estimular la fibrinólisis<sup>3</sup>. La proteína C circula como zimógeno y se convierte en una proteasa de 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 Agkistrodon contortrix. 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.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos contenidos en este kit son sólo para uso diagnóstico – **NO SE DEBEN INGERIR**. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

## COMPOSICIÓN

### 1. Sustrato de la proteína C

Cada vial contiene 2,75  $\mu$ mol de pyro-Glu-Pro-Arg-pNA.HCl liofilizada.

**Preparar para el uso:** Reconstituir cada vial con 2,0 ml de disolvente de proteínas C. Si queda turbio, caliente a 37°C durante unos minutos.

### 2. Activador de la proteína C

Cada vial contiene 0,8 unidades de activador de veneno de serpiente (Protac®).

**Preparar para el uso:** Reconstituir el activador con 2 ml de agua desionizada.

### 3. Disolvente de proteínas C

Cada vial contiene tampón tris con azida de sodio como conservante. Listo para su uso.

### 4. Otros componentes del kit

Cada kit contiene instrucciones de uso.

## ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

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.

### 1. Sustrato de proteína C

El reactivo reconstituido permanece estable durante una semana a 2...6°C o un mes a -20°C.

AC-4 POS 27@37°C=6hrs.

### 2. Activador de la proteína C

El reactivo reconstituido permanece estable durante una semana a 2...6°C o un mes a -20°C.

AC-4 POS 30@RT = 6hrs.

### 3. Disolvente de proteínas C

Guardar a 2...6°C.

**ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS**

Nº Cat. 5185 plasma de referencia SARP

Nº Cat. 1471 PACKS-4 Analizador o espectrofotómetro capaz de leer a 405 nm.

Ácido acético glacial y temporizador para la técnica manual

**RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE 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 después de la centrifugación a 2000-3000xg durante 15 minutos. El plasma debe conservarse a 2...6°C. Las pruebas deberían terminarse en 2 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20 °C durante 2 semanas o -70°C durante un mes. Descongelar rápidamente a 37°C antes de realizar la prueba. No conservar a 37°C durante más de 5 minutos.

Pueden producirse resultados erróneos por contaminación con líquidos tisulares o estasia. Evitar la agitación, las burbujas de aire o la formación de espuma. Sobre los efectos de los fármacos administrados con frecuencia, consultar a Young, y cols<sup>1</sup>. Usar sólo soluciones de NaCl al 0,85% para las diluciones plasmáticas.

**PROCEDIMIENTO PASO A PASO**

Preparar estándares de plasma y muestras de plasma del paciente como sigue:

| Estándares % | Plasma          | Tampón                        |
|--------------|-----------------|-------------------------------|
| 100%         | 100 µl S.A.R.P. | + 300 µl solución salina      |
| 50%          | 50 µl S.A.R.P.  | + 350 µl solución salina      |
| 0%           |                 | + 400 µl solución salina sólo |
| Paciente     | 100 µl plasma   | + 300 µl solución salina      |

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

**Métodos automatizados, AC-4. (5543 x 250 muestras)**

Consúltese el Manual del Operador del AC-4 adecuado para instrucciones detalladas.

Preparar todos los reactivos como se indica en "composición"

|              |              |                      |  |   |
|--------------|--------------|----------------------|--|---|
| START=33s    | METHOD=Chrom | MIX=0                | PATIENT (Pat)<br>vol=12µL<br>pos=35 (CP) | Def. Plasma (DP)<br>Vol=0µL             |
| INCUB=300s   | MATH=lin     | CLEAN=Y              | BUFFER (saline)<br>Vol=36µL<br>Pos=39    | PC Activator (R1)<br>Vol=48µL<br>Pos=30 |
| RUNTIME=180s | SENS=0       | T-CORR=0<br>S-CORR=0 | CLEAR (CLR)<br>Vol=0µL                   | PC Substrate (R2)<br>Vol=48µL<br>Pos=27 |

**Ensayo del método del punto final**

1. 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  $\mu\text{l}$  de sustrato de proteína C y mezclar.  
 Incubar a 37°C durante 10 minutos.  
 Añadir 200  $\mu\text{l}$  de ácido acético y mezclar.  
 Añadir 200  $\mu\text{l}$  de agua (opcional).

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

### Método cinético

Se requiere el uso de un analizador automatizado. Consultar el Manual del Operador para instrucciones detalladas.

Tabla de ejemplos:

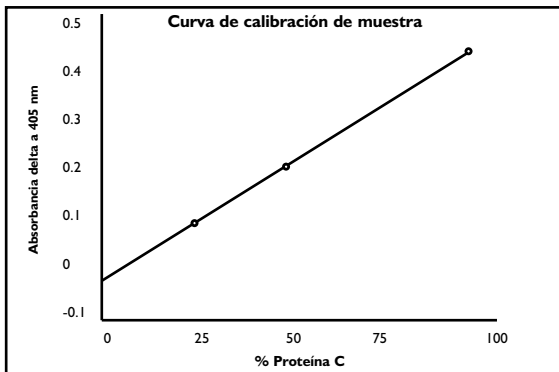
| Reactivo               | Volumen          | Tiempo |
|------------------------|------------------|--------|
| Muestra                | 75 $\mu\text{l}$ | 3:00   |
| Activador              | 75 $\mu\text{l}$ | 5:00   |
| Sustrato de proteína C | 75 $\mu\text{l}$ | 5:00   |

### 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 proteína 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 proteína C, la concentración de proteína C en la muestra del paciente debe ajustarse para la concentración de proteína 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 RESULTADOS**

Las deficiencias de proteína S, congénitas o adquiridas, pueden llevar a acontecimientos trombóticos 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 proteína 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 proteína C es de un caso por 300 personas o aproximadamente el 0,33%.

**Deficiencias adquiridas**

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

- trastornos hepáticos: hepatitis, cirrosis.
- CID
- 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 antigénicos
- cualitativo o tipo II, caracterizado por un nivel funcional más bajo y un nivel inmunológico normal o subnormal.

**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 suministra los siguientes controles disponibles para usar con este producto:

Nº Cat. 5301 SAC1

Nº Cat. 5302 SAC2

**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 también 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 frío. Los blancos se realizan sustituyendo el activador por solución salina en la reacción de prueba. Restar la actividad del blanco de muestra de la actividad de la prueba de muestra.

El activador natural de la proteína C es la trombina en presencia de la trombomodulina. No debe excluirse la posible existencia de anomalías clínicas de la proteína 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 pipeteado precisos y seguir los procedimientos recomendados con especial atención a los tiempos y temperatura de incubación.

## VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal. Los valores de actividad de la proteína C suelen expresarse en porcentajes relativos en comparación con un estándar de plasma normal acumulado. Bertina, y cols<sup>5</sup> 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 proteína C entre varones y mujeres sanos<sup>6</sup>.

Helena estudió 17 plasmas de varones y mujeres presuntamente sanos usando el Helena AC-4 con los siguientes datos.

$X = 105\%$   
 $DE = 26,6$   
intervalo = 61,2-162,9%

## CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Helena BioSciences o sus representantes han determinado las siguientes características de rendimiento como directriz. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de rendimiento.

### I. Especificidad

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

### II. Precisión

**Dentro de las pruebas:** Se estudió la precisión en un control por duplicado, en el que se obtuvieron los siguientes datos.

$n = 10$   
 $X = 68,5$   
 $DE = 1,7$   
 $CV\% = 2,5$

**Entre pruebas:** Se repitió el estudio anterior. Los datos combinados de las tres pruebas fueron los siguientes:

$n = 18$   
 $X = 45,3$   
 $DE = 1,2$   
 $CV\% = 2,6$

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Walker, F.J., J Biol Chem 256:11128-11131, 1981.
2. Taylor, F.B. and Lockhart, M.S., Thrombin Res 27:115-164, 1985.
3. Fulcher, C.A., et al., Blood 63:486-489, 1981.
4. Young, D.S. et al., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed., AACC Press, Washington, D.C., 1990
5. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. 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, 1984.
6. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Throm Haemostas, 50:810-813, 1983.

Helena Biosciences Europe  
Queensway South  
Team Valley Trading Estate  
Gateshead  
Tyne and Wear  
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440  
Fax: +44 (0) 191 482 8442  
Email: [info@helena-biosciences.com](mailto:info@helena-biosciences.com)  
[www.helena-biosciences.com](http://www.helena-biosciences.com)

HL-2-1677P 2008/06 (4)