



HEMOCLOT PROTEIN C

Ref CK031K, R1, R2 : 3 x 1 ml

Ref CK032K, R1, R2 : 3 x 2 ml

Stanovení aktivity Proteinu C koagulační metodou

Pouze pro diagnostické účely "In Vitro"



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Datum revize: 12_2021

POUŽITÍ:

HEMOCLOT Protein C je reagensie pro kvantitativní stanovení Proteinu C v lidské citrátové plazmě koagulační metodou, manuální nebo automatizovanou.

SOUHRN:

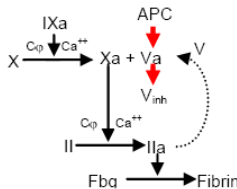
Protein C (PC) je lidský protein závislý na vitamínu K, který inhibuje a reguluje koagulaci prostřednictvím specifického štěpení faktorů Va a VIIIa. Tím snižuje jejich prokoagulační kofaktorovou aktivitu.

Vrozené a získané deficity Proteinu C jsou rizikovým faktorem rozvoje žilní trombózy.

PRINCIP STANOVENÍ:

HEMOCLOT Protein C je koagulační test podobný APTT, provedený v přítomnosti aktivátoru Proteinu C (Protac® – extrahovaný z jedu hada Agkistrodon Contortrix), fosfolipidů, aktivátoru kontaktní fáze a kalciových iontů.

V prvním kroku je ředěná testovaná plazma smíchána s Protein C deficitní plazmou (R1). Potom je přidán Aktivační Reagent (R2) v konstatním a optimalizovaném množství. Koagulace je zahájena přidáním Ca^{2+} a zaznamená se koagulační čas. Protein C je limitujícím faktorem. Je zde přímá lineární závislost na bilogaritmičtém grafickém papíru mezi koncentrací Proteinu C a koagulačním časem.



REAGENCIE:

R1: Protein C Deficitní Plazma

Protein C Deficitní plazma, optimalizovaná pro test, lyofilizovaná v přítomnosti heparin neutralizující látky.

R2: Aktivační Reagent:

Protac® (vysoce čistěný enzym, extrahovaný z jedu Agkistrodon C. Contortrix, schopný aktivovat Protein C), obsahuje fosfolipidy v optimální koncentraci.

Ref CK031K → R1, R2: 3 lahvičky po 1 ml.

Ref CK032K → R1, R2: 3 lahvičky po 2 ml.

Upozornění:

- Lidská plazma použitá pro přípravu reagensie byla testována a sledována negativní pro HIV protilátky, HBsAg a protilátky proti HVC. Přesto žádný test nemůže zcela vyloučit naprostou absenci infekčních agens. Takže, jako s každým jiným produktem lidského původu, musí se s reagensiem zacházet s předepsanou opatností a jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Musí být respektována všechna upozornění, aby nedošlo k požití nebo k náhodnému vniknutí reagensie do těla. V případě kontaktu s pokožkou omyjte velkým objemem vody. V případě kontaktu s poraněním vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc a seznamte lékaře s biologickou povahou produktu.
- Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a s očima. Nevylévejte do odpadního potrubí. Noste ochranný oděv.
- Pouze k použití „In Vitro.“
- Koncentrace Protacu® může mírně kolísat od šarže k šarži, ale je vždy přesně uzpůsobena pro každou šarži reagensie.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

Reagensie:

- Destilovaná voda, nejlépe sterilní.
- Calcium chloride 0,025M (např.: AR001B/K/L)
- Imidazolový pufr (např.: AR021B/K/L/M/N).
- Kalibrátor (např.: BIOPHEN Plasma Calibrator 222101)
- Normální a abnormální kontrolní plazmy (např. BIOPHEN Normal Control Plasma #223201 a BIOPHEN Abnormal Control Plasma #223301).

Materiál:

- Elektromagnetická vodní lázeň nebo poloautomatický či automatický koagulometr.
- Stopky.
- Kalibrované pipety.

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ:

Souprava HEMOCLOT Protein C musí být skladována při 2-8°C ve svém originálním obalu. Je pak stabilní do data expirace uvedeného na krabici.

Pozn.: studie stability při 30°C ukázaly, že reagensie může být přepravována za pokojové teploty bez poškození.

PŘÍPRAVA A STABILITA REAGENCIÍ:

Příprava reagensie:

R1: PC deficitní plazma

Rozpusťte každou lahvičku přesně s:

Ref CK031K → 1 ml destilované vody.

Ref CK032K → 2 ml destilované vody.

Opatrně míchejte, dokud se lyofilizát zcela nerozpustí (Vortex). Inkubujte za pokojové teploty (18-25°C) 15 minut za občasného promíchání. Před každým použitím promíchejte.

R2: Aktivační reagent

Rozpusťte každou lahvičku přesně s:

Ref CK031K → 1 ml destilované vody.

Ref CK032K → 2 ml destilované vody.

Opatrně míchejte, dokud se lyofilizát zcela nerozpustí (Vortex). Inkubujte za pokojové teploty (18-25°C) 15 minut za občasného promíchání. Před každým použitím promíchejte.

Stabilita:

Stabilita reagensie R1 a R2 po rekonstituci při skladování v originální lahvičce:

- 8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C)
- 24 hodin při teplotě 2-8°C
- 1 měsíc při -20°C nebo nižší

Upozornění:

- Pro zlepšení stability musí být reagensie uzavřeny jejich originálními zátkami po každém použití.
- S reagensií musí být zacházeno s opatností, aby nedošlo ke kontaminaci během užívání.

Pozn.:

- R1 a R2 lahvičky jsou uzavřeny pod vakuem. Otevírejte opatrně, aby nedošlo ke ztrátě lyofilizátu při otevírání lahvičky.
- Při použití automatizované metody mohou být reagenty rozpuštěny jiným objemem než výše uvedeným. V každém případě musí být zachován reakční poměr (respektive koncentrace reagensií v reakčním prostředí) mezi R1 a R2.
- Užívejte pouze reagensie ze soupravy se stejným číslem šarže. Nezaměňujte reagensie ze souprav z různých šarží v jednom testu. Reagenty R1 a R2 jsou optimalizovány pro každou šarži.

PŘÍPRAVA PLAZMY (ODBĚR VZORKU):

Krev (9 objemů) musí být odebrána do 0.109 M citrátu sodného (1 objem) s opatrností do plastové nebo silikonované nebo plastové zkumavky. Vzorek musí být odebrán přímou venepunkcí, aby nedošlo k aktivaci koagulace.

- Do 2 hodin musí být vzorek zcentrifugován při 2500g po dobu 20 min. a plazma musí být přenesena plastovou pipetou do plastové zkumavky.
- Skladování plazmy
 - maximálně 4 hodiny při pokojové teplotě (18-25°C)
 - maximálně 1 měsíc při teplotě -20°C nebo nižší

Viz. Směrnice GEHT nebo NCCLS pro další instrukce týkající se odběru vzorků, manipulace a skladování.

PROVEDENÍ TESTU:

Souprava HEMOCLOT Protein C je koagulační metoda pro manuální nebo automatizované provedení. Adaptace pro automatické přístroje jsou dostupné na vyžádání. Test se provádí při 37°C a koagulační čas spuštěný přidáním kalcia je měřeným výsledkem.

Kalibrace:

Připraví se 2 ml normální poolované lidské citrátové plazmy ředěné imidazolovým pufr (např. #AR021) v poměru 1:5. Dle definice, 10x ředění normální poolované lidské citrátové plazma odpovídá 100% koncentraci Proteinu C, a ředění 1:5 odpovídá 200% Proteinu C.

Použitím ředění 1:5 získáme následující kalibrační řadu:

PC	25%	50%	100%	200%
Ředění	1 : 40	1 : 20	1 : 10	1 : 5
Plazma pool 1:5	0,125 ml	0,250 ml	0,500 ml	1 ml
Imidazolový pufr	0,875 ml	0,750 ml	0,500 ml	0 ml

HEMOCLOT Protein C souprava může být též kalibrována s **BIOPHEN Plasma Calibrator (222101)** s danou hodnotou Proteinu C „C“ v příloženém letáku. Ředění kalibrátoru desetkrát potom odpovídá koncentraci C% proteinu C. Ředění 1:5 připravené z kalibrátoru dle výše uvedené tabulky potom odpovídá koncentraci **2xC%**.

Příprava plazmy a kontrol kvality pro testování:

Testované plazmy a kontroly musí být ředěny imidazolovým pufr v poměru 1:10.

Upozornění: K dosažení optimálního průběhu testování provádějte všechna měření (kalibrace, vzorky, kontroly) jedno po druhém bez přerušování.

Provedení:

Mechanická manuální metoda:

Provedení	
Kalibrátor nebo testovaná plazma nebo kontroly ředěné 1:10	100 µl
R1 reagensie	100 µl
Míchejte a inkubujte 2 minuty při 37°C	
R2 reagensie	100 µl
Míchejte a inkubujte 5 minut při 37°C	
CaCl ₂ 0,025M (předehřátý na 37°C a míchaný)	100 µl
Zaznamenejte koagulační čas	

Automatické metody:

Detailní nastavení přístrojů včetně pokynů pro přípravu reagentů jsou k dispozici na vyžádání.

Pozn.: Pro stanovení Proteinu C soupravou HEMOCLOT Protein C je doporučen izotonický imidazolový pufr (#AR021) pro ředění kalibrátorů, kontrol a testovaných plazem, protože dává nejlepší reprodukovatelnost. Stejný pufr musí být použit v testu pro ředění kalibrátoru, kontrol i plazem.

KONTROLA KVALITY:

Použití kontrolních plazem umožní validaci kalibrační křivky i homogenosti reaktivity setu HEMOCLOT Protein C v sérii i mezi sériemi při použití stejné šarže reagensie. K dispozici jsou různé kontrolní plazmy:

BIOPHEN Normal Control Plasma (#223201)

BIOPHEN Abnormal Control Plasma (#223301)

Každá laboratoř by měla ověřit a validovat svoje vlastní přijatelné rozmezí pro každou novou šarži kontrolního materiálu v souladu s pravidly správné laboratorní praxe.

Kalibrační křivka je platná, pokud změřené koncentrace pro kontrolní materiál jsou v přijatelném rozmezí.

Pozn.: Začleňte alespoň jednu kontrolu kvality (na různé úrovni) do každé serie testů, aby tato byla validní. Pro každou novou šarži reagensie musí být zhotovena nová kalibrační křivka, stejně tak po důležité údržbě přístroje, nebo když naměřené hodnoty kontrol nejsou v očekávaných mezích. Každá laboratoř by měla stanovit svoje vlastní přijatelné rozmezí pro konkrétní přístroj.

LIMITY TESTU:

- Test může být proveden u pacientů léčených heparinem (do 1 IU/ml), nebo deriváty dikumarolu (aktivita PC je pak snížena). V přítomnosti abnormálně prodlouženého koagulačního času (CT) potvrďte diagnózu jinou metodou.
- Speciální obezřetnost je nutná u nemocných se známými vysokými hladinami FVIII:C nebo s LA. Výsledek musí být konfirmován jinou metodou.
- Aprotinin inhibuje aktivovaný Protein C. Změřená aktivita Proteinu C může být snížena u pacientů léčených Aprotininem⁷. Použijte jinou metodu pro testování Proteinu C (např. immunoassay).
- Pro lepší přesnost by měly být vzorky s hodnotou ≤ 10% testovány v ředění 1:5 a získaná hodnota pak dělena 2. Pro vzorky s hodnotou > 140% pak použijte ředění 1:20 a výsledek musí být násoben 2. Pokud je použito jiné ředění vzorku než 1:10, výsledná koncentrace musí být přepočtena na diluční faktor – tedy x2 pro 1:20 a x0,5 pro 1:5.
- Přítomnost aktivovaných faktorů může zkrátit koagulační čas (CT)
- Aby byl zajištěn optimální průběh testu, musí být striktně dodrženy testovací podmínky.
- Pro zajištění optimálního provedení testu provádějte kalibraci, měření vzorků a kontrol společně, bez přerušování.
- Pro stejnou šarži reagensie a stejné vzorky může koagulační čas (CT) kolísat v závislosti na použitém přístroji a na citlivosti metody detekce koagula.
- Výsledek testu může lehce kolísat dle užití reagensie a měřicí techniky. Provedení testu, stejně jako normální rozmezí a akceptabilní meze každé šarže kontrolních materiálů musí být ověřeny (a případně upraveny) dle zásad správné laboratorní praxe.

VÝSLEDEK:

Koncentrace Proteinu C v testovaném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky. Výsledek je vyjádřen v %.

Při použití bilogarithmického grafického papíru je test lineární v rozmezí 25 – 200%.

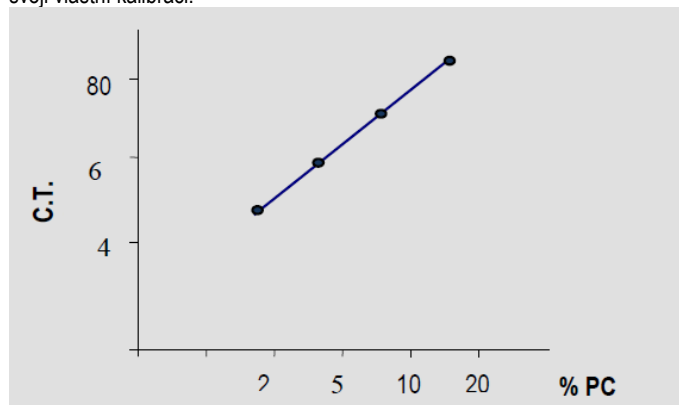
Pro manuální metodu – na bilogarithmický papír vynesete na osy koncentraci PC v % a odpovídající koagulační čas v sec. Na získané kalibrační křivce odčítejte přímo koncentraci PC odpovídající koagulačnímu času testované plazmy.

Kalibrační křivka je akceptabilní, pokud jsou koncentrace kontrolních materiálů v přijatelném rozmezí.

Při použití automatizované metody – koncentrace Proteinu C je přímo odečtena analyzátozem z kalibrační křivky.

PŘÍKLAD KALIBRACE:

Kalibrační křivka uvedená níže byla získána za použití přístroje KC-10 a je uvedena pouze jako příklad. Pro vlastní měření musí každý uživatel vytvořit svoji vlastní kalibraci.



VALIDACE KALIBRAČNÍ KŘIVKY:

Kalibrační křivka je akceptabilní, když jsou naměřené koncentrace Proteinu C kontrolních materiálů v akceptabilních mezích.

CHARAKTERISTIKA:

Detekční mez je určena jako výsledek měření koncentrace Proteinu C, která odpovídá koagulačnímu času Protein C deficitní plazmy plus 3 směrodatné odchylky (SD). Toto detekční rozhraní je kolem 10%.

Dynamické rozmezí je 25 – 200%.

Příklady reprodukovatelnosti v sérii a mezi sériemi získané pro vzorky s různou koncentrací Proteinu C za použití přístroje KC-10 jsou uvedeny v tabulce.

Vzorek	PC konc. %	V sérii CV%	N	Mezi sériemi CV%	N
Vzorek 1	87%	6.7	10	8.4	9
Vzorek 2	63%	7.3	10	5.7	9

OČEKÁVANÝ VÝSLEDEK:

Dle definice, 100% koncentrace Proteinu C odpovídá koncentraci v normální poolované lidské citrátové plazmě, získané od zdravých dárců, mužů a žen, ve věku od 18 do 55 let, neužívajících žádné léky. Koncentrace Proteinu C u dospělých je obvykle mezi 70 – 140%³.

Koncentrace Proteinu C u novorozenců je snížena.

KLINICKÉ VARIACE:

Koncentrace Proteinu C \leq 60% svědčí pro deficit a výsledek by měl být potvrzen dalším měřením nově odebraného vzorku pacienta⁶.

Aktivita Proteinu C je snížena během terapie deriváty dikumarolu, u onemocnění jater, u DIC, nebo v přítomnosti vrozeného nebo získaného deficitu.

BIOCHEMIE:

Protein C je na K vitamínu dependentní lidský protein koagulačního systému, syntetizovaný v játrech, o MH kolem 62 kDa. V plazmě je obvykle přítomen jako proenzym v koncentraci okolo 4-5 μ g/ml. Po aktivaci trombinem (a trombomodulinem), v přítomnosti kalciových iontů a fosfolipidů pak aktivovaný Protein C v přítomnosti Proteinu S inhibuje a reguluje koagulaci prostřednictvím specifického štěpení FVa a FVIIIa a tak snižuje jejich prokoagulační kofaktorovou aktivitu.

KLINICKÉ INFORMACE:

Deficit Proteinu C může být:

- Získaný: je pozorován u jaterních onemocnění, během terapie deriváty dikumarolu nebo při DIC
- Vrozený: je pak spojen s recidivující žilní trombózou.

Deficity Proteinu C mohou být kvalitativní (typ I) nebo kvantitativní (typ II).

REFERENCE:

1. Horellou M.H., Van Dreden P., Conard J., Samama M. : Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux. Feuil. Biol., 26,27-31, (1985).
2. Stenflo J. : Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis, 10,2, 109-121, (1984).
3. Mannucci P.M., Vigano S. : Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet, 2, 463-467, (1982).
4. Esmon C.T., Esmon N.L. : Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis, 10,2, 122-133, (1984).
5. Exner T. and Vaasjoki R. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistrodon Contortrix venom. Thromb. Haemostasis 59, 40-44 (1988).
6. Pabinger I. : Clinical relevance of Protein C. Blut 53, 63-75 (1986).
7. Wendel H.P et al. Aprotinin in therapeutic doses inhibits chromogenic peptide substrate assays for Protein C. thromb. Res 74, 543-548 (1994).