

## PROTEIN C Liquid



kit cromogenico per la misura dell'attività della Proteina C (PC) in campioni di plasma. Reagenti liquidi pronti all'uso.

Code MH221211

Packaging R1 3x3 ml + R2 3x3 ml

### UTILIZZO

Kit con substrato cromogenico per la determinazione automatica quantitativa della Proteina C nel plasma umano citratato sui sistemi di coagulazione ACL e sui sistemi aperti a 405nm. Metodo (LRT = Liquid reagent Technology).

### PRINCIPIO DEL METODO

La Proteina C è una proteina vitamina K dipendente, presente nel plasma sotto forma di zimogeno. L'attivazione della Proteina C *in vivo* è svolta dalla trombina, in presenza di trombomodulina. L'attivazione della Proteina C *in vitro* può essere svolta da una frazione proteica ottenuta dal veleno del serpente *Agkistrodon contortrix contortrix*. Le carenze di Proteina C sono generalmente associate a ricorrenti fenomeni di trombosi venosa ed embolia polmonare, specialmente in soggetti giovani. Carenze acquisite di Proteina C sono associate a malattie epatiche, terapia anticoagulante orale e a Coagulazione Intravascolare Disseminata.

Il kit Proteina C è basato su un substrato cromogenico sintetico.

I livelli di Proteina C nei campioni in esame sono misurati automaticamente sui sistemi per la coagulazione ACL in due fasi:

- Incubazione del plasma con l'attivatore della Proteina C.
- Determinazione della Proteina C attivata con un substrato cromogenico. La paranitroanilina rilasciata è monitorata cinematicamente a 405 nm ed è direttamente proporzionale al livello di Proteina C nel campione. il kit è performante anche su altri analizzatori automatici ed in manuale.

### REAGENTI

#### R1: Protein C activator

3 flaconi da 3 mL di una frazione liquida del veleno di Agkistrodon contortrix contortrix, 0.32 U/ml di Protac con aggiunta di tampone, albumina bovina serica e conservante.

#### R2: Chromogenic substrate

3 flaconi da 3 mL di substrato cromogenico liquido.

Ogni fiala contiene 1.6 mg/ml di SaPC-21

### NOTE:

per l'utilizzo sugli analizzatori ACL serie 7000, 9000, ELITE PRO, richiedere il kit a 3 reagenti: R1 + R2 + R3 Diluente 8 ml.

### MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

#### Reagenti:

- Acqua distillata, preferibilmente sterile.
- Acido Acetico (20%) o Acido Citrico (2%) (End point method).
- Soluzione Salina (0.9% NaCl).
- Meridian Healthcare Plasma Calibrator REF MH3700.
- Meridian Healthcare Normal Control Plasma REF MH3110, e Meridian Healthcare Abnormal Control Plasma REF MH3210.

#### Attrezzature:

- Spettrofotometro o analizzatore automatico con filtro a 405 nm per dosaggi cromogenici.
- Cronometro.
- Pipette calibrate.

### CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Il kit Proteina C (LRT) Meridian Healthcare va conservato a 2-8°C, nella confezione originale. I reagenti così conservati sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

### PREPARAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

#### R1: Reagent 1: Protac

(fiala chiara) - Liquido, pronto all'uso. Portare a temperatura ambiente (18-25°C), prima dell'uso. Omogeneizzare per inversione prima dell'uso.

Stabilità: dopo l'apertura, in confezione originale ed in assenza di contaminazioni o evaporazioni, il reagente è stabile:

5 settimane a 2-8°C.

7 giorni a temperatura ambiente (18-25°C).

#### R2: Reagent 2: Activated Protein C specific Chromogenic substrate (SaPC-21)

(fiala marrone) - Liquido, pronto all'uso. Portare a temperatura ambiente (18-25°C), prima dell'uso. Omogeneizzare per inversione prima dell'uso.

Stabilità: dopo l'apertura, in confezione originale ed in assenza di contaminazioni o evaporazioni, il reagente è stabile:

5 settimane a 2-8°C.

7 giorni a temperatura ambiente (18-25°C).

### RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Effettuare il prelievo venoso evitando emolisi e contaminazioni

- Miscelare immediatamente il sangue con l'anticoagulante in provetta: 9 volumi di sangue ed 1 volume di Soluzione di Citrato trisodico 3,2%)
- Centrifugare a 2000 giri/minuto per 15 minuti
- Prelevare il surnatante ed eseguire il test entro 2 ore dal prelievo se conservato a Temperatura ambiente, (18-25°C)

### PROCEDURA

La Proteina C (LRT) Meridian Healthcare può essere utilizzata con metodo cinetico in automatico ma anche in manuale con metodo "end point". Applicazioni per vari tipi di analizzatori sono disponibili su richiesta. Il test va eseguito a temperatura controllata di 37°C and lo sviluppo della colorazione va misurato a 405 nm.

### CALIBRAZIONE

La Calibrazione deve essere eseguita utilizzando un Plasma Calibrator (REF MH3700) o in alternativa può essere utilizzato un pool di plasma normali, composto da almeno 30 individui sani, maschi e femmine di età compresa tra i 18 e i 55 anni che non abbiano assunto farmaci. il valore assegnato è: Proteina C attività 100%, vedi tabella di seguito:

% Protein C	Plasma Calibrator (µl)	Saline (µl)
0	0	500
C:4	125	375
C:2	250	250
C	500	0

Per il punto 150%, utilizzare il calibratore 100% ("C") 3:4 diluito direttamente nel pozzetto di reazione (vedi sotto \*). Per ottenere prestazioni ottimali, la curva di taratura deve essere preparata almeno un'ora prima dell'esecuzione del test.

### PROTOCOLLO

#### Metodo Manuale:

Diluire i campioni, i controlli e i calibratori 1/2 con soluzione salina (0.9% Sodium Chloride).

In micropiastra o provetta in plastica pre-incubata a 37°C, dispensare:

REAGENTS	MICROPLATE	TEST TUBE
Calibrators, Controls or tested plasmas, diluted 1:2*	25 µL	50 µL
R1: Protac preincubated at 37°C	100 µL	200 µL
Mix and incubate for 5 min. at 37°C, then introduce:		
R2: SaPC-21 Substrate preincubated at 37°C	100 µL	200 µL
Mix and incubate for 5 min. at 37°C, exactly		
Stop the reaction by introducing:		
Acetic Acid (20%) or Citric Acid (2%)	100 µL	200 µL
Mix and measure the optical density at 405 nm against the sample blank		

\* Per il punto 150% PC, introdurre 18.75µl di plasma e 6.25µl di Soluzione Salina nella micropiastra o 37.5µl di plasma e 12.5µl di Soluzione Salina nella provetta.

Il colore giallo sviluppato è stabile per 2 ore.

Il bianco è ottenuto miscelando i reagenti in ordine inverso rispetto al test: Acetic Acid (20%) o Citric Acid (2%), SaPC-21 substrate, Protac, plasma diluito.

Misurare l'assorbanza a 405 nm. sottraendo il bianco.

### METODO AUTOMATICO

Per il dosaggio su analizzatori automatici fare riferimento ai manuali d'uso.

Per gli analizzatori ACL dalla serie 7000 in poi non sono necessarie modifiche alla metodica, utilizzare tal quale. Ordinare il kit a 3 reagenti.

### CONTROLLO QUALITA'

Utilizzare il Normal Control Plasma (MH3110) e l' Abnormal Control Plasma (MH3210), Meridian Healthcare. La curva di calibrazione è ritenuta accettabile quando i valori dei controlli rientrano nel range assegnato. Ogni laboratorio dovrà stabilire i propri valori medi e le deviazioni standard per ogni controllo ed individuare le corrette procedure di analisi.

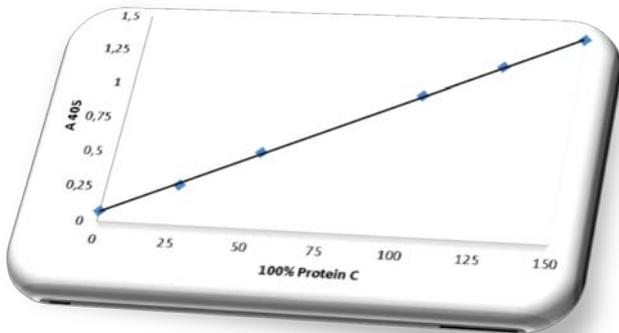
### RISULTATI

- Per il metodo end-point tracciare la curva su carta millimetrata: sull'asse X l'attività in % e sull'asse Y le assorbanze.
- Calcolare il valore "r<sup>2</sup>". La Calibrazione è ritenuta accettabile se: r<sup>2</sup> ≥ 0.98, e i valori dei controlli rientrano nel range assegnato. Utilizzando il metodo test-tube i valori di assorbanza sono i seguenti: 0 per lo 0% PC, e circa 0.90 (0.90 ± 0.15) per il 100% PC.

- I valori di Proteina C dei campioni sono direttamente proporzionali alla curva di calibrazione. I valori sono espressi in %.
- Sugli analizzatori automatici il valore viene calcolato direttamente.

#### ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE

La curva di calibrazione espressa di seguito è stata ottenuta in laboratorio e non deve essere utilizzata per calcolare i valori dei campioni. Utilizzare esclusivamente la curva ottenuta nel proprio laboratorio.



#### LIMITI DELLA PROCEDURA

- I risultati del test Proteina C ottenuti in laboratorio su ACL Classic (100-7000) e ACL Futura/ACL Advance non sono influenzati dalla presenza di livelli di eparina (eparina non frazionata e a basso peso molecolare) fino a 2 U/mL, emoglobina fino a 200 mg/dL, trigliceridi fino a 500 mg/dL e bilirubina fino a 5 mg/dL.
- I risultati del test Proteina C su Famiglia ACL TOP non sono influenzati dalla presenza di livelli di eparina (eparina non frazionata e a basso peso molecolare) fino a 2 U/mL, emoglobina fino a 500 mg/dL, trigliceridi fino a 890 mg/dL e bilirubina fino a 21 mg/dL.
- I campioni patologici che hanno subito una attivazione da contatto possono dare dei livelli falsamente elevati di Proteina C. Per esempio, 200-300 U/L di una sostanza con attività Callicreina-simile possono aumentare del 10-20% l'attività della Proteina C. L'aprotinina è un inibitore dell'attività della Proteina C, quindi in pazienti trattati con questo farmaco si può osservare una diminuzione dell'attività della Proteina C.

#### VALORI ATTESI

In individui sani i livelli di attività della proteina C sono approssimativamente nell'intervallo di 70 – 140%. Livelli di proteina C bassi si individuano nei bambini e nei neonati mentre livelli più alti della normalità in adulti in età adolescenziale.

A causa delle numerose variabili che possono influenzare i risultati, ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio intervallo di riferimento.

#### VARIAZIONI CLINICHE

Una concentrazione di Proteina C  $\leq 60\%$  indica la presenza di carenza che deve essere confermata con altri esami o ripetendo la misura del campione. L'attività della Proteina C viene ridotta durante la terapia anti vitamina K (AVK), nelle malattie epatiche o in presenza di una deficienza congenita o acquisita.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Horellou M.H., Van Dreden P., Conanrd 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. Manucci P.M. , Vignano 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. Axner T. and Vaasjoki R. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistridom Concortrix 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).

#### SIMBOLOGIA

LEGENDA DEI SIMBOLI					
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso		Test per kit		Produttore
	Unicamente per diagnosi in vitro		Scadenza		Monouso
	Conservare ad una temperatura compresa tra 2° e 30°C		Numero di lotto		Codice prodotto

#### PRODUTTORE

**Meridian Healthcare srl**  
 Via Caronda, 446 SC/A - 95129 Catania - Italy  
 Tel. +39 095 725 68 69 - Fax: +39 095 725 44 54  
 info@meridianhealthcare.it  
 www.meridianhealthcare.it

