



Chrom Protein C

Para a determinação quantitativa de proteína C por método cromogênico

SIGNIFICADO CLÍNICO

A proteína C é uma proteína vitamina K dependente que, juntamente com o seu cofactor proteína S, actua como um inibidor da coagulação, através da regulação dos factores V e VIII activados. É uma serina protease que é activada a proteína C activada por acção do complexo trombina-trombomodulina na superfície das células endoteliais. A deficiência de proteína C tanto hereditária e adquirida pode levar a eventos trombóticos com diferentes graus de severidade. A manifestação mais comum da doença é a trombose venosa profunda dos membros inferiores, complicadas ou não com embolia pulmonar.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A proteína C no plasma é ativada pelo veneno da serpente Agkistrodon contortrix. A quantidade de proteína C ativada é determinada através da velocidade da hidrólise de um substrato cromogênico específica da proteína C (Pad-Pro-Arg-pNA). A liberação de p-nitroanilina é medida a 405 nm e é proporcional ao nível de proteína C.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: substrato cromogênico da proteína C (Pad-Pro-Arg-pNA), 6 µmol. Liofilizado.

B. Reagente B: ativador de proteína C contendo 0,8 Unidades/frasco de extrato de veneno de serpente. Liofilizado

C. Reagente C: tampão Tris 6,1 g/L, NaCl 12,7 g/L e albumina 0,1%, pH 8,4.

Calibrador 1: padrão de proteína C contendo (vide a concentração no rótulo). Liofilizado.

Calibrador 2: padrão de proteína C (vide a concentração no rótulo). Liofilizado.

Calibrador 3: padrão de proteína C (vide a concentração no rótulo). Liofilizado.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

- Água destilada

- Coagulation Control N e Coagulation Control P de Wiener lab.

INSTRUÇÕES DE USO

Reagente C: pronto para uso.

Reagentes A, B e Calibradores: reconstituir com o volume de água destilada indicado no rótulo. Tampar e deixar repousar 30 minutos. Misturar suavemente sem agitar até obter uma solução homogênea.

PRECAUÇÕES

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

Os calibradores foram preparados partindo de material não reativo para HBsAg, anticorpos anti-HCV e anticorpos anti-HIV 1+2. No entanto, os calibradores e todas as amostras de sangue devem ser manipuladas como material potencialmente contaminado.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os Reagentes Fornecidos são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem.

Uma vez reconstituídos são estáveis:

Reagente	37°C	TA (< 25°C)	2-10°C	-20°C
Reagente A	8 horas	1 semana	1 mês	6 meses
Reagente B	-	3 dias	1 semana	6 meses
Calibrador 1-3	-	8 horas	2 dias	6 meses

AMOSTRA

Plasma citratado

a) Coleta: obter sangue cuidadosamente (evitando estase ou trauma), e colocar num tubo com anticoagulante na proporção 9 + 1 exata (exemplo: 4,5 ml de sangue + 0,5 ml de anticoagulante). Misturar suavemente. Centrifugar durante 15 minutos e separar o plasma antes de 30 minutos.

b) Aditivos: para obter o plasma deve-se utilizar citrato de sódio 130 mmol/l (3,8%) ou 109 mmol/l (3,2%).

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: o plasma deve ser conservado a temperatura ambiente até o momento de realizar a prova. Este período não deve prolongar-se mais que 4 horas. Caso não seja possível realizar a prova na hora, o plasma pode ser conservado por até 6 meses a -20°C.

INTERFERÊNCIAS

Não deve ser utilizado EDTA ou heparina para obter plasma. Não é observada interferência por heparina até 2 UI/ml. Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Tubos de hemólise.

- Pipetas e micropipetas para medir os volumes indicados.
- Banho-maria a 37°C.
- Cronômetro.
- Espectrofotômetro ou analisador de coagulação.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Longitude de onda: 405 nm
- Temperatura de reação: 37°C
- Tempo de reação: 8 minutos
- Volume final: 1,15 mL para técnica de ponto final e 0,75 mL para técnica cinética.

PROCEDIMENTO

Técnica cinética

Tampão Substrato 1:6: diluir o Reagente A 1:6 com Reagente C (1 parte de Reagente A + 5 partes de Reagente C). Pré-aquecer a 37°C. Em um tubo de hemólise colocar D (Desconhecido) ou C (Calibrador):

	D ou C
Amostra	50 uL
Reagente B	100 uL

Misturar e incubar exatamente 5 minutos a 37°C. Depois acrescentar:

Tampão Substrato 1:6	0,60 mL
-----------------------------	---------

Misturar e ler a absorbância a 405 nm durante 3 minutos ($\Delta A/\text{min}$) registrando as absorbâncias cada minuto. Calcular a atividade de proteína C (%) utilizando a mudança de absorbância por minuto e interpolando na curva de calibração.

CURVA DE CALIBRAÇÃO

Traçar uma gráfica da absorbância obtida para cada calibrador ($\Delta A/\text{min}$ ou A) versus a % de proteína C de cada calibrador indicado na etiqueta.

VALORES DE REFERÊNCIA

70-130 %

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência de acordo com as técnicas e equipamento utilizado.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Coagulation Control N e Coagulation Control P da Wiener lab.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Estabilidade e instruções de armazenamento em AMOSTRA e INTERFERÊNCIAS.

Uma nova calibração é necessária para cada lote de reagentes e para cada instrumento utilizado.

Valores de heparina em plasma maiores a 2 UI heparina/ml alteram os resultados da prova.

DESEMPENHO

a) **Reprodutibilidade:** a precisão foi determinada com

diferentes amostras (em série e dia a dia). Os seguintes resultados foram obtidos:

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
106,2%	2,23%	2,10%
22,2%	1,32%	5,95%

Precisão inter-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
106,2%	2,87%	2,70%
22,2%	1,31%	5,90%

b) **Faixa de medição:** 10 - 170%

PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

Vide as adaptações específicas para cada tipo de analisador.

APRESENTAÇÃO

- 3 x 1 ml Reagente A
 - 3 x 1 ml Reagente B
 - 1 x 60 ml Reagente C
 - 1 x 1 ml Calibrador 1
 - 1 x 1 ml Calibrador 2
 - 1 x 1 ml Calibrador 3
- (Cód. 1705013)

REFERÊNCIAS

- Walker FJ (1981) Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation, J BiolChem, 256: 11128-31.
- Taylor FB, Lockhart MS (1985) A new function for activated protein C: activated protein C prevents inhibition of plasminogen activators by releasate from mononuclear leukocytes--platelet suspensions stimulated by phorbol diester, Thromb Res,37(1): 155-64.
- 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, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"

	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Uso médico-diagnóstico "in vitro"
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data de validade
	Limite de temperatura (conservar a)
	Não congelar
	Risco biológico
	Volume após a reconstituição
	Conteúdo
	Número de lote
	Elaborado por:
	Nocivo
	Corrosivo / Caústico
	Irritante
	Consultar as instruções de uso
	Calibrador
	Controle
	Controle Positivo
	Controle Negativo
	Número de catálogo