

**HEMOCLOT™ Protein C**

Ref CK031K, R1, R2: 3 x 1 mL

Ref CK032K, R1, R2: 3 x 2 mL

**Dosage Fonctionnel de la Protéine C (PC)
plasmatique par méthode coagulante.**

A usage diagnostic in vitro exclusivement

Dernière révision : 12-2021

UTILISATION :

Le coffret HEMOCLOT™ Protein C est une méthode coagulante proposée pour la détermination quantitative de l'activité de la Protéine C (PC) dans un plasma humain citraté, in vitro, par méthode manuelle ou automatisée.

INTERET CLINIQUE :

La Protéine C (PC) est une protéine plasmatique, vitamine K dépendante, qui inhibe et régule la coagulation, en clivant les Facteurs Va et VIIIa, ce qui supprime leur activité coagulante (1,2).

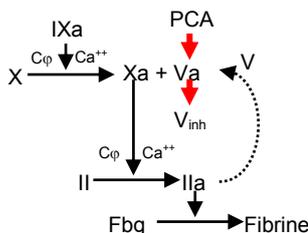
Dosage de la Protéine C plasmatique afin de diagnostiquer les déficits constitutionnels ou acquis en Protéine C de la coagulation (3, 4, 5, 6).

Le déficit en Protéine C (congénital ou acquis), constitue un facteur de risque de thromboses veineuses (3).

PRINCIPE :

Le coffret HEMOCLOT™ Protein C est une méthode coagulante, utilisant le Temps de Céphaline Activée (TCA), en présence d'activateur de Protéine C (Protac®, extrait du venin de serpent Agkistrodon Contortrix), de phospholipides, d'activateur de phase contact et de calcium.

Le plasma du patient à tester dilué est mélangé dans un premier temps au plasma déficient en PC (R1). Dans un deuxième temps, le réactif activateur (R2), en concentration constante et optimisée, est ajouté. La coagulation est déclenchée par ajout de calcium (Ca²⁺). Le temps de coagulation est mesuré. La Protéine C étant le facteur limitant, il en résulte une relation linéaire directe, en coordonnées bilogarithmiques, entre la concentration en Protéine C et le temps de coagulation correspondant.

**REACTIFS :****R1 : Réactif 1: Plasma déficient en Protéine C**

Plasma déficient en Protéine C, optimisé pour le test, lyophilisé en présence d'un agent neutralisant l'héparine.

R2 : Réactif 2 : Réactif activateur

Protac® hautement purifié (activateur spécifique de la Protéine C, extrait de venin de serpent Agkistrodon Contortrix), lyophilisé, contenant des phospholipides et un activateur de la phase contact, en concentration optimisée pour le test.

Ref CK031K → R1, R2 : 3 flacons de 1 mL.

Ref CK032K → R1, R2 : 3 flacons de 2 mL.

Nota :

- Le plasma humain utilisé pour la préparation des réactifs est certifié exempt pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.
- Toute précaution doit être prise pour éviter tout risque d'ingestion et d'introduction accidentelles des réactifs dans l'organisme. En cas de contact avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de contact avec une plaie, contacter un service médical compétent en précisant la nature et l'origine biologique du produit.
- A usage diagnostic in vitro exclusivement.
- Le taux de Protac® peut varier de lot à lot et est ajusté exactement pour chaque lot de réactif.

REACTIFS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS :**Réactifs :**

- Eau distillée.
- Chlorure de Calcium 0.025M (ex : réf AR001B/AR001K/AR001L).
- Tampon Imidazole (ex : réf AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N)
- Plasmas de calibration titrés en Protéine C (ex : BIOPHEN™ Plasma Calibrator réf 222101).
- Plasmas de contrôle de qualité normaux ou anormaux titrés en Protéine C (ex : BIOPHEN™ Normal Control Plasma réf 223201 et BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma réf 223301).

Matériels :

- Bain marie électromagnétique ou automates pour dosages coagulants.
- Chronomètre.
- Pipettes calibrées.

CONSERVATION :

Les réactifs non encore utilisés doivent être conservés à 2-8 °C, dans leur coffret d'origine. Ils sont alors stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

Remarque : Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :**PREPARATION :****Réactif 1 : R1 : Plasma déficient en Protéine C :**

Reconstituer chaque flacon par exactement :

Ref CK031K → 1 mL d'eau distillée

Ref CK032K → 2 mL d'eau distillée

bien homogénéiser pour une dissolution complète du contenu (vortex). Laisser stabiliser 15 min. à température ambiante (18-25°C), en agitant de temps en temps. Bien homogénéiser avant chaque utilisation.

Réactif 2 : R2 : Réactif activateur

Reconstituer chaque flacon par exactement :

Ref CK031K → 1 mL d'eau distillée

Ref CK032K → 2 mL d'eau distillée

bien homogénéiser jusqu'à dissolution complète du contenu (vortex). Laisser stabiliser 15 min. à température ambiante (18-25°C), en agitant de temps en temps. Bien homogénéiser avant chaque utilisation.

STABILITE :

La stabilité des réactifs R1 et R2 reconstitués, conservés dans leur flacon d'origine, est de :

24 heures

2-8°C

8 heures

température ambiante (18-25°C)

1 mois

congelé à -20°C ou moins

Précautions :

- Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage avec leurs bouchons respectifs.
- Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination.

Nota :

- Les flacons R1 et R2 sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.
- Suivant la méthode automatique utilisée, les réactifs peuvent être reconstitués avec des volumes différents de ceux indiqués. Dans tous les cas, les rapports respectifs de chaque réactif, R1 et R2, préconisés dans la méthode manuelle (concentration finale dans le milieu réactionnel et volume total), doivent être respectés.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffrets. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage. Les réactifs R1 et R2 sont optimisés pour chaque lot de coffrets.

PREPARATION DES PLASMAS :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109M (1 vol.), par ponction veineuse franche, en évitant toute activation. Rejeter les premières gouttes de sang.

- Centrifuger le prélèvement, dans les 2 heures suivantes, pendant 15 minutes à 2500g. Le plasma citraté doit être décanté dans un tube plastique.
- Conservation du plasma :
 - 4 heures à température ambiante (18-25°C).
 - 1 mois congelé à -20°C ou moins.

Se référer aux recommandations du GEHT et du NCCLS/CLSI pour de plus amples informations sur la collecte, le transport et la conservation des échantillons.

PROCEDURE :

Le coffret HEMOCLOT™ Protein C est utilisé en méthode coagulante manuelle ou automatisée. Les adaptations sur automates sont disponibles sur demande. Le test est réalisé à 37°C, et le temps de coagulation, après addition du réactif déclenchant (calcium), est mesuré.

ETALONNAGE :

Préparer 2 ml de pool de plasma humain normal citraté dilué au 1:5 en tampon de dilution imidazole (ex : réf AR021). Par définition, la dilution au 1:10 de pool de plasma normal citraté correspond à la concentration de 100% de Protéine C, et la

dilution 1:5 à 200% de protéine C. Utiliser cette dilution au 1:5 pour préparer la gamme d'étalonnage suivante :

| PC | 25% | 50% | 100% | 200% |
|--------------------|----------|----------|----------|------|
| Dilution | 1:40 | 1:20 | 1:10 | 1:5 |
| Pool de plasma 1:5 | 0,125 mL | 0,250 mL | 0,500 mL | 1 mL |
| Tampon Imidazole | 0,875 mL | 0,750 mL | 0,500 mL | 0 mL |

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée avec le **BIOPHEN™ Plasma Calibrator (réf. 222101)** en utilisant le taux indiqué « C » pour la Protéine C du lot utilisé. La dilution au 1:10 correspondra alors à la concentration de C% de Protéine C, indiquée pour chaque lot. Utiliser la dilution au 1:5 pour préparer la gamme d'étalonnage comme ci-dessus à partir de « 2C% ».

PLASMA A TESTER :

Le plasma (et contrôles) à tester est dilué au 1/10 en tampon imidazole.

Précaution : dans la mesure du possible, pour obtenir les performances optimales du dosage, tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) seront réalisés extemporanément et simultanément.

METHODES :

| Réalisation du test | Méthode Manuelle |
|--|------------------|
| Calibrateur ; ou contrôle ou plasma dilué 1/10 | 100µl |
| Réactif R1 | 100µl |
| Mélanger et incubé 2 minutes à 37°C | |
| Réactif R2 | 100µl |
| Mélanger et incubé 5 minutes à 37°C | |
| CaCl ₂ 0.025M (pré incubé à 37°C, et agité) | 100µl |
| Noter le Temps de Coagulation | TC |

Pour les méthodes automatiques, les adaptations sur automates peuvent être fournies sur demande.

Note : Le tampon isotonique Imidazole (ref AR021) est recommandé pour diluer les calibrateurs, contrôles et plasmas testés, pour le dosage de la Protéine C avec le kit HEMOCLOT™ Protein C, afin d'obtenir une bonne reproductibilité. Le même tampon doit être utilisé pour l'ensemble du test, pour diluer les calibrateurs, contrôles et plasmas testés.

CONTRÔLE DE QUALITE :

L'utilisation de plasmas de contrôle de qualité Normal ou Anormal permet de vérifier la bonne pratique du dosage et la réactivité homogène de série à série. Ces plasmas contrôles sont disponibles sous les références :

BIOPHEN™ Normal Control Plasma: (#223201).

BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma: (#223301).

Chaque laboratoire devra vérifier et valider ses propres valeurs cibles et intervalles d'acceptation, selon l'instrument et dans les conditions de travail exactes du laboratoire, pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé.

La courbe d'étalonnage est valide lorsque les concentrations obtenues pour les contrôles entrent dans la zone d'acceptation.

Nota: Au moins un contrôle de qualité (à différents niveaux) doit être inclus dans chaque série de dosages, afin de la valider. Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être effectuée à chaque changement de lot du réactif, après toute maintenance importante de l'analyseur, et lorsque les résultats des Contrôles de Qualité ne sont pas dans les valeurs annoncées pour la méthode. Chaque laboratoire peut établir son propre domaine d'acceptation, en fonction des protocoles et des instruments utilisés.

LIMITES DU DOSAGE :

- Le test peut être réalisé chez les patients traités par l'héparine (jusqu'à 1 UI/ml) ou sous AVK (le taux est alors diminué). Le diagnostic doit être vérifié par une autre méthode si les temps sont anormalement allongés.
- Une attention particulière doit être portée aux patients connus avec un taux de FVIII :C élevé ou un LA, et le résultat confirmé par une autre méthode.
- L'aprotinine inhibe la Protéine C activée. L'activité "apparente" de la Protéine C pourrait être diminuée chez les patients traités par l'aprotinine (7). Il est alors recommandé d'utiliser une méthode différente (ex : immunologique) pour mesurer la Protéine C.
- Pour une meilleure précision des résultats, pour un échantillon mesuré ≤10%, utiliser la dilution 1:5 et diviser le taux ainsi obtenu par 2 ; pour un échantillon mesuré >140% utiliser la dilution 1:20 et multiplier le taux ainsi obtenu par 2. Si une dilution différente du 1 :10 est utilisée, la concentration doit être corrigée par le facteur de dilution (ex : x2 pour 1 :20, ou x0.5 pour 1 :5).
- La présence de facteurs activés peut réduire les temps de coagulation.
- Pour obtenir les performances optimales du coffret, suivre scrupuleusement les instructions techniques.
- Pour obtenir les performances optimales du dosage, réaliser tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) extemporanément et successivement sans interruption.
- Pour un même lot de réactifs, et un même plasma, le temps de coagulation TC peut varier selon l'instrument utilisé, et selon la sensibilité du réglage de la détection de la formation du caillot.
- Les performances du test peuvent varier légèrement selon les réactifs et l'automate utilisés. Ces performances, ainsi que la zone normale et les valeurs cibles et intervalles de confiance, pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé, doivent, par conséquent, être confirmées (et ajustées si nécessaire), dans les conditions de travail exactes du laboratoire.

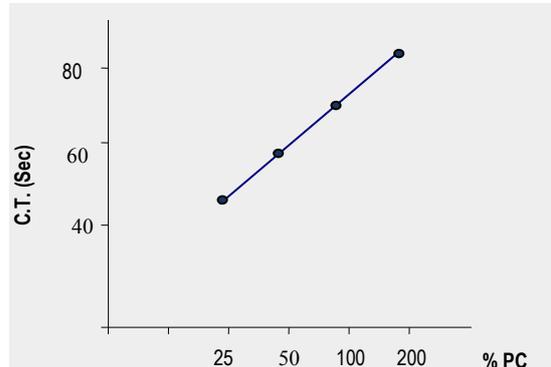
RESULTATS :

La concentration de Protéine C dans l'échantillon à doser est déduite directement sur la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en %. En coordonnées bilogarithmiques, le test est linéaire de 25-200 % de Protéine C.

- Pour la méthode manuelle, tracer sur papier bilogarithmique la droite étalon, en portant en ordonnées le temps de coagulation TC (en sec) et en abscisses le taux de Protéine C en %. La courbe d'étalonnage est valide lorsque les concentrations obtenues pour les contrôles entrent dans la zone d'acceptation.
- En technique automatique, les taux sont directement calculés par l'instrument en fonction des valeurs de l'étalonnage.

EXEMPLE DE COURBE DE CALIBRATION :

La courbe d'étalonnage ci-dessous, obtenue au KC10, n'est montrée qu'à titre d'exemple. Seule la courbe d'étalonnage effectivement réalisée doit être utilisée pour le calcul des taux des échantillons testés lors de la série de dosages.



PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES :

- La limite de détection est déterminée en mesurant sur la courbe d'étalonnage le « taux apparent » de Protéine C, qui correspond au temps de coagulation moyen obtenu pour un échantillon sans protéine C plus 3 écart-types. Cette limite de détection est d'environ 10%.
- Zone de mesure : 25-200%
- Exemple de reproductibilité obtenue au KC10 :

| Plasmas | Concentration en PC % | CV Intra-Essai % | N | CV Inter-Essais % | N |
|---------|-----------------------|------------------|----|-------------------|---|
| 1 | 87% | 6.7 | 10 | 8.4 | 9 |
| 2 | 63% | 7.3 | 10 | 5.7 | 9 |

Les CV intra et inter-essais obtenus sur les TC sont <5%.

VALEURS ATTENDUES :

Par définition, le taux de 100% correspond à la concentration de Protéine C dans un pool de plasmas humains normaux, hommes ou femmes, âgés de 18 à 55 ans, en dehors de toute médication. Le taux plasmatique de Protéine C chez l'adulte sain est généralement compris entre 70 et 140%. Le taux de Protéine C est bas à la naissance, par immaturité hépatique. Il est ensuite indépendant de l'âge et du sexe.

VARIATIONS CLINIQUES :

Un taux de Protéine C ≤ 60% indique la présence d'un déficit qui doit être confirmé par un autre dosage et/ou un autre prélèvement (6).

Le taux de Protéine C est diminué dans les traitements aux AVK, dans les atteintes hépatiques, les CIVD, et en présence de déficits congénitaux ou acquis.

BIOCHIMIE :

La Protéine C (PC) est une protéine humaine de la coagulation vitamine K dépendante, synthétisée dans le foie, d'environ 62 kDa. La PC est généralement présente dans les plasmas comme proenzyme, à une concentration d'environ 4-5 µg/ml. Après activation par la thrombine (et la thrombomoduline), en présence de calcium et phospholipides, la Protéine C activée, en présence de protéine S, inhibe et régule la coagulation, en clivant les Facteurs Va et VIIIa, ce qui supprime leur activité coagulante.

INFORMATIONS CLINIQUES :

Les déficits en Protéine C peuvent être :

- Acquis : ils s'observent lors des atteintes hépatiques, des traitements AVK ou lors de CIVD.
- Congénitaux : ils se traduisent alors majoritairement par des thromboses veineuses récidivantes ;

Les déficits en Protéine C peuvent être quantitatifs (type I) ou qualitatifs (type II).

REFERENCES :

- 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).
- Stenflo J. : Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis, 10,2, 109-121, (1984).
- Mannucci P.M., Viganò S. : Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet, 2, 463-467, (1982).
- Esmon C.T., Esmon N.L. : Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis, 10,2, 122-133, (1984).
- Exner T. and Vaasjoki R. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistrodon Contortrix venom. Thromb. Haemostasis 59, 40-44 (1988).
- Pabinger I. : Clinical relevance of Protein C. Blut 53, 63-75 (1986).
- Wendel H.P. et al. Aprotinin in therapeutic doses inhibits chromogenic peptide substrate assays for Protein C. thromb. Res 74, 543-548 (1994).