

بروشور Heamostica Protein C kit

شماره بروشور SA11 REF
لطفا قبل از انجام آزمایش، اطلاعات موجود در برگه راهنمای انجام آزمایش را به دقت بخوانید

موارد استفاده

آزمایش پروتئین C یک آزمایش اولیه برای ارزیابی بیماران مشکوک به کمبود مادرزادی پروتئین C، از جمله افرادی که سابقه شخصی یا خانوادگی عوارض ترومبوتیک دارند. این کیت برای اندازه گیری کمی سطح پروتئین C عملکردی در پلاسما مورد استفاده قرار می گیرد.

مقدمه

پروتئین C متعلق به گروه پروتئین های وابسته به ویتامین K است (۱). این پروتئین در کبد سنتز می شود و دارای وزن مولکولی تقریباً ۶۲۰۰۰ دالتون است و از دو زنجیره پلی پپتیدی تشکیل شده است (۲، ۳). پروتئین C مانند سایر فاکتورهای انعقادی، به صورت یک پرو آنزیم در پلاسما وجود دارد؛ تبدیل آن به یک آنزیم فعال نیاز به حضور ترومبین، کلسیم و فسفولیپیدها دارد. پروتئین C در حالت فعال، با خنثی کردن فعالیت انعقادی فاکتورهای Va و VIIIa در حضور پروتئین S، فرایند انعقاد را تنظیم می کند.

کمبود پروتئین C می تواند به صورت اکتسابی یا مادرزادی رخ دهد. کمبود پروتئین C اکتسابی در شرایطی مانند اختلالات کبدی، درمان با آنتاگونیست های ویتامین K و انعقاد داخل عروقی منتشر (DIC) مشاهده می شود (۴). از سوی دیگر، کمبود مادرزادی پروتئین C که با ترومبوزهای وریدی مکرر همراه است، دارای ۲ نوع مختلف می باشد: نوع I و نوع II. نوع I با کاهش همزمان سطوح عملکردی و آنتی ژنی پروتئین C همراه است (۵). نوع II، که نادرتر است، با کاهش سطح عملکردی پروتئین C، اما سطح نرمال آنتی ژنی پروتئین C مشخص می شود.

اصول آزمایش

در این آزمایش، پروتئین C توسط فعال کننده اختصاصی که از سم Agkistrodon C مشتق شده است فعال می شود و سپس مقدار آنزیم با میزان فعالیت آمیدازی آن بر روی سوبسترای کروموزنیک مصنوعی سنجیده می شود. عمل پروتئین C فعال موجب رهاسازی پارانیتروانیلین می شود. پارانیتروانیلین یک محصول رنگی است و حداکثر جذب آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر می باشد. شدت رنگ تولید شده به طور مستقیم با سطح پروتئین C که در پلاسما مورد آزمایش وجود دارد، متناسب است.

محتویات کیت

معرف شماره یک : عصاره خالص شده سم Agkistrodon contortrix که قادر به فعال کردن پروتئین C به صورت اختصاصی می باشد که به صورت لیوفیلیزه ارائه می شود.

محلول شماره دو : سوبسترای کروموزنیک پروتئین C فعال شده که به صورت لیوفیلیزه ارائه می شود.

محلول شماره ۳ : حلال فعال کننده ی پروتئین C که همه ی مایع موجود در این ویال به ویال معرف شماره یک اضافه می شود.

احتیاط

- لطفا تمام اطلاعات بروشور را قبل از انجام تست بخوانید.
- این ریید تست فقط برای استفاده in vitro می باشد. بعد از رویت تاریخ مصرف استفاده کنید.
- در محل انجام آزمایش از خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن خودداری نمایید.
- کیت در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود. این معرف ها فقط باید توسط پرسنل آزمایشگاه پزشکی استفاده شوند. قبل از استفاده، از روش کار دستگاه کاملاً آگاهی داشته باشید.
- در برخورد با این معرف ها و نمونه های بیمار دقت زیادی به خرج دهید. دفع مواد زائد باید مطابق مقررات محلی انجام شود

شرایط جمع آوری و پایداری نمونه

- خونگیری برای تست های انعقادی باید در لوله های حاوی ضد انعقاد سیرتات سدیم ۳.۲٪ انجام شود. نسبت خون به ضد انعقاد ۹ به ۱ باید باشد.

توجه: از پلاسمای دارای ضد انعقاد EDTA، هپارین، و اگزالات استفاده نشود.

- پلاسمای مورد استفاده پلاسمای فقیر از پلاکت (PPP) (سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰g تا ۲۵۰۰g) است. تعداد پلاکت ها باید کمتر از ۱۰۰۰۰ باشد.
- پلاسما به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق، ۲۴ ساعت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد و دو هفته در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قابل نگه داری است.

نگه داری و آماده سازی محلول ها

کل محلول موجود در ویال شماره ۳ را به ویال شماره یک اضافه کنید. به ویال شماره دو ۳ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید. معرف های آب شده را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. سپس به آرامی به هم بزنید تا یکنواخت شود. معرف ها تا پایان تاریخ انقضای خود در دمای ۲ تا ۸ درجه پایداری هستند.

کیت پس از آب شدن در صورت نگه داری در دمای ۲ تا ۸ درجه تا ۱۲ روز قابل استفاده است. پس از خروج معرف آب شده از یخچال، معرف را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داری کنید و سپس تست ها را انجام دهید.

لوازم مورد نیاز که در کیت موجود نیست

محلول اورن کلر (Owren-Koller)، دستگاه کواگولومتر، کالیبراتور، کنترل های نرمال و پاتوزن

روش انجام آزمایش

این تست توسط دستگاه کواگولومتر قابل انجام می باشد جهت دسترسی به جزئیات کامل در مورد چگونگی انجام تست، به "روش های عملیاتی استاندارد" دستگاه کواگولومتر مراجعه کنید. سنجش پروتئین C پلاسماهای مورد آزمایش به محض بارگیری نمونه ها به طور خودکار توسط آنالایزر در طول موج ۴۰۵ نانومتر انجام می شود. اگر هر یک از نتایج خارج از محدوده سنجش قرار گیرد، دستگاه به طور خودکار نمونه مورد نظر را با رقت مناسب مجدداً آزمایش می کند. دستگاه به این منظور، پلاسمای رفرنس (استاندارد) و فعال کننده ی پروتئین C را میکس می کند و پس از ۵ دقیقه سوبسترا را اضافه می کند و پس از ۱۵ ثانیه میزان جذب نوری را در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری می کند. سپس در دو نقطه ی ۶۰ ثانیه و ۱۲۰ ثانیه، میزان جذب را اندازه گیری می کند مقدار ΔA/min (جذب در زمان ۱۲۰ ثانیه منهای جذب در دمای ۶۰ ثانیه) و فاکتور F_L را بر اساس فرمول زیر محاسبه می کند.

$$F_L = \frac{\text{Assigned value (\% of Norm) reference plasma}}{\Delta A/\text{min reference plasma}}$$

سپس برای نمونه های بیماران نیز Δ min را محاسبه می کند. مقدار پروتئین C هر نمونه برابر است با:

$$\text{Protein C sample (\% of Norm)} = F_L \times \Delta A/\text{min sample}$$

کنترل کیفی

در هر ران کاری از نمونه ی کنترل نرمال و کنترل بالا استفاده کنید تا از عملکرد صحیح کیت مطمئن شوید.

در صورتی که نتایج هر یک از کنترل ها در محدوده ی مورد نظر نبود، تمام اجزای آزمایش را بررسی شود و مجدد تست انجام شود اگر همچنان نتایج خارج از محدوده ی مورد نظر بود از یک معرف دیگر استفاده کنید

نتایج و مقادیر مورد انتظار

نتیجه ی تست به صورت سطح پروتئین C (درصد) گزارش می شود و نتایج باید با توجه به وضعیت بالینی بیمار تفسیر شود.

نتیجه ی تست ۱۲۰ فرد نرمال با کیت Heamostica Protein C نشان دهنده ی محدوده ی مرجع ۷۰ تا ۱۳۰ درصد بود.

مقادیر مورد انتظار برای افراد سالم بسته به تکنیک مورد استفاده از آزمایشگاهی به آزمایشگاه دیگر متفاوت است. بنابراین، هر آزمایشگاه باید مقادیر مورد انتظار خود را برای جمعیت بیمار خاص خود بر اساس تکنیک و ابزار مورد استفاده تعیین کند.

محدودیت ها و تداخلات

آنالیت های زیر تا مقادیر مشخص شده تداخلی در تست انجام شده با Heamostica Protein C ندارند:

- بیلی روبین تا سطح ۲۱ mg/dl
- هموگلوبین آزاد پلاسما تا سطح ۲۱۰ mg/dl

- کلسترول تا غلظت ۳۵۰ mg/dl
- تری گلیسرید تا سطح ۴۱۰ mg/dl

ایمنی و دفع پسماند

این کیت صرفاً برای استفاده توسط پرسنل واجد شرایط آزمایشگاه طراحی شده است. در هنگام کار با معرفهای آزمایشگاهی رعایت کردن اقدامات احتیاط مورد نیاز ضروری میباشد. در صورت شکسته بودن ویال، کیت قابل استفاده نیست. از آلوده کردن معرف ها خودداری کنید. این معرف ها غیر قابل خوردن و نوشیدن هستند. در مورد چگونگی دور ریختن مواد از قوانین تدوین شده عمل شود.

ویژگی های عملکردی

تکرارپذیری

نمونه های کنترل تجاری نرمال، کنترل تجاری غیر نرمال، نمونه ی بالینی نرمال و نمونه بالینی غیر نرمال برای مطالعات تکرارپذیری intra-assay (۸۰ تکرار) و inter-assay (۸۰ تکرار) استفاده شد. نتایج به دست آمده در زیر نشان داده شده است:

Intra assay				
نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد	نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد	نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد	نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد	نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد
Mean	102.7125	39.3625	109.8	33.95
SD	1.43191082	1.30475033	1.85144487	1.31699236
CV%	1.38881423	3.31470391	1.68619751	4.46831329
Inter assay				
نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد	نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد	نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد	نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد	نتایج آزمایشگاه با روش استاندارد
Mean	104.392405	37.35	106.475	34.9125
SD	2.44119413	1.70702198	3.46401026	1.70028851
CV%	2.33847867	4.57033998	3.25335549	4.87034252

همبستگی با کیت مرجع

در ارزیابی همبستگی نتایج بین کیت حاضر با کیت شرکت Protein C شرکت stago بر روی ۱۰۰ فرد نرمال و اینتروال نتایج زیر به دست آمد:

Protein C Correlation	
Heamostica Protein C vs Stago Protein C N= 100	$y = 0.9846x - 0.0334$ $R^2 = 0.9951$

علائم به کار رفته در لیبل

مورد استفاده در آزمایشگاه تشخیص پزشکی	IVD
به دفترچه ی راهنما مراجعه کنید.	
در دمای دو تا ۸ درجه نگه داری شود.	
معرف حاوی سدیم آزاید است.	CONT NaN ₃
آدرس تولید کننده	
تاریخ انقضا	
لات نامبر	LOT
دور از رطوبت نگه داری شود.	
تاریخ تولید	
تعداد تست قابل انجام توسط کیت	Σ

منابع

1. MANNUCCI P.M., VIGANO S.: "Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation". Lancet, 2, 463-467, 1982.
2. ESMON C.T., ESMON N.L.: "Protein C activation". Semin. Thromb. Hemost., 10, 2, 122-130, 1984.
3. STENFLO J.: "Structure and function of protein C". Semin. Thromb. Hemost., 10, 2, 109-121, 1984.
4. HORELLOU M.H., VAN DREDEN P., CONARD J., SAMAMA M.: "Intérêt du dosage de la protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux". Feuil. Biol., XXVI, 27-31, 1985.
5. STOCKER K., MEIER J.: "Thrombin-like snake venom enzymes" in "Symposium on Animal Venoms and Haemostasis", San Diego, July 20-21, 1985.
6. SAMAMA M., CONARD J., HORELLOU M.H., LECOMPTE T.: "Physiologie et exploration de l'hémostase". Paris: Doin, 169-170, 1990.