

**BIOPHEN™ Protein C LRT**REF 221211
R1 R2: 3 x 3 mLChromogenní stanovení aktivity Proteinu C v plazmě, tekutá reagenie
připravená k použití.

Poslední revize: 01-2023

POUŽITÍ

BIOPHEN™ Protein C LRT souprava je chromogenní test pro In Vitro kvantitativní stanovení aktivity Proteinu C v lidské citrátové plazmě za použití manuální nebo automatizované metody. Reagenie jsou v tekuté formě připravené k použití (LRT = Liquid Reagent Technology).

SHRnutí:**Technické:**

Protein C je na K vitamínu dependentní lidský protein, který inhibuje koagulaci. Jeho normální koncentrace v lidské plazmě je kolem 4 µg/ml. Aktivuje se komplexem trombomodulin-trombin. Aktivovaný Protein C spolu s vápníkem, fosfolipidy a jeho kofaktoru Proteinu S štěpí Faktor Va a VIIIa. Štěpením je potlačena jejich prokoagulační kofaktorová aktivita^{1,2}.

Klinické:

Vyšetření koagulace Proteinu C v lidské plazmě může pomoci při diagnostice vrozených nebo získaných deficitů Proteinu C^{3,4,5,6,7,8}.

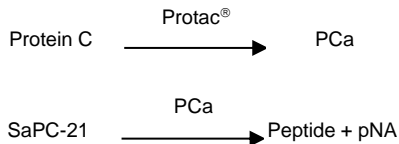
Získané deficity jsou pozorovány u poruch jater, během VKA terapie nebo při Diseminované intravaskulární koagulaci (DIC).

Vrozené deficity mohou být kvantitativní (Typ I) nebo kvalitativní (Typ II) jsou spojeny s opakovanou venózní trombózou.

Vrozené nebo získané deficity Proteinu C jsou rizikovým faktorem pro žilní trombozu³.

PRINCIP TESTU

Soupravou BIOPHEN Protein C LRT je Protein C v plazmě stanoven pomocí specifické aktivace enzymem Protac®, což je enzym extrahovaný z jedu hada (Agkistrodon C Contortrix)^{4,5}. Aktivovaný Protein C (APC) potom specificky štěpí substrát SaPC-21 za uvolnění para-nitroanilinu (pNA). Množství uvolněného pNA, měřeného při 405 nm, je přímo úměrné koncentraci Proteinu C ve vzorku.

**REAGENCIE:**

R1 Protac®. Vysoce čištěný enzym, extrahovaný z jedu hada Agkistrodon C Contortrix, tekutý a stabilizovaný. Enzym je schopen specificky aktivovat Protein C. Každá lahvička obsahuje okolo 0,32 U/ml enzymu Protac®. Obsahuje BSA a malé množství Azidu Sodného (0,9 g/l).

R2 SaPC-21. Chromogenní substrát, specifický pro aktivovaný Protein C, stabilizovaný, tekutý. Každá lahvička obsahuje 1,6 mg/ml SaPr-21. Obsahuje směs 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-jedna a 2-methyl-2H-isothiazol-3-jedna (3:1) a chlorid cesný.

R1 R2 3 lahvičky po 3 ml.

Koncentrace Protac® se mohou lišit mezi šaržemi, ale jsou přesně stanoveny pro každou šarži.

UPOZORNĚNÍ:

- Některé reagenie v soupravě jsou zvířecího původu. Manipulujte s nimi jako s potenciálně infekčním materiálem se všemi náležitými bezpečnostními opatřeními.
- Při používání musí být zachována všechna opatření, aby se zabránilo riziku požití, nebo jiného způsobu vniknutí R1 (Protac®) do těla. V případě kontaktu s pokožkou omyjte velkým objemem vody, v případě kontaktu s otevřeným poraněním vyhledejte ihned lékařskou pomoc a oznaďte biologický původ produktu.
- Pro podrobnější informace konzultujte Bezpečnostní List produktu.
 - P201: Před použitím prostudujte specifický aplikační protokol.
 - P280: Používejte ochranné rukavice, oblečení, ochranu očí a obličje.
 - P302+352: PŘI KONTAKTU S POKOŽKOU: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla.
 - P308+313: Při vystavení nebo obavách: Vyhledejte lékařskou pomoc.
 - P333+313: Při podráždění nebo exému: Vyhledejte lékařskou pomoc.
 - P405: Skladujte v zamčených prostorách.
 - P501: Likvidujte obal/obsah dle místních příslušných regulací.
- Používejte pouze reagenie stejné šarže.

- Studie stability prokázaly, že reagenie mohou být převáženy při pokojové teplotě bez degradace.
- Pouze pro in vitro diagnostické použití.

PŘÍPRAVA REAGENCIE:

R1 R2 Reagenie jsou připraveny k použití. Homogenizujte obsah lahvičky, zabraňte tvorbě pěny, a ihned vložte do analyzátoru dle specifického aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte reagenie stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), homogenizujte před použitím.

Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití:

- 5 týdnů v 2-8°C
- 7 dní za pokojové teploty (18-25°C)
- nemrazit

R2: Reagent 2: SaPC-21

Hnědá lahvička, připraven k použití. Nechte stabilizovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C) za občasného promíchání. Před každým použitím promíchejte.

Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití:

- 5 týdnů v 2-8°C
- 7 dní za pokojové teploty (18-25°C)
- nemrazit

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagenie musí být skladovány v teplotě 2-8°C, v jejich originálních obalech v krabičkách. Pak jsou stabilní až do data expirace vytištěného na obalu.

R1 R2 Stabilita reagenie po otevření, pokud je zabráněno odpařování a kontaminaci a pokud je skladována uzavřená:

- 5 týdnů při 2 – 8°C
- 7 dní při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru: Viz specifický aplikační protokol pro daný analyzátor.

Žluté zbarvení substrátu indikuje kontaminaci. Kontaminovanou reagenii znehodnoťte a načněte novou lahvičku.

REAGENCIE POTŘEBNÉ, ALE V SOUPRAVĚ NEPŘÍTOMNÉ:**Reagenie:**

- Destilovaná voda.
- Kyselina octová (20%) nebo 2% kyselina citrónová (pro end point metodu).
- Fyziologický roztok (0,9% NaCl).
- Plazmatické kalibrátory se známou koncentrací jako jsou:

Produkt	Katalogové číslo
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201

Viz specifický aplikační protokol pro použití analyzátoru.

Materiál:

- Spektrofotometr nebo automatický přístroj pro chromogenní testy.
- Stopky, kalibrované pipety, plastové zkumavky nebo mikrotitrační destička.

ODBĚR VZORKU A PŘÍPRAVA PLAZMY

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M tri-sodného citrátového antikoagulantu (1 díl; 0,109M, 3,2%), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů.

Pro skladování plazmy se odkažte na referenci^{10,11,12}.

PROVEDENÍ TESTU:

Souprava je speciálně určena pro kinetickou metodu automatickou nebo manuální (endpoint). Měření je prováděno při 37°C a změna zbarvení se odečte při 405 nm.

Pro automatickou metodu jsou aplikační protokoly dostupné na vyžádání. Viz specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

Provedení měření:

1. Rekonstruujte kalibrátory a kontroly dle jejich příbalových instrukcí. Pro zhotovení kalibrace naředte kalibrátor fyziologickým roztokem, jak je uvedeno níže („C“ je definována jako koncentrace Proteinu C). Ředění 1:2 odpovídá vyznačené koncentraci (C) PC a ředění 3:4 odpovídá 1,5krát této koncentraci (3C:2).

Kalibrační křivka může být stanovena následovně:

%Proteinu C	3C:2	C	C:2	C:4	0
%Protein C	150	100	50	25	0
Objem kalibrátoru	150 µl	250 µl	250 µl	125 µl	0 µl
Objem fyziologického roztoku	50 µl	250 µl	750 µl	875 µl	1000 µl

2. Nařeďte vzorky fyziologickým roztokem, jak je popsáno níže:

Vzorek	Katalogové číslo	Ředění
Kontrola	223201/223301	1:2
Vzorek	n.a.	1:2

Vytvořte kalibrační křivku a testujte kontroly kvality. Pokud skladujete vzorky při pokojové teplotě (18-25°C), proveďte měření co nejdříve po naředění. Přesné hodnoty kalibrátorů a kontrol jsou pro každou šarži uvedeny v letáku přiloženém k soupravě.

3. Do jamek destičky nebo zkumavek, inkubovaných na 37°C, přidejte následující:

	Mikrotitrační destička	Zkumavka
Ředěné vzorky, kontroly, kalibrátory.	25 µl	50 µl
R1: Protac® Předehřátý na 37°C	100 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C 5 minut, potom přidat		
R2: SaPC-21, předehřátý na 37°C	100 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C přesně 5 minut		
Zastavit reakci následujícím způsobem		
Kyselina citronová (2%)*	100 µl	200 µl
Promíchat a měřit absorbcí při 405 nm proti odpovídajícímu blank		

*Nebo 20% kyselinu Octovou. Žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.

Blank se získá mícháním reagensů v opačném pořadí – Kyselina, R2, R1, ředěný vzorek.

Měřte optickou prostupnost na vlnové délce 405 nm. Od naměřené hodnoty odečtěte absorbcí blank vzorku.

Blank vzorku vytvořte, pokud je vzorek ikterický, lipemický, hemolyzovaný, nebo jeho barva neodpovídá standardní plazmě.

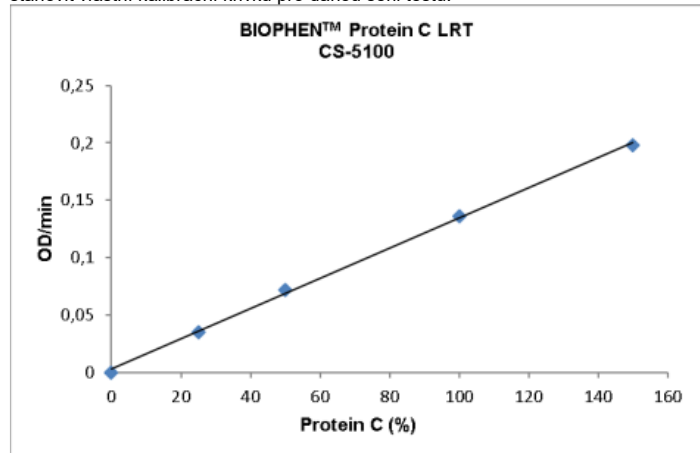
Pokud jsou potřeba jiné reakční objemy, než výše uvedené, je naprosto nutné zachovat poměr objemů. Uživatel je zodpovědný za to, že provedené změny validuje a za případný vliv změn na výsledek.

KALIBRACE:

Soupravu BIOPHEN™ Protein C LRT je nutné kalibrovat pro testování aktivity Proteinu C. Kalibrátor pokrývající dynamické rozmezí testu je dostupný od HYPHEN-BioMed (viz část REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V SOUPRAVĚ NEPŘÍTOMNÝ).

- Rozmezí kalibrace je přibližně od 0% do 150%.

Níže zobrazená kalibrační křivka je pouze příkladem. Každá laboratoř si musí stanovit vlastní kalibrační křivku pro danou sérii testů.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrol slouží k validaci výsledků a homogenity měření v sérii nebo mezi sériemi pro danou šarži reagensů.

Začněte kontrolu kvality do každé série testů. Nová kalibrace musí být provedena nejméně pro každou novou šarži reagentie, po každé významné opravě či údržbě přístroje, nebo když výsledek kontrol je mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř musí definovat vlastní přijatelné rozmezí kontrol pro konkrétní analytický systém.

VÝSLEDKY:

- Pro manuální endpoint metodu vynesete kalibrační křivku bi-lineárně s OD 405 nm na osu Y a aktivitu Proteinu C vyjádřenou v % na osu X. Pro kinetickou metodu použijte ΔOD_{405} místo OD₄₀₅.
- Koncentrace Proteinu C (%) v testovaném vzorku je přímo odvozena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění.
- Výsledky musí být interpretovány s přihlédnutím k biologickému a klinickému stavu pacienta.

LIMITY METODY:

- Pro optimální průběh testu by měly být dodržovány instrukce Hyphen-BioMed. Laboratoř je odpovědná za validaci každé změny v těchto instrukcích.
- Reagenciem neobvyklého vzhledu nebo jevící známky kontaminace nesmí být použita.
- Podezřelé vzorky nebo vzorky vykazující známky kontaminace musí být znehodnoceny.
- Vzorky vykazující známky aktivace musí být znehodnoceny.
- Aprotinin inhibuje Aktivovaný Protein C – vzorky s Aprotininem tak mají falešně nižší aktivitu Proteinu C⁹.
- Přítomnost protilátek proti lidskému Proteinu C může inhibovat amidolytickou aktivitu Proteinu C v průběhu testu.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Koncentrace Proteinu C u dospělých jedinců je mezi 70 a 140%, dle interní studie. Každá laboratoř si musí stanovit vlastní normálové rozmezí.

CHARAKTERISTIKA:

- Nízké detekční rozhraní je závislé na použitém analytickém systému (<1,8% na Sysmex CS-5100).
- Detekční rozhraní metody je závislé na použitém analyzátoru (kolem 7 až 200% PC na Sysmex CS-sérii).
- Studie výkonu byly provedeny interně na Sysmex CS-5100.
- Studie výkonu byla provedena za použití laboratorních kontrol po dobu 20 dní, 2 série denně, 3 opakování v každé sérii. Následující hodnoty byly získány:

Kontroly	Intra assay			
	N	Průměr	CV%	SD
Kontrola 1	40	35,7	2,2	0,8
Kontrola 2	40	81,2	1,5	1,2
	Inter assay			
	N	Průměr	CV%	SD
Kontrola 1	120	36,3	2,4	0,9
Kontrola 2	120	84,1	2,0	1,7

- Dle principu metody není předpokládána interference anti-Xa a anti-IIa antikoagulans, jako jsou Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban, Dabigatram nebo UFH.
- Korelace s referenční metodou (Berichrom Protein C souprava – Siemens, vs BIOPHEN™ Protein C LRT na Sysmex CS-5100):
N = 114 y = 1,04x - 4,04 r = 0,979
- Interference:
Nebyly zaznamenány žádné interference na Sysmex CS-5100 do následujících hodnot:

Hemoglobin	Bilirubin (F/C)	Intralipidy
500 mg/dl	60 mg/dl	1000 mg/dl

Viz specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

REFERENCE:

- Horellou M.H. Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux. Feuil. Biol. 1985.
- Stenflo J. Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
- Manucci P.M: Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet. 1982.
- Esmon C.T. Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
- Exner T. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistrodom Concortrix venom. Thromb. Haemostasis. 1988.
- Pabinger I. Clinical relevance of Protein C. Blut 53. 1986.
- Wypasek E. and Undas Anetta. Protein C and Protein S Deficiency – Practical Diagnostic Issues. Adv Clin Exp Med. 2013.
- Cooper P.C. et al. Recommendations for clinical laboratory testing for protein C deficiency, for the subcommittee on plasma coagulation inhibitors of the ISTH. J. Thromb. Haemost. 2020.
- Wendel H.P et al. Aprotinin in therapeutic doses inhibits chromogenic peptide substrate assays for Protein C. thromb. 1994.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
- Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

SYMBOLY:

Použité symboly jsou uvedeny v seznamu ISO15223-1 standard, viz dokument Definice symbolů.

- R2** H317: Může způsobit alergickou kožní reakci.
H361f: Podezření na poškozování plodnosti.