

# ZYMUTEST™ Protein C

REF RK027A

96 testů



IVD

ELISA měření lidského Proteinu C.

Datum revize: 12/2021

## POUŽITÍ:

ZYMUTEST™ Protein C souprava je sendvičová ELISA metoda pro in vitro kvantitativní měření lidského antigenu Proteinu C (PC) v lidské plazmě.

## PRINCIP STANOVENÍ:

### Technický:

Protein C je vitamin K závislý glykoprotein, který inhibuje koagulaci. Jeho normální koncentrace v lidské plazmě je kolem 4µg/ml. Aktivovaný Protein C (APC), který je aktivován trombomodulin-trombin komplexem, štěpí v přítomnosti kofaktorů Proteinu S, vápníku a PPL Faktory Va a VIIIa a potlačuje jejich prekoagulační kofaktorovou aktivitu<sup>1,2</sup>.

### Klinický:

Měření Proteinu C v plazmě může pomoci diagnóze dědičného nebo získaného deficitu Proteinu C<sup>3,4,5,6</sup>.

Získaný deficit je pozorován u poruch jater, během VKA terapie nebo u Diseminované Intravaskulární koagulace (DIC).

Vrozené deficity mohou být kvantitativní (Typ I) nebo kvalitativní (Typ II). Oba dva typy jsou spojené s opakovanými venózními trombózami.

Vrozený nebo získaný deficit Proteinu C je rizikový faktor pro žilní trombózu<sup>3</sup>.

## PRINCIP:

ZYMUTEST™ Protein C je ELISA metoda založená na antigen-protilátka reakci: PC antigen ve vzorku reaguje s anti-PC polyklonální stabilizovanou protilátkou.

Do jamky mikrotitrační destičky, na jejíž stěny je navázána monoklonální protilátka specifická pro lidský Protein C, se přidá ředěný vzorek. Pokud je ve vzorku PC přítomen, naváže se na přítomné protilátky. Následuje promývací krok, po kterém se přidá imunokonjugát, což je králičí polyklonální protilátka specifická proti lidskému PC značená křenovou peroxidázou (HRP). Ta se naváže na volné epitopy znehyněného PC a následuje další promývání. Do jamky se přidá 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) a peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a vytvoří se modré zbarvení. Reakce se zastaví kyselinou sírovou a barva se změní na žlutou, měřenou při 450nm. Množství získané barvy je přímo úměrné koncentraci Proteinu C v testovaném vzorku.

## REAGENCIE:

1. **COAT ELISA destička:** 12x8 obsahuje 12 proužků po 8 jamkách, potažených stabilizovanou králičí polyklonální protilátkou specifickou pro lidský PC, balenou v hliníkovém pouzdru hermeticky uzavřeném společně s desikantem. Obsahuje malé množství Azidu Sodného (0,9 g/l).

2. **SD ELISA Diluent vzorku:** 2 lahvičky po 50 ml, připraveno k použití. Obsahuje BSA.

3. **CAL Protein C kalibrátor:** 3 lahvičky po 2 ml, lyofilizováno. Každou lahvičku rozpustíte v 2 ml **SD ELISA**, abyste získali standard obsahující „C%“ lidského PC (Již ředěného 1:50). Koncentrace „C“ je mezi 110 a 150%, podle šarže. Standard je v návaznosti na NIBSC mezinárodní standard. Obsahuje BSA.

4. **CI Protein C Vysoká kontrola:** 1 lahvička po 0,5 ml, lyofilizováno.

5. **CII Protein C Nízká kontrola:** 1 lahvička po 0,5 ml, lyofilizováno.

6. **IC Anti-(h)-PC-HRP imunokonjugát:** 3 lahvičky po 7,5 ml, polyklonální protilátky specifické pro lidský Protein C s navázanou HRP (křenovou peroxidázou), lyofilizováno. Obsahuje BSA.

7. **CD ELISA Diluent Konjugátu:** 1 lahvička o 25 ml, připraveno k použití. Obsahuje BSA.

8.: **WS ELISA Wash solution:** 1 lahvička o 50 ml **20x** 20krát koncentrovaného.

9. **TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine:** 1 lahvička 25 ml substrátu, připraveno k použití. Obsahuje hydrogen peroxidázu.

10. **Stop 0,45M Kyselina sírová:** 1 lahvička o 6 ml, připraveno k použití.

Koncentrace kalibrátorů a kontrol se mohou lišit mezi šaržemi reagentie. Přesné hodnoty jsou uvedeny na letáku přiloženém k balení dané šarže.

## VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Některé reagentie v soupravě obsahují materiál lidského původu. Plazma použitá k výrobě takového materiálu byla testována registrovanými metodami a shledána negativní na přítomnost protilátek HIV 1, HIV 2 a HCV a antigenu Hepatitidy B. Přesto žádná metoda testování nemůže kompletně vyloučit přítomnost infekčních agens. Proto musí být tyto reagentie považovány za potencionálně infekční se všemi odpovídajícími bezpečnostními opatřeními.
- Odpad likvidujte dle příslušných místních platných regulací.
- Používejte pouze reagentie stejné šarže.
- Studie stability prokazují, že reagentie mohou být přepravovány při pokojové teplotě bez degradace.
- Reagentie jsou pouze pro in vitro diagnostické použití v laboratoři.

## PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Stabilizujte pásky a reagentie alespoň 30 minut při pokojové teplotě před použitím. Opatrně sundejte z lahviček zátku, abyste zabránili ztrátě lyofilizátu.

**COAT** Otevřete hliníkové pouzdro a vyjměte potřebné množství pásků. Pásky použijte během 30 minut.

Následující obsahy lahviček rozpustíte s:

**CI CII 0,5 ml destilované vody.** Dobře promíchejte do úplného rozpuštění.

**CAL 2 ml SD ELISA** abyste získali roztok s „C“ % PC (již ředěného 1:50). Dobře promíchejte do úplného rozpuštění.

**IC 7,5 ml CD ELISA** alespoň 15 minut před použitím. Dobře promíchejte do úplného rozpuštění.

**SD ELISA TMB Stop CD ELISA**

Reagentie připraveny k použití.

**WS ELISA** lahvičku promíchejte a naředte 1:20 s destilovanou vodou (50ml roztoku stačí na přípravu 1 litru promývacího roztoku po naředění).

Dle potřeby inkubujte ve vodní lázni při 37°C dokud se nerozpustí pevné látky.

## SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

IVD

Neotevřené reagentie musí být skladovány při 2 – 8°C v originálním balení. Potom jsou stabilní až do data expirace uvedeném na obalu.

**COAT** Nepoužité proužky mohou být skladovány při 2-8°C **4 týdny** v originálním hliníkovém balení (hermeticky uzavřen v přítomnosti desikantů), a v přiloženém plastovém sáčku (minigrip), chránění před vlhkostí.

Stabilita reagentie po rozpuštění, pokud je zamezeno kontaminaci nebo odpařování a pokud je reagentie skladována uzavřená, je:

- CAL**
- 72 hodin při 2 – 8 °C
  - 24 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- Ci | CII**
- 72 hodin při 2 – 8 °C
  - 24 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)
  - 2 měsíce při -20°C a méně\*

- IC**
- 4 týdny při 2 – 8 °C
  - 24 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)

\*Rozmrazujte pouze jednou co nejrychleji při 37°C a ihned použijte.

Stabilita reagentie po otevření, pokud je zamezeno kontaminaci nebo odpařování a pokud je reagentie skladována uzavřená, je:

**SD ELISA | CD ELISA | TMB**

- 4 týdny při 2 – 8 °C

**WS ELISA**

- 4 týdny při 2 – 8 °C
- 7 dní při 2 – 8°C pro ředěnou reagentii.

**Stop**

- 8 týdnů při 2 – 8 °C

**MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:**

**Reagentie:**

- Destilovaná voda.

**Materiál:**

- 8smi kanálová opakovací pipeta schopná dávkovat 50-300 µl.
- Pipety o různých objemech od 0 do 20 µl, od 20 do 200 µl a od 200 do 1000 µl.
- Micro ELISA třepačku destiček a promývací přístroj.
- Čtečka micro ELISA destiček s vlnovou délkou 450 nm.

**VZOREK:**

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M tri-sodného citrátového antikoagulantia (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 reference.

**PRŮBĚH TESTU:**

**Metoda měření:**

1. Vzorky a kontroly naředte v **SD ELISA** dle tabulky níže:

Vzorky	Ředění
<b>Ci   CII</b>	<b>1:50</b>
Vzorky	<b>1:50</b>

Pro předpokládanou PC koncentraci nad „C“ v %, naředte vzorky **1:100** (D=100) nebo více.

2. Stanovte kalibrační rozmezí dle tabulky níže s kalibrátorem **CAL** o koncentraci „C“ v %.

Koncentrace PC (%)	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
Objem <b>CAL</b>	1 ml	0,5ml	0,25ml	0,1ml	0,05ml	0
Objem <b>SD ELISA</b>	0	0,5ml	0,75ml	0,9ml	0,95ml	1 ml

Homogenizujte.

Ředění jsou stabilní **8 hodin** při pokojové teplotě (18-25°C).

3. Vložte proužky do přiložených rámečků. Přidejte následující do jamek ELISA destičky a proveďte měření dle následující tabulky:

Reagentie	Objem	Postup
<b>CAL nebo Ci nebo CII nebo ředěné vzorky nebo SD ELISA (blank)</b>	200 µl	Přidejte reagentie nebo vzorek do odpovídající jamky micro ELISA destičky
<b>Inkubujte po 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25°C) (a)</b>		
<b>WS ELISA</b>	300 µl	Proveďte 5 promytí <b>(b)</b>
<b>IC</b>	200 µl	Přidejte IC do jamek destičky
<b>Inkubujte po 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25°C) (a)</b>		
<b>WS ELISA</b>	300 µl	Proveďte 5 promytí <b>(b)</b>
<b>TMB</b>	200 µl	<p>Okamžitě po promytí přidejte substrát (b, c).</p> <p>Pozn: Distribuce substrátu musí být přesná objemem i časovými intervaly.</p>
<b>Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (a)</b>		
<b>Stop</b>	50 µl	<p>Dodržujte stejné časové intervaly jako s přidáním substrátu. (c)</p>
<b>Počkejte 10 minut, aby se mohlo zbarvení stabilizovat a pak měřte absorbanci při 450 nm. Odečtěte od hodnot blank vzorku (d).</b>		

Distribujte naředěné kalibrátory, kontroly a vzorky co nejrychleji, abyste získali homogenní kinetiku dávkování. Příliš dlouhá prodleva (> 10 minut) mezi první a poslední jamkou může mít vliv na imunologickou kinetiku a vydávat nepřesné výsledky (falešně nízké pro poslední jamky).

- Zabraňte vystavení destičky přímému slunečnímu svitu během inkubace, hlavně pak při zbarvovací reakci. Můžete použít třepačku micro ELISA destiček.
- Nikdy nenechávejte jamky vyschnout mezi kroky postupu. Další reagentie musí být přidána do 3 minut. Vyschnutí jamek by mohlo poškodit znehýbněné komponenty a snížit reaktivitu destičky. Dle potřeby nechte promývací roztok v jamkách a odstraňte jej těsně před přidáním další reagentie. Promývací přístroj musí být nastaven tak, aby proužky promýval a vyprazdňoval opatrně; jinak může dojít k poškození potahu jamek a snížení jejich reaktivity.
- Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do řádků musí být přesně určeny a stejné intervaly musí pak být při pipetování zastavovacího roztoku.
- Pro bichromatické měření můžete použít vlnovou délku 620 nebo 690 nm.



### **Jednokroková metoda**

PC měření může být provedeno metodou s jedním krokem. V tomto případě je kalibrační křivka 0 do C%.

Všechny reagentie se ředí jako v předchozí metodě kromě **IC**, který musí být ředěn v **CD ELISA**.

Měřená plazma je analyzována při 1:50 ředění v **SD ELISA** nebo vyšším ředění, dle potřeby. Kontroly a vzorky musí být ředěny 1:50, jako v předchozí metodě.

No jamek ELISA proužku přidejte 50 µl **IC**, pak 200µ kalibrátoru nebo plazmy. Následuje inkubace po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě, po níž se proužky promyjí a přidá se **TMB** (200 µl/jamka) a reakce se zastaví za 5 minut přidáním 50 µl **Stop**. Zbarvení se měří při 450 nm. Operační upozornění, promývání a interpretace výsledků je stejná jako u předchozí, doporučené, metody.

### **KONTROLA KVALITY:**

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

Začněte kontroly kvality do každé série měření, podle pravidel laboratorní praxe. Nová kalibrační křivka musí být stanovena pro každou sérii testů.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní přijatelné meze pro svůj analytický systém a ověřit jejich výkon.

### **VÝSLEDKY:**

- Získaný OD450 se může lišit podle teploty během průběhu testu.
- Stanovte kalibrační křivku s OD 450 nm podél osy Y a koncentraci PC v % podél osy X s interpolační metodou „best fit“ (viz příložený leták k soupravě).
- Výsledky vzorků a kontrol jsou vyjádřeny v OD450, viz kalibrační křivka.
- Koncentrace PC (%) je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění 1:50.
- Pokud je použito jiné ředění, získané hodnoty musí být násobeny použitým ředícím faktorem.
- Pro kalkulaci koncentrace PC se může použít specifický software (např.: Dynex, Biolise, atd.).
- Pro **CI** a **CIII** jsou koncentrace přímo odečteny z kalibrační křivky.
- Výsledky musí být vyloženy dle pacientova klinického a biologického stavu.

### **LIMITY:**

- Pro zajištění optimálního průběhu testu a pro splnění specifikací by měly být dodrženy instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed.
- Reagentie s neobvyklým vzhledem nebo jevící známky kontaminace, by měly být znehodnoceny.
- Vzorky podezřelého vzhledu nebo vzorky vykazující známky aktivace musí být znehodnoceny.
- Pokud není promývací krok postupu řádně proveden, negativní kontrola může vykazovat vyšší hodnoty absorbance. Abyste zajistili nespecifickou tvorbu zbarvení, zkontrolujte, jestli je promývací krok správně prováděn.

### **OČEKÁVANÉ HODNOTY:**

Dle definice 100% koncentrace PC odpovídá koncentraci normální lidské poolové citrátové plazmě, která je získána od zdravých mužů a žen mezi 18 a 55 lety bez medikace nebo chorob. Koncentrace PC u dospělých je mezi 70 a 140%.

Koncentrace PC je nižší u novorozenců nebo u jaterních poruch. Potom není závislá na pohlaví ani věku.

### **CHARAKTERISTIKA:**

- Měření je kalibrováno v souladu s mezinárodním standardem NIBSC pro PC.
- Není přítomna žádná interference k Revmantoidnímu faktoru.
- Nebyly pozorovány žádné interference Prozonu na koncentraci PC do 100 µg/ml na doporučeném protokolu.
- Dynamické rozmezí: 0 až 130%.
- Detekční limit ≤5%.
- Intra-assay CV: 3-8%.
- Inter-assay CV: 5-10%.
- **Interference:** Nebyly zjištěny žádné interference do následujících koncentrací:

Heparin	Bilirubin	Hemoglobin
2 UI/ml	0,05 mg/ml	5 mg/ml

### **REFERENCE:**

1. Horellou M.H. Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux. Feuil. Biol. 1985.
2. Stenflo J. Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
3. Manucci P.M. Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet. 1982.
4. Esmon C.T. Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
5. Axner T. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistrodom Concoctrix venom. Thromb. Haemostasis. 1988.
6. Pabinger I. Clinical relevance of Protein C. Blut. 1986.
7. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
8. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

### **SYMBOLY:**

Použité symboly a znaky jsou uvedeny v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument definice symbolů.

**SD ELISA** **CD ELISA** **WS ELISA** H317: Může způsobit alergickou kožní reakci.

