

ZYMUTEST™ Free Protein S (II)

REF RK015B

96 testů



ELISA souprava pro kvantitativní stanovení Volného Proteinu S.

IVD



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Datum revize: 05/2018

POUŽITÍ:

ZYMUTEST™ Free Protein S (II) je ELISA metoda pro kvantitativní stanovení Volného Proteinu S (aktivovaného kofaktoru Proteinu C) v lidské plazmě.

SOUHRN INFORMACÍ:

- Koncentrace Proteinu S v normální lidské plazmě je kolem 25 µg/ml¹. Kolem 40% (10 µg/ml) je ve volné podobě a 60% (15 µg/ml) koluje v krvi jako nekovalentní komplex C4b-BP. Pouze volná forma PS funguje jako antikoagulant jako kofaktor aktivovaného Proteinu C.
- Protein S je syntetizován v játrech. Je to vitamin K závislý glykoprotein s molekulární vahou 80 000 daltonů. Rovnováha mezi jeho volnou a C4b-BP vázanou formou je velmi důležitá, protože jen volný PS je aktivní. V prvních fázích zánětlivých onemocnění klesá koncentrace volného Proteinu S kvůli nárůstu jeho vázané formy. Protein S je také snižena u pacientů s terapií dikumarolu nebo L-asparaginázou a u pacientů s jaterními onemocněními.

PRINCIP:

Do jamky mikrotitrační destičky, na jejíž stěny je navázána monoklonální protilátka specifická pouze na Volný Protein S (Neváže se na PS v komplexu s C4b-vázacím proteinem) se přidá imunokonjugát, což je jiná specifická monoklonální protilátka proti Volnému PS, značená křenovou peroxidázou (HRP). Reakce se zahájí přidáním ředěného vzorku plazmy nebo jiné tekutiny. Pokud je přítomen volný protein S, váže se na monoklonální protilátku na pevné fázi přes jeden epitop a přes jiný epitop se na něj váže druhá protilátka značená křenovou peroxidázou (HRP). Následuje promývací krok a přidání 3,3',5,5'- tetramethylbenzidinu (TMB) v přítomnosti peroxidu vodíku (H₂O₂). V přítomnosti křenové peroxidázy dojde k vytvoření modrého zbarvení. Po zastavení reakce kyselinou sírovou se modrá barva změní na žlutou. Intenzita zbarvení, měřená při 450 nm, je přímo úměrná koncentraci lidského Volného Proteinu S v testovaném vzorku.

REAGENCIE:

- COAT** Micro ELISA destička, obsahuje 12 proužků po 8 jamkách, potažených stabilizovanou myší monoklonální protilátkou specifickou pro Volný Protein S, balenou v hliníkovém pouzdru hermeticky uzavřeném společně s desikantem.
- SD ELISA** Diluent vzorku, 2 lahvičky s obsahem 50 ml, připraveno k použití. Obsahuje BSA.
- CAL PROTEIN S** Plasma kalibrátor: 3 lahvičky po 2 ml, lyofilizováno. Každá lahvička musí být rozpuštěna s 2 ml Diluentu vzorku. Získaná plazma je již ředěna 1:50. Kalibrátor má návaznost na NIBSC mezinárodní standard. Obsahuje BSA.
- CI PROTEIN S** Control I (High): 1 lahvička o 0,5 ml, lyofilizováno. Obsahuje BSA.
- CII PROTEIN S** Control II (Low): lahvička o 0,5 ml, lyofilizováno. Obsahuje BSA.
- IC** Anti-(h)-Free PS (II)-HRP imunokonjugát: 3 lahvičky po 4 ml, lyofilizováno. Monoklonální protilátka navázaná na HRP, obsahuje BSA.

7. **CD ELISA** Diluent konjugátu: 1 lahvička o 15 ml, připraveno k použití. Obsahuje BSA.

8.: **WS ELISA** Promývací roztok: 1 lahvička o 50 ml, 20krát koncentrovaná. Obsahuje Proclin.

9. **TMB 3,3',5,5'** - Tetramethylbenzidin: 1 lahvička o 25 ml, peroxidázový substrát. Obsahuje peroxid vodíku. Připraven k použití.

10. **SA** Kyselinasírová 0,45M: 1 lahvička o 6 ml zastavovacího roztoku, připraveno k použití. Obsahuje BSA a 0,45M kyselinu sírovou.

Koncentrace kalibrátoru a kontrol se mohou lišit mezi jednotlivými šaržemi. Přesné hodnoty pro danou šarži jsou uvedeny na letáku přiloženém k balení.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- S materiálem biologického původu musí být zacházeno jako s potenciálně infekčním se všemi náležitými bezpečnostními opatřeními.
- Lidská plazma použitá k přípravě reagentie byla testována a shledána negativní na HIV a HCV protilátky a Hbs antigen.
- Bovinní plazma použitá k výrobě BSA byla testována a shledána negativní na infekční agens, hlavně pak boviní spongiformní encefalitidy.
- Žluté zbarvení TMB substrátu indikuje kontaminaci. Substrát znehodnoťte a načněte novou lahvičku.
- Odpad likvidujte dle příslušných místních platných regulací.
- Používejte pouze reagentie stejné šarže.
- S reagentie manipulujte opatrně. Zabraňte odpařování a kontaminaci.
- Abyste zaručili stabilitu reagentie, zavírejte lahvičky původním víčkem po každém použití.
- Studie stability prokazují, že reagentie mohou být přepravovány při pokojové teplotě bez degradace.
- Kyselina sírová, i při ředění 0,45M, je žíravá. Zacházejte s ní dle příslušných bezpečnostních opatření. Používejte ochranné rukavice a brýle při manipulaci. Zabraňte kontaktu s očima a pokožkou.
- Pouze pro In Vitro diagnostické účely.

SA

H290: Může způsobit korozi kovů.

CD ELISA **SD ELISA** **WS ELISA**

H317: Může způsobit alergickou kožní reakci.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ A STABILITA:

Alespoň 30 minut před použitím zahřejte soupravu na pokojovou teplotu. Skladujte nepoužité reagentie při 2-8°C. Lahvičky otevřete opatrně, abyste zabránili ztrátě lyofilizátu.

- COAT** Otevřete plastové pouzdro a vyjměte požadovaný počet 8-mi jamkových proužků pro analýzu. Pokud jsou mimo pouzdro, musí být testovací proužky použity do 30 minut.

IVD

Nepoužité proužky mohou být skladovány v **2-8°C 4 týdny** v jejich originálním hliníkovém pouzdru, za přítomnosti desikantu, hermeticky uzavřené, chráněné před vlhkostí a uložené v přiloženém skladovacím pouzdru.

2. **SD ELISA** Připraven k použití.

Stabilita reagensi po otevření, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **4 týdny při 2-8°C**

3. **CAL PROTEIN S** Rozpusťte každou lahvičku **2 ml diluentu vzorku**. Získáte kalibrační plazmu, obsahující protein S v koncentraci „C%“, již ředěnou **50x**.

Stabilita reagensi po otevření, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **24 hodin při 2-8°C**
- **8 hodin** za pokojové teploty (18 – 25°C)

4. **CI PROTEIN S** Rozpusťte s **0,5 ml** destilované vody, promíchejte do úplného rozpuštění.

Stabilita reagensi po rozpuštění, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **24 hodin při 2-8°C**
- **8 hodin** za pokojové teploty (18 – 25°C)
- **2 měsíce** zmražené při -20°C a méně*

5. **CII PROTEIN S** Rozpusťte s **0,5 ml** destilované vody, promíchejte do úplného rozpuštění.

Stabilita reagensi po rozpuštění, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **24 hodin při 2-8°C**
- **8 hodin** za pokojové teploty (18 – 25°C)
- **2 měsíce** zmražené při -20°C a méně*

*Rozmrazujte pouze jednou co nejrychleji při 37°C, přizpůsobte inkubační dobu dle objemu reagensie. Stabilita rozmražené reagensie by měla být ověřena při laboratorních podmínkách.

6. **IC** Každá lahvička musí být rozpuštěna se **4 ml diluentu konjugátu**. Nechte částičky kompletně rozpustit. Před použitím opatrně lahvičku promíchejte, aby se obsah homogenizoval. Stabilita reagensi po otevření, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

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

7. **CD ELISA** Připraven k použití.

Stabilita reagensi po otevření, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **4 týdny při 2-8°C**

8. **WS ELISA** Dle potřeby inkubujte ve vodní lázni při **37°C**, dokud se zcela nerozpustí pevné částičky. Promíchejte lahvičku a naředte požadovaný objem v poměru **1:20** v **destilované vodě** (obsah lahvičky 50 ml dovoluje získat 1 litr promývacího roztoku).

Stabilita reagensi po otevření, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **4 týdny při 2-8°C**

Stabilita reagensi po naředění, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **7 dní při 2-8°C**

9. **TMB** Připraven k použití. Stabilita reagensi po otevření, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **4 týdny při 2-8°C**

10. **SA** Připraven k použití.

Stabilita reagensi po otevření, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování během použití, je:

- **4 týdny při 2-8°C**

Neotevřené reagensie jsou stabilní při 2-8°C v jejich originálním balení do data expirace uvedeném na obalu.

MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

Reagensie:

- 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 třepačka destiček a promývací přístroj.
- Čtečka micro ELISA destiček s vlnovou délkou **450 nm**.

ODBĚR VZORKU:

Během přípravy a skladování vzorků dodržujte lokální předpisy (pro USA viz CLSI doc GP44-A4)¹.

Vzorek:

Lidská plazma odebraná z citrátového antikoagulantu nebo EDTA lidská plazma. Skladovací podmínky jsou stejné jako s citrátovanou plazmou.

Odběr

Krev (9 objemů) musí být odebrána do citrátu sodného (1 objem, 0,109M) přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Centrifugace

Do 2 hodin po odběru použijte metodu ve vaší laboratoři validovanou pro získání plazmy chudé na destičky, např. 15 minut při 2 500 g a v pokojové teplotě 18-25°C.

Plazma musí být stočena do plastové zkumavky.

Skladování plazmy:

- 8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- 1 měsíc při -20°C
- 18 měsíců při -70°C

Vzorek plazmy rozmrazujte rychle při 37°C, promíchejte a testujte. Zamíchejte po rozmražení a před testováním.

POSTUP:

Metoda měření:

1. Vzorky a kontroly naředte v **diluentu vzorku** dle tabulky níže:

Vzorky	Ředění
Plazma	1:50
Kontroly	1:50

U vzorků s vysokým množstvím Proteinu S ředte **1:100** nebo více. Získané výsledky pak násobte použitým dilučním faktorem. Pro vzorky s nízkým předpokládaným množstvím PS (<10%) je vhodné nižší ředění. Získané výsledky pak vydělte dilučním faktorem.

2. Stanovte kalibrační rozmezí dle tabulky níže s **kalibrátorem (CAL PROTEIN S)**, s koncentrací Volného Proteinu S „C“, kde **100% koncentrace Volného PS odpovídá** normální poolované lidské plazmě ředěné **1:50**.

Koncentrace Volného PS (%)	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
Volné PS kalibrátor	1 ml	0,5ml	0,25ml	0,1ml	0,05ml	0
Diluent vzorku	0	0,5ml	0,75ml	0,9ml	0,95ml	1 ml

Homogenizujte.

Ředění jsou stabilní **4 hodiny** při pokojové teplotě (18-25°C).

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

Reagencie	Objem	Postup
Konjugát anti (h)-Free PS (II)-HRP	100 µl	Přidejte imunokonjugát do odpovídajících jamek micro ELISA destičky
Protein S kalibrátor nebo Vzorek nebo Diluent vzorku (blank)	100 µl	Ihned přidejte do jamek mikrodestičky (a).
Opatrně zamíchejte a inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25°C) (d)		
Promývací roztok (20 krát ředěný v destilované vodě)	300 µl	Proveďte 5 promytí (b)
TMB / H ₂ O ₂ Substrát	200 µl	Ihned po promytí přidejte substrát (b). Pozn: Distribuce substrátu musí být přesná objemem i časovými intervaly. (c, d)
Inkubujte přesně 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (d)		
Zastavovací roztok	50 µl	Dodržujte stejné časové intervaly jako s přidáním substrátu. (c)
Počkejte 10 minut, aby se mohlo zbarvení stabilizovat a pak měřte absorbanci při 450 nm (A450). Odečtěte od hodnot blank vzorku (e).		

- a) Distribuujte 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). **Pokud používáte celý proužek, přidejte ředěný kalibrátor uprostřed, abyste snížili kinetický efekt na výsledek.**
- b) Nikdy nenechávejte jamky vyschnout mezi kroky postupu. Další reagencie musí být přidána do 3 minut. Vyschnutí jamek by mohlo poškodit znehybněné komponenty a snížit reaktivitu destičky. Dle potřeby nechávejte promývací roztok v jamkách a odstraňte jej těsně před přidáním další reagencie. Promývací přístroj musí být nastaven tak, aby proužky promýval a vyprazdňoval opatrně; jinak může dojít k poškození potahu jamek a snížení jejich reaktivity.
- c) Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do řádků musí být přesně určeny a stejné intervaly musí pak být při pipetování zastavovacího roztoku.
- d) Zabraňte vystavení destičky přímému slunečnímu svitu během inkubace, hlavně pak při zbarvovací reakci. Můžete použít třepačku micro ELISA destiček. Zajistěte, aby inkubační teploty byla 18-25°C. Výsledky jsou ovlivněny teplotou – příliš nízká nebo vysoká absorbance při 450nm. Zohledněte teplotu inkubace při vyhodnocování výsledků. Absorbance při 450nm jsou značně zvýšené u vzorku v micro-ELISA třepačce po celou dobu inkubací.
- e) Pro bichromatické měření můžete použít vlnovou délku 620 nebo 690 nm.

KONTROLA KVALITY:

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

Začněte kontroly kvality do každé série měření, podle pravidel laboratorní praxe. Nová kalibrační křivka je potřeba pro každou sérii testu.

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

VÝSLEDKY:

- U manuální metody stanovte kalibrační křivku s **OD 405 nm** podél osy Y a koncentraci Volného Proteinu S (v %) podél osy X, dle „best-fit“ interpolačního módu – viz přiložený leták u soupravy.
- ELISA software (Dynex, Biolise, atd...) může být použit pro výpočet koncentrací.
- Koncentrace Volného PS v měřeném vzorku a v kontrolách I a II jsou přímo odečteny z kalibrační křivky, pokud byl dodržen ředící poměr 1:50. Výsledky jsou v %.
- Pro vyšší a nižší ředění se musí koncentrace vynásobit použitým dilučním faktorem (ředění 1:100 násobit 2, atd...)

LIMITY:

- Pro zajištění optimálního průběhu testu a pro splnění specifikací by měly být dodrženy instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed. Jakékoliv změny musí být validovány uživatelem.
- Reagencie s neobvyklým vzhledem nebo jevící známky kontaminace, by měly být znehodnoceny.
- Pokud nebyl promývací krok proveden správně, negativní kontroly mohou vykazovat vysoké hodnoty. Abyste zabránili vývoji nespecifického zbarvení, zkontrolujte, zda byl promývací krok proveden správně.
- Nebyly zjištěny žádné interference látek na test do daných koncentrací:
Heparin do 2 IU/ml, bilirubin do 0,6 mg/ml, hemoglobin do 10 mg/ml, intralipidy do 10 mg/ml a DOAC do 400 ng/ml.

PATOLOGICKÉ VARIACE:

- ZYMUTEST™ Free Protein S souprava je specifická pro obě formy Volného Proteinu S. Přítomné monoklonální protilátky nereagují s komplexy Proteinu S-C4b-BP, ale měří specificky funkční natovni a aktivní formu Proteinu S.
- Dynamické rozmezí 5 až kolem 130%.
- Detekční limit ≤ 5%.
- Intra-assay CV: ≤ 6% (pro vzorky normální plazmy), ≤ 8% (pro abnormální plazmu).
- Inter-assay CV: ≤ 10%.
- Referenční materiál: Mezinárodní standard pro Protein S (03/228).

REFERENCE:

1. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
2. Faioni E., Valsecchi C., Palla A., Taioli E., Razzari C., Mannucci P.: Free Protein S Deficiency is a Risk Factor for Venous Thrombosis: Thromb. Haemost., 1997, 78, 1343-46
3. Henkens C.A.A., Bom V.S., Van der Schaaf W., Pelsma P.M., Smit Sibinga C.T., Kam P.S., Van der Meer J.: Plasma Levels of Protein S, Protein C, and Factor X : Effects of sex, Hormonal State and Age : Thromb. Haemost., 1995, 74, 1271-7.5
4. Aiach M., Borgel D., Gaussem P., Emmerich J., Alhenc-gelas M., Gandrille S.: Protein C and Protein S deficiencies. Sem. in Hemat., 1997, 34, 205-17.
5. Schwartz H.P., Fischer M., Hopmeier P., Batard M.A., and Griffin J.H.: Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease; Blood, 1984, 64, 1297-1300.
6. Marlar R. A., Gausman J. N. Protein S abnormalities a diagnostic nightmare. Am. J. Hematol, 2011, 86, 418–421.

SYMBOLY:

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

