

**IVD****HEMOCLOT™ Protein S****REF CK041K R1 R2 3 x 1 ml**Koagulační metoda pro měření aktivity
Proteinu S.

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: 07_2024

POUŽITÍ:

HEMOCLOT™ Protein S souprava je koagulační metoda pro in vitro kvantitativní měření aktivity Proteinu S (PS) v lidské citrátové plazmě automatickou nebo manuální metodou.

SHRNUTÍ:**Technické:**Protein S je vitamin K závislý protein tvořený v játrech. PS v plazmě má dvě formy: komplex C4b-BP, nebo volný PS, který funguje jako antikoagulans kofaktorovou aktivitou aktivovaného Proteinu C (APC). V přítomnosti vápníku a fosfolipidů APC-PS komplex inhibuje Faktory Va a VIIIa.¹**Klinické:**Aktivita PC/PS inhibiční cesty je snížena pokud je deficit volného PS nebo jeho deformace. Vrozený nebo získaný deficit PS je spojený se zvýšeným rizikem venózní trombózy.^{1,2}PS aktivita je závislá na věku a pohlaví^{3,4}, a může být snížena v několika případech: Vitamin K deficit nebo VKA terapie (predisponující ke krvácivým problémům víc než trombotickým), terapie L-asparaginázou, poruchy jater, nefrotický syndrom, těhotenství, orální kontraceptiva nebo estrogen terapie, první fáze zánětu, virová infekce, disseminovaná intravaskulární trombóza (DIC), žilní trombóza (DVT), pulmonární embolie (PE) a vzácně kvůli získaným nebo přechodným protilátkám proti PS (například u dětí s planými neštovicemi).^{1,2}Získaný deficit Proteinu S je klasifikován do tří typů: typ I a III jsou 95% případů PS deficitu.^{1,5}Mutace faktoru V (FV Leiden mutace R506Q) je rezistentní na inaktivaci jeho koagulační aktivity APC-PS komplexem.¹**PRINCIP:**

HEMOCLOT™ Protein S je souprava pro koagulační metodu za použití času aktivovaného parciálního tromboplastinu (APTT), který je aktivován Faktorem IXa v přítomnosti fosfolipidů, vápníku a nadbytku APC.

Ředěná měřená plazma je smíchána s PS deficitní plazmou (R1). Aktivační reagentie (R2) je přidána v konstantní a optimalizované koncentraci. Koagulace je spuštěna přidáním vápníku (Ca²⁺). Koncentrace PS je limitující faktor, a proto je výsledný čas koagulace přímo úměrný koncentraci Proteinu S.**REAGENCIE:****R1** Protein S deficitní plazma, připraveno imunodeplecí, lyofilizováno v přítomnosti heparin neutralizující látky.**R2** Aktivační reagentie, lyofilizováno. Obsahuje lidský Faktor IXa, lidský APC a fosfolipidy, v optimální koncentraci. Obsahuje BSA.**REF CK041K** > **R1 R2 3 lahvičky po 1 ml.****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 potenciálně infekční se všemi odpovídajícími bezpečnostními opatřeními.

- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Používejte pouze reagentie ze stejné šarže.
- Studie stability prokázaly, že reagentie může být přepravována za pokojové teploty bez jejího poškození.
- Pouze pro laboratorní použití In Vitro.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Abyste zabránili ztrátě produktu, lahvičky otevřete opatrně.

R1 R2 Rozpusťte obsah každé lahvičky s přesně:
REF CK041K > **1 ml destilované vody**

Řádně promíchejte, dokud se obsah nerozpustí, zabraňte tvorbě pěny při míchání a vložte do analyzátoru dle specifického aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte stabilizovat 15 minut při pokojové teplotě (18 – 25°C) a homogenezujte před použitím.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Reagentie musí být skladována při 2-8°C ve svém originálním obalu. Je pak stabilní do data expirace uvedeného na krabičce.

R1 R2 Stabilita otevřené reagentie po rozpuštění, pokud je zabráněno kontaminaci nebo odpařování a je skladována uzavřená, je:

- 24 hodin při 2 - 8°C
- 8 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru: viz specifický aplikační protokol.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V SOUPRAVĚ NEPŘÍTOMNÝ:**Reagentie:**

- Destilovaná voda.
- Imidazol pufr (AR021B/K/L/M/N).
- CaCl₂ při 0,025M (AR001B/K/L)
- Specifické kalibrátory a kontroly:

Název produktu	Referenční číslo
BIOPHEN™ Plasma Clibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Použijte stejný pufr pro všechna měření.

Viz specifický aplikační protokol pro Váš analyzátor.

Materiál:

- Vodní lázeň, semi-automatický nebo automatický analyzátor pro koagulační měření.
- Stopy; Kalibrované pipety; Zkumavky z plastu nebo silikonového skla.

PŘÍPRAVA A ODBĚR VZORKU:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M citrátového antikoagulantia (1 díl; 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 reference⁶.**PROVEDENÍ TESTU:**

Souprava může být použita pro manuální nebo automatickou metodu. Provádějte test při 37°C a měřte čas koagulace, který je započatý přidáním vápníku.

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

Manuální metoda:

1. Připravte kalibrátory a kontroly dle jejich specifických instrukcí. Kalibrátor by měl být ředěn v imidazolovém pufru pro stanovení kalibrační křivky, viz níže („C“ definuje PS koncentraci, 100% pro normální poolovou plazmu).

Pokud je kalibrace provedena s komerčním plazmatickým kalibrátorem (např.: BIOPHEN™ Plasma Calibrator), ředění 1:10 odpovídá indikovanému „C“ koncentrace aktivity PS.

Pro kalibrátor o hladině C, hladina 100% (v podmínkách testu) je získána ředěním standardu faktorem: $10 \times (C)/100$.

Připravte 3 ml normální poolové plazmy o ředění 1:10, nebo ředění (10x C/100) kalibrační plazmy s danou hladinou PS (C1). Tato plazma odpovídá 100% PS. Připravte kalibrační křivku následovným ředěním v imidazolovém pufru, viz tabulka níže:

Kalibrátor	C5	C4	C3	C2	C1
Protein S (%)	0	25	50	75	100
Kalibrátor	0 ml	0,250 ml	0,500 ml	0,750 ml	1 ml
Imidazol pufr	1 ml	0,750 ml	0,500 ml	0,250 ml	0 ml

2. Nařed'te vzorky a kontroly v imidazolovém pufru, dle tabulky níže:

Vzorky	Referenční číslo	Ředění
Kontroly	223201/223301	1:10
Vzorky	-	1:10

Pro předpokládaný výsledek >100% mohou být hodnoty získány měřením plazmy při ředění 1:20 a pak násobeny 2; pro vzorek ≤10% použijte 1:5 ředění a výsledek dělte 2.

Stanovte kalibrační křivku a proveďte kontrolu kvality. Naředěné vzorky by měly být měřeny rychle, pokud jsou skladovány při pokojové teplotě (18-25°C). Pokud možno, pro optimální výkon, všechna měření (kalibrace, vzorky a kontroly) by měly být provedeny společně. Přesné koncentrace kalibrátorů a kontrol jsou uvedeny na letácích přiložených k jejich balení.

3. Do plastové zkumavky inkubované při 37°C, přidejte:

	Objem
Kalibrátor nebo ředěné vzorky nebo kontroly (ředěné)	50 µl
R1 Protein S deficitní plazma, předinkubovaná na 37°C	50 µl
Míchejte a inkubujte 1 minutu při 37°C, pak přidejte:	
R2 Aktivační reagensii, inkubovanou na 37°C	50 µl
Míchejte a inkubujte při 37°C po dobu 3 minut pak přidejte následující a zapněte stopky:	
CaCl ₂ 0,025M (při 37°C, míchaný)	100 µl
Zaznamenejte čas koagulace (CT, sekundy).	

Pokud jsou zapotřebí jiné reakční objemy, než je uvedeno výše, poměry objemů musí být zachovány. Uživatel je zodpovědný za validaci všech změn a jejich dopadu na výsledky.

KALIBRACE:

HEMOCLLOT™ Protein S souprava může být kalibrována pro PS měření. Kalibrační plazmy pokrývající dynamické rozmezí testu jsou k dispozici od HYPHEN BioMed (Viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE NEPŘÍTOMNÝ) a mohou být použity ke stanovení kalibrační křivky.

Kalibrační rozmezí je od 0 do 100% (na CN sérii).

Kalibrační křivka uvedena níže je pouze příklad. Stanovte vlastní kalibrační křivku pro sérii testů.

KONTROLA KVALITY:

Kontrola kvality umožňuje validaci souladu metody a homogenitu mezi sériemi pro danou šarži reagentie.

Pro validaci měření zařaďte kvalitu kontroly do každé série testů podle správné laboratorní praxe. Nová kalibrační křivka by měla být stanovena nejlépe pro každou novou sérii testů, při nové šarži reagentií, po opravě analyzátoru, nebo pokud jsou naměřené kontroly kvality mimo přijatelné rozmezí.

Každá laboratoř si musí stanovit svoje vlastní přijatelné rozmezí a verifikovat předpokládaný výkon na svém analyzátoru.

VÝSLEDEK:

- Pro manuální end-point metodu vypište kalibrační křivku bi-logaritmicky s koagulačním časem (v sekundách) podél osy Y a koncentraci Proteinu S (v %) podél osy X.
- Koncentrace PS (%) v měřeném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud byla použita standardní ředění.
- Pokud byla použita odlišná ředění, získaný výsledek se musí násobit použitým ředicím faktorem.
- Výsledky by měly být interpretovány dle klinického a biologického stavu pacienta.

LIMITY:

- Abyste zajistili optimální výkon testu, přesně následujte technické instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed.
- Jakýkoliv reagentie neobvyklého vzhledu nebo vykazující známky kontaminace musí být znehodnocena.
- Jakýkoliv podezřelý vzorek nebo vzorek vykazující známky aktivace musí být znehodnocen.
- Test může být proveden u pacientů na heparinu (do 1 IU/ml) nebo VKA (PS aktivita je snižena). Sledujte výsledky pacientů se známou abnormálně vysokou hladinou FVIII:C, Lupus Antikoagulans (LA), nebo zmutovaným FV (R506Q, FV Leiden). Aprotinin má tendenci inhibovat aktivovaný PC, a aktivita PC může být snižena u pacientu na Aprotininu⁸. Pokud jsou koagulační časy abnormálně krátké nebo dlouhé, měly by být potvrzeny jinou metodou (například imunologickou) a / nebo dalším vzorkem a zkoumány z hlediska klinického stavu pacienta.
- Pro stejnou šarži reagentie a stejnou plazmu se může koagulační čas (CT) měnit podle použitého analyzátoru (hlavně v závislosti na typu detekce koagula – mechanický nebo optický) a nastavení citlivosti detekce.

PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY:

Hladina PS v normální plazma v dospělé populaci je mezi 64 až 140% (dle věku a pohlaví)^{3,4}. Každá laboratoř si musí stanovit vlastní normálové rozmezí.

CHARAKTERISTIKA:

Studie výkonu metody byly prováděny dle CLSI směrnic. Následující data reprezentují typické výsledky – nejsou zamýšleny jako specifikace pro HEMOCLLOT™ Protein S reagentie.

Matematická analýza byla provedena na validovaném analytickém systému dle GLSI směrnice.

Všechna data jsou uvedena v specifických aplikačních protokolech.

Analytický výkon

Měřicí rozmezí

Měřicí rozmezí je definováno použitým analytickým systémem a je uvedeno v aplikačním protokolu pro daný analyzátor.

Přesnost

Studie přesnosti byly provedeny s laboratorními kontrolami a poolovanou plazmou.

Zkreslení pro všechny vzorky bylo menší než 13%.

Koeficient variability (CV) byl pro všechny vzorky při opakování menší než 7% a pro reprodukovatelnost menší než 8% v rámci laboratoře. Přesnost měření je dokumentována v specifických aplikačních protokolech pro daný analyzátor.

Interference

Rozmezí látek, ve kterých interferují při měření, jsou uvedeny v aplikačním protokolu pro daný analyzátor.

Klinický výkon

Shoda – ACL TOP® skupina				
Analyt	N	Lineární regrese	R	Referenční metoda
Protein S	129	$Y = 0,92x + 8,56$	0,940	HemosIL® Protein S

Citlivost/Specifická – ACLT TOP® skupina					
Analyt	N	Citlivost	Specifická	Prostor pod křivkou (ROC)	
Protein S	129	0,97	0,97	0,998	
Analyt	N	PPV	NPV	LR+	LR-
Protein S	129	97%	98%	31,99	0,02

PPV = Předpokládaná hodnota pozitivního výsledku

NPV = Předpokládaná hodnota negativního výsledku

LR+/- = Poměr pravděpodobnosti +/-

REFERENCE:

1. Meireles Rezende S. *et al.* Coagulation, inflammation, and apoptosis : different roles for protein S and the protein S – C4b binding protein complex. *Blood*. 2004.
2. Wypasek E. and Undas Anetta. Protein C and Protein S Deficiency – Practical Diagnostic Issues. *Adv Clin Exp Med*. 2013.
3. Appel IM *et al.* Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty, *J Thromb Haemost*. 2012.
4. Lowe GDO *et al.* Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA survey I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. *Br J Haematol*. 1997.
5. Castoldi E. *et al.* Similar hypercoagulable state and thrombosis risk in type I and type III protein S-deficient individuals from families with mixed type I/III protein S deficiency. *Haematologica*. 2010.
6. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
7. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. *Ann Biol Clin*. 2014.
8. Tanaka K.A. *et al.* The effect of aprotinin on activated protein C-mediated downregulation of endogenous thrombin generation. *Br J Haematol*. 2006.

SYMBOLY:

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