

LIAPHEN™ Free Protein S



REF 120004

R1 4x3 mL, R2 4x4,4 mL

Turbidimetrischer Latex-Immunoassay zur Bestimmung des Freien Protein S:Ag im Plasma, mit gebrauchsfertigen Flüssigreagenzien



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
 www.coachrom.com | info@coachrom.com
 Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
 Kostenfreie Nummern für Deutschland:
 Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

VERWENDUNGSZWECK:

LIAPHEN™ Free Protein S ist ein turbidimetrischer Latex-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung des Freien Protein S-Antigens (Freies Protein S:Ag) in humanem Citratplasma und ist zur automatisierten Durchführung geeignet. Die Reagenzien liegen gebrauchsfertig in flüssiger Form vor.

ZUSAMMENFASSUNG:

Protein S (PS) ist ein Vitamin K-abhängiges Glykoprotein, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird. Seine Konzentration in humanem Normalplasma beträgt ca. 25 µg/mL. Hiervon liegt ca. 40% (d.h. 10 µg/mL) in freier Form vor und 60% (d.h. 15 µg/mL) zirkuliert im Blut als nicht-kovalenter Komplex mit dem C4b-Bindeprotein. Das Gleichgewicht zwischen der freien und der C4b-Bindeprotein-gebundenen Form des Protein S ist von großer Bedeutung, da nur das Freie Protein S als Cofaktor des aktivierten Protein C antikoagulatorisch aktiv ist.

Ein angeborener oder erworbener Mangel an PS stellt einen Risikofaktor für venöse Thromboembolien dar.

In der frühen Phase von Entzündungskrankheiten ist die PS-Konzentration wegen einer Erhöhung des C4b-Bindeproteins erniedrigt. Auch unter anderen Umständen wie während einer Dicoumarol- oder L-Asparaginase-Therapie, bei Lebererkrankungen, nephrotischem Syndrom, während der Schwangerschaft, im Zusammenhang mit der Einnahme von oralen Kontrazeptiva oder Östrogen-therapie, bei viralen Infektionen oder bei DIC kann die PS-Konzentration vermindert sein. Die Konzentration des Freien PS kann auch bei Neugeborenen vermindert sein.

Der hereditäre PS-Mangel wird in drei Typen unterteilt:

Typ I: Verminderte Konzentration des Gesamten und des Freien PS (quantitative Mängel)

Typ II: Verminderte PS-Aktivität, aber normale Antigen-Konzentration (seltener qualitativer Mangel)

Typ III: Normale Konzentrationen des Gesamten PS, aber verminderte Konzentrationen des Freien PS (quantitativer Mangel)

95% der PS-Mängel sind den Typen I und III zuzuordnen.^{1,2,3}

TESTPRINZIP:

LIAPHEN™ Free Protein S ist ein turbidimetrischer Latex-Immunoassay, basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion: Das Freie Protein S:Ag der Probe reagiert mit den Latexpartikeln, die mit zwei monoklonalen Maus-Anti-Freies Protein S-Antikörpern gekoppelt wurden, was zur Agglutination der Latexpartikel führt. Diese Agglutination kann durch Absorptionsmessung direkt detektiert werden. Die Absorptionzunahme ist direkt proportional zur Menge von Freiem Protein S:Ag in der Probe.

IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

R1 Reaktionspuffer, 4 Flaschen mit je 3 mL Flüssigreagenz.

R2 Latexreagenz, 4 Flaschen mit je 4,4 mL Flüssigreagenz.

Die Reagenzien enthalten bovines Serumalbumin (BSA) sowie eine geringe Konzentration an Natriumazid (0,9 g/L), der unten aufgeführte Warnhinweis ist zu beachten.

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- Das Material dieses Testkits enthält Substanzen tierischen Ursprungs und ist als Träger und potentieller Übermittler von Krankheiten zu behandeln.
- Natriumazid kann mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlicher Chargennummer verwendet werden. Die Kombination der Reagenzien ist in Bezug auf die Testcharge optimiert.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, um jegliche Kontamination während der Verwendung zu vermeiden. Um Verdunstung der Reagenzien während der Verwendung soweit wie möglich zu vermeiden, ist die Verdunstungsfläche so gering wie möglich zu halten. Verdunstung verringert die Reagenzstabilität in Analysenautomaten.
- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzflaschen nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Stabilitätsstudien haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Zur in-vitro-Diagnostik.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

- R1 Gebrauchsfertiger Reaktionspuffer
- R2 Gebrauchsfertiges Latexreagenz

Vor Verwendung für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Vor dem Gebrauch durchmischen. Bei dem Latexreagenz ist durch sanftes Schwenken eine Schaumbildung zu vermeiden.

Stabilität der in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Reagenzien unter der Voraussetzung, dass diese nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

- 4 Monate bei 2-8°C.
- 2 Wochen bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Nicht einfrieren

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- Imidazol-Puffer (Art.Nr. AR021A / AR021K / AR021L) zur Probenverdünnung.
- Spezifische Kalibratoren und Kontrollen mit bekannten Freies Protein S:Ag-Werten, gegen den Internationalen Standard (WHO/NIBSC) für Freies Protein S:Ag im Plasma kalibriert, z.B.:

Artikelbezeichnung	Art.Nr.
BIOPHEN™ Kalibrationsplasma Gerinnung	222101
BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Normal“	223201
BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“	223301

Geräte:

- Gerinnungsautomaten für turbidimetrische Immunoassays
- Kalibrierte Pipetten.

PROBENGEWINNUNG:

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind für die USA im CLSI H21-A5⁴ Dokument veröffentlicht).

Proben: Humanes Plasma mit Tri-Natrium Citrat als Antikoagulant.

Blutabnahme: Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

Zentrifugation: Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2500g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.

Lagerung der Plasmaproben bis zu:

- 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate tiefgefroren bei -20°C
- 18 Monate tiefgefroren bei -70°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C aufgetaut, anschließend behutsam gemischt und dann sofort getestet werden. Jegliche Niederschläge sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

LIAPHEN™ Free Protein S wurde als kinetische Methode zur automatisierten Durchführung auf Gerinnungsautomaten entwickelt. Der Test wird bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt, die Agglutinationsentwicklung wird bei 575 nm gemessen (andere Wellenlängen können benutzt werden, vorzugsweise zwischen 540 und 800 nm).

Automatisierte Methoden:

Adaptationsanleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die Besonderheiten der jeweiligen Anwendung und spezifische Warnhinweise für den jeweiligen Automaten sind zu beachten.

Testmethode:

- Die Kalibratoren und Kontrollen sind anhand der spezifischen Packungsbeilagen zu rekonstituieren. Die Kalibrationspunkte sind in einem Bereich zwischen 0 und 150% Freies Protein S:Ag (z.B. 0-10-37,5-75-110-150% Freies Protein S:Ag mit Imidazol-Puffer verdünnt) zu setzen.
- Die Proben, Kalibratoren und Kontrollen werden mittels Imidazol-Puffer wie in der unten stehenden Tabelle verdünnt:

Probe	Art.Nr.	Verdünnung
Kalibrator	222101	3/20
Kontrolle	223201 / 223301	3/20
Probe	n.a.	3/20

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Verdünnte Proben müssen, wenn sie bei Raumtemperatur (18-25°C) gelagert werden, umgehend getestet werden. Die Kalibrator- und Kontroll-Konzentrationen werden für jede Charge exakt gemessen und sind dem jeweiligen Datenblatt zu entnehmen.

- Die folgende Tabelle zeigt beispielhaft das Anwendungsschema für die Sysmex CS-Serie:

Reagenzien	Volumen
Kalibratoren, Proben oder Kontrollen, in Imidazol-Puffer verdünnt im Verhältnis 3:20	10 µL
Imidazolpuffer	10 µL
[R1] Reaktionspuffer	60 µL
Inkubation bei 37°C für 130 Sek.	
[R2] Latexreagenz	100 µL
Mischen und Messen der Absorption (kontinuierlich zwischen 40 und 80 Sek.) bei 575 nm (bei 37°C)	

Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumenta als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Tests zu gewährleisten.

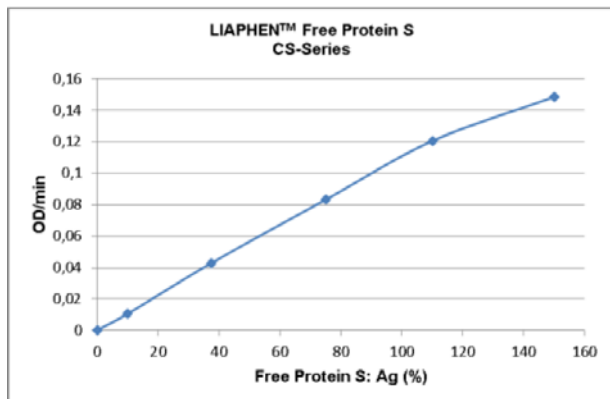
Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, alle durch eigenständige Veränderungen verursachten Auswirkungen auf die Testergebnisse zu überprüfen.

KALIBRATION:

Der LIAPHENT™ Free Protein S Test wird für die Messung von Freiem Protein S:Ag in humanem Plasma kalibriert.

Bei Kalibration nach der Punkt-für-Punkt-Methode von 0-150% ist der Test auf der Sysmex CS-Serie linear bis 150% Freies Protein S:Ag (bei Standardverdünnung).

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve, die auf einem Sysmex CS-5100 erstellt wurde, dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben darf ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessene Kalibrationskurve verwendet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse.

Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen.

Zumindest bei Chargenwechsel, größeren Wartungsarbeiten am Analysenautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen, muss eine Neukalibration erfolgen. Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

ERGEBNISSE:

- Entlang der y-Achse wird die Absorption bei 575 nm und entlang der x-Achse die Freies Protein S:Ag-Konzentration in % aufgetragen.
- Die Freies Protein S:Ag-Konzentration in der Probe leitet sich, sofern die Standardverdünnung genutzt wurde, direkt von der Kalibrationskurve ab.
- Ergebnisse werden in % Freies Protein S:Ag angegeben

- Falls andere Verdünnungen genutzt wurden, wird die gemessene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert (auf der Sysmex CS-Serie kann der Messbereich zwischen 6 und ca. 300 % Freies Protein S:Ag erweitert werden).
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Leistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden. Für die Validierung jeglicher Abweichungen von diesen Anweisungen ist das Labor verantwortlich.
- Jedliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Plasmen, die Gerinnsel oder Anzeichen für Kontaminationen aufweisen, sind zu verwerfen.
- Rheumafaktoren und heterophile Antikörper können zu abnormal hohen Freies Protein S:Ag-Werten führen. Um ihren Einfluss zu minimieren, wurde dieser Testkit durch Zugabe eines Blockierungsreagenzes optimiert (auf dem Sysmex CS-5100 wurden keine signifikanten Effekte für Konzentrationen von Rheumafaktoren ≤ 3000 IE/mL beobachtet). Eine vollständige Beseitigung dieses Einflusses kann jedoch nicht für alle Proben garantiert werden.
- Bzgl. eines möglichen Hook-Effektes, richten Sie sich nach den spezifischen Adaptionsanleitungen für den verwendeten Automaten (auf der Sysmex CS-Serie wurden keine signifikanten Effekte für Freies Protein S:Ag-Konzentration bis 600% beobachtet)
- Für mögliche Einflüsse von Störfaktoren richten Sie sich nach den spezifischen Adaptionsanleitungen für den verwendeten Automaten (auf dem Sysmex CS-5100 wurden keine signifikanten Effekte für Konzentrationen von Heparin ≤ 10 IE/mL, Bilirubin ≤ 60 mg/dL, Hämoglobin ≤ 1000 mg/dL, Intralipid ≤ 1000 mg/dL, Fibrinogen ≤ 12 g/L und Thrombozyten $\leq 490 \times 10^9/L$ beobachtet).

ERWARTETE WERTE:

Der Referenzbereich wurde bei gesunden Erwachsenen (N = 120) gemessen (Zentral 90%, 95. Perzentil) und liegt bei Frauen zwischen 55% und 112% und bei Männern zwischen 64% und 139%. Jedoch sollte jedes Labor seinen eigenen Normbereich festlegen.

Faktoren wie das Alter oder der hormonelle Status beeinflussen die Freies Protein S:Ag-Konzentration im Plasma.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Die untere Nachweisgrenze hängt vom verwendeten Analysensystem ab ($< 0,6\%$ auf dem Sysmex CS-5100).
- Auf der Sysmex CS-Serie liegt der Messbereich zwischen 6 und 300% Freies Protein S:Ag.
- Spezifität: PS-Mangelplasma wurde auf der Sysmex CS-Serie mit $< 6\%$ gemessen. Eine Zugabe von C4b-Bindeprotein zum Plasma senkt die gemessene Freies Protein S:Ag-Konzentration durch eine Erhöhung des C4b-Bindeprotein-gebundenen PS.
- Diese Präzision wurde auf einem Sysmex CS-5100 erstellt. Sie wurde mittels Qualitätskontrolle des Labors über 5 Tage ausgewertet, 2 Läufe pro Tag und 3 Wiederholungen pro Lauf für jedes Kontrollniveau. Die folgenden Daten wurden erhalten:

Kontrolle	Intra-Lauf				Inter-Lauf			
	N	Mittelwert	VK%	SD	N	Mittelwert	VK%	SD
Normal	40	97,7	2,5	2,4	30	95,3	1,2	1,1
Pathologisch	40	29,0	1,8	0,5	30	29,9	1,9	0,6

REFERENZEN:

- 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.
- Wypasek E. and Undas Anetta. Protein C and Protein S Deficiency – Practical Diagnostic Issues. Adv Clin Exp Med. 2013.
- Meireles Rezende S. et al. Coagulation, inflammation, and apoptosis : different roles for protein S and the protein S – C4b binding protein complex. Blood. 2004.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Zeichenerklärungs-Blatt ist zu beachten.