

BIOPHEN™ Protein C LRT

REF 221211

R1 R2 3 x 3 mL



Méthode chromogène pour le dosage fonctionnel de la protéine C plasmatique, avec réactifs liquides prêt à l'emploi.

Français, dernière révision : 01-2023

UTILISATION:

Le coffret BIOPHEN™ Protein C LRT est une méthode chromogène pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité de la Protéine C sur plasma humain citraté en utilisant une méthode manuelle ou automatisée. L'ensemble des réactifs est sous forme liquide prêt à l'emploi (LRT, Liquid Reagent Technology).

RESUME ET EXPLICATION:**Technique :**

La Protéine C est une glycoprotéine, vitamine K dépendante, qui inhibe la coagulation. Sa concentration normale dans le plasma humain est d'environ 4 µg/mL. Activée par le complexe thrombomoduline-thrombine, la Protéine C activée (PCa), en présence de son cofacteur la Protéine S, de calcium et de phospholipides (PPL), va cliver les Facteurs Va et VIIIa, supprimant ainsi toute activité coagulante^{1,2}.

Clinique :

Le dosage de la Protéine C plasmatique peut aider au diagnostic des déficits congénitaux ou acquis en Protéine C^{3,4,5,6,7,8}.

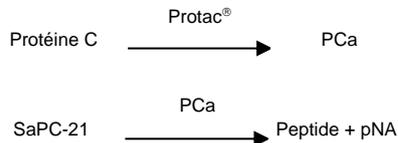
Les déficits acquis s'observent lors des atteintes hépatiques, des traitements AVK ou lors de Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD).

Les déficits congénitaux peuvent être quantitatifs (type I) ou qualitatifs (type II) et sont associés à des thromboses veineuses récidivantes.

Le déficit en Protéine C constitue un facteur de risque de thromboses veineuses³.

PRINCIPE:

Dans le dosage BIOPHEN™ Protein C LRT, la Protéine C plasmatique est dosée après activation spécifique par une enzyme extraite du venin de serpent, le Protac® (Agkistrodom C. Contortrix)^{4,5}. La Protéine C activée hydrolyse le substrat chromogène (SaPC-21) qui libère de la para-nitroaniline (pNA). La quantité de pNA libérée (mesurée par absorbance à 405 nm) est directement proportionnelle à la concentration de Protéine C dans l'échantillon.

**REACTIFS:**

R1 Protac®. Enzyme hautement purifiée extraite du venin de serpent Agkistrodom C. Contortrix, stabilisée, sous forme liquide, capable d'activer spécifiquement la Protéine C. Chaque flacon contient environ 0,32 U/mL de Protac®. Contient de la BSA.

R2 SaPC-21. Substrat chromogène spécifique de la Protéine C activée, stabilisé, sous forme liquide. Chaque flacon contient environ 1,6 mg/mL de SaPC-21. Contient un mélange de 5-Chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Méthyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) et du Chlorure de Césium.

R1 R2 3 flacons de 3 mL.

Le taux de Protac® peut varier de lot à lot et est ajusté exactement pour chaque lot de réactif.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- Toute précaution doit être prise pour éviter tout risque d'ingestion et d'introduction accidentelle de **R1** (Protac®) dans l'organisme. En cas de contact avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de contact avec une plaie, contacter un service médical compétent en précisant la nature et l'origine biologique du produit.
- Veuillez consulter la Fiche de Données de Sécurité (FDS), disponible sur www.hyphen-biomed.com.
- R2** (SaPC-21) – Sensibilisant cutané (Cat 1, H317), Reprotoxique (Cat 2, H361f)
 - P201: Se procurer les instructions avant utilisation.
 - P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 - P302+P352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
 - P308+P313: EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.
 - P333+P313: En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.

- P405: Garder sous clef.
- P501: Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale et nationale
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Le dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

R1 R2 Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser, en évitant la formation de mousse, et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

R1 R2 La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 5 semaines à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:**Réactifs:**

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Solution saline (0,9% NaCl).
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes en plastique ou microplaque.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5¹⁰ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{10,11,12}.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est mesurée à 405nm.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans la solution saline comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en Protéine C).

La dilution au 1/2 correspond à la concentration (C) en PC indiquée, et le 3/4 à 1,5 fois cette concentration (3C/2).

La gamme d'étalonnage peut alors être préparée comme suit :

% Protéine C	3C/2	C	C/2	C/4	0
% Protéine C	150	100	50	25	0
Volume Etalon	150µL	250µL	250µL	125µL	0µL
Volume solution saline	50µL	250µL	750µL	875µL	1000µL

2. Diluer les échantillons et contrôles dans la solution saline comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Dilution
Contrôle	223201 / 223301	1/2
Echantillons	n.a	1/2

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C :

	Microplaque	Volume
Echantillon, contrôle ou étalon dilués	25 µL	50 µL
R1 Protac® Préincubé à 37°C	100 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 5 minutes puis introduire :		
R2 SaPC-21 Préincubé à 37°C	100 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C exactement pendant 5 minutes		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%)*	100 µL	200 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures. Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), R2, R1, échantillon dilué. Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Faire un blanc plasma si l'échantillon est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

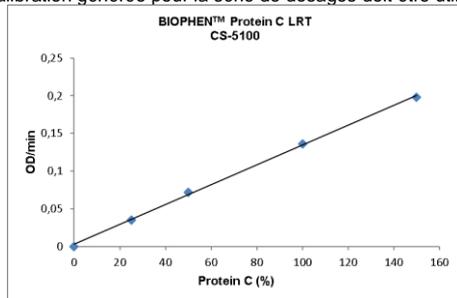
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ Protein C LRT peut être calibré pour le dosage de l'activité de la Protéine C. L'étalon couvrant la zone calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- La zone de calibration est environ de 0 à 150%.

La courbe de calibration ci-dessous, est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTROLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration lin-lin, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de Protéine C en %. Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration de Protéine C (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- L'aprotinine inhibe la Protéine C activée. L'activité "apparente" de la Protéine C est diminuée chez les patients traités par l'aprotinine⁹.
- La présence d'anticorps anti-Protéine C humaine dans le plasma peut inhiber l'activité amidolytique lors du dosage.

VALEURS ATTENDUES:

Le taux plasmatique de Protéine C chez l'adulte sain est généralement compris entre 70 et 140% en étude interne. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé (<1,8% sur Sysmex CS-5100).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 7 à 200% de Protéine C sur Sysmex CS-series).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 20 jours, 2 séries par jour et 3 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
	N	Moy.	CV%	SD	n	Moy.	CV%	SD
Contrôle 1	40	35.7	2.2	0.8	120	36.3	2.4	0.9
Contrôle 2	40	81.2	1.5	1.2	120	84.1	2.0	1.7

- Selon le principe de dosage, aucune interférence aux anticoagulants anti-Xa et anti-IIa, tels que Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban, Dabigatran ou HNF aux concentrations usuelles, n'est attendue.
- Corrélation avec une autre méthode (Berichrom Protein C Kit (Siemens) vs BIOPHEN™ Protein C LRT sur Sysmex CS-5100) :
n = 114 y = 1,04x - 4,04 r = 0,979
- Interférences :
Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes:

Hémoglobine	Bilirubine (L/C)	Intralipides
500 mg/dL	60 mg/dL	1000 mg/dL

Se référer aussi au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

- 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. Déficiences de Protéine C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet. 1982.
- Esmont 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 – Pratical 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.

SYMBOLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

- R2** H317 : Peut provoquer une allergie cutanée
- H361f: Susceptible de nuire à la fertilité

Changements par rapport à la précédente version.