BIOPHEN Protein C (LRT)
Art.Nr. 221211

Chromogene Methode zur Bestimmung der Protein C-Aktivität im Plasma mit flüssigem Fertigreagenz

CE

In vitro-Diagnostikum

HYPHEN BioMed

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:

BIOPHEN Protein C (LRT) ist ein Test zur chromogenen Bestimmung der Protein C-Aktivität in humanem Citratplasma [1,2] mit automatisierten oder manuellen Methoden. Alle Reagenzien liegen gebrauchsfertig in flüssiger Form vor (LRT = „Liquid Reagent Technology").

KLINISCHE BEDEUTUNG:

Bestimmung der Protein C-Aktivität zur Diagnose eines angeborenen oder erworbenen Mangels an Protein C [3,4,5,6]. Angeborener oder erworbener Mangel an Protein C stellt einen Risikofaktor für venöse Thrombosen dar.

TESTPRINZIP:

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges humanes Protein, das die Gerinnung durch spezifische Spaltung der Faktoren Va und VIIIa inhibiert und somit reguliert. Dadurch wird die prokoagulatorische Aktivität dieser Kofaktoren unterdrückt [1,2]. BIOPHEN® Protein C (LRT) ist eine chromogene Methode, bei der vorhandenes Protein C durch die Zugabe von Protac®, einem Enzym aus Schlangengift (Agkistrodon contortrix), spezifisch aktiviert wird [4,5]. Das dabei entstehende APC (aktiviertes Protein C) spaltet das zugesetzte, spezifische, chromogene Substrat SaPC-21. Dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) freigesetzt. Die Menge des freigesetzten pNA ist direkt proportional zur Protein C-Aktivität. Die Farbentwicklung wird bei 405nm gemessen.

$$\text{Protein C} \xrightarrow{\text{Protac®}} \text{APC}$$

$$\text{SaPC-21} \xrightarrow{\text{APC}} \text{Peptide + pNA}$$

IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Protac® (Aktivator)
Hochgereinigtes Enzym aus dem Schlangengift von Agkistrodon contortrix zur spezifischen Aktivierung von Protein C, stabilisiertes Flüssigreagenz:
3 Flaschen mit je 3 ml, etwa 0,32 U/ml Protac® (gebrauchsfertig).

R2: Reagenz 2: SaPC-21 (Chromogenes Substrat)
Chromogenes Substrat, spezifisch für aktiviertes Protein C (SaPC-21), Flüssigreagenz:
3 Flaschen mit je 3 ml, etwa 1,6 mg/ml SaPC-21 (gebrauchsfertig).

Anmerkungen:
- Alle nötigen Vorsichtsmaßnahmen müssen ergriffen werden, um das Verschlucken von R1 (Protac®) zu vermeiden. Bei Kontakt mit der Haut ist die betroffene Stelle gründlich mit Wasser zu reinigen. Bei Kontakt mit einer offenen Wunde wenden Sie sich an einen Arzt und informieren Sie ihn über den Ursprung des Produktes.
- Enthält als Konservierungsmittel geringe Mengen Natriumazid (<1 g/l), welches mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren kann. Bei Entsorgung der Lösung in den Abguss muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.
- Die Protac®-Konzentration kann von Charge zu Charge variieren, wird jedoch für jede Charge exakt bestimmt.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kitchargen nicht miteinander mischen.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- aqua dest,
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- Plasma Kalibrator (z.B. BIOPHEN® Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101).
  oder sonstiges Referenzmaterial (internationaler NIBSC Standard oder interner Standard) mit bekannter Protein C-Aktivität.
- Normal- und Abnormal- Kontrollplasmen (z.B. BIOPHEN® Normal Kontrollplasma, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN® Abnormal Kontrollplasma, Art.Nr. 223301).

Material:

- Spektrophotometer, Photometer oder Gerinnungsautomat für chromogene Tests mit einer Wellenlänge von 405nm.
- Stoppuhr.
- Geeichte Pipetten.

LAGERUNG:

Ungeöffnete BIOPHEN Protein C (LRT)-Reagenzien müssen bei 2-8 °C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

Anmerkung: Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Reagenzien bei Raumtemperatur versendet werden können.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Anmerkung: Die gerätespezifische Adaptionsanleitung ist zu beachten.

R1: Reagenz 1: Protac® (Klare Flasche)
Gebrauchsfertiges Flüssigreagenz. Um eine homogene Reaktivität zu gewährleisten, vor Verwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und durchmischen.

R2: Reagenz 2: Chromogenes Substrat, spezifisch für aktiviertes Protein C (SaPC-21) (Braune Flasche)
Gebrauchsfertiges Flüssigreagenz. Um eine homogene Reaktivität zu gewährleisten, vor Verwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und durchmischen.

Stabilität der in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Reagenzien 1 (Protac®) und 2 (SaPC-21) unter der Voraussetzung, dass diese nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

- 5 Wochen bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).

Vorsichtsmaßnahmen:
- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzien nach Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden (weiße Kappe für Protac®, gelbe Kappe für SaPC-21).
- Um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden, sind die Reagenzien sorgfältig zu handhaben.
- Falls das Substrat eine Gelbfärbung aufweist, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche muss verwendet werden.
- Die 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur ermöglicht eine Stabilisierung der Reagenzien und gewährleistet eine homogene Reaktivität.
- Um Verdunstung der Reagenzien zu vermeiden, können Reduzierstücke für den Flaschenhals verwendet werden.

Anmerkung:

Die festgelegten reaktiven Verhältnisse von R1 und R2 müssen entsprechend der verwendeten Automatenmethode genau eingehalten werden.

PROBENGEWINNUNG:

Gewinnung: Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulanz (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei jegliche Gerinnungsaktivierung vermieden werden muss.

Zentrifugation: Die Trennung von Plasma und Thrombozyten mittels Zentrifugation ist ein wichtiger Schritt, der bei Verwendung von Citrat-Blutabnahmeröhrchen innerhalb einer Stunde und bei Verwendung von Kunststoffröhrchen innerhalb von 4 Stunden erfolgen muss.

Um ein plättchenarmes Plasma zu erhalten, ist eine validierte Labormethode zu nutzen wie eine Zentrifugation für mindestens 15 Minuten bei 2000 g bei Raumtemperatur (18 bis 25°C). Das Plasma wird anschließend mit einer nichtaktivierenden Plastikpipette in ein Plastikröhrchen überführt.

Lagerung der Plasmaproben bis zu:

4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
1 Monat tiefgefroren bei -20°C oder
24 Monate bei -70°C

Anmerkung: Weitere Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im NCCLS/CLSI Dokument H21-5 veröffentlicht.

TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN Protein C (LRT) kann sowohl als automatisierbare kinetische Methode, wie auch als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. Anleitungen für verschiedene Gerinnungs-automaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405nm gemessen.

KALIBRATION:

BIOPHEN Protein C (LRT) kann mit kommerziell verfügbarem Kalibrationsplasma (z. B. BIOPHEN Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101), internem bzw. internationalem Referenzplasma mit einer bekannten Protein C-Aktivität („C") oder einem gepoolten Normalplasma (zusammengeführt aus Citratplasma von mindestens 30 medikationsfreien, gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren und mit einer Protein C-Aktivität von 100 % definiert) kalibriert werden.

Die Kalibratorverdünnungen werden wie folgt hergestellt:

% Protein C	Plasma Kalibrator (µl)	Phys. Kochsalzlösung (µl)
0	0	500
C:4	125	375
C:2	250	250
C	500	0

Für einen Kalibrationspunkt mit 150% wird der 100% Kalibrator („C") im Testansatz entsprechend geringer (3:4) verdünnt*.
Um die volle Effizienz des Testes zu gewährleisten, muss die Kalibration binnen einer Stunde nach Herstellung der Kalibratorverdünnungen durchgeführt werden.

TESTPROTOKOLL:

Manuelle Methode:

Die zu testenden Proben, Kontrollen und Kalibratorverdünnungen werden 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% Natriumchlorid) verdünnt.

In Mikrotiterplatten oder Teströhrchen, die jeweils bei 37 °C präinkubiert sind, wird nach folgendem Schema zugegeben:

Reagenz	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Kalibratoren, Kontrollen od. Testplasma, 1:2 verdünnt*	25 µl	50 µl
R1: Protac® präinkubiert bei 37 °C	100 µl	200 µl
Mischen und für 5 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R2 : SaPC-21 Substrat präinkubieren bei 37 °C	100 µl	200 µl
Mischen und für 5 Minuten bei 37°C inkubieren		
Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von:		
Essigsäure (20%) oder Zitronensäure (2%)	100 µl	200 µl
Mischen und die optischen Dichte bei 405nm gegen den entsprechenden Probenleerwert messen.		

*Für die 150% Protein C-Aktivität werden 18,75 µl Plasma und 6,25 µl Kochsalzlösung in die Mikrotiterplatte oder 37,5 µl Plasma und 12,5 µl Kochsalzlösung in ein Teströhrchen pipettiert.

Die gebildete Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten d.h. Essigsäure (20%) oder Zitronensäure (2%), SaPC-21 Substrat, Protac®, verdünntes Plasma. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405nm (A_{405}) ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Automatisierte Methode:

Ausführliche Anleitungen inklusive Reagenzvorbereitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Anmerkungen:
- Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reaktionsvolumina eingehalten werden.
- Für hoch -lipämische, -ikterische oder -hämolytische Plasmen, sowie für Plasmen, deren „Färbung" abweicht, müssen Probenleerwerte gemessen werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibration bzw. der homogenen Reaktivität des BIOPHEN® Protein C (LRT) Tests von Analyse zu Analyse. Es sind verschiedene Qualitätskontrollen erhältlich:

BIOPHEN® Normal Kontrollplasma, Art.Nr. 223201
BIOPHEN® Abnormal Kontrollplasma, Art.Nr. 223301

Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

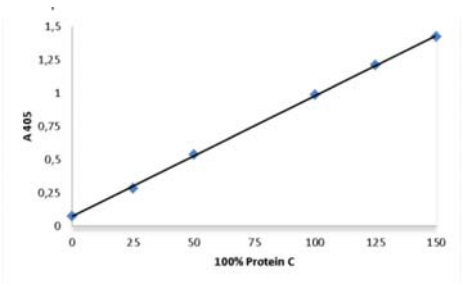
Anmerkung: Eine neue Kalibrationskurve muss bei Wechsel der Testkitcharge, größeren Wartungsarbeiten am Messgerät und wenn die gemessenen Werte außerhalb des zu erwartenden Bereiches liegen, erstellt werden. Jedes Labor kann, entsprechend der verwendeten Testvorschriften und Geräte, eigene Vertrauensbereiche festlegen. Bei jeder Testserie ist eine Qualitätskontrolle (mit unterschiedlichen Werten) zu inkludieren.

ERGEBNISSE:

- Bei der Endpunktmethode wird auf linearem Millimeterpapier die Protein C-Aktivität in Prozent (x-Koordinate) gegen die korrespondierende Absorption A_{405} (y-Koordinate) aufgetragen.
- Die Kalibrationskurve wird gezeichnet und r^2 kalkuliert. Ist $r^2 \geq 0{,}98$ und liegen die Messwerte der Kontrollen innerhalb der Akzeptanzgrenzen, ist die Kalibration gültig. Bei der manuellen Methode im Teströhrchen liegt der Absorptionsbereich zwischen 0 für den 0% PC und 0,90 (± 0,15) für den 100% PC Kalibrator. In der Mikrotiterplatten Methode liegen die Absorptionen generell etwas niedriger. Bei den automatisierten Methoden sind die Absorptionen abhängig vom verwendeten Gerinnungsautomaten.
- Die Protein C-Aktivität der zu testenden Probe wird direkt von der Kalibrationskurve abgelesen. Die Ergebnisse werden in % Protein C angegeben.
- Der Messbereich liegt zwischen 0 und 100% und kann bis auf 150% Protein C-Aktivität erhöht werden. Bei einer 1:2 Probenverdünnung kann die Protein C-Aktivität direkt an der Kalibrationskurve abgelesen werden. Bei abweichender Probenverdünnung müssen die Ergebnisse mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.
- Bei der Verwendung von Gerinnungsautomaten wird die Protein C-Aktivität in Bezug auf die Kalibrationskurve und Probenverdünnung direkt vom Automaten berechnet.
- Alternativ können Statistik-Software-Programme zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung verwendet werden. Das Verhältnis zwischen Protein C-Aktivitäten und Extinktionen (A_{405}) ist direkt proportional.

BEISPIELKALIBRATION:

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben darf ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessene Kalibrationskurve verwendet werden.



LEISTUNGSMERKMALE:

- Dynamischer Bereich: 0 bis 150% (0 bis 1,5 IE/ml) Protein C-Aktivität.
- Die Nachweisgrenze wird durch die „scheinbare" Protein C-Aktivität definiert. Diese entspricht der mittleren Gerinnungszeit eines PC-Mangelplasmas plus 3 Standardabweichungen. Die Nachweisgrenze liegt bei ≤ 5%.
- Reproduzierbarkeit: Inter Assay-VK ≤2%.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Eine signifikante Beeinflussung des Testes durch Heparin-Konzentrationen bis 1 IE/ml, Bilirubin-konzentrationen <0,28 mg/ml, Hämoglobinkonzentrationen <1,5 mg/ml und Triglyzerid-konzentrationen <3 mg/ml, wurde nicht beobachtet.
- Da Aprotinin aktiviertes Protein C inhibiert, erscheint die Protein C-Aktivität bei Patienten unter Aprotiningabe herabgesetzt [7].
- Das Vorhandensein von anti-Human Protein C-Antikörpern im Plasma kann die amidolytische Aktivität von aktiviertem Protein C inhibieren.
- Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.

ERWARTETE WERTE:

100% Protein C entspricht der Aktivität in normalem, humanen Plasma, zusammengeführt aus Citratplasma von mindestens 30 medikationsfreien, gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren. Gewöhnlich liegt die Protein C-Aktivität bei Erwachsenen geschlechts- und altersunabhängig zwischen 70 und 140%.

Die Protein C-Aktivität ist bei Neugeborenen aufgrund der hepatischen Unreife niedriger.

KLINISCHE VARIATIONEN:

- Eine Protein C-Aktivität ≤60% weist auf einen Mangel hin und muss mit einem weiteren Test oder durch Testung einer neuen Plasmaprobe bestätigt werden [6].
- Die Protein C-Aktivität ist während einer Anti-Vitamin K (Dicoumarol) Therapie, bei hepatischen Erkrankungen, bei DIC oder bei Vorhandensein eines angeborenen oder erworbenen Mangels herabgesetzt.

KLINISCHE INFORMATIONEN:

Ein Protein C Mangel kann:

- Erworben sein: Beobachtet bei hepatischen Erkrankungen, während einer Dicoumaroltherapie oder bei DIC.
- Angeboren sein: Es zeigt sich ein Zusammenhang von rezidivierenden, venösen Thrombosen. Ein Protein C Mangel kann quantitativ (Typ I) oder qualitativ (Typ II) auftreten.

REFERENZEN:

1. Horellou M.H., Van Dreden P., Conard J., Samama M.: Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux. Feuil. Biol., 26,27-31, (1985).
2. Stenflo J.: Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis, 10,2, 109-121, (1984).
3. Manucci P.M., Vignano S.: Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet, 2, 463-467, (1982).
4. Esmon C.T., Esmon N.L.: Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis, 10, 2, 122-133, (1984).
5. Axner T. and Vaasjoki R. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistridom Concortrix venom. Thromb. Haemostasis 59, 40-44 (1988).
6. Pabinger I.: Clinical relevance of Protein C. Blut 53, 63-75 (1986).
7. Wendel H.P et al. Aprotinin in therapeutic doses inhibits chromogenic peptide substrate assays for Protein C. Thromb. Res 74, 543-548 (1994).