



# BIOPHEN™ Protein C 5

REF 221205

R1 R2 4 Flaschen mit 5 mL

### VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN™ Protein C 5 ist ein chromogener Testkit zur quantitativen *in-vitro*-Bestimmung der Protein C (PC)-Aktivität in humanem Citratplasma mit manueller oder automatisierter Methode. Er dient dem Nachweis eines PC-Mangels bei Patienten mit Verdacht auf angeborenen oder erworbenen PC-Mangel. Dieses Produkt ist zur *in-vitro*-Diagnostik in professionellem Laborgebrauch vorgesehen.

### ZUSAMMENFASSUNG:

#### Technisch:

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges humanes Glykoprotein, das die Gerinnung inhibiert. Gewöhnlich liegt die PC-Konzentration in humanem Plasma bei ca. 4 µg/mL. Durch den Thrombomodulin-Thrombin-Komplex aktiviert, spaltet aktiviertes PC (APC) in Anwesenheit seines Co-Faktors Protein S, Calcium und Phospholipiden die Faktoren Va und VIIIa. Dadurch wird die prokoagulatorische Co-Faktoren-Aktivität von Faktor Va und VIIIa unterdrückt.<sup>1,2</sup>

#### Klinisch:

Die Bestimmung von PC in humanem Plasma dient zur Diagnose eines angeborenen oder erworbenen PC-Mangels.<sup>3,4,5,6,7,8</sup>

Erworbene PC-Mängel werden bei Lebererkrankungen, während einer VKA-Therapie oder bei intravasalen Koagulopathien (DIC) beobachtet. Angeborene PC-Mängel können quantitativ (Typ I) oder qualitativ (Typ II) sein.

Ein PC-Mangel ist ein Risikofaktor für venöse Thrombosen<sup>3</sup>.

Die PC-Konzentration variiert mit dem Alter (erniedrigt bei Neugeborenen und Kindern).<sup>8</sup>

### TESTPRINZIP:

BIOPHEN™ Protein C 5 ist eine chromogene Methode, bei der vorhandenes Protein C durch die Zugabe von Protac®, einem Enzym aus Schlangengift (Agkistrodon C Contortrix), spezifisch aktiviert wird<sup>4,5</sup>. Das dabei entstehende APC (aktiviertes Protein C) spaltet das zugesetzte chromogene Substrat (SaPC-21). Dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) aus dem chromogenen Substrat freigesetzt. Die Menge des freigesetzten pNA (Messung über die Absorption bei 405 nm) ist direkt proportional zur PC-Konzentration in der Probe.

### IM TESTKIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

**R1 Protac®** (ca. 0,32 E/mL). Gereinigtes Enzym, aus dem Schlangengift der Agkistrodon C Contortrix extrahiert, lyophilisiert und stabilisiert, zur spezifischen Aktivierung von PC. Enthält BSA und Stabilisatoren.

**R2 SaPC-21** (ca. 1,6 mg/mL). Chromogenes Substrat, spezifisch für APC, lyophilisiert. Enthält Cäsiumchlorid und Stabilisatoren. H361f: Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

Die Protac®-Konzentration kann von Charge zu Charge variieren, aber wird für jede neue Reagenzcharge exakt angepasst.

### ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Für die Herstellung der Reagenzien wird Material tierischen Ursprungs verwendet. Daher müssen diese mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potenziell infektiös gehandhabt werden.
- Bitte beachten Sie das auf [www.coachrom.com](http://www.coachrom.com) abrufbare Sicherheitsdatenblatt.
- R2** SaPC-21 – Reproduktionstoxizität (Kategorie 2, H361f)
  - P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
  - P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
  - P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
  - P405: Unter Verschluss aufbewahren.
  - P501: Inhalt/Behälter in Absprache mit dem regionalen Entsorger zuführen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.

### VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

Die Gummistopfen der Flaschen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden.

**R1 R2** Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 5 mL **aqua dest.** rekonstituieren.

Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen und dabei Schaumbildung vermeiden, gemäß Applikationsanleitung auf den Gerinnungsautomaten laden.

*Manuelle Methode: 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.*

### LAGERUNG UND STABILITÄT:

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

**R1 R2** Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 3 Monate bei 2-8°C
- On Board-Stabilität – siehe gerätespezifische Applikation

Eine Gelbfärbung des Substrats deutet auf Kontamination hin. Die betroffene Flasche muss entsorgt und eine neue verwendet werden.

### ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENTHALTEN SIND:

- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- Kalibrationsplasma (z.B. BIOPHEN™ Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101)
- Normal- und Abnormalkontrollplasmen (z.B. BIOPHEN™ Normal Kontrollplasma, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN™ Abnormal Kontrollplasma, Art.Nr. 223301)
- Gerinnungsautomat für chromogene Tests, z.B. STA-R®-Serie
- Labormaterialien

### PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig mit 0,109 M Citrat (3,2%) als Antikoagulant (1 Volumenteil) durch Venenpunktion abgenommen.

Die Gewinnung, Vorbereitung und Lagerung der Proben hat gemäß aktuellen lokalen Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im CLSI-Dokument H21-A5<sup>10</sup> veröffentlicht). In Bezug auf die Lagerung des Plasmas sind die Referenzen zu beachten.<sup>10,11,12</sup>

### TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Testkit kann sowohl als automatisierbare kinetische Methode wie auch als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. Der Test wird bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

**Automatisierte Methoden:** Adaptionenleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die Besonderheiten der jeweiligen Anwendung und spezifische Warnhinweise für den jeweiligen Automaten sind zu beachten.

### Manuelle Methode:

1. Die Kalibratoren und Kontrollen sind anhand der spezifischen Inserts zu rekonstituieren. Der Kalibrator wird 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um die C% Konzentration zu erhalten (gemäß Definition 100% für ein gepooltes Normalplasma oder C% für einen kommerziell verfügbaren Kalibrator). Anschließend wird die Kalibrationskurve wie unten beschrieben erstellt ("C" definiert die Protein C-Konzentration):

Kalibrator (Art.Nr. 222101) % Protein C	C	C:2	C:4	0
Kalibrator (1:2 verdünnt)	500 µL	250 µL	125 µL	0 µL
Kochsalzlösung (0,9% NaCl)	0 µL	250 µL	375 µL	500 µL

2. Die Proben sind wie unten beschrieben in Kochsalzlösung zu verdünnen:

	Art.Nr.	Verdünnung
Kontrollen	223201 / 223301	1:2
Proben	n.a.	1:2

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mit Qualitätskontrollen zu testen. Sofern sie bei Raumtemperatur (18-25°C) gelagert werden, sind die verdünnten Proben rasch zu testen. Die exakten chargenspezifischen Werte der Kalibratoren und Kontrollen sind dem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.

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

	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Proben, Kalibratoren oder Kontrollen, 1:2 verdünnt	25 µL	50 µL
<b>R1 Protac®</b> präinkubiert bei 37°C	100 µL	200 µL
Mischen und für 5 min bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
<b>R2 SaPC-21</b> präinkubiert bei 37°C	100 µL	200 µL
Mischen und für exakt 5 min bei 37°C inkubieren		
Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von:		
Zitronensäure (2%)*	100 µL	200 µL
Mischen und Messen der optischen Dichte bei 405nm gegen den entsprechenden Probenleerwert.		

\*Oder Essigsäure (20%). Die gebildete Gelbfärbung ist 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure (2%), R2, R1, verdünnte Probe.

Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm (A405) ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Bei lipämischem, ikterischem oder hämolysiertem Plasma, oder bei unüblicher Färbung ist eine Leerprobe durchzuführen.

Falls die verwendete Methode andere Reagenzienvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen und Reagenzolumina genau eingehalten werden, um eine optimale Testleistung zu gewährleisten. Der Benutzer ist für die Validierung jeglicher Änderungen und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse verantwortlich

**QUALITÄTSKONTROLLE:**

Die Verwendung von Kontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Methodenkonformität und der homogenen Reaktivität des Tests.

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 unter den eigenen Testbedingungen seine Akzeptanzbereiche festlegen und die erwartete Testleistung verifizieren.

**ERGEBNISSE:**

- Bei der manuellen Endpunktmethode ist die Konzentration, ausgedrückt in % Protein C, auf der x-Achse (Abszisse) gegen die korrespondierende Absorption (A405) auf der y-Achse (Ordinate) aufgetragen. Bei Anwendung der kinetischen Methode ist ΔA405 anstelle von A405 zu verwenden.
- Sofern die Standardverdünnung verwendet wird, leitet sich die PC-Konzentration in % in der Probe direkt von der Kalibrationskurve ab.
- 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.
- Jedes Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Alle auffälligen Proben und jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden.
- Da Aprotinin APC inhibiert, erscheint die PC-Aktivität bei Patienten unter Aprotinigungabe herabgesetzt.<sup>9</sup>
- Das Vorhandensein von Anti-Human Protein C-Antikörpern im Plasma kann die amidolytische Aktivität von aktiviertem Protein C inhibieren.
- Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, Modifikationen in Bezug auf diese Gebrauchsanweisung oder eine Verwendung der Reagenzien auf Gerinnungsautomaten, die von dieser Gebrauchsanweisung oder der von HYPHEN BioMed zur Verfügung gestellten Applikationsanleitung abweicht, zu validieren.
- Ein unerwartet abnormales Ergebnis sollte durch eine andere Methode und/oder eine andere Probe bestätigt werden. Es sollte im klinischen Kontext des Patienten beurteilt werden.<sup>6,8</sup>

**ERWARTETE WERTE:**

Gewöhnlich liegt die PC-Konzentration bei Erwachsenen zwischen 70 und 140%. Jedes Labor muss jedoch seinen eigenen Normalbereich bestimmen.

**LEISTUNGSMERKMALE:**

- Die folgenden Leistungsdaten stellen typische Ergebnisse dar und sollten nicht als Spezifikationen für BIOPHEN™ Protein C 5 betrachtet werden.
- Die Nachweisgrenze der Methode wird durch Messung der „scheinbaren“ A405 einer Probe mit PC-Mangel plus 3 Standardabweichungen ermittelt. Sie liegt bei ≤ 5%.
- Der Arbeitsbereich des Testes reicht von 5 bis 140%.
- Beispielwerte für die Intra-Assay- und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit der Methode, gemessen mit Proben mit unterschiedlichen PC-Konzentrationen:

Proben	Protein C-Konzentration %	Intra-Assay VK%	N	Inter-Assay VK%	N
Probe 1	98	0,37	9	1,26	12
Probe 2	59	1,17	10	1,97	12
Probe 3	39	0,84	10	1,51	12

- Korrelation: COAMATIC® Protein C vs. BIOPHEN™ Protein C 5 auf BCS:  
n = 21    y = 1x + 0,8463    r = 0,998

- **Interferenzen:** Es ist die spezifische Anwendungsanleitung des verwendeten Automaten zu beachten.

**REFERENZEN:**

1. Horellou M.H: Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux. Feuil. Biol. 1985.
2. Stenflo J.: Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
3. Manucci P.M.: Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet. 1982.
4. Esmon C.T.: Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
5. Exner T.: Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistridom Concortrix venom. Thromb. Haemostasis. 1988.
6. Pabinger I.: Clinical relevance of Protein C. Blut. 1986.
7. Wypasek E. and Undas Anetta. Protein C and Protein S Deficiency – Pratical Diagnostic Issues. Adv Clin Exp Med. 2013.
8. 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.
9. Wendel H.P. *et al.* Aprotinin in therapeutic doses inhibits chromogenic peptide substrate assays for Protein C. thromb. Res. 1994.
10. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline. 2008.
11. Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
12. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

**Änderungen im Vergleich zur Vorversion**

Auf der Kennzeichnung des Produkts können sich die folgenden Symbole befinden:

<b>REF</b> Catalogue number	<b>LOT</b> Batch code	<b>IVD</b> <i>In-vitro</i> diagnostic medical device
<b>Rx</b> Numerical < x> identification of reagent	See instructions for use	<b>WHO STD</b> WHO standard code
Temperature limitation	Manufacturer	YYYY-MM-DD Use by
<b>CE</b> CE marking of conformity	Reconstitution volume	<b>CONTENTS</b> Contents
<b>Cx</b> Numerical < x> identification of control	See instructions in Method Application guide	<b>CONTAINS</b> Contains
<b>EXP</b> Expiration date	Contains sufficient for <n> tests	<b>UNIT</b> Measurement unit
<b>TARGET VALUE</b> Target Value	Keep away from sunlight and heat	<b>CALx</b> Numerical < x> identification of calibrator
<b>ACCEPTANCE RANGE</b> Acceptance range	Biological risks	