



BIOPHEN Protein C 5

Ref 221205

(R1, R2: 4 x 5 mL)



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

Chromogene Methode zur Bestimmung von Protein C im Plasma

VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN Protein C 5 ist ein Test zur chromogenen *in-vitro*-Bestimmung der Protein C-Aktivität in humanem Citratplasma^{1,2} mit automatisierten oder manuellen Methoden.

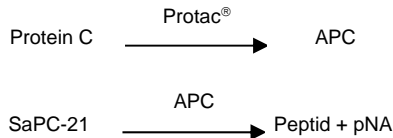
ZUSAMMENFASSUNG:

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}.

Die Bestimmung der Protein C-Aktivität in humanem Plasma dient zur Diagnose eines angeborenen oder erworbenen Mangels an Protein C^{3,4,5,6}. Ein Mangel an Protein C stellt einen Risikofaktor für venöse Thromboembolien dar.

TESTPRINZIP:

BIOPHEN PC 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^{4,5}. Das dabei entstehende APC (aktiviertes Protein C) spaltet das zugesetzte spezifische Substrat SaPC-21. Dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) aus dem chromogenen Substrat freigesetzt. Die Menge des freigesetzten pNA korreliert mit der Protein C-Aktivität. Die Farbentwicklung wird bei 405 nm gemessen.



IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

R1: Protac[®]. Gereinigtes Enzym zur spezifischen Aktivierung von Protein C aus dem Schlangengift der Agkistrodon C Contortrix, lyophilisiert und stabilisiert. Jede Flasche enthält etwa 1,60 U Protac[®]. Das Reagenz enthält bovines Serumalbumin (BSA).

4 Flaschen mit je 5 mL

R2: SaPC-21. Chromogenes Substrat, spezifisch für aktiviertes Protein C, lyophilisiert. Jede Flasche enthält etwa 8 mg SaPC-21.

4 Flaschen mit je 5 mL

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- 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 ihn über den Ursprung des Produktes.
- Die Protac[®]-Konzentration kann von Charge zu Charge abweichen, wird jedoch für jede Charge exakt bestimmt.
- 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.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- 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 für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Das zur Herstellung des bovines Serumalbumins (BSA) verwendete bovine Plasma wurde mit dokumentierten Methoden auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet, insbesondere auf den bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) verursachenden Erreger.
- Bei lipämischem, ikterischem oder hämolysiertem Plasma, oder bei unüblicher Färbung ist eine Leerprobe durchzuführen.
- Bei der kinetischen Methode ist ΔOD_{405nm} anstatt OD 405nm zu verwenden.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Die Reagenzflaschen sind unter Vakuum verschlossen. Die Verschlüsse sind vorsichtig zu entfernen, um einen Verlust an Reagenz beim Öffnen zu vermeiden.

R1: Protac[®]

R2: SaPC-21

Den Inhalt jeder Reagenzflasche mit exakt 5 mL aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen und dabei gelegentlich schütteln. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

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

- 3 Monate bei 2-8°C.
- 3 Tage 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.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- Kalibrations- und Kontrollplasmen mit bekannten Werten wie z.B.:

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

Geräte:

- Photometer oder Gerinnungsautomaten zur Bestimmung chromogener Teste.
- Stoppuhr, geeichte 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 Dokument H21-A5⁸ 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.

Zentrifugation: Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat 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).
- 1 Monat tiefgefroren bei -20°C oder
- 24 Monate bei -70°C

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

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: Adoptionsanleitungen 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	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. 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
R1: Protac® präinkubiert bei 37°C	100 µL	200 µL
Mischen und für 5 min bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R2: SaPC-21 Substrat 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.

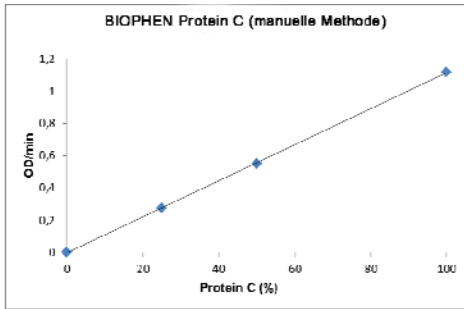
Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm (A405) ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

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

KALIBRATION:

BIPHEN Protein C 5 kann für die Messung von Protein C kalibriert werden. Spezielle Kalibratoren, die den dynamischen Bereich des Tests abdecken, sind bei HYPHEN BioMed erhältlich (siehe Abschnitt **ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND**) und können für die Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden.

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



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasma ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen 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 Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

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.
- Wenn die Standardverdünnung verwendet wird, wird die Protein C-Konzentration in der Probe direkt von der Kalibrationskurve abgelesen. Die Ergebnisse werden in % Protein C angegeben.
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Testleistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden. Für die Validierung jeglicher Änderungen dieser Anweisungen ist das Labor verantwortlich.
- Alle Reagenzien, die ein ungewöhnliches Aussehen oder Anzeichen für Kontaminationen aufweisen, sind zu verwerfen.
- Alle auffälligen Proben und solche, die Anzeichen für Aktivierung zeigen, sind zu verwerfen.
- Alle Plasmen, die Gerinnsel oder Anzeichen für Kontaminationen aufweisen, sind zu verwerfen.
- Da Aprotinin aktiviertes Protein C inhibiert, erscheint die Protein C-Aktivität bei Patienten unter Aprotinigungabe herabgesetzt!.
- Das Vorhandensein von Anti-Human Protein C-Antikörpern im Plasma kann die amidolytische Aktivität von aktiviertem Protein C inhibieren.

- Eine Beeinflussung des Testes durch Heparinkonzentrationen <1 IE/mL, Bilirubinkonzentrationen <0,1 mg/mL, Hämoglobinkonzentrationen <1 mg/mL und Triglyzeridkonzentrationen (Intralipid) <1000 mg/dL wurde in Plasma Overload-Tests nicht beobachtet.

ERWARTETE WERTE:

Gemäß Definition entspricht die Konzentration von 100% Protein C der Konzentration in normalem, humanem Citratplasma, gepoolt aus mehreren, gesunden Plasmen von Männern und Frauen im Alter zwischen 18 und 55 Jahren, welche nicht unter Medikation stehen. Gewöhnlich liegt die Protein C-Konzentration bei Erwachsenen zwischen 70 und 140%. Jedes Labor muss jedoch seinen eigenen Normalbereich bestimmen.

Bei Neugeborenen ist die Protein C-Konzentration aufgrund von hepatischer Unreife erniedrigt. Später ist die Konzentration unabhängig von Alter und Geschlecht.

Klinische Abweichungen:

- Eine Protein C-Konzentration ≤ 60% weist auf einen Mangel hin und muss mit einem weiteren Test oder durch Testung einer neuen Plasmaprobe bestätigt werden⁶.
- Die Protein C-Aktivität ist während einer 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 Dicoumarol-Therapie 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.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei ≤ 5%.
- Der Arbeitsbereich des Testes reicht von 5% bis 140%.
- Beispielwerte für die Reproduzierbarkeit der Methode, gemessen mit Proben mit unterschiedlichen Protein C-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

REFERENZEN:

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

SYMBOLE:

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