



**BIOPHEN™ Protein C 5**

REF 221205



R1 R2 4 Flaschen x 5 mL

Deutsch, Revision: 02-2023

#### **VERWENDUNGSZWECK:**

Chromogene Methode zur quantitativen *In-vitro*-Bestimmung der Protein-C-Aktivität in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden. Dieser Test dient zur Diagnose eines angeborenen oder erworbenen Mangels an Protein C.

Dieses Produkt zur *In-vitro*-Diagnostik ist für die professionelle Verwendung in der Laborumgebung bestimmt.

#### **ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG:**

##### **Technisch:**

Protein C ist ein Vitamin-K-abhängiges Glykoprotein, das die Gerinnung inhibiert. Seine normale Konzentration in humanem Plasma beträgt etwa 4 µg/mL. Aktiviert durch den Thrombomodulin-Thrombin-Komplex spaltet das aktivierte Protein C (APC) – in Gegenwart seines Kofaktors Protein S sowie von Calcium und Phospholipiden (PPL) – die Faktoren Va und VIIa und unterdrückt dadurch die prokoagulatorische Aktivität dieser Kofaktoren<sup>1,2</sup>.

##### **Klinisch:**

Die Bestimmung der Protein C-Aktivität in humanem Plasma kann bei der Diagnose eines angeborenen oder erworbenen Mangels an Protein C helfen<sup>3,4, 5, 6,7,8</sup>.

Ein erworbener Mangel ist bei hepatischen Erkrankungen, während einer VKA-Therapie oder bei disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) zu beobachten.

Ein angeborener Protein-C-Mangel kann quantitativ (Typ I) oder qualitativ (Typ II) auftreten und zeigt sich im Zusammenhang mit rezidivierenden venösen Thrombosen.

Ein angeborener oder erworbener Protein-C-Mangel stellt einen Risikofaktor für venöse Thromboembolien dar<sup>3</sup>.

Die Protein-C-Aktivität variiert in Abhängigkeit vom Alter (sie ist bei Neugeborenen oder Kindern niedriger).<sup>6</sup>

#### **TESTPRINZIP:**

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

#### **REAGENZIEN:**

**R1 Protac®** bei etwa 0,32 E/mL. Hochgereinigtes Enzym zur spezifischen Aktivierung von Protein C aus dem Schlangengift der Agkistrodon C Contortrix, lyophilisiert und stabilisiert. Enthält bovines Serumalbumin (BSA) und Stabilisatoren.

**R2 SaPC-21** bei etwa 1,6 mg/mL. Chromogenes Substrat, spezifisch für aktiviertes Protein C, lyophilisiert. Enthält Cäsiumchlorid und Stabilisatoren. H361f: Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen..

Die Protac® -Konzentration kann von Charge zu Charge abweichen, wird jedoch für jede Reagenziencharge exakt bestimmt.

#### **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN:**

- Dieses Produkt enthält Material tierischen Ursprungs und muss als potenzieller Krankheitsträger und -überträger gehandhabt werden.
- Bitte beachten Sie das auf [www.hyphen-biomed.com](http://www.hyphen-biomed.com) abrufbare Sicherheitsdatenblatt.
- **R2** (SaPC-21) - Reproduktionstoxisch (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 gemäß den regionalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.

#### **VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:**

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

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

Reagenz unter Vermeidung von Schaumbildung gut durchmischen, bis es sich vollständig gelöst hat, und danach unter Beachtung der Anwendungsanleitung direkt in das Analysegerät laden.

*Für die manuelle Methode, 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) stabilisieren lassen, vor Gebrauch homogenisieren.*

#### **LAGERUNG UND STABILITÄT:**

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2–8 °C in der Originalverpackung gelagert werden. Unter diesen Bedingungen können sie dann bis zu dem auf der Verpackung aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden.

**R1 R2** Stabilität der geschlossen gelagerten Reagenzien nach der Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass diese nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

- **3 Monate** bei 2-8 °C.
- **On-Board-Stabilität:** siehe spezifische Anwendungsanleitung.

Konservierungskombinationen werden nicht empfohlen.

Wenn das Substrat eine Gelbfärbung aufweist, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu entsorgen und eine neue Flasche muss verwendet werden.

#### **ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:**

- Physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl).
- Spezifische Kalibratoren und Kontrollplasmen:

Produktbezeichnung	Art.Nr.
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201

- Automatische Analysesysteme für chromogene Tests, wie: STA-R®-Serie
- Labormaterial.

#### **PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG:**

Das Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat (3,2 %) als Antikoagulans (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion.

Die Gewinnung, Vorbereitung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Richtlinien zu erfolgen (für die Vereinigten Staaten siehe Richtlinie CLSI H21-A5<sup>10</sup> für weitere Informationen für Probengewinnung, -handhabung und -lagerung).

Hinsichtlich der Lagerung der Plasmaproben sind die Literaturhinweise 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** und die Farbintensität bei **405 nm** gemessen.

**Anwendungsanleitungen für eine automatisierte Methode sind auf Anfrage erhältlich. Siehe spezifische Anwendungsanleitung und spezifische Vorsichtsmaßnahmen für jedes Analysegerät.**

#### **Testmethode:**

1. Die Kalibratoren und Kontrollen gemäß den spezifischen Anweisungen rekonstituieren. Für die Kalibrationskurve wird der Kalibrator **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 (222101) % Protein C	C	C:2	C:4	0
Volumen Kalibrator (Verdünnung 1:2)	500 µL	250 µL	125 µL	0 µL
Volumen physiologische Kochsalzlösung	0 µL	250 µL	375 µL	500 µL

2. Die Proben wie in der nachstehenden Tabelle beschrieben in physiologischer Kochsalzlösung verdünnen:

Proben	Art.Nr.	Verdünnung
Kontrollen	223201 / 223301	1:2
Proben	N/A	1:2

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mit Qualitätskontrollen zu testen. Bei Lagerung bei Raumtemperatur (18-25 °C), die verdünnten Proben schnell testen. Die genauen Kalibrator- und Kontrollkonzentrationen für jede Charge werden im Flyer angegeben, der jedem Kit beigelegt ist.

3. In Mikrotiterplatten oder Teströhrchen, die jeweils bei 37 °C inkubiert sind, wird Folgendes zugegeben:

	Mikrotiterplatte	Volumen
Proben, Kalibratoren oder Kontrollen 1:2 verdünnt	25 µL	50 µL
R1 Protac® vorinkubiert bei 37 °C	100 µL	200 µL
Mischen und bei 37 °C für 5 Minuten inkubieren, dann Folgendes hinzugeben:		
R2 SaPC-21 vorinkubiert bei 37 °C	100 µL	200 µL
Mischen und für exakt 5 Minuten bei 37 °C inkubieren		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (2 %)	100 µL	200 µL
Mischen und Messen der optischen Dichte bei 405 nm 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 optische Dichte bei 405 nm messen. Der Probenleerwert ist von der Absorption des entsprechenden Probenwerts abzuziehen.

Für ikterische, lipämische oder hämolytische Plasmen sowie für Plasmen, deren Färbung von den Standardplasmen abweicht, ist eine Leerprobe durchzuführen.

Wenn ein anderes Reaktionsvolumen als das oben angegebene für die verwendete Methode erforderlich ist, muss das Volumenverhältnis strikt beachtet werden, um die Testleistung zu gewährleisten. Der Anwender ist für die Validierung aller Änderungen und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse verantwortlich.

#### QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen dient der Validierung der Methodenkonformität und der Homogenität zwischen den Tests für eine bestimmte Charge von Reagenzien.

Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle durchzuführen, um die erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen. Vorzugsweise bei jeder Testserie, zumindest aber bei Chargenwechsel, Wartungsarbeiten am Analysengerät oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereichs für die Methode liegen, muss eine neue Kalibrationskurve erfolgen.

Jedes Labor muss die Richtigkeit der Zielwerte und Vertrauensbereiche unter den eigenen Testbedingungen im Analysesystem überprüfen.

#### ERGEBNISSE:

- Bei der manuellen Endpunktmethode wird die Kalibrationskurve (Maßstab Lin-Lin), ausgedrückt in % Protein C, auf der x-Achse gegen die OD 405 nm auf der y-Achse aufgetragen. Bei der kinetischen Methode ist  $\Delta OD$  405 anstatt OD 405 zu verwenden.
- Die Protein-C-Konzentration (%) in der Probe wird bei Verwendung der Standardverdünnung direkt von der Kalibrationskurve abgelesen.
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.

#### EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS:

- Um eine optimale Testleistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgfältig beachtet werden.
- Jegliches nicht klare oder Anzeichen von Kontamination aufweisende Reagenz muss verworfen werden.
- Alle verdächtigen Proben oder Proben mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden.
- Da Aprotinin aktiviertes Protein C inhibiert, erscheint die Protein C-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.
- Anwenderdefinierte Änderungen werden von HYPHEN BioMed nicht unterstützt, da sie die Systemleistung und die Testergebnisse beeinträchtigen können. Der Anwender ist für die Validierung jeglicher

Änderungen dieser Anweisungen oder der Verwendung der Reagenzien in anderen Analysegeräten als denen verantwortlich, die in HYPHEN Biomed Anwendungsanleitungen oder dieser Gebrauchsanweisung angegeben sind.

- Ein unerwartetes anomales Ergebnis ist durch eine andere Methode und/oder eine andere Probe zu bestätigen und gemäß dem klinischen Kontext zu berücksichtigen<sup>6,8</sup>.

#### ERWARTETE WERTE:

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

#### LEISTUNGSMERKMALE:

- Die folgenden Leistungsdaten stellen typische Ergebnisse dar und sind nicht als Spezifikationen für BIOPHEN™ Protein C 5 anzusehen.
- Die Nachweisgrenze wird berechnet durch Messung des „scheinbaren“ A405-Werts, bestimmt für eine Protein-C-defiziente Probe plus 3 Standardabweichungen (SD). Die Nachweisgrenze der Methode ist  $\leq 5$  %.
- Der Arbeitsbereich des Tests reicht von 5 % bis 140 %..
- Beispielwerte für die Intra-Assay- und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit der Methode, gemessen mit Proben mit unterschiedlichen Protein-C-Konzentrationen:

Proben	Protein-C-Konzentrationen (%)	Intra-Assay CV(%)	N	Inter-Assay CV(%)	N
1	98	0,37	9	1,26	12
2	59	1,17	10	1,97	12
3	39	0,84	10	1,51	12

- Korrelation mit Referenzmethode (COAMATIC® Protein C vs. BIOPHEN™ Protein C 5 auf BCS):  
 $n = 21$   $y = 1x + 0,8463$   $r = 0,998$
- Interferenzen: Siehe spezifische Anwendungsanleitungen auf dem verwendeten Analysegerät.

#### LITERATURHINWEISE:

- 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: Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet. 1982.
- Esmon C.T.: Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
- Exner T. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistrodon Concoctrix venom. Thromb. Haemostasis. 1988.
- Pabinger I.: Clinical relevance of Protein C. Blut. 1986.
- Wypasek E. and Undas Anetta. Protein C and Protein S Deficiency – Practical 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. Res. 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.

Änderungen im Vergleich zur vorherigen Version.

Die folgenden Symbole sind auf der Produktkennzeichnung zu sehen:

<b>REF</b> Katalognummer	<b>LOT</b> Chargennummer	<b>IVD</b> In-vitro-Diagnostikum
<b>Rx</b> Numerische < x > Identifikation des Reagenz	<b>i</b> Siehe Gebrauchsanweisung	<b>WHO STD</b> WHO-Standardcode
<b>CE</b> Temperaturgrenzwert	<b>→</b> Hersteller	<b>JJJJ-MM-TT</b> Verwendbar bis
<b>CE XXXX</b> CE-Kennzeichnung der Konformität mit der ID-Nummer der benannten Stelle	<b>→</b> Rekonstitutionsvolumen	<b>CONTENTS</b> Inhalt
<b>Cx</b> Numerische < x > Identifikation der Kontrolle	<b>i-MA</b> Siehe Anweisungen zur Methode in der Anwendungsanleitung	<b>CONTAINS</b> Enthält
<b>EXP</b> Verfalldatum	<b>Σ</b> Ausreichend für <n> Prüfungen	<b>UNIT</b> Messeinheit
<b>TARGET VALUE</b> Zielwert	<b>☀</b> Vor Sonnenlicht und Hitze schützen	<b>CALx</b> Numerische < x > Identifikation des Kalibrators
<b>ACCEPTANCE RANGE</b> Vertrauensbereich.	<b>☠</b> Biologische Risiken	