



BIOPHEN™ Protein C LRT

REF 221211



R1 | R2 | 3 x 3 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 der Protein C-Aktivität im Plasma mit gebrauchsfertigen Reagenzien in flüssiger Form.

Deutsch, letzte Überarbeitung: 03-2023

VERWENDUNGSZWECK:

Der BIOPHEN™ Protein C LRT Kit ist eine chromogene Methode zur quantitativen *In-vitro*-Bestimmung der Protein C-Aktivität in humanem Citratplasma mit manuellen oder automatisierten Methoden. Alle Reagenzien liegen gebrauchsfertig in flüssiger Form vor (LRT = „Liquid Reagent Technology“)

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^{1,2}.

Klinisch:

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

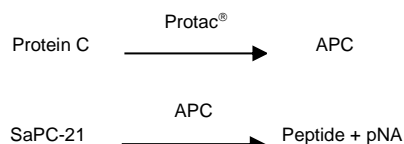
Ein erworbener Mangel ist bei hepatischen Erkrankungen, während einer VKA-Therapie oder bei disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) zu beobachten.

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 dar⁹.

TESTPRINZIP:

Beim BIOPHEN™ Protein C LRT Test wird vorhandenes Protein C durch die Zugabe von Protac®, einem Enzym aus Schlangengift (Agkistrodon C Contortrix), spezifisch aktiviert^{4,5}. Das aktivierte Protein C (APC) spaltet das spezifische 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®. Hochgereinigtes Enzym zur spezifischen Aktivierung von Protein C, extrahiert aus dem Schlangengift der Agkistrodon C Contortrix und stabilisiert, in flüssiger Form. Jede Flasche enthält etwa 0,32 E/mL Protac®. Enthält BSA.

R2 SaPC-21. Chromogenes Substrat, spezifisch für aktiviertes Protein C, stabilisiert, in flüssiger Form. Jede Flasche enthält etwa 1,6 mg/mL SaPC-21. Enthält ein Gemisch aus 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one und 2-Methyl-2H-isothiazolin-3-one (3:1) und Cäsiumchlorid.

R1 | R2 | 3 Flaschen mit je 3 mL

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

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN:

- Einige der in diesen Kits enthaltenen Reagenzien beinhalten Stoffe tierischen Ursprungs. Reagenzien dieses Typs müssen deshalb mit größter Sorgfalt unter Beachtung der erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potenziell 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. Wenden Sie sich bei Kontakt mit einer offenen Wunde an einen geeigneten Arzt und informieren Sie ihn über den biologischen Ursprung und die Art des Produkts.
- Bitte beachten Sie das auf www.hypHEN-biomed.com abrufbare Sicherheitsdatenblatt.
- R2** (SaPC-21) – Sensibilisierung der Haut (Kategorie 1, H317), Reproduktionstoxizität (Kategorie 2, H361f)
 - P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
 - P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
 - P302+P352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

- P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333+P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: 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.
- Alterungsuntersuchungen zeigen, dass die Reagenzien bei Raumtemperatur versandt werden können, ohne dass es zu einem Abbau kommt.
- Dieses Produkt zur *In-vitro*-Diagnostik ist für die professionelle Verwendung in der Laborumgebung bestimmt.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

R1 | R2 Die Reagenzien sind gebrauchsfertig. Unter Vermeidung von Schaumbildung gut durchmischen 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 dem Öffnen 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).
- Nicht einfrieren.
- On-Board-Stabilität: siehe spezifische Anwendungsanleitung.

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:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- 20 % Essigsäure oder 2 % Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl).
- Spezifische Kalibratoren und Kontrollen mit bekannter Titration, wie:

Produktbezeichnung	Referenz
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201

Siehe auch spezifische Anwendungsanleitungen auf dem verwendeten Analysegerät.

Materialien:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomat für chromogene Tests.
- Stoppuhr; geeichte Pipetten; Teströhrchen oder Mikrotiterplatten.

PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG:

Das Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat (3,2 %) als Antikoagulans (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutentnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

Die Gewinnung, Vorbereitung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Richtlinien zu erfolgen (für die Vereinigten Staaten siehe Richtlinie CLSI H21-A5¹⁰ für weitere Informationen für Probengewinnung, -handhabung und -lagerung).

Hinsichtlich der Lagerung der Plasmaproben sind die Literaturhinweise zu beachten^{10,11,12}.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Testkit kann sowohl als automatisierbare kinetische Methode als 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 die Kalibratoren in physiologischer Kochsalzlösung verdünnen, wie unten beschrieben („C“ definiert die Protein C-Konzentration).

Die 1:2 Verdünnung entspricht der angegebenen Konzentration (C) von PC und die 3:4 Verdünnung entspricht dem 1,5fachen dieser Konzentration (3C:2).

Der Kalibrierungsbereich kann wie folgt vorbereitet werden:

% Protein C	3C:2	C	C:2	C:4	0
% Protein C	150	100	50	25	0
Volumen Kalibrator	150 µL	250 µL	250 µL	125 µL	0 µL
Volumen physiologische Kochsalzlösung	50 µL	250 µL	750 µL	875 µL	1000 µL

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

Proben	Referenz	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 beigefügt ist.

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

	Mikrotiterplatte	Volumen
Verdünnte Proben, Kalibratoren oder Kontrollen	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.

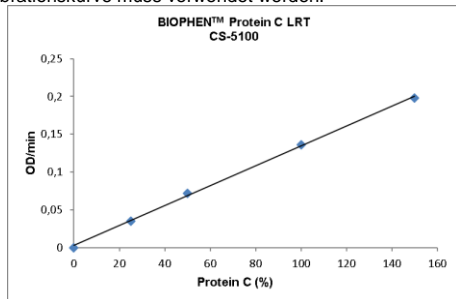
Wenn ein anderes Reaktionsvolumen als das oben angegebene für die verwendete Methode erforderlich ist, muss das Volumenverhältnis strikt beachtet werden, um die Testleistung zu gewährleisten. Der Anwender ist für die Validierung aller Änderungen und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse verantwortlich.

KALIBRIERUNG

BIOPHEN™ Protein C LRT kann für den Test der Protein C-Aktivität kalibriert werden. Der Kalibrator, der den Kalibrierbereich abdeckt, ist bei HYPHEN BioMed erhältlich (siehe Abschnitt ERFORDERLICHE REAGENZIEN UND MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND) und kann zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden.

- Der Kalibrationsbereich beträgt etwa 0 % bis 150 %.

Die nachstehende Kalibrationskurve dient nur als Beispiel. Die für die Testserie erstellte Kalibrationskurve muss verwendet werden.



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) mit der OD 405 nm auf der y-Achse und die Protein C-Konzentration, ausgedrückt in %, auf der x-Achse aufgetragen. Bei der kinetischen Methode ist ΔOD 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.
- Reagenzien mit ungewöhnlichem Aussehen oder Anzeichen von Kontamination sind zu verwerfen.
- 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 Aprotinogabe herabgesetzt⁹.
- Das Vorhandensein von Anti-Human Protein C-Antikörpern im Plasma kann die amidolytische Aktivität von aktiviertem Protein C inhibieren.

ERWARTETE WERTE:

In internen Studien liegt die Protein C-Konzentration bei Erwachsenen gewöhnlich zwischen 70 und 140 %. Jedes Labor muss jedoch seinen eigenen Normalbereich bestimmen.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Die untere Nachweisgrenze des Analysegeräts hängt vom verwendeten Analysesystem ab (<1,8 % bei Sysmex CS-5100).
- Der Messbereich hängt vom verwendeten Analysesystem ab (etwa 7 bis 200 % Protein C bei Sysmex CS-Serien).
- Interne Leistungsstudien wurden mit dem Sysmex CS-5100 durchgeführt. Die Leistung wurde mittels Laborkontrollen über einen Zeitraum von 20 Tagen durchgeführt: 2 Serien pro Tag und 3 Wiederholungen innerhalb jeder Serie für eine Probenebene. Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

Kontrolle	Intra-Assay				Inter-Assay			
	n	Mittelwert	CV%	SD	n	Mittelwert	CV%	SD
Kontrolle 1	40	35,7	2,2	0,8	120	36,3	2,4	0,9
Kontrolle 2	40	81,2	1,5	1,2	120	84,1	2,0	1,7

- Aufgrund des Testprinzips sind keine Interferenzen mit Anti-Xa- und Anti-IIa-Antikoagulantien wie Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban, Dabigatran oder UFH zu erwarten.
- Korrelation mit Referenzmethode (Berichrom Protein C Kit (Siemens) vs. BIOPHEN™ Protein C LRT auf Sysmex CS-5100):
 $n = 114$ $y = 1,04x - 4,04$ $r = 0,979$

Interferenzen:

Auf dem Analysegerät Sysmex CS-5100 wurden keine Interferenzen mit den Molekülen bis zu den folgenden Konzentrationen beobachtet:

Hämoglobin	Bilirubin (F/C)	Intralipide
500 mg/dL	60 mg/dL	1000 mg/dL

Siehe spezifische Anwendungsanleitungen auf dem verwendeten Analysegerät.

LITERATURHINWEISE:

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 Agkistrodom Concoctrix venom. Thromb. Haemostasis. 1988.
6. Pabinger I. Clinical relevance of Protein C. Blut 53. 1986.
7. Wypasek E. and Undas Anetta. Protein C and Protein S Deficiency – Practical 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. 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.

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet, Zeichenerklärungsblatt.

- R2** H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H361f: Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.