



HEMOCLOT™ Protein C

Art.Nr. CK031K (R1, R2: 3x1 mL)

Art.Nr. CK032K (R1, R2: 3x2 mL)

Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung der Protein C-Aktivität

In vitro-Diagnostikum



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:

HEMOCLOT™ Protein C ist ein Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung der Protein C (PC)-Aktivität in humanem Citratplasma und ist sowohl zur manuellen als auch zur automatisierten Durchführung geeignet.

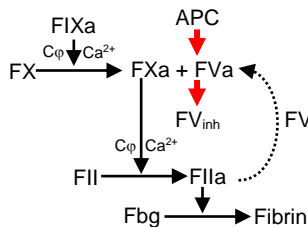
ZUSAMMENFASSUNG:

Protein C (PC) ist ein Vitamin K-abhängiges humanes Protein. Als Inhibitor regelt PC die Gerinnung, indem es durch spezifische Spaltungen der Faktoren Va und VIIIa, ihre aktive gerinnungsfördernde Co-Faktoren-Tätigkeit unterdrückt. Ein angeborener oder erworbener Protein C-Mangel ist ein Risikofaktor für venöse Thrombosen.

TESTPRINZIP:

Der HEMOCLOT™ Protein C Test ist ein aPTT-ähnlicher Gerinnungstest, der in Anwesenheit des Protein C-Aktivators (Protac®), welcher aus dem Schlangengift der Art Agkistrodon Contortrix aufgereinigt wurde), Phospholipiden, Kontakphasen-Aktivatoren und Kalzium durchgeführt wird.

In einem ersten Schritt wird das verdünnte Probenplasma mit einem PC-Mangelplasma (R1) gemischt. Nach Zugabe des Aktivierungsreagenzes (R2), welches in einer konstanten und optimalen Konzentration enthalten ist, wird die Gerinnung durch die Zugabe von Kalziumionen ausgelöst. Da Protein C der limitierende Faktor im Testansatz ist, besteht eine direkte lineare Beziehung, grafisch auf doppellogarithmischem Millimeterpapier, zwischen der gemessenen Gerinnungszeit und der PC-Aktivität der Probe.



IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

R1: PC-Mangelplasma, immunadsorbiert, in Gegenwart eines Heparin-Neutralisators lyophilisiert.

R2: Aktivierungsreagenz, lyophilisiert. Enthält Protac®, welches aus dem Schlangengift der Art Agkistrodon Contortrix aufgereinigt wurde, sowie Phospholipide in einer konstanten, optimierten Konzentration.

Art.Nr. CK031K → R1, R2: 3 Flaschen mit je 1 mL

Art.Nr. CK032K → R1, R2: 3 Flaschen mit je 2 mL

Warnhinweis:

Das zur Herstellung der im Kit enthaltenen Reagenzien verwendete Humanplasma wurde mit anerkannten Methoden auf HIV-Antikörper, HBS-Ag und HCV-Antikörper untersucht und für negativ befunden. Kein Test kann jedoch die Abwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit garantieren. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen deshalb unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

Die Konzentration des Protein C-Aktivators (Protac®) kann von Charge zu Charge variieren, sie wird jedoch für jede Reagenzcharge genau angepasst.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest. vorzugsweise steril.
- 25 mM CaCl₂ (z.B. Art.Nr. AR001K).
- Imidazolpuffer (z.B. Art.Nr. AR021K/L).
- Kalibrationsplasma (z.B. BIOPHEN™ Kalibrationsplasma Gerinnung, Art.Nr. 222101) oder sonstiges Referenzmaterial (internationaler oder interner Standard) mit bekannter PC-Aktivität.
- Normal- und Abnormal Kontrollplasmen (z.B. BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Normal“, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“, Art.Nr. 223301).

Materialien:

- Manuelle Methode: Kalibrierte Pipetten, Wasserbad, Stoppuhr.
- Automatisierte Methode: Gerinnungsautomat.

LAGERUNG:

Bei 2-8°C gelagert sind die ungeöffneten Reagenzien bis zum auf der Verpackung gedruckten Verfallsdatum stabil.

Anmerkung: Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Reagenzien bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

R1: Den Inhalt der Flasche mit aqua dest. rekonstituieren:

Art.Nr. CK031K → 1 mL aqua dest.

Art.Nr. CK032K → 2 mL aqua dest.

Bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig schwenken. Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schwenken. Vor jedem Gebrauch durchmischen.

R2: Den Inhalt der Flasche mit aqua dest. rekonstituieren:

Art.Nr. CK031K → 1 mL aqua dest.

Art.Nr. CK032K → 2 mL aqua dest.

Bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig schwenken. Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schwenken. Vor jedem Gebrauch durchmischen.

Nach Rekonstitution sind die Reagenzien, verschlossen in ihrer Originalflasche und geschützt vor jeglicher Kontamination und Verdunstung, über folgende Zeiträume stabil:

- 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)
- 24 Stunden bei 2-8°C
- 1 Monat bei ≤ -20°C

Vor jedem Gebrauch müssen gefrorene Reagenzien bis zum vollständigen Auftauen im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend durchmischt werden.

Vorsichtsmaßnahmen:

- Die im Kit enthaltenen Flaschen werden unter Vakuum verschlossen. Um einen Verlust deren Inhalts beim Öffnen zu vermeiden, müssen die Verschlüsse vorsichtig entfernt werden.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, um jegliche Kontamination während der Verwendung zu vermeiden.
- Um die Stabilität der Reagenzien zu gewährleisten, müssen die Flaschen nach jedem Gebrauch mit ihren Originalschraubkappen verschlossen werden.

Anmerkungen:

- Bei einer automatisierten Testdurchführung kann es in Abhängigkeit des verwendeten Gerinnungsautomaten zu Abweichungen der Rekonstitutionsvolumina von den hier angegebenen Werten kommen. Die festgelegten Reaktionsverhältnisse (das Verhältnis der einzelnen Reagenzkonzentrationen im Testansatz) müssen aber auf jeden Fall eingehalten werden.
- Die Kombination der einzelnen Reagenzien ist chargenabhängig optimiert. Zur Testdurchführung dürfen folglich ausschließlich Komponenten aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden.

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M oder 0,129 M Trinatrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen und innerhalb von 2 Stunden für 15 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert. Das gewonnene Plasma kann für bis zu 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) oder für bis zu 1 Monat bei ≤ -20°C gelagert werden.

Anmerkung: Weitere Empfehlungen zur Probengewinnung, -handhabung und -lagerung können den GEHT- und NCCLS/CLSI-Dokumenten entnommen werden. Ikerische, hämolytische und lipämische Plasmen sind zu verwerfen.

TESTDURCHFÜHRUNG:

HEMOCLOT™ Protein C ist ein Gerinnungstest, der sowohl zur manuellen als auch zur automatisierten Durchführung geeignet ist. Der Test wird bei einer konstanten Temperatur von 37°C durchgeführt. Anwendungsvorschriften für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Kalibration:

HEMOCLOT™ Protein C kann mithilfe eines **gepoolten humanen Normalplasmas** (zusammengeführt aus den Citratplasmen von mindestens 30 gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren, die nicht unter Medikation stehen) kalibriert werden. Eine **1:5-Verdünnung** eines solchen gepoolten humanen Normalplasmas entspricht einer **PC-Aktivität von 200%**.

Alternativ können kommerziell verfügbare Kalibrationsplasmen mit bekannter PC-Aktivität (z.B. BIOPHEN™ Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101) zur Kalibration des Testes herangezogen werden. Eine **1:5-Verdünnung** eines solchen Kalibrationsplasmas mit Imidazolpuffer (1 Teil Plasma + 4 Teile Puffer) entspricht einer **PC-Aktivität von 2°C%**. Die Aktivität "C" ist chargenabhängig und wird auf dem Datenblatt, das jeder Packung beigelegt ist, exakt angeführt.

HEMOCLOT™ Protein C misst in einem Bereich von 25 bis 200% PC-Aktivität. Zur Kalibration des Testes werden zunächst **3 mL** einer **1:5-Verdünnung** eines gepoolten humanen Normalplasmas bzw. eines kommerziell verfügbaren Kalibrationsplasmas mit bekannter PC-Aktivität hergestellt. Die Verdünnung erfolgt in isotemem Imidazolpuffer (z.B. Art.Nr. AR021K/L) und enthält dann eine Ausgangsaktivität von **2°C%** (ca. 200%). Von dieser Stammlösung werden weitere Kalibratorlösungen durch Verdünnung mit demselben Puffer hergestellt. Beispiel:

Kalibrator	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5
PC-Aktivität	2°C%	C %	C3/4 %	C/2 %	C/4 %
Stammlösung mit 2°C% PC	1,00 mL	0,50 mL	0,375 mL	0,25 mL	0,125 mL
Imidazolpuffer	0,00 mL	0,50 mL	0,625 mL	0,75 mL	0,875 mL

Es empfiehlt sich die Durchführung einer Kalibration mit frisch hergestellten Kalibratorlösungen.

Proben und Kontrollen:

Proben und Kontrollen müssen zur Testung 1:10 mit Imidazolpuffer verdünnt werden. Bei erwarteten PC-Aktivitäten von >100% können die Proben in einer Verdünnung von 1:20 getestet werden. Umgekehrt können Proben mit erwarteten PC-Aktivitäten von <25% in einer Verdünnung von 1:5 getestet werden.

Anmerkung: Zur Verdünnung der Kalibrations-, Kontroll- und Probenplasma wird isotoner Imidazolpuffer (z.B. Art.Nr. AR021K/L) empfohlen. Auf jeden Fall müssen innerhalb eines Testansatzes alle Kalibrations-, Kontroll- und Probenplasma mit demselben Puffer verdünnt werden.

Testdurchführung:

Manuelle Methode:

Ein Reaktionsgefäß bei 37°C vorwärmen und nach folgendem Schema zugeben:

Reagenz	Volumen
Kalibratorlösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:10 verdünnt) oder Proben (1:10 verdünnt)	100 µL
R1	100 µL
Mischen und 2 Minuten bei 37°C inkubieren	
R2	100 µL
Mischen und 5 Minuten bei 37°C inkubieren	
25 mM CaCl ₂ (unter Rühren bei 37°C vorgewärmt)	100 µL
Gerinnungszeit in Sekunden messen	

Automatisierte Methode:

Anwendungsvorschriften für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Anmerkung: Um eine optimale Leistungsfähigkeit des Testes zu gewährleisten, müssen alle Schritte rasch und zügig durchgeführt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Der Einsatz interner oder kommerziell verfügbarer Kontrollplasma (z.B. BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Normal“, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“, Art.Nr. 223301) mit bekannter PC-Aktivität erlaubt die Validierung der ermittelten Kalibrationskurve sowie die Überprüfung der Testqualität von einer Analysenserie zur nächsten. Es empfiehlt sich eine Messung von Kontrollen auf verschiedenen Levels. Die Kalibrationskurve ist gültig, wenn die gemessenen Kontrollwerte innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen.

Anmerkung: Eine Neukalibration ist bei jedem Wechsel der Testkitcharge, nach sämtlichen größeren Wartungsarbeiten am verwendeten Gerinnungsautomaten oder wann immer die Kontrollwerte außerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen erforderlich. Für jede neue Kontrollcharge sollte jedes Labor in Abhängigkeit des verwendeten Gerinnungsautomaten, der gewählten Messvorschriften sowie der vorherrschenden Arbeitsbedingungen laborspezifische Sollwerte und Vertrauensbereiche festlegen.

ERGEBNISSE:

Manuelle Methode:

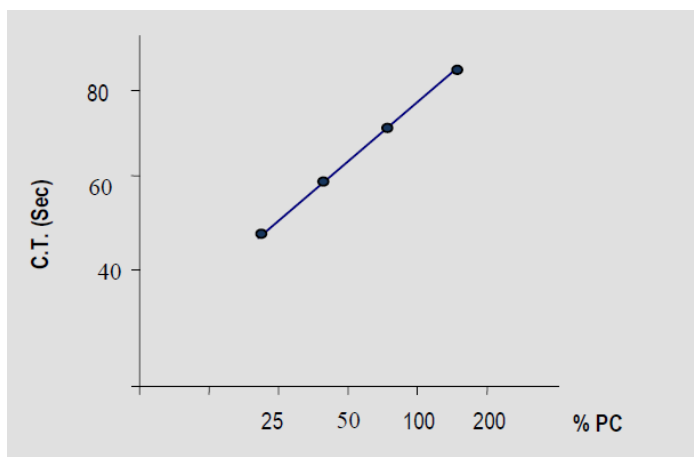
- Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden die berechneten PC-Aktivitäten (%) der einzelnen Standardlösungen auf der x-Achse in **doppelloarithmischer Skalierung** gegen die jeweils gemessenen Gerinnungszeiten (sec) auf der y-Achse aufgetragen. Der Test ist im Bereich von 25 bis 200% PC-Aktivität linear.
- Von der ermittelten Kalibrationskurve kann anhand der für die **Proben und Kontrollen** gemessenen Gerinnungszeiten auf die jeweiligen PC-Aktivitäten geschlossen werden. Wurden die Proben **anders als 1:10** verdünnt, muss der errechnete Wert unter Berücksichtigung des abweichenden Verdünnungsfaktors multipliziert werden.

Automatisierte Methode:

- Die PC-Aktivitäten der Proben und Kontrollen werden anhand der automatisch ermittelten Kalibrationskurve und unter Berücksichtigung eventuell abweichender Probenvorverdünnungen direkt vom Gerinnungsautomaten berechnet.

BEISPIEL EINER KALIBRATIONSKURVE:

Die hier gezeigte Kalibrationskurve wurde durch die Messung eines in mehreren Schritten verdünnten Kalibratorplasmas mittels HEMOCLOT™ Protein C an einem KC-10-Kugelkoagulometer ermittelt und dient lediglich als Beispiel. Zur Kalibration des Testes darf nur die für die jeweilige Testkitcharge erstellte Kalibrationskurve verwendet werden.



TESTCHARAKTERISTIKA:

- Messbereich:** Von 25 bis etwa 200%.
- Nachweisgrenze:** ≤ 10%. Die Nachweisgrenze wird durch die „scheinbare“ PC-Aktivität definiert. Diese entspricht der mittleren Gerinnungszeit eines PC-Mangelplasmas plus 3 Standardabweichungen.
- Spezifität:** Bei der Testung von PC-Mangelplasmen können Werte von <5% gemessen werden.
- Reproduzierbarkeit:** Folgende Ergebnisse wurden an einem KC-10 System erstellt:

Proben	PC Konzentration %	Intra-Assay CV%	N	Inter-Assay CV%	N
Probe 1	87	6,7	10	8,4	9
Probe 2	63	7,3	10	5,7	9

TESTEINSCHRÄNKUNGEN:

- Gerinnungsaktivierung während der Probengewinnung kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Test kann bei Patienten unter Heparin- (bis zu 1 IE/mL) und Dicoumaroltherapie durchgeführt werden. Wird eine ungewöhnlich stark verlängerte Gerinnungszeit festgestellt, empfiehlt sich die Bestätigung der Diagnose durch die Wiederholung der Messung anhand einer weiteren Probe desselben Patienten bzw. durch Heranziehung einer weiteren Methode.
- Es liegt keine Beeinflussung durch Faktor VIII bis mindestens 300% sowie heterozygoten Faktor-V-Leiden vor.
- Besondere Sorgfalt ist bei der Interpretation der Ergebnisse von Patienten mit homozygotem Faktor-V-Leiden oder Antiphospholipidsyndrom geboten. In solchen Fällen empfiehlt sich eine eingehende Evaluierung des Befundes unter Berücksichtigung des klinischen Kontextes und die Bestätigung der Diagnose durch Heranziehung einer weiteren Methode.
- Da PC durch Aprotinin inhibiert wird, kann die „scheinbare“ PC-Aktivität bei Patienten unter Aprotintherapie erniedrigt sein. Auch in diesem Falle empfiehlt sich die Bestätigung der Diagnose durch Heranziehung einer weiteren Methode.
- In Abhängigkeit des verwendeten Gerinnungsautomaten, des Messprinzips (mechanische oder optische Gerinnseldetektion) sowie der Sensitivitätseinstellungen bei der Gerinnseldetektion können für eine bestimmte Probe trotz Verwendung derselben Testkitcharge unterschiedliche Gerinnungszeiten gemessen werden.

ERWARTETE BEREICHE:

Ein **gepooites humanes Normalplasma** (zusammengeführt aus den Citratplasmen von mindestens 30 gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren, die nicht unter Medikation stehen) enthält eine PC-Aktivität von **100%**. Bei gesunden Erwachsenen schwankt die PC-Aktivität zwischen **70 und 140%**. Bei Neugeborenen ist die PC-Aktivität hingegen niedriger.

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN:

PC ist ein Vitamin K-abhängiges menschliches Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa, das in der Leber synthetisiert wird. PC ist gewöhnlich als Proenzym im Plasma in einer Konzentration von 4-5 µg/mL enthalten. Der Thrombin-Thrombomodulin Komplex aktiviert PC in Anwesenheit von Kalzium und Phospholipiden zu PCa. Zusammen mit Protein S, spaltet PCa die Faktoren Va und VIIIa, ihre aktive gerinnungsfördernde Co-Faktoren-Tätigkeit wird unterdrückt.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

Eine PC-Aktivität von ≤60% bei Erwachsenen weist auf einen PC-Mangel hin, der durch die Wiederholung der Messung mit einer weiteren Probe desselben Patienten bzw. durch Heranziehung einer weiteren Methode bestätigt werden sollte⁶. Ein PC-Mangel kann angeboren oder erworben sein.

Angeborener PC-Mangel:

- Typ I: Teilweise erniedrigte Konzentration an Protein C Antigen und Aktivität
- Typ II: Normale Konzentration an Protein C Antigen, aber erniedrigte Aktivität.
- Angeborene PC-Mängel können die Ursache von tiefen Venenthrombosen (TVT) und Lungenembolien (LE) sein.

Erworbener PC-Mangel:

- Bei Vitamin K-Mangel oder unter Dicoumaroltherapie. In diesen Fällen sind Vitamin K-abhängige Faktoren (II, VII, IX, X und PS) ebenfalls erniedrigt, so dass ein erhöhtes Blutungsrisiko besteht.
- Bei Lebererkrankungen, bestimmten chronischen Infektionen wie AIDS oder Hepatitis sowie einer DIC.

REFERENZEN:

- 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).
- Stenflo J. : Structure and Function of Protein C. *Semin. Thromb. Haemostasis*, 10,2, 109-121,(1984).
- Mannucci P.M., Vigano S. : Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet* 2,463-467, (1982).
- Esmon C.T., Esmon N.L. : Protein C activation. *Semin. Thromb. Haemostasis*, 10,2, 122-133,(1984).
- Exner T. and Vaasjoki R. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistrodon Contortrix 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).