

## BIOPHEN™ Protein C 5

REF 221205

R1 R2: 4 x 5 ml

### Chromogenní stanovení aktivity Proteinu C v plazmě.

Revize: 05\_2025, verze 6

#### POUŽITÍ:

BIOPHEN™ Protein C 5 souprava je chromogenní test pro *In Vitro* kvantitativní stanovení aktivity Proteinu C v lidské citrátové plazmě<sup>1,2</sup> za použití manuální nebo automatizované metody.

#### SHRNUTÍ:

##### Technické:

Protein C je na K vitamínu dependentní lidský glykoprotein, který inhibuje koagulaci. Jeho normální hladina v lidské plazmě je kolem 4 µg/ml a aktivuje se komplexem thrombomodulin-thrombin. Aktivovaný Protein C (APC) za přítomnosti jeho kofaktoru Protein S, vápníku a PPL štěpí Faktor Va a VIIIa, a tím je potlačena jejich prokoagulační kofaktorová aktivita<sup>1,2</sup>.

##### Klinické:

Vyšetření proteinu C v lidské plazmě může pomoci při diagnostice vrozených nebo získaných deficitů Proteinu C<sup>3,4,5,6</sup>.

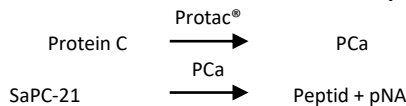
Získané deficity jsou pozorovány u nemocí jater, během VKA terapie nebo při Diseminované Intravaskulární Koagulopatie (DIC).

Vrozené deficity mohou být kvantitativní (Typ I) nebo kvalitativní (Typ II) a jsou spojené s rekurentní žilní trombózou.

Vrozené nebo získané deficity Proteinu C jsou rizikovým faktorem pro žilní trombozu<sup>3</sup>.

#### PRINCIP TESTU:

Soupravou BIOPHEN™ Protein C je Protein C stanovován pomocí specifické aktivace enzymem Protac®, což je enzym extrahovaný z jedu hada (Agkistrodon Contortrix)<sup>4,5</sup>. Aktivovaný Protein C (APC) potom hydrolyticky štěpí substrát (SaPC-21) za uvolnění para-nitroanilinu (pNA). Jeho barva je pak měřena při 405 nm. Mezi intenzitou zbarvení a aktivitou Proteinu C ve vzorku je přímá závislost.



#### OBSAH SOUPRAVY:

**R1 Protac®:** Vysoce čistěný enzym, extrahovaný z jedu hada Agkistrodon Contortrix, lyofilizovaný a stabilizovaný. Enzym je schopen specificky aktivovat Protein C.

Každá lahvička obsahuje okolo 1.60 U enzymu Protac®. Obsahuje BSA.

**R2 SaPC-21:** Chromogenní substrát, specifický pro aktivovaný Protein C, lyofilizovaný. Každá lahvička obsahuje 1,6 mg/ml SaPC-21. Obsahuje Chlorid cesný a stabilizátory.

H361f: Podezření na poškozování plodnosti.

Protac® koncentrace se mohou lišit mezi šaržemi, ale jsou vždy stejné pro každou novou šarži.

#### UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ:

- Některé reagenty v soupravě obsahují materiál zvířecího původu. S produkty biologického původu musí být zacházeno s opatrností, jako s potenciálně infekčními.
- Podrobnější informace naleznete v Bezpečnostním listě reagenty.
- R2 (SaPC-21)** – Repr toxický (Kategorie 2, H361f)
  - P201: Prostudujte specifické instrukce produktu před použitím.
  - P280: Používejte ochranné rukavice, oblečení, ochranu očí a obličej.
  - P308+313: Při expozici nebo obavách: Vyhledejte lékařskou pomoc.
  - P405: Skladujte v zamčených prostorech.
  - P501: Likvidujte obsah/obal dle místních platných regulací.
- Používejte pouze reagenty stejné šarže.

#### PŘÍPRAVA REAGENCIE:

Reagenty jsou lyofilizovány ve vakuu v jejich vlastních lahvičkách. Pro zamezení ztráty lyofilizátu otevřete lahvičky opatrně.

**R1 R2** Rekonstituujte obsah každé lahvičky přesně 5 ml destilované vody.

Opatrně promíchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí, zabraňte tvorbě pěny. Po promíchání ihned vložte do analyzátoru.

*Pro manuální metodu nechte reagenty stabilizovat po dobu 30 minut za pokojové teploty (18 – 25°C), homogenizujte před použitím.*

#### SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagenty musí být skladovány v teplotě 2-8°C, v jejich originálních obalech v krabičkách. Pak jsou stabilní až do data expirace vytištěného na obalu.

**R1 R2** Stabilita rozpuštěných reagentů, skladovaných uzavřeně, pokud je předejito kontaminaci a odpařování, je:

- 3 měsíce při 2-8°C
- 3 dny za pokojové teploty (18-25°C)
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru: Viz specifický aplikační protokol.

Pokud substrát zežloutne, je kontaminovaný. Materiál znehodnoťte a načněte novou lahvičku.

#### REAGENCIE POTŘEBNÉ, V SOUPRAVĚ NEPŘÍTOMNÉ:

##### Reagenty:

Destilovaná voda

Kyselina octová (20%) nebo 2% kyselina citrónová (pro end point metody)

Fyziologický roztok (0,9% NaCl)

Plazmatické kalibrátory se známou koncentrací jako jsou:

Produkt	Katalogové číslo
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201

Odkažte se na specifický aplikační protokol pro daný analyzátor.

##### Materiál:

Spektrofotometr nebo automatický přístroj pro chromogenní testy

Stopy, kalibrované pipety, plastové zkumavky nebo mikrotitrační destička

#### ODBĚR VZORKU A PŘÍPRAVA PLAZMY:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M citrátového antikoagulantu (1 díl), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů.

Pro skladování plazmy se odkažte na reference<sup>8,9,10</sup>.

#### PROVEDENÍ TESTU:

Souprava je pro kinetickou metodu, automatizovanou nebo manuální (end point). Měřeno při 37°C a změna zbarvení se odečte při 405 nm.

**Adaptace pro koagulometri je přístupná na vyžádání. Odkazujeme na aplikace pro jednotlivé analyzátoři a specifické podmínky stanovení.**

#### Metoda testu:

1. Rekonstituujte kalibrátory a kontroly dle jejich příbalových instrukcí. Pro zhotovení kalibrace naředte kalibrátor 1 : 2 fyziologickým roztokem, čímž získáte koncentraci C% (dle definice 100% pro poolovanou normální plazmu nebo C% pro komerční kalibrátor). Poté připravte kalibrační řadu dle níže uvedeného návodu („C“ definuje koncentraci Proteinu C):

Kalibrátor (222101) %Proteinu C	C	C:2	C:4	0
Objem kalibrátoru (ředěného 1:2)	500µl	250 µl	125 µl	0 µl
Objem fyziologického roztoku	0 µl	250 µl	375 µl	500 µl

2. Naředte vzorky fyziologickým roztokem, jak je popsáno níže:

Vzorek	Katalogové číslo	Ředění
Kontrola	223201 / 223301	1:2
Vzorek	n.a.	1:2

Vytvořte kalibrační křivku a testujte kontroly kvality. Přesné hodnoty kalibrátorů a kontrol jsou pro každou šarži uvedeny v letáku přiloženém k soupravě. Pokud jsou ředěné vzorky skladovány za pokojové teploty (18-25°C), proveďte měření nejdříve.

3. Pipetujte do jamky mikrotitrační destičky nebo do plastové zkumavky předehřátých na 37°C.

	Mikrotitrační destička	Zkumavka
Vzorky, kontroly, kalibrátory, ředění 1:2	25 µl	50 µl
<b>R1: Protac® Předehřátý na 37°C</b>	100 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C 5 minut, potom přidat		
<b>R2: SaPC-21, předehřátý na 37°C</b>	100 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C přesně 5 minut		
Zastavit reakci následujícím způsobem		
Kyselina citronová 2%	100 µl	200 µl
Promíchat a měřit absorbancí při 405 nm proti odpovídajícímu blank		

\*nebo 20% octová kyselina. Žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.

Blank se získá smícháním v opačném pořadí než v testu: Kyselina citrónová (2%), substrát R2, R1, ředěný vzorek.

Měří se absorbance při 405 nm. Vzorek blank musí být odečten od absorbance naměřené u korespondujícího testu.

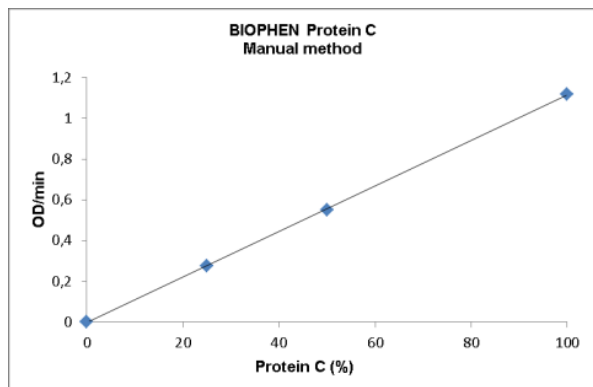
Pokud je vzorek ikterický, lipemický, hemolyzovaný nebo pokud má jinou barvu než obvykle, vytvořte pro něj plazma blank.

Pokud jsou potřeba jiné reakční objemy, než výše uvedené, je naprosto nutné zachovat poměr objemů. Uživatel je zodpovědný za to, že provedené změny validuje a za případný vliv změn na výsledek.

#### **KALIBRACE:**

Souprava BIOPHEN Protein C 5 je nutné kalibrovat pro testování Proteinu C. Kalibrátor pokrývající dynamické rozmezí testu je dostupný od Hyphen-BioMed (viz část Reagencie a materiál potřebný, v soupravě nepřítomný).

Níže zobrazená kalibrační křivka byla získána použitím manuální metody a je pouze příkladem. Kalibrace by měla být provedena pro každou sérii testů.



#### **KONTROLA KVALITY:**

Užití kontrolních plazem umožňuje ověření kalibrační křivky stejně tak jako homogenity reaktivity mezi sériemi při použití stejné šarže reagentů.

Začněte kontrolu kvality do každé série testů. Nová kalibrace musí být provedena nejméně pro každou novou šarži reagentů, po každé významné opravě či údržbě přístroje, nebo když výsledek kontrol je mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř musí definovat vlastní přijatelné rozmezí kontrol pro konkrétní analytický systém.

#### **VÝSLEDKY:**

- Pro manuální endpoint metodu vynesete kalibrační křivku s OD 405 nm na osu Y a koncentrace Proteinu C vyjádřené v % na osu X. Pro kinetickou metodu použijte  $\Delta OD$  405 místo OD 405.
- Koncentrace Proteinu C v testovaném vzorku je přímo odvozena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění.
- Výsledky musí být interpretovány s přihlédnutím k biologickému a klinickému stavu pacienta.

#### **LIMITY METODY:**

- Pro optimální průběh testu a dosažení specifikací by měly být dodržovány technické instrukce validované společností HYPHEN BioMed.
- Reagencie neobvyklého vzhledu nebo jeví známky kontaminace musí být znehodnoceny.
- Vzorky, které jsou podezřelé nebo jeví známky aktivace, nesmí být testovány.
- Aprotinin inhibuje Aktivovaný Protein C – vzorky s Aprotininem tak mají falešně nižší aktivitu Proteinu C<sup>7</sup>.

- Přítomnost protilátek proti lidskému Proteinu C může inhibovat amidolytickou aktivitu Proteinu C v průběhu testu.

#### **OČEKÁVANÉ HODNOTY:**

Normální hladina Proteinu C v plazmě dospělého člověka je většinou od 70 do 140%. Přesto si musí každá laboratoř stanovit vlastní normálové rozmezí.

Koncentrace Proteinu C u novorozenců je snižena kvůli nezralosti jater. Poté je koncentrace nezávislá na věku a pohlaví.

Koncentrace Proteinu C  $\leq 60\%$  indikuje přítomnost deficitu, který musí být potvrzen dalším měřením a/nebo na dalším vzorku<sup>6</sup>.

Koncentrace Proteinu C jsou sniženy při VKA terapii, při nemocech jater, DIC a zrozených deficitech.

#### **CHARAKTERISTIKA:**

- Limit detekce je vypočítán měřením A405 získané pro Protein C plus 3 směrodatné odchylky (SD). Limit detekce je  $\leq 5\%$ .
- Rozmezí testu je od 5 do 140%.
- Příklad Intra-assay a Inter-assay reprodukovatelnosti získané pro vzorky s různou koncentrací Proteinu C:

Vzorek	Koncentrace PC%	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

- Korelace s referenčním materiálem (COAMATIC® Protein C vs BIOPHEN™ Protein C 5 na BCS):  
 $n = 21$   $y = 1x + 0,8463$   $r = 0,998$
- **Interference:** Odkáže se na specifický aplikační protokol pro daný analyzátor.

#### **REFERENCE:**

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. Axner T. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistrodom Concortrix venom. Thromb. Haemostasis. 1988.
6. Pabinger I.: Clinical relevance of Protein C. Blut. 1986.
7. Wendel H.P *et al.* Aprotinin in therapeutic doses inhibits chromogenic peptide substrate assays for Protein C. thromb. Res. 1994.
8. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
9. Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
10. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

#### **SYMBOLY:**

Použité symboly jsou v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument definice symbolů.