



ZYMUTEST® Protein C

Art.Nr. RK027A

ELISA-Kit zur Bestimmung der
Konzentration an humanem Protein C

In vitro-Diagnostikum



155, rue d'Eragny, F 95000 Neuville-sur-Oise

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:

ZYMUTEST® Protein C ist ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Konzentration an humanem Protein C (hPC) im Blutplasma oder jeder anderen biologischen Flüssigkeit, in der hPC quantifiziert werden soll.

TESTPRINZIP:

Die verdünnte Probe wird auf eine Mikrotiterplatte pipettiert, die mit einem polyklonalen anti-hPC-Antikörper beschichtet ist, an den das in der Probe enthaltene hPC bindet. Nach einem Waschschrift wird ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter, ebenfalls polyklonaler anti-hPC-Antikörper zugegeben, der an das auf der Mikrotiterplatte immobilisierte hPC bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zugefügt. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine HRP-vermittelte Oxidation von TMB zu einem blauen Farbstoff, der beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach gelb umschlägt. Die Farbintensität ist direkt proportional zur hPC-Konzentration der Probe.

PROBENMATERIAL:

Humanes Citratplasma, EDTA-Plasma oder jede andere biologische Flüssigkeit, in der hPC quantifiziert werden soll.

IM TESTKIT ENTHALTENE KOMPONENTEN:

- COAT: ELISA-Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-hPC-Antikörper. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- SD: 2 Flaschen mit je 50 ml Probenverdünner, gebrauchsfertig.
- Cal: 3 Flaschen hPC-Kalibrationsplasma, lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit 2 ml Probenverdünner (SD) erhält man ein 1:50 vorverdünntes Kalibrationsplasma mit einer hPC-Konzentration von C%. Diese Konzentration ist chargenabhängig und wird für jede Charge gegen den aktuellen internationalen Standard für hPC bestimmt.
- CI: 1 Flasche hPC-Kontrollplasma I (hoch), lyophilisiert. Mit 0,5 ml Aqua dest. zu rekonstituieren.
- CII: 1 Flasche hPC-Kontrollplasma II (niedrig), lyophilisiert. Mit 0,5 ml Aqua dest. zu rekonstituieren.

Anmerkung: Der Sollwert des Kalibrationsplasmas (Cal) sowie der Sollwert und der Vertrauensbereich der Kontrollplasmen (CI und CII) variieren von Charge zu Charge. Sie werden auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt.

- CD: 1 Flasche mit 25 ml Konjugatverdünner, gebrauchsfertig.
- IC: 3 Flaschen anti-hPC-HRP-Immunkonjugat. Polyklonaler Kaninchen-anti-hPC-Antikörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP), lyophilisiert. Mit 7,5 ml Konjugatverdünner (CD) zu rekonstituieren.
- WS: 1 Flasche mit 50 ml 20-fach konzentrierter Waschlösung.
- TMB: 1 Flasche mit 25 ml Peroxidasesubstrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), versetzt mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂), gebrauchsfertig.
- SA: 1 Flasche mit 6 ml Stopplösung (0,45 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig.

Anmerkung: Zur Testdurchführung dürfen ausschließlich Komponenten aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Es dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern kombiniert werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENTHALTEN SIND:

- 8-Kanal- oder Repeaterpipette mit einem Pipettiervolumen im Bereich von 50-300 µl
- Einkanalpipetten mit Pipettiervolumina in den Bereichen von jeweils 0-20, 20-200 und 200-1000 µl
- Mikrotiterplattenwascher
- Mikrotiterplattenleser zur Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm
- Aqua dest.

VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

In der Originalverpackung bei 2-8°C gelagert sind die ungeöffneten Reagenzien bis zum auf dem Etikett gedruckten Verfallsdatum haltbar.

- COAT: Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die jeweilige Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen. Nach Entnahme aus dem Beutel müssen die Streifen innerhalb von 30 min verwendet werden. Zur Lagerung werden nicht benö-

tigte Streifen in Gegenwart des Trockenmittels im originalen Aluminiumbeutel verschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Unter diesen Bedingungen sind sie 4 Wochen bei 2-8°C haltbar.

- SD: Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann die Lösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- Cal: Den Inhalt einer Flasche 30 min vor Gebrauch mit 2 ml Probenverdünner (SD) rekonstituieren. Somit erhält man ein 1:50 vorverdünntes Kalibrationsplasma mit einer hPC-Konzentration von C%, die auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt wird. Das rekonstituierte Kalibrationsplasma ist 24 h bei Raumtemperatur (18-25°C) und 72 h bei 2-8°C stabil.
- CI: Den Inhalt der Flasche 30 min vor Gebrauch mit 0,5 ml Aqua dest. rekonstituieren.
- CII: Den Inhalt der Flasche 30 min vor Gebrauch mit 0,5 ml Aqua dest. rekonstituieren.

Anmerkung: Nach Rekonstitution sind die Kontrollplasmen (CI und CII) 24 h bei Raumtemperatur (18-25°C), 72 h bei 2-8°C und 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil.

Warnhinweis: Sowohl das Kalibrationsplasma (Cal) als auch die Kontrollplasmen (CI und CII) wurden aus humanem Plasma gewonnen, das mit validierten Methoden auf HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper untersucht und für negativ befunden wurde. 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.

- CD: Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann die Lösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- IC: Den Inhalt einer Flasche 30 min vor Gebrauch mit 7,5 ml Konjugatverdünner (CD) rekonstituieren. Das rekonstituierte Immunkonjugat ist 24 h bei Raumtemperatur (18-25°C) und 4 Wochen bei 2-8°C stabil.
- WS: Für 15-30 min im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Feststoffe inkubieren. Schütteln und das für die Testreihe erforderliche Volumen 1:20 mit Aqua dest. verdünnen. Aus 50 ml Konzentrat lässt sich folglich 1 l verdünnte Waschlösung herstellen. Nach dem Öffnen ist das Konzentrat 4 Wochen bei 2-8°C haltbar. Nach Verdünnung kann die Waschlösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 7 Tage bei 2-8°C gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- TMB: Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Peroxidasesubstrat, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.
- SA: Gebrauchsfertig.

Warnhinweis: Die in der Stopplösung (SA) enthaltene Schwefelsäure ist trotz Verdünnung auf 0,45 M ätzend und wie ähnliche Chemikalien mit größter Vorsicht zu handhaben. Jeglicher Haut- und Augenkontakt ist unter Verwendung von Handschuhen und Schutzbrillen zu vermeiden.

Anmerkung: Die erforderlichen Testkitkomponenten müssen 30 min vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Nicht benötigte Komponenten sind bei 2-8°C zu lagern. Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Testpackungen ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Komponenten bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Probengewinnung:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Trinatrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen und für 20 min bei 2.500 g zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma muss innerhalb von 24 h getestet werden. Alternativ kann es bis zu 6 Monaten bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Gefrorenes Citratplasma muss vor Gebrauch für 15 min bei 37°C aufgetaut und innerhalb von 8 h getestet werden. EDTA-Plasma kann ebenfalls verwendet werden und wird gleich wie Citratplasma behandelt.

Proben und Kontrollen:

Proben und Kontrollplasmen (CI und CII) müssen zur Testung 1:50 mit Probenverdünner (SD) verdünnt werden. Bei einer erwarteten hPC-Konzentration von > C% müssen die Proben in höherer Verdünnung (1:100 oder höher) getestet werden. Umgekehrt müssen Proben mit einer erwarteten hPC-Konzentration von < 10% in niedrigerer Verdünnung (1:25 oder niedriger) getestet werden.

Kalibration:

Unter Verwendung des 1:50 vorverdünnten Kalibrationsplasmas (Ca) mit einer hPC-Konzentration von C%, die auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt wird, werden folgende Kalibrationslösungen hergestellt, die für 8 h bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil sind:

| hPC-Konzentration (%) | C | C/2 | C/4 | C/10 | C/20 | 0 |
|---------------------------------|------|--------|---------|--------|---------|------|
| Volumen Kalibrationsplasma (Ca) | 1 ml | 0,5 ml | 0,25 ml | 0,1 ml | 0,05 ml | 0 ml |
| Volumen Probenverdünner (SD) | 0 ml | 0,5 ml | 0,75 ml | 0,9 ml | 0,95 ml | 1 ml |

Testdurchführung (Zwei-Stufen-Test):

Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Dann nach folgendem Schema verfahren:

| Reagenz | Volumen | Vorgehen |
|---|---------|--|
| Leerwert (nur Probenverdünner), Kalibrationslösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:50 verdünnt) oder Proben (1:50 verdünnt) | 200 µl | In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren ¹ |
| Für 1 h bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren ² | | |
| Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt | 300 µl | 5 aufeinanderfolgende Waschschrte unter Verwendung eines Wascheräts ³ |
| Immunkonjugat (IC), mit 7,5 ml Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert | 200 µl | In die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren |
| Für 1 h bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren ² | | |
| Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt | 300 µl | 5 aufeinanderfolgende Waschschrte unter Verwendung eines Wascheräts ³ |
| Peroxidasesubstrat (TMB) | 200 µl | In die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren ⁴ |
| Für 5 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren ^{2,5} | | |
| Stopplösung (SA) | 50 µl | In die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen hinzupipettieren ⁴ |
| Für 10 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren ² | | |
| Die Absorption bei 450 nm (A ₄₅₀) messen ⁶ und den Leerwert jeweils abziehen | | |

Anmerkungen:

- Um eine homogene Antigenbindung zu gewährleisten müssen die Kalibrationslösungen, Kontrollen und Proben so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 10 min pipettiert werden.
- Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden.
- Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen müssen schonend gewaschen werden und dürfen im Zuge der Entfernung der Waschlösung nach jedem Waschschrte niemals austrocknen, da dies die darin immobilisierten Komponenten beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 3 min nach Entfernung der Waschlösung pipettiert werden.
- Die Zugabe des Peroxidasesubstrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen. Diese Zeitabstände müssen bei der anschließenden Zugabe der Stopplösung eingehalten werden.
- Um eine für die im jeweiligen Labor vorherrschende Raumtemperatur optimale Reaktivität (A₄₅₀ der Kalibrationslösung C ≈ 2) der Testansätze zu erzielen, kann die Farbentwicklung bis auf 3 min verkürzt werden. Bei Bedarf ist zusätzlich eine geringfügige Verkürzung der vorausgehenden Inkubationen möglich.
- Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von 620 oder 690 nm verwendet werden.

Testdurchführung (Ein-Stufen-Test):

Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Je 50 µl Immunkonjugat (IC), das mit 2 ml Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert wurde, in den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen vorlegen und je 200 µl Leerwert (nur Probenverdünner), Kalibrationslösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:50 verdünnt) oder Proben (1:50 verdünnt) hinzupipettieren. Für 1 h bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. 5 aufeinanderfolgende Waschschrte mit je 300 µl Waschlösung unter Verwendung eines Wascheräts durchführen. Je 200 µl Peroxidasesubstrat (TMB) in die einzelnen Vertiefungen pipettieren. Für 5 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Je 50 µl Stopplösung (SA) hinzupipettieren. Für 10 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Die Absorption bei 450 nm (A₄₅₀) messen und den Leerwert jeweils abziehen.

ERGEBNISBERECHNUNG:

Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden die A₄₅₀-Werte der einzelnen Kalibrationslösungen gegen die jeweiligen berechneten hPC-Konzentrationen aufgetragen. Die Kurvenanpassung erfolgt z.B. durch Akima- oder Spline-Interpolation.

Anhand dieser Kalibrationskurve werden ausgehend von den A₄₅₀-Werten der Proben und Kontrollen die jeweiligen hPC-Konzentrationen interpoliert. Wurden die Proben anders als 1:50 verdünnt, müssen die ermittelten hPC-Konzentrationen unter Berücksichtigung des abweichenden Verdünnungsfaktors D mit D:50 multipliziert werden (z.B. mit 100:50 = 2 bei einer Verdünnung von 1:100).

ERWARTETE BEREICHE:

Gepooltes humanes Normalplasma, das aus den Citratplasmen von mindestens 30 gesunden und nicht unter Medikation stehenden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren hergestellt wird, enthält per Definition eine hPC-Konzentration von 100%. Bei gesunden Erwachsenen schwankt die hPC-Konzentration zwischen 70 und 140%. Sie ist bei Neugeborenen erniedrigt, ansonsten unabhängig von Alter und Geschlecht.

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN:

hPC ist ein in der Leber synthetisiertes, Vitamin K-abhängiges Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. In humanem Normalplasma kommt es in einer Konzentration von 4-5 µg/ml vor. In Anwesenheit von Thrombomodulin, Calcium und Phospholipide wird PC durch Thrombin zu aktiviertem PC (PCa) aktiviert. Im Komplex mit seinem Cofaktor Protein S spaltet PCa die aktivierten Faktoren V und VIII und wirkt somit gerinnungshemmend.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

Eine hPC-Konzentration von ≤ 60% bei Erwachsenen weist auf einen PC-Mangel hin, der durch die Wiederholung der Messung anhand einer weiteren Probe des betroffenen Patienten bzw. durch Heranziehung einer weiteren Messmethode bestätigt werden muss.

Ein PC-Mangel kann quantitativ (Typ I) oder qualitativ (Typ II) sein. Des Weiteren wird zwischen angeborenem und erworbenem PC-Mangel unterschieden. Ersterer ist mit wiederkehrenden venösen Thrombosen assoziiert. Letzterer kann hingegen durch anti-hPC-Autoantikörper, Dicoumaroltherapie, intravasale Koagulopathien (DIC), Lebererkrankungen und Vitamin-K-Mangel hervorgerufen werden.

TESTEIGENSCHAFTEN:

- Referenzmaterial: internationaler Standard für PC
- Dynamischer Messbereich: von 0 bis ca. 130%
- Nachweisgrenze: ≤ 5%
- Intra-Assay-VK: 3-8%
- Inter-Assay-VK: 5-10%
- Kein signifikanter Einfluss durch Bilirubin bis zu 0,05 mg/ml, Hämoglobin bis zu 5 mg/ml, Heparine bis zu 2 IE/ml und Rheumafaktor.

REFERENZEN:

- Dahlbäck & Villoutreix (2003). Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway, *Thromb. Haemost.*, 1:1525-34.
- Esmon & Esmon (1984). Protein C activation, *Semin. Thromb. Hemost.*, 10:122-33.
- Horellou *et al.* (1985). Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux, *Feuil. Biol.*, 26:27-31.
- Manucci & Vignano (1982). Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation, *Lancet*, 2:463-67.
- Pabinger (1986). Clinical relevance of Protein C, *Blut*, 53:63-75.
- Stenflo (1984). Structure and Function of Protein C, *Semin. Thromb. Hemost.*, 10:109-21.