

VERWENDUNGSZWECK:

ZYMUTEST® Gesamt-Protein S ist ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Konzentration an humanem Gesamt-Protein S im Blutplasma oder jeder anderen biologischen Flüssigkeit, in der humanes Gesamt-Protein S quantifiziert werden soll.

TESTPRINZIP:

Ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter monoklonaler Antikörper, der für beide Protein S-Formen (freies und an das C4b-Bindeprotein gebundenes Protein S) spezifisch ist, wird in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, die mit einem anderen, ebenfalls für beide Protein S-Formen spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet sind. Unmittelbar danach erfolgt die Zugabe des verdünnten Probenplasmas oder einer anderen biologischen Flüssigkeit. Das in der Probe enthaltene Gesamt-Protein S bindet daraufhin über ein Epitop an den monoklonalen Antikörper, mit dem die Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und wird über ein anderes Epitop durch den zweiten, HRP-gekoppelten monoklonalen Antikörper gebunden. Nach einem Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zugegeben. Unter diesen Bedingungen färbt sich TMB blau und schlägt beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach gelb um. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur Konzentration an humanem Gesamt-Protein S der Probe.

PROBENMATERIAL:

Humanes Citratplasma oder jede andere biologische Flüssigkeit, in der die Konzentration an humanem Gesamt-Protein S bestimmt werden soll.

IM TESTKIT ENTHALTENE KOMPONENTEN:

- **COAT:** ELISA-Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem stabilisierten monoklonalen Mausantikörper, der für beide Protein S-Formen spezifisch ist. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- **SD:** 2 Flaschen mit je 50 mL **Protein S-Probenverdünner**, gebrauchsfertig.
- **Cal:** 3 Flaschen humaner **Gesamt-Protein S-Kalibrator**, lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit 2,0 mL Protein S-Probenverdünner erhält man ein **1:50 vorverdünntes** Kalibrationsplasma mit einer Konzentration von **C%** an humanem Gesamt-Protein S. Diese Konzentration ist chargenabhängig und wird für jede Charge exakt bestimmt.
- **CI:** 1 Flasche humanes **Gesamt-Protein S-Kontrollplasma I (hoch)**, lyophilisiert. Mit **0,5 mL** Aqua dest. zu rekonstituieren.
- **CII:** 1 Flasche humanes **Gesamt-Protein S-Kontrollplasma II (niedrig)**, lyophilisiert. Mit **0,5 mL** Aqua dest. zu rekonstituieren.

Anmerkung: Die Gesamt-Protein S-Konzentration des Kalibrators (Cal) sowie die Gesamt-Protein S-Konzentration und der Akzeptanzbereich der Kontrollplasmen (CI und CII) variieren von Charge zu Charge. Sie werden auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt.

- **IC:** 3 Flaschen **anti-(h)-Gesamt-Protein S-HRP-Immunkonjugat**. Monoklonaler Mausantikörper, spezifisch für humanes Gesamt-Protein S, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP), lyophilisiert. Mit **4,0 mL** Protein S-Konjugatverdünner (CD) zu rekonstituieren.
- **CD:** 1 Flasche mit 15 mL **Protein S-Konjugatverdünner**, gebrauchsfertig.
- **WS:** 1 Flasche mit 50 mL 20-fach konzentrierter **Protein S-Waschlösung**. Enthält Calcium.
- **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 Repletierpipette 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 und -schüttler
- 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 Minuten verwendet werden. Zur Lagerung werden nicht benötigte Streifen in Gegenwart des Trockenmittels im originalen Aluminiumbeutel verschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Unter diesen Bedingungen sind die Streifen **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 der Flasche mindestens 30 Minuten vor Gebrauch mit **2,0 mL** Protein S-Probenverdünner (SD) rekonstituieren. Somit erhält man ein **1:50 vorverdünntes** Kalibrationsplasma mit einer Konzentration von **C%** (auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt) an humanem Gesamt-Protein S. Das rekonstituierte Kalibrationsplasma ist **8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)** stabil.
- **CI:** Den Inhalt der Flasche mindestens 30 Minuten vor Gebrauch mit **0,5 mL** Aqua dest. rekonstituieren.
- **CII:** Den Inhalt der Flasche mindestens 30 Minuten vor Gebrauch mit **0,5 mL** Aqua dest. rekonstituieren.

Anmerkung: Nach Rekonstitution sind die Gesamt-Protein S-Kontrollplasmen (CI und CII) **8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)**, **24 Stunden bei 2-8°C** und **2 Monate bei ≤ -20°C** stabil.

Warnhinweis: Sowohl der Gesamt Protein S-Kalibrator (Cal) als auch die Gesamt Protein S-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.

- **IC:** Den Inhalt der Flasche mit **4,0 mL** Protein S-Konjugatverdünner (CD) rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig schütteln. Das rekonstituierte Immunkonjugat ist **24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)** und **4 Wochen bei 2-8°C** stabil.
- **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.
- **WS:** Für 15-30 Minuten im Wasserbad **bei 37°C** bis zur vollständigen Auflösung all-fälliger 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 in der Originalflasche **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 und Calcium.
- **TMB:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Substrat, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.
- **SA:** 0,45 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig.

Anmerkung: Die erforderlichen Testkitkomponenten müssen mindestens 30 Minuten 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 Trinitrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen und für 20 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma muss innerhalb von **8 Stunden** getestet werden. Alternativ kann es für bis zu **6 Monate** bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Das gefrorene Plasma muss vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut und innerhalb von **4 Stunden** getestet werden.

Proben und Kontrollen:

Proben und Kontrollen (CI und CII) müssen zur Testung **1:50** mit Protein S-Probenverdünner (SD) verdünnt werden. Bei erwarteten Gesamt-Protein S-Konzentrationen von **> 100%** müssen die Proben in höherer Verdünnung (**1:100 oder höher**) getestet werden.

Umgekehrt können Proben mit erwarteten Gesamt-Protein S-Konzentrationen von < 10% in niedrigerer Verdünnung (1:25 oder niedriger) getestet werden.

Kalibration:

Gesamt-Protein S-Konzentrationen werden als Prozente (%) eines **gepoolten humanen Normalplasmas** angegeben. Eine **100%-Konzentration** entspricht einer 1:50-Verdünnung dieses Normalplasmas.

Unter Verwendung des **1:50 vorverdünnten Gesamt-Protein S-Kalibrators (Cal)** mit einer Konzentration von **C%** (auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt) an humanem Gesamt-Protein S werden folgende Kalibrationslösungen hergestellt:

Gesamt-PS-Konzentration (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volumen Gesamt-PS-Kalibrator (Cal)	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

Die Kalibrationslösungen werden vorsichtig durchmischt und sind für **4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)** stabil.

Testdurchführung:

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
Anti (h)-Gesamt-PS-HRP-Immunkonjugat (IC), mit 4,0 mL Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert	100 µL	In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren
Leerwert (nur Probenverdünner), Kalibrationslösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:50 verdünnt) oder Proben (1:50 verdünnt)	100 µL	In die einzelnen Vertiefungen sofort hinzupipettieren ¹
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren ²		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschriffe unter Verwendung eines Waschrägers ^{3,4}
Peroxidasesubstrat (TMB)	200 µL	Unmittelbar nach dem letzten Waschschriffe in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren ^{4,5}
Für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren ^{2,6,7}		
Stopplösung (SA)	50 µL	In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren, um die Farbreaktion zu stoppen ⁵
Zur Stabilisierung der Farbe für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren , ^{2,6} die Absorption bei 450 nm (A₄₅₀) messen ⁸ und jeweils den Leerwert subtrahieren		

Anmerkungen:

- Um eine homogene Antigenbindung zu gewährleisten müssen die Kalibrationslösungen, Kontrollen und Proben so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 10 Minuten in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert werden. Etwaige Verzögerungen können zu falschen Ergebnissen führen.
- Vor jeder Inkubation ist ein kurzes Durchmischen der Testansätze unter Verwendung eines Mikrotiterplattenschüttlers empfohlen.
- Aufgrund der Calciumabhängigkeit der verwendeten monoklonalen Gesamt-Protein S-Antikörper darf ausschließlich die im Kit enthaltene, calciumhaltige Waschlösung eingesetzt werden.
- Im Zuge der Entfernung der Waschlösung nach jedem einzelnen Waschschriffe dürfen die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen niemals austrocknen, da dies die an der Platte immobilisierten Komponenten beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 3 Minuten nach Entfernung der Waschlösung in die einzelnen Vertiefungen pipettiert werden. Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und ein abruptes Entfernen der Waschlösung vermieden wird.
- 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.
- Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden.
- Um eine für die im jeweiligen Labor vorherrschende Raumtemperatur optimale Reaktivität (A₄₅₀ der höchsten Kalibrationslösung ≈ 2,0) der Testansätze zu erzielen, kann die Farbentwicklung bis auf 3 Minuten reduziert werden. Bei Bedarf ist zusätzlich eine geringfügige Verkürzung der vorausgehenden Inkubation möglich.
- Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von 620 oder 690 nm verwendet werden.

ERGEBNISDARSTELLUNG:

- Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden die berechneten **Gesamt-Protein S-Konzentrationen (%)** der einzelnen Kalibrationslösungen auf der x-Achse gegen die

bei **450 nm** jeweils ermittelten Absorptionen (**A₄₅₀**) auf der y-Achse aufgetragen (linlin). Die Kurvenberechnung erfolgt z.B. mittels Akima oder smoothed cubic spline.

- Von der ermittelten Kurve kann man anhand der für die **Proben und Kontrollen** gemessenen A₄₅₀-Werte auf die jeweiligen Gesamt-Protein S-Konzentrationen schließen. Wurden die Proben **anders als 1:50** verdünnt, muss der errechnete Wert unter Berücksichtigung des abweichenden Verdünnungsfaktors **D mit D:50 multipliziert** werden (z.B. mit 100:50 = **2 bei einer Verdünnung von 1:100**), um die tatsächliche Gesamt-Protein S-Konzentration der Probe zu erhalten.
- Alternativ kann eine ELISA-Software (z.B. Dynex, Biolise o.ä.) für die Berechnung der jeweiligen Gesamt-Protein S-Konzentrationen herangezogen werden.

ERWARTETE BEREICHE:

Die Gesamt-Protein S-Konzentration in humanem Normalplasma schwankt im Bereich von 70-150%. Sie ist bei Männern höher als bei Frauen und nimmt sowohl mit dem Alter als auch mit den Blutfettwerten zu.

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN:

Die Gesamt-Protein S-Konzentration in humanem Normalplasma beträgt ca. 25 µg/mL. Etwa 40% zirkuliert frei, während etwa 60% in einem nicht-kovalenten Komplex mit dem C4b-Bindeprotein (C4b-BP) vorliegt. Nur in seiner freien Form kann Protein S als Cofaktor von aktiviertem Protein C fungieren und somit seine gerinnungshemmende Aktivität entfalten.

Protein S wird in der Leber synthetisiert und ist ein Vitamin K-abhängiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 80 kDa. Das Gleichgewicht zwischen seiner freien und seiner an C4b-BP gebundenen Form spielt eine wichtige Rolle in der Hämostase, da nur die freie Form aktiv ist. In den Frühstadien von entzündlichen Prozessen ist die Konzentration an freiem Protein S als Konsequenz einer Hochregulierung von C4b-BP erniedrigt. Die Gesamt-Protein S-Konzentration ist im Rahmen von Coumarin- und L-Asparaginase-Therapien, aber auch bei Lebererkrankungen erniedrigt.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

Erniedrigte Gesamt-Protein S-Konzentrationen findet man bei einem Protein S-Mangel vom Typ I.

Ein vorübergehender Mangel an freiem Protein S kann in den Frühstadien von entzündlichen Prozessen als Konsequenz der Hochregulierung von C4b-BP beobachtet werden. Die Gesamt-Protein S-Konzentration bleibt dabei aber unverändert und kann sogar erhöht sein.

Abnormale Gesamt-Protein S-Konzentrationen liegen im Bereich von < 70%. Bevor aber ein Protein S-Mangel diagnostiziert wird, muss dieser Cutoff in Abhängigkeit von Faktoren wie Alter, Geschlecht, Fettmetabolismus, Therapie usw. sorgfältig evaluiert werden.

ANWENDUNGEN:

- Diagnose eines angeborenen, erworbenen oder vorübergehenden Protein S-Mangels:
 - Typ I: Teilweise erniedrigte Konzentration an freiem und Gesamt-Protein S.
 - Typ II: Normale Konzentration an freiem und Gesamt-Protein S, aber erniedrigte Aktivität.
 - Typ III: Normale Gesamt-Protein S-Konzentration mit erniedrigtem Anteil an freiem Protein S und somit erniedrigter Aktivität.
- Bestimmung der Gesamt-Protein S-Konzentration in klinischen Studien.

TESTEIGENSCHAFTEN:

- Messbereich: Von 0 bis etwa 100%.
- Nachweisgrenze: ≤ 5%.
- Intra-Assay-VK: 3-8%
- Inter-Assay-VK: 5-10%
- Kein Einfluss durch Heparin bis zu 2 IE/mL und Bilirubin bis zu 0,1 mg/mL.
- Referenzmaterial: Internationaler Standard für Protein S.

REFERENZEN:

- Faioni *et al.* (1997). Free Protein S Deficiency is a Risk Factor for Venous Thrombosis, *Thromb. Haemost.*, 78:1343-46.
- Henkens *et al.* (1995). Plasma Levels of Protein S, Protein C, and Factor X: Effects of sex, Hormonal State and Age, *Thromb. Haemost.*, 74:1271-7.
- Aiach *et al.* (1997). Protein C and Protein S deficiencies. *Sem. in Hemat.*, 34:205-17.
- Schwartz *et al.* (1984). Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease. *Blood*, 64:1297-1300.

Änderungen im Vergleich zur Vorversion