



ZYMUTEST™ Protein C



REF RK027A

96 Tests

ELISA-Kit zur quantitativen Bestimmung von Protein C



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:

ZYMUTEST™ Protein C ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen *in-vitro*-Bestimmung von Protein C (PC)-Antigen in humanem Plasma.

ZUSAMMENFASSUNG:

Technisch:

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges humanes Glykoprotein, das die Gerinnung inhibiert. Seine Konzentration im humanem Plasma liegt bei ca. 4 µg/mL. Durch den Thrombomodulin-Thrombin-Komplex aktiviertes PC (APC) spaltet, in Gegenwart seines Cofaktors Protein S sowie Calcium und Phospholipiden, die Faktoren Va und VIIIa und unterdrückt so deren gerinnungsfördernde Co-Faktoren-Aktivität.^{1,2}

Klinisch:

Der Test dient der Diagnose eines angeborenen oder erworbenen PC-Mangels.^{3,4,5,6}

Erworbene PC-Mängel werden bei Lebererkrankungen, während einer VKA-Therapie oder bei intravasalen Koagulopathien (DIC) beobachtet. Angeborene PC-Mängel können quantitativ (Typ I) oder qualitativ (Typ II) sein und sind mit wiederkehrenden venösen Thrombosen assoziiert. Ein angeborener oder erworbener PC-Mangel ist ein Risikofaktor für venöse Thrombosen.³

TESTPRINZIP:

ZYMUTEST™ Protein C ist eine auf Antigen-Antikörper-Reaktion basierende ELISA-Methode: In der Probe enthaltene PC-Antigen reagiert mit polyklonalen Anti-PC-Antikörpern.

Die Probe wird auf eine beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Das in der Probe enthaltene PC bindet an den immobilisierten Antikörper. Nach einem Waschschrift wird das Immunkonjugat, ein Meerrettich-peroxidase (HRP)-gekoppelter, ebenfalls polyklonaler, Anti-PC-Antikörper zugegeben, der an die freien Epitope des auf der Mikrotiterplatte immobilisierten PC 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 Absorption bei 450 nm ist direkt proportional zur PC-Konzentration der Probe.

IM TESTKIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

- COAT** ELISA-Mikrotiterplatte: [12x8] Bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-PC-Antikörper. Die Platte ist stabilisiert und in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt. Enthält eine geringe Menge an Natriumazid (0,9 g/L).
- SD ELISA** Probenverdünner: 2 Flaschen mit je 50 mL, gebrauchsfertig. Enthält BSA.
- CAL** PC-Kalibrator: 3 Flaschen mit je 2 mL, lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit 2 mL **SD ELISA** erhält man ein 1:50 vorverdünntes Kalibrationsplasma mit einer PC-Konzentration von C% Diese Konzentration ist chargenabhängig und liegt zwischen 110 und 150%. Die Standardkonzentration wird anhand des internationalen NIBSC Standards festgelegt. Enthält BSA.
- CI** PC-Kontrollplasma hoch: 1 Flasche mit 0,5 mL, lyophilisiert.
- CII** PC-Kontrollplasma niedrig: 1 Flasche mit 0,5 mL, lyophilisiert.
- IC** Anti-(h)-PC HRP Immunkonjugat: 3 Flaschen mit je 7,5 mL, polyklonaler Kaninchen-Anti-PC-Antikörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP), lyophilisiert. Enthält BSA.
- CD ELISA** Konjugatverdünner: 1 Flasche mit 25 mL, gebrauchsfertig. Enthält BSA.
- WS ELISA** Waschlösung: 1 Flasche mit 50 mL, 20-fach konzentriert.
- TMB** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin: 1 Flasche mit 25 mL Substrat, gebrauchsfertig. Enthält Wasserstoffperoxid (H₂O₂).
- Stop** 0,45 M Schwefelsäure: 1 Flasche mit 6 mL, gebrauchsfertig.

Die Konzentrationen der Kontroll- und Kalibrationsplasmen können von Charge zu Charge leicht variieren. Die exakten chargenspezifischen Werte sind dem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Für die Herstellung einiger der enthaltenen Reagenzien wird Material humanen und tierischen Ursprungs verwendet. Jedes verwendete Humanplasma wurde mit registrierten Methoden getestet und als negativ für Hepatitis B-Oberflächenantigen, Hepatitis C-Antikörper (HCV) und Antikörper gegen HIV 1 und 2 eingestuft. Kein Test kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen mit größter Sorgfalt unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potenziell infektiös gehandhabt werden.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Stabilitätsstudien haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik in professionellem Laborgebrauch.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

Die erforderlichen Testkitkomponenten müssen vor Gebrauch für 30 Minuten auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Die Gummistopfen der Flaschen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden

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.

Den Inhalt jeder Flasche rekonstituieren mit exakt:

CI **CII** → 0,5 mL **Aqua dest.** Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

CAL → 2 mL **SD ELISA** um ein 1:50 vorverdünntes Kalibrationsplasma mit einer PC-Konzentration von C% zu erhalten. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

IC → 7,5 mL **CD ELISA** mindestens 15 Minuten vor Gebrauch. Bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig durchmischen.

SD ELISA **TMB** **Stop** **CD ELISA** Gebrauchsfertig

WS ELISA Die Flasche schütteln und die Waschlösung 1:20 mit **Aqua dest.** verdünnen (aus 50 mL Konzentrat lässt sich folglich 1 L verdünnte Waschlösung herstellen). Falls nötig im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Feststoffe inkubieren.

LAGERUNG UND STABILITÄT:

Die ungeöffneten Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

COAT Nicht benötigte Streifen können im Original-Aluminiumbeutel (verschlossen, in Gegenwart des Trockenmittels), im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt und geschützt vor jeglicher Feuchtigkeit für 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.

Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

CAL

72 Stunden bei 2-8°C

24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)

CI **CII** 72 Stunden bei 2-8°C

24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)

2 Monate tiefgefroren bei ≤ -20°C*

*Kann einmalig bei 37°C aufgetaut werden und muss dann umgehend verwendet werden.

IC

4 Wochen bei 2-8°C

24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)

Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach dem Öffnen unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

SD ELISA **CD ELISA** **TMB**

4 Wochen bei 2-8°C

WS ELISA

4 Wochen bei 2-8°C bzw.

7 Tage bei 2-8°C (verdünnte Lösung)

Stop

8 Wochen bei 2-8°C

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.

Materialien:

- 8-Kanal- oder Repeaterpipette mit einem Pipettiervolumen im Bereich von 50-300 µL
- Einkanalpipetten mit Pipettierolumina 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

PROBEGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen. Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktuellen lokalen Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind in den CLSI-Dokumenten GP44-A4⁷ und H21-A5⁸ veröffentlicht). In Bezug auf die Lagerung des Plasmas sind die Referenzen zu beachten.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Proben und Kontrollen (CI und CII) müssen zur Testung 1:50 mit **SD ELISA** verdünnt werden. Bei erwarteten PC-Konzentrationen von >C% muss die Verdünnung auf 1:100 oder mehr erhöht werden.

2. Unter Verwendung von **CAL** mit einer PC-Konzentration von C% werden folgende Kalibrationslösungen hergestellt:

PC-Konzentration (%)	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
CAL	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,1 mL	0,05 mL	0 mL
SD ELISA	0 mL	0,5 mL	0,75 mL	0,9 mL	0,95 mL	1 mL

Die Kalibrationslösungen werden vorsichtig durchmischt und sind für 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil.

3. Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Dann nach folgendem Schema verfahren (Zwei-Stufen-Test):

Reagenz	Volumen	Vorgehen
CAL oder CI oder CII oder Verdünnte Proben oder SD ELISA (Leerwert)	200 µL	In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren
1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (a)		
WS ELISA	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschriffe (b)
IC	200 µL	In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren
1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (a)		
WS ELISA	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschriffe (b)
TMB	200 µL	Unmittelbar nach dem letzten Waschschriff in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren (b,c). Die Verteilung des Substrats muss genau und in exakten Zeitabständen erfolgen.
5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (a)		
Stop	50 µL	Mit identischer Verteilung und Zeitintervallen wie vorher für das Substrat in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren, um die Farbentwicklung zu stoppen (c)
Zur Stabilisierung der Farbe für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren, dann die Absorption bei 450 nm messen und jeweils den Leerwert subtrahieren (d).		

Die Kalibrationslösungen, Kontrollen und Proben müssen so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 10 Minuten in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert werden. Etwaige Verzögerungen können zu falschen Ergebnissen führen (Unterschätzung der Werte bei den letzten Vertiefungen).

(a) Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden. Es kann ein Mikrotiterplattenschüttler verwendet werden.

(b) Im Zuge des Hinzufügens der Reagenzien oder der Entfernung der Waschlösung nach jedem einzelnen Waschschriff 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. Falls nötig, kann die Platte mit Waschlösung gefüllt bleiben und erst direkt vor Zugabe des nächsten Reagenzes geleert werden. Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und ein abruptes Entfernen der Waschlösung vermieden wird.

(c) Die Zugabe des Substrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen.

(d) Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von 620 oder 690 nm verwendet werden.

Testdurchführung (Ein-Stufen-Test):

Dieser Test kann auch als Ein-Stufen-Methode durchgeführt werden. In diesem Fall wird die Kalibrationskurve von 0 bis C% betrachtet. Bis auf das **IC**, welches mit 2 mL **CD ELISA** zu rekonstituieren ist, werden alle Reagenzien wie bei der Zwei-Stufen-Methode rekonstituiert. Das Testplasma wird nach 1:50-Verdünnung in **SD ELISA** analysiert (oder falls nötig stärker verdünnt). Kontrollen und Proben werden, wie bei der Zwei-Stufen-Methode, 1:50 verdünnt.

Je 50 µL **IC** in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen zugeben und anschließend 200 µL der Kalibrationslösung des verdünnten Plasmas hinzupipettieren. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) und einem Waschschriff wird das **TMB** (200 µL pro Vertiefung) zugegeben und die Reaktion nach 5 Minuten mit 50 µL **Stop** gestoppt. Die Absorption bei 450 nm ist zu messen. Waschschriffe, Warnhinweise und Ergebnisinterpretation sind identisch mit der Zwei-Stufen-Methode.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasma ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse. Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. Für jede Testserie ist eine neue Kalibrationskurve zu erstellen. Jedes Labor kann unter den eigenen Testbedingungen seine Akzeptanzbereiche festlegen und die erwartete Testleistung verifizieren.

ERGEBNISSE:

- Die bei 450 nm gemessenen Absorptionen können je nach effektiver Temperatur während des Testlaufs variieren.
- Die PC-Konzentration in % wird auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption A450 auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen, wobei das „best fit“-Interpolationsverfahren zu wählen ist (das der Packung beiliegende Datenblatt ist zu beachten).
- Die Ergebnisse werden unter Verwendung der Kalibrationskurve mit den für die Proben und Kontrollen erhaltenen Absorptionen bei 450 nm ausgedrückt.
- Die PC-Konzentration (%) der Probe kann, sofern die Standardverdünnung von 1:50 verwendet wird, direkt von der erhaltenen Kalibrationskurve abgelesen werden.
- Bei Verwendung anderer Verdünnungen muss der erhaltene Wert noch mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.
- Alternativ kann eine ELISA-Software (z.B. Dynex, Biolise o.ä.) für die Berechnung der jeweiligen PC-Konzentrationen herangezogen werden.
- Für die Kontrollen **CI** und **CII** werden die Konzentrationen direkt von der Kalibrationskurve abgeleitet.
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Leistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Jegliche verdächtige Proben oder jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden.
- Wird ein Waschschriff nicht korrekt ausgeführt, kann die Negativkontrolle einen hohen Extinktionswert hervorrufen. Um nicht-spezifische Farbentwicklung zu vermeiden, ist sicherzustellen, dass alle Waschschriffe korrekt ausgeführt werden.

ERWARTETE BEREICHE:

Per Definition entspricht eine PC-Konzentration von 100% der Konzentration eines Normal-Citratplasma-Pools, der durch Plasmen gesunder weiblicher oder männlicher Spender ohne Medikation im Alter zwischen 18 und 55 Jahren erhalten wurde. Bei Erwachsenen liegt die PC-Konzentration gewöhnlich zwischen 70 und 140%. Bei Neugeborenen ist sie verringert, ansonsten aber unabhängig von Alter und Geschlecht.

TESTEIGENSCHAFTEN:

- Der Test wird gegen den internationalen NIBSC-Standard für PC kalibriert.
- Keine Beeinflussung durch Rheumafaktor
- Für PC-Konzentrationen bis zu 100 µg/mL wurde bei Nutzung des empfohlenen Protokolls kein Prozone-Effekt beobachtet
- Messbereich: Von 0 bis 130%.
- Nachweisgrenze: ≤ 5%.
- Intra-Assay-VK: 3-8%.
- Inter-Assay-VK: 5-10%.
- Keine Beeinflussung durch Heparine bis zu 2 IE/mL, Bilirubin bis zu 0,05 mg/mL und Hämoglobin bis zu 5 mg/mL.

REFERENZEN:

- Horellou M.H. Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux. Feuil. Biol. 1985.
- Stenflo J. Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
- Manucci P.M. Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet. 1982.
- Esmon C.T. Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis. 1984.
- Axner T. Characterisation and some properties of the Protein C activator from Agkistrodon Concorrix venom. Thromb. Haemostasis. 1988.
- Pabinger I. Clinical relevance of Protein C. Blut. 1986.
- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Zeichenerklärungs-Blatt ist zu beachten.

SD ELISA CD ELISA WS ELISA

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Änderungen im Vergleich zur Vorversion