

CE ZYMUTEST TOTAL PROTEIN S # RK021A



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Revize:17_11_2022

IVD

Kompletní ELISA test pro stanovení Proteinu S

Pouze pro použití In Vitro.

POUŽITÍ:

ZYMUTEST Free Protein S kit je jedнокroková, dvou-místná imunochemická metoda pro měření veškerého lidského Proteinu S v plazmě, nebo v jakékoli tekutině, kde může být Protein S přítomen.

PRINCIP:

Do jamky mikrotitrační destičky, na jejíž stěny je navázána monoklonální protilátka specifická pro obě formy Proteinu S (volný PS nebo PS v komplexu s C4b-vázacím proteinem) se přidá imunokonjugát, což je jiná specifická monoklonální protilátka proti oběma formám PS, značená křénovou peroxidázou (HRP). Reakce se zahájí přidáním ředěného vzorku plazmy nebo jiné tekutiny. Pokud je přítomen protein S (volný nebo vázaný), váže se na monoklonální protilátku na pevné fázi přes jeden epitop a přes jiný epitop se na něj váže druhá protilátka značená křénovou peroxidázou (HRP). Následuje promývací krok a přidání 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) v přítomnosti peroxidu vodíku (H₂O₂). V přítomnosti křénové peroxidázy dojde k vytvoření modrého zbarvení. Po zastavení reakce kyselinou sírovou se modrá barva změní na žlutou. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci lidského proteinu S v testovaném vzorku.

VZOREK:

- Lidská citrátová plazma.
- Veškeré biologické tekutiny, ve kterých má být měřen Protein S

REAGENCIE:

1. **COAT: Micro ELISA destička**, obsahuje 12 proužků po 8 jamkách, potažených stabilizovanou myší monoklonální protilátkou specifickou pro dvě formy lidského Proteinu S, balenou v hliníkovém pouzdro hermeticky uzavřeném společně s desikantem.
2. **SD: 2 lahvičky s obsahem 50 ml Protein S diluentu vzorku** připraveného k použití (obsahuje vápník).
3. **Cal: 3 lahvičky kalibrátoru proteinu S** (normální plazma kalibrovaná s referenční poolovanou plazmou), lyofilizovaný, předředěný 1:50. Každá lahvička, po rozpuštění s 2 ml diluentu vzorku (SD) umožní získat kalibrátor, již předředěný 1:50. Přesná koncentrace proteinu S je uvedena na přiloženém letáku.
4. **CI: 1 lahvička s obsahem 0,5 ml lyofilizované kontrolní plazmy I pro protein S**, vysoká.
5. **CII: lahvička s obsahem 0,5 ml lyofilizované kontrolní plazmy II pro protein S**, nízká

Pozn.: Koncentrace proteinu S a akceptabilní meze pro kontrolní plazmy CI, CII a kalibrátor mohou kolísat od šarže k šarži. Přesné hodnoty jsou uvedeny na přiloženém letáku.

6. **IC: 3 lahvičky Anti-(h)-Total Protein S-HRP imunokonjugátu** – myší monoklonální protilátka s navázanou HRP, lyofilizovaný.
7. **CD: 1 lahvička 15 ml diluentu konjugátu Proteinu S**, připraveného k použití.
8. **WS: 1 lahvička 50 ml promývacího roztoku pro Protein S**, 20x koncentrovaného (obsahuje kalcium)
9. **TMB: 1 lahvička 25 ml peroxidázového substrátu: 3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine**, s obsahem peroxidu vodíku. Připraven k použití.
10. **SA: 1 lahvička 6 ml 0,45 M kyseliny sírové (zastavovací roztok)**. Připraven k použití.

Poznámka: Užívejte komponenty pouze z kitu stejné šarže. Nezaměňujte komponenty z kitů o různých šaržích v jednu testu.

REAGENCIE A VYBAVENÍ POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:

- 8-kanálová pipeta nebo rozplňovací pipeta 50 – 300 µl
- 1-kanálové pipety o různých objemech od 0 - 20 µl, 20 – 200 µl, 200 – 1000 µl
- Promývačka mikrotitračních destiček a třepačka
- ELISA Reader s vlnovou délkou 450 nm
- Destilovaná voda

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ, SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

V originálním balení, před použitím, pokud jsou skladovány v 2-8°C jsou neotevřené reagenty stabilní do data vytištěného na obalu.

1. **ELISA mikrotitrační destička:** otevřete plastové pouzdro a vyjměte požadovaný počet 8-mi jamkových proužků pro analýzu. Pokud jsou mimo pouzdro, musí být testovací proužky použity do 30 minut. Nepoužité proužky mohou být skladovány v 2-8°C 4 týdny v jejich originálním hliníkovém pouzdro, za přítomnosti desikantu, hermeticky uzavřené, chráněné před vlhkostí a uložené v přiloženém skladovacím pouzdro.
 2. **Protein S diluent vzorku:** je připraven k použití. Po otevření může být používán po 4 týdny, pokud je skladován při 2-8°C a pokud je zabráněno bakteriální kontaminaci během použití. Obsahuje 0,05% Kathon CG.
 3. **Kalibrátor Proteinu S:** rozpusťte každou lahvičku 2 ml diluentu vzorku. Získáte kalibrační plazmu, obsahující protein S v koncentraci „C%“, již ředěnou 50x. Tento roztok je stabilní 8 hodin při pokojové teplotě.
 4. **Protein S kontrola I** (lidská plazma, vysoká): rozpusťte s 0,5 ml destilované vody.
 5. **Protein S kontrola II** (lidská plazma, nízká): rozpusťte s 0,5 ml destilované vody.
- Pozn.: rozpuštěné kontroly proteinu S jsou stabilní 8 hodin za pokojové teploty, 24 hodin při 2-8°C nebo 2 měsíce zmrazené při -20°C nebo nížší.

Upozornění: Kalibrátor Proteinu S (3) a kontroly (4 a 5) jsou připraveny z normální lidské plazmy. Tyto plazmy byly testovány registrovanými metodami a sledány negativními na anti-HIV protilátky, HBsAg a anti-HCV protilátky. Přesto, žádný test nemůže vyloučit nepřítomnost infekčních agens. S každým produktem lidského původu musí být zacházeno s opatrností, jako s potenciálně infekčním.

6. **Imunokonjugát anti-(h)-Total PS-HRP** : každá lahvička musí být rozpuštěna se 4 ml PS diluentu konjugátu. Nechte částičky kompletně rozpustit. Před použitím opatrně lahvičku promíchejte, aby se obsah homogenizoval. Rozpuštěný konjugát je stabilní 24 hodin za pokojové teploty, 4 týdny při 2-8°C.

7. **Diluent konjugátu PS:** Připraven k použití. Po otevření může být užíván po 4 týdny, pokud je skladován při 2-8°C a je zabráněno bakteriální kontaminaci během použití. Obsahuje 0,05% Kathon CG.

8. **Promývací roztok pro PS:** Inkubujte lahvičku 15 – 30 minut ve vodní lázni v 37°C dokud se zcela nerozpustí pevné částičky (pokud jsou přítomné). Promíchejte lahvičku a naředte požadovaný objem v poměru 1:20 v destilované vodě (obsah lahvičky 50 ml dovoluje získat 1 litr promývacího roztoku). Promývací roztok pro Protein S musí být skladován při 2-8°C ve své originální lahvičce a použit do 4 týdnů po otevření. Ředěný promývací roztok musí být použit do 7 dnů, pokud bylo zabráněno kontaminaci a pokud byl skladován při 2-8°C. Obsahuje 0,05% Kathon CG. Tento promývací roztok obsahuje kalcium a musí být použit pro testování proteinu S.

9. **TMB substrát:** Připraven k použití. Po otevření může být používán po 4 týdny, pokud je skladován při 2-8°C a pokud bylo zabráněno bakteriální kontaminaci během používání.

10. **Zastavovací roztok:** 0,45M kyselina sírová. Připraven k použití.

Pozn.: soupravu přeneste do pokojové teploty nejméně 30 minut před použitím. Skladujte nepoužité reagenty při 2-8°C. Studie stability provedené při 30°C ukazují, že reagenty mohou být přepravovány při pokojové teplotě bez poškození.

PROVEDENÍ:

Odběr vzorku:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109M citrátu sodného (1 díl), plazma musí být oddělena centrifugací při 2500 g po 20 minut. Citrátová plazma může být testována do 8 hodin nebo skladována zmrazená při teplotě -20°C nebo nížší po dobu 6 měsíců. Plazmu rozmrazte 15 minut při 37°C. Rozmražený vzorek musí být testován do 4 hodin.

Testovaná plazma, vzorek:

Vzorek musí být testován ředěný 50x (1:50) diluentem vzorku PS. Pro očekávané koncentrace PS >100% může být vzorek testován v ředění 1:100 nebo větším. Pokud je diluční faktor D, získaná koncentrace musí být vynásobena dodatečným ředicím faktorem, který je D:50 (tedy x2 pro 1:100 atd.)

Pro nízké hladiny PS (<10%) mohou být vzorky testovány v nižším ředění D' a získaná koncentrace musí být vydělena 50:D'. Protein S kontroly I a II musí být testovány ředěné 50x (1:50) v PS diluentu vzorku.

Kalibrace:

Koncentrace Proteinu S je vyjádřena jako % normální poolované lidské plazmy. Pro test na Protein S, 100% koncentrace odpovídá normální poolované lidské plazmě, ředěné 1:50, což je standardní ředění v testu.

Použití kalibrátoru Proteinu S – součást soupravy – (2 ml kalibrátoru již naředěného 1:50 s koncentrací volného Proteinu S „C“ uvedenou pro každou šarži na přiloženém letáku) dovoluje připravit následující standardní ředění:

Protein S koncentrace (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Objem PS kalibrátoru	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,05 ml	0 ml
Objem PS diluentu vzorku	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	0,9 ml	0,95 ml	1 ml

Ředěné standardy jsou stabilní 4 hodiny při pokojové teplotě.

Distributor: Diagnostica s.r.o., Za Trať 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz



Postup:

Vyjmete pro počet testů požadovaný počet proužků z hliníkového pouzdra a vložte je do přiloženého rámečku. Do jamek pak pipetujete reagenty dle následujícího postupu:

Reagent	Objem	Testovací krok
Anti-(h)-Total Protein S-HRP imunokonjugát (rozpuštěný ve 4 ml PS diluentu konjugátu)	100 µl	Napipetování Anti-(h)-Total Protein S-HRP imunokonjugátu do jamek mikrotitrační destičky
PS kalibrátor nebo testované vzorky nebo PS diluent vzorku (blank)	100 µl	Pipetujte ihned standardní roztoky nebo testované vzorky do odpovídajících jamek destičky
Promíchejte na třepačce nebo manuálně a inkubujte 1 hodinu v pokojové teplotě (18-25°C)		
PS promývací roztok (20x ředěný destilovanou vodou)	300 µl	Provedte 5 promytí za použití promývačky (a)
TMB/H ₂ O ₂ Substrát	200 µl	Ihned po promytí pipetujte substrát do jamek Pozn: pipetování substrátu řádek za řádkem musí být přesně ve stejných časových intervalech (b,c)
Inkubujte přesně 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (d)		
0,45 M Kyselina sírová	50 µl	Pipetujte ve stejných časových intervalech jako substrát, přidáním 0,45 M kyseliny sírové zastavíte rozvoj barvy (c)
Počkejte 10 minut aby se zbarvení stabilizovalo a měřte absorbanci při 450 nm (A450). Odečtěte hodnotu blanku.		

Poznámka:

Pipetujte kalibrátory, kontroly a testované vzorky tak rychle, jak je možné (během 10 minut), aby byla získána homogenní imunologická kinetika pro vazbu antigenu. Příliš dlouhé prodloužení mezi napipetováním do první a poslední jamky může ovlivnit imunologickou kinetickou reakci a vést k chybným výsledkům.

- | | |
|----|--|
| a) | Musí být užit pouze promývací roztok specifický pro Protein S, obsahující kalcium. Monoklonální protilátka vyžaduje kalcium |
| b) | Nikdy nenechávejte destičku prázdnou mezi přidáním reagentů nebo po promytí. Následující reagent musí být přidán do 3 minut, aby se zabránilo vyschnutí destičky – poškodilo by navázané komponenty. Pokud je nezbytné, udržujte destičku naplněnou promývacím roztokem a vyprázdněte až před pipetováním další reagenty. Promývačka musí být nastavena tak, aby promývala destičku jemně. Je nutné se vyhnout příliš energickému vyprazdňování jamek, aby se nesnížila reaktivita destičky. |
| c) | Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do řádků musí být přesně určeny a stejné intervaly musí pak být při pipetování zastavovacího roztoku |
| d) | Vyvarujte se ponechání destičky na slunečním světle během inkubace a během vývoje zbarvení. Měla by být použita třepačka destiček |
| e) | Pro bichromatický odečet může být užita referenční vlnová délka 690 nm nebo 620 nm. |

VÝSLEDEK:

Uživatel musí sestavit kalibrační křivku získanou za použití standardních ředění (viz leták). Na lineární grafický papír vyneste na jednu osu **koncentraci Proteinu S (%)** a na druhou odpovídající absorbance (**A450**). Z obdržené kalibrační křivky odečtěte přímo koncentraci Proteinu S ve vzorcích testovaných v ředění 1:50. Pokud bylo užito větší ředění (**D**), pak musí být koncentrace volného Proteinu S vynásobena doplňkovým dilučním faktorem (**D:50**). Pokud bylo použito menší ředění (**D'**), musí být odečtená koncentrace vydělena **50:D'**. Koncentrace kontroly I a II jsou přímo odečteny z křivky. Alternativně lze použít ELISA software (např. Dynex, Biolise) pro odečet koncentrací.

OČEKÁVANÁ ROZMEZÍ:

Koncentrace Proteinu S v normální lidské plazmě je obvykle v rozmezí 70 – 150%. Koncentrace je větší u mužů než u žen. Má sklon ke zvýšení se stoupajícím věkem a s koncentrací krevních lipidů.

BIOCHEMIE:

Koncentrace Proteinu S v normální lidské plazmě je kolem 25 µg/ml (1). Kolem 40% (tedy 10 µg/ml) je ve volné formě a 60% (tedy 15 µg/ml) v krvi cirkuluje jako nekovalentní komplex s C4b-BP. Pouze volná forma má antikoagulační aktivitu jako kofaktor Aktivovaného Proteinu C. Protein S je syntetizován v játrech. Je to K vitamin dependentní glykoprotein o molekulové hmotnosti 80,000 D. Rovnováha mezi volnou formou a formou vázanou na C4b-BP hraje důležitou roli, protože pouze volná forma je aktivní. V časných stádiích zánětlivých onemocnění klesá hladina volného proteinu S jako důsledek vzestupu C4b-BP. Protein S klesá při terapii dikumarolem nebo L-asparaginázou, u jaterních onemocnění.

PATOLOGIE:

- Koncentrace PS klesá u deficiencí PS typu I.
- Přechodný pokles volného Proteinu S je pozorován během časného stadia zánětu, jako výsledek vzestupu koncentrace C4b-BP, který tvoří komplexy s Proteinem S.
- Abnormální rozmezí pro Protein S je <70%. Přesto tato hraniční hodnota se musí posuzovat v kontextu s pacientem (věk, pohlaví, terapie, lipidový metabolismus atd.), pokud hodnotíme deficit PS.

APLIKACE:

- Diagnóza deficitu Proteinu S (vrozená, získaná nebo přechodná):
 - Typ I – částečný deficit celkového a volného Proteinu S – antigenu
 - Typ II – normální celkový a volný Protein S antigen, snížená aktivita.
 - Typ III – normální celkový antigen, pokles aktivity a volného antigenu
- Test Proteinu S v klinických studiích.

CHARAKTERISTIKA:

Test ZYMUTEST Total Protein S je specifický pro obě formy Proteinu S (volný nebo v komplexu s C4b-BP) a je charakterizován dvěma, kalcium dependentními monoklonálními protilátkami, které se dobře váží na oba typy Proteinu S.

- Dynamické rozmezí: 0 – 100%
- Detekční práh ≤ 5%
- Intra-assay CV: 3-8%
- Inter-assay CV: 5-10%

Žádné signifikantní interference s heparinem do 2 IU/ml, bilirubinem do 0,1 mg/ml a s hemoglobinem do 10 mg/ml

Referenční materiál: Mezinárodní Standard pro Protein S (93/590) a normální poolovaná plazma.

REFERENCE:

- Faioni E., Valsecchi C., Palla A., Taioli E., Razzari C., Mannucci P. : Free Protein S Deficiency is a Risk Factor for Venous Thrombosis : Thromb. Haemost., 1997, 78, 1343-46
- Henkens C.A.A., Bom V.S., Van der Schaaf W., Pelsma P.M., Smit Sibinga C.T., Kam P.S., Van der Meer J. : Plasma Levels of Protein S, Protein C, and Factor X : Effects of sex, Hormonal State and Age : Thromb. Haemost., 1995, 74, 1271-7.5
- Aiach M., Borgel D., Gaussem P., Emmerich J., Alhenc-gelas M., Gandrille S. : Protein C and Protein S deficiencies. Sem. in Hemat., 1997, 34, 205-17.
- Schwartz H.P., Fischer M., Hopmeier P., Batard M.A., and Griffin J.H. : Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease; Blood, 1984, 64, 1297-1300.