

**READS®
PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT**

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of Total and Free Protein S Antigen in citrated human plasma.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE PROTEIN S TEST

Protein S is a vitamin K-dependent protein synthesized in the liver, vascular endothelium, and megakaryocytes, which plays an important physiologic role in the Protein C Anticoagulant System.^{1,2} This anticoagulant system is one of the major regulators of hemostasis by inhibiting clot formation and by promoting fibrinolysis. Protein S functions as a cofactor for activated Protein C on the vascular membrane to facilitate the degradation of clotting factors Va and VIIIa, downregulating clot formation. In normal plasma approximately 40% of Protein S circulates as a free molecule, while 60% is complexed with C4b, a plasma protein of the classical complement pathway.³ Only Free Protein S is functionally active and able to bind to activated Protein C, while the complexed form of Protein S is not.⁴

Protein S deficiency, either congenital or acquired, may lead to serious thrombotic events such as thrombophlebitis, deep vein thrombosis, or pulmonary embolism. The prevalence of Protein S deficiency has been estimated to be less than 1 case per 300 in the general population. Two-thirds of patients with a congenital deficiency of Protein S (levels less than 50% of normal) may present with venous thrombosis in young adulthood.^{5,6} In young patients (<35 years) with a history of thrombosis, the prevalence may be as high as 15 to 18%.⁷ Acquired Protein S deficiency may be seen during pregnancy, oral contraceptive or oral anticoagulant therapy, liver disease, diabetes mellitus, postoperative complications, septicemia and various inflammatory syndromes.⁸ A decreased Protein S activity in plasma may be the result of low concentrations or abnormal function of the Protein S molecule.

The laboratory diagnosis of Protein S deficiency may require both quantitative and qualitative (functional) determinations. Quantitative determinations of Protein S Antigen are based on immunologic procedures such as radial immunodiffusion in gel, Laurell rocket immunoelectrophoresis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).^{9,10} ELISA procedures are less labor intensive and offer several advantages including more objective, accurate and reproducible results. In addition, ELISA allows automation with commonly available laboratory instrumentation. Measurement of plasma levels of both Total and Free Protein S are useful to determine the type of defect in patients with Protein S deficiency.

PRINCIPLE OF THE TEST

The Protein S Antigen assay is a sandwich ELISA. A capture antibody specific for human Protein S is coated to 96-microwell polystyrene plates. Diluted patient plasma is incubated in the wells, allowing any available Protein S to bind to the anti-human Protein S antibody on the microwell surface. The plates are washed to remove unbound proteins or other plasma molecules. Bound Protein S is quantitated using horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human Protein S detection antibody. Following incubation, unbound conjugate is removed by washing. A chromogenic substrate of tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂) is added to develop a colored reaction. The intensity of the color is measured in optical density (O.D.) units with a spectrophotometer at 450nm. Protein S relative percent concentrations in patient plasma are determined against a curve prepared from the reference plasma provided with the kit.

To measure Free Protein S, PEG is added to plasma samples prior to beginning the assay to precipitate the Protein SC4b binding protein complex. The supernatant fraction containing Free Protein S may be tested along with the untreated plasma sample. Results obtained from diluted plasma samples not pretreated with polyethylene glycol (PEG) represent the Total Protein S concentration for that sample. Both Total (untreated) and Free (PEG-treated) Protein S concentrations are determined following the same assay procedure as described above using separate reference curves.

REAGENTS

Store at 2 - 8°C. Do Not Freeze.

Each REAADS Protein S Antigen 96-microwell Test Kit contains the following reagents:

- 12 x 8 anti-human Protein S antibody coated microwells
- 60mL Sample Diluent (blue-green solution); contains sodium azide.
- 3 vials x 0.5mL lyophilized Reference Plasma, with assay sheet.
- 12mL anti-human Protein S HRP Conjugate (red solution).
- 13mL Substrate (TMB and H₂O₂).
- 15mL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid).
- 30mL Wash Concentrate (33X PBS with 0.01% Tween 20). Note: turbidity may appear in wash concentrate which will not affect component performance and should disappear when working dilution is prepared.
- 2mL Free Protein S Reagent (PEG).

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *In Vitro* Diagnostic Use

1. Human source material used to prepare the reference plasma included in this kit has been tested and shown to be negative for antibodies to HBsAg, HCV, and HIV-I & II by FDA required tests. However, all human blood derivatives, including patient samples, should be handled as potentially infectious material.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. One component substrate can cause irritation to the eyes and skin. Absorption through the skin is possible. Use gloves when handling substrate and wash thoroughly after handling. Keep reagent away from ignition sources. Avoid contact with oxidizing agents.
6. The Sample Diluent contains sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to form lead and copper azides when left in contact with these metals. These metal azides are explosive. Any solutions containing azide must be thoroughly flushed with copious amounts of water to prevent the build-up of explosive metal azides in the plumbing system.
7. Certain components are labeled with the following:

Irritating to eyes (R 36). Avoid contact with skin (S 24). Avoid contact with eyes (S 25). In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (S 26). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S 46).

Irritant . Biological Risk .

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma, collected with either 3.2% or 3.8% sodium citrate as an anticoagulant, should be used as the sample matrix. Blood should be collected by venipuncture, and the sample centrifuged immediately. Remove the plasma and store at 2 - 8°C until testing can be performed. If not tested within 8 hours of collection, the sample should be stored at -70°C and tested within 1 month.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided

REAADS Protein S Antigen Test Kit; see "Reagents," for a complete listing.

Materials Required but not Supplied

- Protein S Control Plasma (Total and/or Free). Reconstitute Control Plasma selected for use following manufacturer's instructions, and store as recommended.
- Reagent grade water (1L) to prepare PBS/Tween wash solution, to reconstitute Reference Plasma, and to zero or blank the plate reader during the final assay step.
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 5 and 1000 microliters, with appropriate tips
- Miscellaneous glassware appropriate for small volume handling
- Flask or bottle, 1 liter
- Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semi-automated washing system
- Disposable gloves, powder-free recommended
- Plate reading spectrophotometer capable of reading absorbance at 450nm (with a 650nm reference, if available)
- Multichannel pipettors capable of delivering to 8 wells simultaneously
- Microdilution tubes for patient sample preparation
- Centrifuge

Procedural Notes

1. Bring plasma samples and kit reagents to room temperature (18 - 26°C) and mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage (2 - 8°C) as soon as possible.
2. All dilutions of reference plasma, control plasma selected for use, and patient samples must be made just prior to use in the assay.
3. A single water blank well should be set up on each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to this well. Instead, add 200µL of reagent grade water to the well immediately prior to reading the plate in the spectrophotometer. The plate reader should be programmed to zero or blank against this water well.
4. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution from a plastic squeeze bottle with a wide tip into the bottom of the microwells. Wash solution in the water blank well will not interfere with the procedure. An automated microtiter plate washing system can also be used.
5. IMPORTANT: Failure to adequately remove residual PBS/Tween 20 can cause inconsistent color development of the substrate solution.
6. Use a multichannel pipettor capable of delivering to 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and allows for more uniform incubation and reaction times for all wells.
7. Carefully controlled timing of all steps is critical. All reference plasma dilutions, controls and samples must be added within a five minute period. Batch size of samples should not be larger than the amount that can be added within this time period.
8. For all incubations, the start of the incubation period begins with the completion of reagent or sample addition.
9. Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
10. Incubation temperatures above or below normal room temperature (18 - 26°C) may contribute to inaccurate results.
11. Avoid contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
12. Do not use kit components beyond expiration date.
13. Coated microwells, conjugate, and substrate are lot specific components that should not be used with different kit lots.

Reagent Preparation

1. Wash Solution - phosphate buffered saline (PBS)/Tween 20: Measure 30mL Wash Concentrate (33X PBS/Tween 20) and dilute to 1 liter with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused PBS/Tween 20 solution at 2 - 8°C. Discard if solution shows signs of contamination.
2. Reconstitute Reference Plasma by adding 0.5mL reagent grade water. Swirl gently to mix. Allow to stand 10 minutes before use for complete dissolution. Stable for 8 hours when stored at 2 - 6°C.
3. Reconstitute appropriate control plasma following manufacturer's instructions, and store as recommended.

Assay Procedure

1. Remove any microwell strips that will not be used from the frame and store them in the bag provided.
2. Assay each reference plasma dilution in duplicate for Total and Free Protein S. Duplicate determinations are also recommended for patient and control samples. One well should be run as a reagent blank; sample diluent without serum is added to the well as explained in step 8 of this section. This well will be treated the same as a control or patient sample in subsequent assay steps. A water blank well should be included with each plate; it is to remain empty until 200µL of reagent grade water is added at the completion of the assay, immediately prior to reading the plate. The water blank well is to be used to zero the plate reader.
3. **Pretreatment for Free Protein S determination:** all plasma samples to be tested for Free Protein S (Reference Plasma, controls, and patient samples) must be pretreated with polyethylene glycol (PEG) before setting up the Free Protein S assay. Do not dilute plasma samples before PEG pretreatment. Add 15µL of Free Protein S Reagent (PEG) to 85µL control or patient plasma. To yield sufficient supernatant (95µL) to prepare the reference curve, add 45µL PEG to 255µL reference plasma. Vortex and place on ice for 30 minutes. Centrifuge for 10 minutes at 3,000 rpm. Use supernatant to prepare curve and sample dilutions as described in steps 5 and 6.
4. **Pre-dilute all plasmas for Total Protein S determination** (1:2 dilution in Sample Diluent) as follows:
Reference plasma: add 100µL reference plasma to 100µL Sample Diluent.
Control and patient samples: add 20µL plasma to 20µL Sample Diluent.
Mix well. These pre-dilutions are utilized in preparing the working dilutions for Total Protein S in steps 5 and 6.
5. Prepare six reference dilutions as described in the table below. Separate reference curves are used for Total and Free Protein S assays. For **Total Protein S**, prepare one set of dilutions using pre-diluted reference plasma (step 4). For **Free Protein S**, prepare a second set of dilutions using the PEG-treated reference plasma (step 3).

Volume Reference Plasma		Volume Sample Diluent		*Reference Level
30µL	+	500µL	=	150%
20µL	+	500µL	=	100%
15µL	+	500µL	=	75%
10µL	+	500µL	=	50%
10µL	+	1000µL	=	25%
10µL	+	2000µL	=	12.5%

* Reference level value to be used for constructing reference curve only

6. Prepare working dilutions of control and patient samples, as follows:
Total Protein S: add 20µL pre-diluted control or patient plasma (1:2 dilution from step 4) to 500µL Sample Diluent.
Free Protein S: add 20µL PEG-treated control or patient plasma (from step 3) to 500µL Sample Diluent.
(Note: these dilutions correspond to the 100% relative reference plasma dilution.)

7. Mix thoroughly, and add 100µL of the working dilutions (reference plasmas x 6, controls, and patient samples) to the appropriate microwells for Total and Free Protein S determinations.
8. Add 100µL of Sample Diluent to the reagent blank well. Leave the water blank well empty.
9. Incubate 40 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.
10. Wash 4 times with working wash solution (PBS/Tween 20). Each well should be filled with wash solution per wash. Wash solution in the empty well intended to serve as a water blank will not interfere with the procedure. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. The frame must be squeezed at the center on the top and bottom to retain microwell modules during washing. Blot on absorbent paper to remove residual wash fluid. Do not allow wells to dry out between steps.
11. Add 100µL Conjugate (red) to each well (except the water blank well).
12. Incubate 10 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the conjugate solution.
13. Wash 4 times with working wash solution (PBS/Tween 20) as in step 10. Wash solution in the water blank well does not interfere with the procedure. Use a snapping motion to drain the liquid, and blot on absorbent paper after the final wash. Do not allow the wells to dry out.
14. Add 100µL Substrate to each well (except for the water blank well) and incubate for 10 minutes at room temperature. Add the substrate to the wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
15. Add 100µL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid) to each well (except for the water blank well) to stop the enzyme reaction. Be sure to add Stopping Solution to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate Solution was added. Blue Substrate will turn yellow and colorless substrate will remain colorless. Do not add Stopping Solution to the water blank well. Instead, add 200µL of reagent grade water to the water blank well. Blank or zero the plate reader against the water blank well. Read the O.D. of each well at 450nm, against a 650nm reference filter (if available). For best results, the O.D. values should be measured within 30 minutes after the addition of Stopping Solution.

Results

1. Calculate the mean O.D. for the duplicates of the reference plasma dilutions, controls, and patient samples.
2. Plot the mean O.D. obtained for each dilution of the reference plasma (x axis) against the corresponding value of the reference level (y axis). A semi-log or point-to-point graph is recommended, although a log-log may also be used. Prepare separate curves for Total and Free Protein S determinations.
3. Using the mean O.D., determine the control and patient relative values from the graph, or, alternatively, use linear regression to calculate from the reference curve.
4. To calculate Total or Free Protein S Antigen levels in % of normal, multiply the control and patient relative values obtained from the appropriate reference curve by the corresponding assigned value for the Reference Plasma (see Reference Plasma Assay sheet included in Package Insert).

For example:*

Patient relative value (from the reference curve): 40

Reference plasma assigned value (from Reference Plasma Assay sheet): 105% of normal

Actual patient Protein S Antigen value (as % of normal): $40 \times 1.05 = 42\%$

* Example applies to both Total and Free Protein S calculations.

5. Ensure that all quality control parameters have been met (see Quality Control) before reporting test results.

QUALITY CONTROL

1. The mean O.D. of the reagent blank should be < 0.1 when the spectrophotometer has been blanked against the water well. Readings greater than 0.1 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
2. Individual O.D.s for the duplicates of the controls or patient samples should be within 20% of the mean O.D. for samples with absorbance readings greater than 0.200.
3. Protein S Antigen values (Total and Free) obtained for the controls should be within manufacturer's assigned ELISA ranges. Occasional small deviations outside these ranges may be acceptable.
4. Each laboratory should periodically determine their own reference range for this assay.

EXPECTED VALUES¹¹

Normal Range: Total and Free Protein S values are expressed in relative percent (%) as compared to pooled normal plasma. The normal range for Total Protein S for this assay is 60 - 150%. The normal range for Free Protein S for this assay is 50 -130%. These ranges are consistent with normal ranges published in the literature and reported by other commercially available assays.^{6,10} Samples with values above the range of the reference curve may need to be diluted and retested for accurate results.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS¹¹

Detection range:

The detection range for REAADS Protein S Antigen assay (Total and Free) is 5 - 150%. However, the effective range of each run will depend on the assayed value of the reference plasma. For greatest accuracy, samples which generate absorbance readings outside the O.D. range of the reference curve should be retested at an appropriate dilution.

Precision:

Intra-assay precision:

To determine variability within a plate, three plasma samples with known Protein S levels (one high, one medium, and one low) were tested in 16 wells by two operators, on six plates from each of three lots. The data, presented in the following table, shows a mean CV of 10.1% for Total Protein S, and 6.6% for Free Protein S across three lots. In addition, ninety-nine (99) patient samples with Total and Free Protein S levels spanning the entire detection range of the assay were tested in duplicate across 3 lots to demonstrate the precision end users may expect when performing the assay according to package insert instructions. As shown in the table, the overall mean CV for duplicates was 7.8% for Total Protein S and 4.7% for Free Protein S.

Inter-assay precision:

Six (6) commercially prepared, assayed plasma samples with values ranging from 57 - 159% were tested in duplicate on three lots to determine assay precision between lots. The mean inter-assay CV was 11% for Total Protein S, and 10.5% for Free Protein S, as seen in the table:

Intra-assay precision (variability within a plate)	Total Protein S range (% of normal)	Total Protein S CV range (3 pilot lots)	Free Protein S range (% of normal)	Free Protein S CV range (3 pilot lots)
Replicates (x16):	105 - 107%	10.3 - 11.1%	76 - 86%	4.4 - 7.9%
	53 - 83%	8.1 - 12.2%	38 - 80%	3.3 - 8.3%
	44 - 45%	7.1 - 10.4%	34 - 40%	3.4 - 10.4%
Overall mean CV:		10.1%		6.6%
Duplicates:	entire range		entire range	
Overall mean CV:		7.8%		4.7%
Inter-assay precision (variability between lots)		CV range (2 lots)		CV range (2 lots)
Duplicates:	46 - 95%	2.4 - 19.5%	37 - 83%	1.3 - 22.6%
Overall mean CV:		11.0%		10.5%

Linearity:

Serial two-fold dilutions of Protein S reference plasma samples tested on three lots of REAADS Protein S Antigen assay demonstrated curves with a mean coefficient of determination (r-squared) of 0.985 for Total Protein S and 0.992 for Free Protein S.

Accuracy:

Accuracy was determined by testing mixtures of Protein S reference plasma with predetermined values on REAADS Protein S Antigen assay and calculating the recovery of theoretical values. The overall mean percent recovery across three lots was 101% for Total Protein S and 98% for Free Protein S, with an average variation of 7.1% and 5.0% respectively.

LIMITATIONS OF THE TEST

The Protein S concentration values obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedures. Patients with congenital homozygous deficiency of Protein S are rare and may show undetectable levels of Protein S, while those with heterozygous deficiency typically have levels below 50% of normal. Acquired Protein S deficiency may be seen in numerous clinical conditions: neonates (levels 20-35% lower than adults), liver disease, diabetes mellitus, pregnancy, oral contraceptive or oral anticoagulant therapy and disseminated intravascular coagulation (DIC). Increased levels of Protein S may be seen in patients with nephrotic syndrome.⁵⁻¹⁰

Plasma samples can be inadvertently depleted or degraded of Protein S by improper collection or laboratory processing.

As with any assay employing antibodies from an animal source (e.g. mouse, rabbit, goat, etc.) to capture a target molecule, the possibility exists for interference in the serum or plasma of patients who have been exposed to preparations containing animal antibodies for diagnosis or therapy. Falsely elevated or depressed values may be seen in these patients.

WARRANTY

This product is warranted to perform as described in this package insert. Corgenix, Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for a particular use, and in no event shall Corgenix, Inc. be liable for consequential damage.

For Technical or Customer Service in the United States, phone 1-800-729-5661. Outside the United States, phone +303-457-4345, fax +303-457-4519, e-mail: technicalsupport@corgenix.com, or contact a Corgenix authorized distributor.

**REAADS®
PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT**

In-vitro-Diagnostikum

ANWENDUNGSGEBIET

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) zur quantitativen Bestimmung von gesamtem und freiem Protein S Antigen in Zitrushumanplasma.

TESTPRINZIP

Beim Protein S Antigen Test handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Die 96 Mikrovertiefungen der Polystyrolplatten sind mit Capture-Antikörpern beschichtet, die spezifisch mit Humanprotein S reagieren. Bei der Inkubation von verdünntem Patientenplasma in den Mikrovertiefungen wird das verfügbare Protein S an die Antihuman-Protein S-Antikörper auf der Oberfläche der Mikrovertiefungen gebunden. Die Platten werden gewaschen, um nichtgebundene Proteine und andere Moleküle aus dem Plasma zu entfernen. Gebundenes Protein S wird mit Hilfe von Antihuman-Protein S-Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert sind, quantitativ bestimmt. Nichtgebundenes Konjugat wird nach der Inkubation durch Waschen entfernt. Ein chromogenes Substrat aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird hinzugefügt, um eine Farbreaktion hervorzurufen. Die Farbintensität wird mit einem Spektrophotometer bei 450 nm gemessen und in optischen Dichteeinheiten (OD/cm) angegeben. Die relative Konzentration von Protein S in Patientenplasma wird anhand einer Kurve bestimmt, die mit Hilfe des im Kit enthaltenen Referenzplasmas erstellt wurde (in %).

Zur Bestimmung von freiem Protein S werden die Plasmaproben vor Beginn des Tests mit PEG versetzt, um den S-C4b-bindenden Proteinkomplex auszufällen. Die überstehende Fraktion mit freiem Protein S kann zusammen mit der unbehandelten Plasmaprobe analysiert werden. Aus verdünnten, nicht mit Polyethylenglykol (PEG) behandelten Plasmaproben stammende Ergebnisse stellen die Konzentration des Gesamt-Protein S in dieser Probe dar. Sowohl gesamtes (unbehandelt) als auch freies (PEG-behandelt) Protein S werden anhand des gleichen, oben beschriebenen Tests bestimmt, es wird lediglich auf unterschiedliche Referenzkurven Bezug genommen.

REAGENZIEN

Bei 2 – 8°C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder REAADS Testkit für Protein S Antigen (96 Mikrovertiefungen) enthält die folgenden Reagenzien:

- Mit Antihuman-Protein S-Antikörpern beschichtete Mikrovertiefungen (12 x 8) (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml Probenverdünner (blaugrüne Lösung); enthält Natriumazid (Sample Diluent III).
- Lyophilisiertes Referenzplasma (3 Fläschchen mit je 0,5 ml) mit Testblatt (Reference Plasma).
- 12 ml Antihuman-Protein S-HRP-Konjugat (rote Lösung) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml Substrat (TMB und H_2O_2) (One-component Substrate).
- 15 ml Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) (Stopping Solution).
- 30 ml Waschkonzentrat (33X PBS mit 0,01% Tween 20). Hinweis: Das Waschkonzentrat kann Trübungen aufweisen, die sich jedoch nicht negativ auswirken und beim Herstellen der Arbeitsverdünnung verschwinden sollten (Wash Concentrate).
- 2 ml freies Protein S Reagenz (PEG)

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Zur Herstellung des in diesem Kit enthaltenen Referenzplasmas wurden Materialien humanen Ursprungs verwendet, die in den von der FDA geforderten Tests negativ auf Antikörper gegen HBsAg, HCV und HIV-I und II reagierten. Trotzdem sollten alle humanen Blutprodukte einschließlich Patientenproben als potenzielle Infektionsquellen gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Beim Handhaben der Kitreagenzien Einmalhandschuhe tragen und nachher gründlich die Hände waschen.
5. Die Einkomponenten-Substratlösung kann Augen- und Hautreizungen verursachen. Absorption durch die Haut ist möglich. Substrat nur mit Handschuhen handhaben und anschließend gründlich die Hände waschen. Reagenzien von Zündquellen fernhalten. Kontakt mit Oxidationsmitteln vermeiden.
6. Der Probenverdünner enthält Natriumazid als Konservierungsmittel. Es ist bekannt, dass Natriumazid Blei- und Kupferazide bildet, wenn es in Kontakt mit diesen Metallen kommt. Diese Metallazide sind explosiv. Lösungen, die ein Azid enthalten, müssen, wenn sie ausgeschüttet werden, mit reichlich Wasser verdünnt werden, um eine Ansammlung explosiver Metallazide in Wasserrohren zu vermeiden.
7. Bestimmte Komponenten sind wie folgt gekennzeichnet:
Reizt die Augen (R 36). Berührung mit der Haut vermeiden (S 24). Berührung mit den Augen vermeiden (S 25). Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. (S 26). Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikette vorweisen (S 46).

 Reizend. Risque biologique .

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Als Probenmatrix sollte Plasma verwendet werden, dem Natriumzitrat (3,2% oder 3,8%) als Antikoagulantium beigefügt wurde. Blut sollte durch Venenpunktion gewonnen und die Probe sofort zentrifugiert werden. Das Plasma abtrennen und bis zum Test bei 2 – 8°C lagern. Falls der Test nicht innerhalb von 8 Stunden nach Blutabnahme durchgeführt werden kann, sollte die Probe bei -70°C gelagert und innerhalb eines Monats verwendet werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien

REAADS Protein S Antigen Testkit; siehe „Reagenzien“ mit einer vollständigen Auflistung.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Kontrollplasma für Protein S (gesamtes und/oder freies): das zur Verwendung gewählte Kontrollplasma entsprechend den Anleitungen des Herstellers rekonstituieren und lagern
- Analysenreines Wasser (1 l) zur Herstellung der PBS/Tween-Waschlösung, zur Rekonstitution des Referenzplasmas und zum Nullabgleich des Platten-Lesegeräts während des letzten Testschritts
- Messzylinder
- Präzisionspipetten mit dazu passenden Pipettenspitzen zum Abpipettieren von 5 bis 1000 Mikroliter.
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumen
- Kolben oder Flasche, 1 Liter
- Waschflaschen, vorzugsweise mit teilweise zugeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, bzw. Ein automatisches oder halbautomatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Einmalhandschuhe, vorzugsweise talkumfrei

- Spektrophotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten, mit dem die Extinktion bei 450 nm bestimmt werden kann (wobei gegebenenfalls als Referenzwellenlänge 650 nm gewählt wird)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können
- Mikropipetten zur Herstellung der Patientenproben
- Zentrifuge

Hinweise zur Durchführung

1. Plasmaproben und Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (18 – 26°C) bringen und vor Gebrauch gründlich durchmischen – nicht aufschäumen. Alle nicht gebrauchten Proben und Reagenzien so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank/Kühlraum (2 – 8°C) zurückstellen.
2. Alle Verdünnungen von Referenzplasma, zur Verwendung vorgesehenem Kontrollplasma und Patientenproben dürfen erst kurz vor der Verwendung im Test hergestellt werden.
3. Für jeden Testlauf sollte auf jeder Platte eine Vertiefung für den Substratleerwert reserviert bleiben. Dieser Vertiefung werden weder Probenmaterial noch Kitreagenzien beigelegt. Stattdessen werden in diese Vertiefung direkt vor dem Ablesen der Platte im Spektrophotometer 200 µl analysenreines Wasser pipettiert. Das Mikrotiterplatten-Lesegerät sollte so programmiert werden, dass es den Nullabgleich anhand dieser mit Wasser gefüllten Vertiefung durchführt.
4. Für ein optimales Testergebnis ist eine gute Waschtechnik notwendig. Genügendes Waschen lässt sich am besten erreichen, indem ein kraftvoller Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritzflasche mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Die Waschlösung in der für den Substratleerwert vorgesehenen Vertiefung stört den Ablauf des Tests nicht. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. **WICHTIG:** Wenn das restliche PBS/Tween 20 nicht ausreichend entfernt wird, kann eine richtige Farbentwicklung der Substratlösung nicht gewährleistet werden.
6. Wenn möglich sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können. Die Durchführung des Tests wird so beschleunigt. Außerdem unterscheiden sich Inkubations- und Reaktionszeiten für die Vertiefungen weniger voneinander.
7. Exakte Zeitkontrolle bei allen Testschritten ist wichtig. Alle Referenzplasmaverdünnungen, Kontrollen und Proben müssen innerhalb eines Zeitraums von 5 Minuten zugegeben werden. Daher sollten nur so viele Proben verwendet werden, wie innerhalb dieser Zeit zugefügt werden können.
8. Für alle Inkubationen beginnt die Inkubationszeit mit der Komplettierung der Reagenz- oder Probenzugabe.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
10. Eine Inkubationstemperatur über oder unter der Raumtemperatur (18 – 26°C) kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Beim Öffnen der Fläschchen und Entfernen aliquoter Teile sollte eine Kontamination der Reagenzien vermieden werden.
12. Die Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden.
13. Beschichtete Mikrovertiefungen, Konjugat und Substrat sind chargenspezifische Komponenten, die nicht mit anderen Chargen zusammen verwendet werden dürfen.

Vorbereitung der Reagenzien

1. Waschlösung – phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)/Tween 20: 30 ml Waschkonzentrat (33X PBS/Tween 20) abmessen und auf 1 Liter mit analysenreinem Wasser auffüllen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte $7,35 \pm 0,1$ sein. Nicht aufgebrauchte PBS/Tween 20-Lösung ist bei 2 – 8°C aufzubewahren. Bei ersten Anzeichen einer Kontamination ist die Lösung zu verwerfen.
2. Das Referenzplasma durch Zugabe von 0,5 ml analysenreinen Wassers rekonstituieren. Zum Durchmischen vorsichtig mit Drehbewegung schütteln. Vor Verwendung 10 Minuten stehen lassen, damit eine vollständige Auflösung gewährleistet ist. Bei Lagerung zwischen 2 – 6°C acht (8) Stunden stabil.
3. Das benötigte Kontrollplasma entsprechend den Anleitungen des Herstellers rekonstituieren und lagern.

Durchführung des ELISA

1. Nicht benötigte Mikroplattenstreifen aus der Halterung entfernen und im Beutel aufbewahren.
2. Jede Referenzplasmaverdünnung doppelt auf gesamtes und freies Protein S testen. Für die Patienten- und Kontrollproben werden ebenfalls Doppelbestimmungen empfohlen. Eine Vertiefung sollte für die Blindprobe verwendet werden. Der Probenverdünner ohne Serum wird wie in Schritt 8 dieses Abschnitts erklärt in die Vertiefung pipettiert. Diese Vertiefung wird im weiteren Testablauf wie eine Kontrolle bzw. Patienten-Probe behandelt. Bei jeder Mikrotiterplatte ist eine Vertiefung für den Substratleerwert zu reservieren; diese Vertiefung bleibt bis zum Ende des Tests leer, erst direkt vor dem Auswerten der Mikrotiterplatte wird sie mit 200 µl analysenreinem Wasser gefüllt. Der Substratleerwert wird zur Nulleinstellung des Mikrotiterplatten-Lesegeräts verwendet.
3. **Vorbehandlung zur Bestimmung von freiem Protein S:** Vor Einrichten des Tests für freies Protein S müssen alle dahingehend zu untersuchenden Plasmaproben (Referenzplasma, Kontrollen und Patientenproben) mit Polyethylenglykol (PEG) vorbehandelt werden. Plasmaproben dürfen vor der PEG-Behandlung nicht verdünnt werden. 15 µl freies Protein S Reagenz (PEG) zu 85 µl Kontrolle oder Patientenplasma pipettieren. Um ausreichend Überstand zur Erstellung der Eichkurve (95 µl) zu erhalten, werden 255 µl Referenzplasma mit 45 µl PEG versetzt. Im Vortex vermischen und 30 Minuten lang auf Eis legen. 10 Minuten lang mit 3000 U/Min. zentrifugieren. Wie in den Schritten 5 und 6 beschrieben anhand der überstehenden Lösung die Kurve erstellen und die Probenverdünnungen herstellen.
4. **Alle Plasmaproben für die Bestimmung von Gesamt-Protein S** (1:2 Verdünnung mit Probenverdünner) wie folgt vorverdünnen:
Referenzplasma: 100 µl Referenzplasma zu 100 µl Probenverdünner pipettieren.
Kontrollen und Patienten-Proben: 20 µl Plasma zu 20 µl Probenverdünner pipettieren.
 Gut durchmischen. Diese Vorverdünnungen werden zur Herstellung der Arbeitsverdünnungen für Gesamt-Protein S in den Schritten 5 und 6 verwendet.
5. Entsprechend den Angaben in der folgenden Tabelle sechs Referenzverdünnungen herstellen. Für die Tests für gesamtes und freies Protein S werden separate Eichkurven verwendet. Für **Gesamt-Protein S** mit Hilfe des vorverdünnten Referenzplasmas (Schritt 4) einen Satz Verdünnungen herstellen. Für **freies Protein S** mit Hilfe des PEG-behandelten Referenzplasmas (Schritt 3) einen zweiten Satz Verdünnungen herstellen.

Volumen Referenzplasma		Volumen Probenverdünner	=	*Referenz- konzentrationswert
30 µl	+	500 µl	=	150%
20 µl	+	500 µl	=	100%
15 µl	+	500 µl	=	75%
10 µl	+	500 µl	=	50%
10 µl	+	1000 µl	=	25%
10 µl	+	2000 µl	=	12,5%

*Der Referenzkonzentrationswert darf nur zum Erstellen der Eichkurve verwendet werden.

6. Wie nachfolgend beschrieben Arbeitsverdünnungen der Kontroll- und Patientenproben herstellen:
Gesamt-Protein S: 20 µl vorverdünnter Kontrolle oder Patientenplasma (1:2 Verdünnung aus Schritt 4) zu 500 µl Probenverdünner pipettieren.
Freies Protein S: 20 µl PEG-behandelter Kontrolle oder Patientenplasmalösung (aus Schritt 3) zu 500 µl Probenverdünner pipettieren.
 (Hinweis: Diese Verdünnungen entsprechen der relativen 100% Referenzplasmaverdünnung).
7. Gründlich durchmischen und 100 µl der Arbeitsverdünnungen (Referenzplasmaproben x 6, Kontrollen und Patientenproben) zur Bestimmung von gesamtem und freiem Protein S in die betreffenden Mikrovertiefungen pipettieren.
8. 100 µl des Probenverdünners in die für die Blindprobe vorgesehene Vertiefung pipettieren. Die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung bleibt leer.

9. Es wird 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probeflüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrovertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden.
10. Viermal mit Arbeitswaschlösung (PBS/Tween 20) waschen. Jede Vertiefung sollte bei jedem Waschen mit Waschlösung gefüllt werden. Die Waschlösung in der für den Substratleerwert vorgesehenen Vertiefung, stört den Ablauf des Tests nicht. Nach jedem Waschschrift wird die Waschlösung durch Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Die Flüssigkeit wird durch eine Schleuderbewegung mit dem Handgelenk aus den Vertiefungen geschlagen. Der Streifenhalter muss in der Mitte, oben und unten festgedrückt werden, um ein Herausfallen der Mikrostreifen zu vermeiden. Nach dem Entleeren die Mikroplatte auf einer saugfähigen Unterlage abtupfen, damit die restliche Waschlösung abgesaugt wird. Die Vertiefungen dürfen zwischen den Waschschriften nicht austrocknen.
11. In jede Vertiefung (mit Ausnahme der für den Substratleerwert vorgesehenen) 100 µl Konjugat (rot) pipettieren.
12. Es wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert.
13. Wie in Schritt 10 viermal mit Arbeitswaschlösung (PBS/Tween 20) waschen. Die Waschlösung in der für den Substratleerwert vorgesehenen Vertiefung verfälscht das Ergebnis des Tests nicht. Nach dem letzten Waschvorgang durch rasche Bewegungen die Flüssigkeit abfließen lassen und auf einem absorbierenden Papier trocknen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen!
14. Jede (bis auf die für die den Substratleerwert reservierte) Vertiefung mit 100 µl Substrat füllen und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. HS enthaltende Vertiefungen färben sich blau.
15. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) pro Vertiefung (außer der für den Substratleerwert vorgesehenen Vertiefung) beendet. Die Stopplösung muss in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie die Substratlösung den Vertiefungen zugesetzt werden. Das blau gewordene Substrat schlägt nach gelb um, während das farblose Substrat farblos bleibt. In die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung wird keine Stopplösung gegeben. Stattdessen wird diese Vertiefung mit 200 µl analysenreinem Wasser gefüllt. Anhand des Substratleerwerts wird der Nullpunkt des Mikrotiterplatten-Lesegeräts eingestellt. Für jede Vertiefung die optische Dichte (OD) bei 450 nm gegen einen 650-nm-Referenzfilter (sofern verfügbar) ablesen. Im Interesse bestmöglicher Ergebnisse sollten die OD-Werte innerhalb von 30 Minuten nach Beifügen der Stopplösung abgelesen werden.

Ergebnisse

1. Für die Doppelbestimmungen der Referenzplasmaverdünnungen, Kontrollen und Patientenproben die mittleren OD-Werte berechnen.
2. Den für jede Verdünnung des Referenzplasmas erhaltenen mittleren OD-Wert (x-Achse) gegen den entsprechenden Referenzkonzentrationswert (y-Achse) auftragen. Empfohlen wird eine halblogarithmische Darstellung oder Punkt-zu-Punkt-Darstellung, aber eine log-log-Auftragung ist ebenfalls möglich. Separate Kurven zur Bestimmung von gesamtem und freiem Protein S erstellen.
3. Anhand des mittleren OD-Werts die relativen Werte für Kontrolle und Patientenproben aus der grafischen Darstellung bestimmen; alternativ können die Werte durch lineare Regression aus der Eichkurve berechnet werden.
4. Zur Berechnung des Gehalts an gesamtem oder freiem Protein S Antigen (in % relativ zum Normalwert) die aus der betreffenden Eichkurve erhaltenen relativen Werte für Kontrollen und Patientenproben mit dem zugehörigen Wert für das Referenzplasma multiplizieren (siehe Probierenblatt).

Beispiel:*

Relativer Patientenwert (aus Eichkurve): 40

Zugehöriger Referenzplasmawert (vom Probierenblatt): 105% des Normalwerts

Wert für Protein S Antigen in Patientenprobe (in % relativ zum Normalwert): $40 \times 1,05 = 42\%$

* Beispiel gilt für Berechnungen von gesamtem und freiem Protein S.

5. Bevor die Analysenergebnisse berichtet werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Qualitätskontrolle).

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Wenn das Spektrophotometer gegen Wasser auf null gestellt wurde, muss die mittlere OD des Leerversuchs $< 0,1$ sein. Höhere Extinktionen können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte bedingt sein.
2. Bei Proben mit einer Extinktion von mehr als 0,200 sollten die einzelnen OD-Werte der Doppelbestimmungen der Kontrollen oder Patientenproben nicht mehr als 20% voneinander abweichen.
3. Für die Kontrollen erhaltene Werte für Protein S Antigen (gesamt und frei) sollten innerhalb des vom Hersteller für ELISA-Tests festgesetzten Bereichs liegen. Gelegentliche, geringe Abweichungen von diesem Bereich können toleriert werden.
4. Jedes Labor sollte regelmäßig den eigenen Referenzbereich für diesen Test festlegen.

NORMALWERTE¹¹

Normalbereich: Die Konzentrationen des gesamten und freien Protein S werden in Prozent (%) relativ zu einem Pool von Normalplasma angegeben. Der Normalbereich für Gesamt-Protein S in diesem Test beträgt 60 – 150%. Der Normalbereich für freies Protein S in diesem Test beträgt 50 - 130%. Dieser Bereich entspricht den in der Literatur veröffentlichten oder von anderen Testherstellern angegebenen Normalbereichen.^{6,10} Proben, deren Werte oberhalb des Bereichs der Eichkurve liegen, müssen u. U. verdünnt und erneut untersucht werden, um das richtige Ergebnis zu erhalten.

GRENZEN DES TESTS

Die Protein S Konzentrationen, die mit diesem Test erhalten werden, sind als Hilfestellung zur Diagnose anzusehen. Jeder Arzt muss dieses Ergebnis unter Einbeziehung des Krankheitsablaufes, der Patientendaten, des physischen Befundes und anderen diagnostischen Untersuchungen betrachten. Es gibt nur wenige Patienten mit kongenitaler homozygoter Protein S Defizienz, bei denen die Konzentration des Protein S sogar unter der Nachweisgrenze liegen kann. Patienten mit heterozygoter Defizienz haben in der Regel Konzentrationen unterhalb von 50% des Normalwerts. Eine erworbene Protein S Defizienz kann bei Neugeborenen (Konzentrationen von 20–35% unter den Werten Erwachsener), Lebererkrankungen, Diabetes mellitus, Schwangerschaft, Einnahme oraler Kontrazeptiva oder Antikoagulanzen und disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) auftreten. Patienten mit nephrotischem Syndrom können erhöhte Protein S Werte aufweisen.⁵⁻¹⁰

Durch Fehler bei der Blutabnahme oder beim Verarbeiten der Plasmaproben im Labor kann Protein S unbeabsichtigtweise abgebaut oder zerstört werden.

Wie bei jedem Test mit Antikörpern aus tierischen Quellen (z. B. Maus, Kaninchen, Ziege etc.) zum Binden eines Zielmoleküls besteht auch hier die Gefahr von Störungen im Serum oder Plasma von Patienten, die zu einem früheren Zeitpunkt im Rahmen einer Therapie oder Diagnosestellung Zubereitungen mit tierischen Antikörpern ausgesetzt waren. Bei solchen Patienten können erhöhte oder erniedrigte Werte im Ergebnis falsch sein.

GARANTIE

Dieses Produkt kommt mit der Garantie, dass es die auf der Packungsbeilage beschriebene Leistung erbringt. Corgenix, Inc. macht keine stillschweigenden Zusicherungen bezüglich der Handelbarkeit oder Eignung für einen bestimmten Zweck, und in keinem Fall haftet Corgenix, Inc. für Folgeschäden.

Unseren technischen und allgemeinen Kundendienst erreichen Sie in den USA unter 1-800-729-5661 bzw. Außerhalb der USA unter +303-457-4345 oder per Fax unter +303-457-4519 sowie per Email an: technicalsupport@corgenix.com. Sie können sich auch mit einem autorisierten Corgenix-Händler in Verbindung setzen.

**REAADS®
PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT**

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

UTILISATION ENVISAGÉE

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative de l'antigène de la protéine S totale et libre dans le plasma humain citraté.

PRINCIPE DU TEST

Le dosage de l'antigène de la protéine S est un dosage immunoenzymatique en sandwich. Une couche d'anticorps monoclonal de capture spécifique de la protéine S est déposée sur des plaques en polystyrène à 96 micropuits. Le plasma patient dilué est incubé dans les puits en laissant toute la protéine S disponible se lier à l'anticorps anti-protéine S libre de la surface des micropuits. Les plaques sont lavées afin de retirer les protéines non liées et autres molécules du plasma. La protéine S liée est quantifiée à l'aide d'un anticorps de détection anti-protéine S conjugué à la peroxydase du raifort (PR). Après incubation, le conjugué non lié est enlevé par lavage. Un substrat chromogène de tétraméthylbenzène (TMB) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est ajouté pour développer une réaction colorée. L'intensité de la couleur à 450 nm est mesurée en unités de densité optique (D.O.) à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration relative en pourcentage de la protéine S dans le plasma patient est déterminée sur une courbe établie à l'aide du plasma de référence fourni dans le kit.

Pour mesurer la protéine S libre, du PEG est ajouté aux échantillons de plasma avant de commencer le dosage afin de précipiter le complexe protéinique liant protéine S-C4b. La fraction surnageante contenant la protéine S libre peut être dosée en même temps que l'échantillon de plasma non traité. Les résultats obtenus à partir des échantillons de plasma dilués non prétraités au polyéthylène glycol (PEG) représentent la concentration de protéine S totale de cet échantillon. Les concentrations de protéine S totale (non traitée) et libre (prétraitée au PEG) sont déterminées selon la même procédure de dosage décrite ci-dessus en utilisant des courbes de référence distinctes.

RÉACTIFS

Stocker entre 2 et 8°C. Ne pas congeler.



Chaque kit d'antigène de la protéine S REAADS pour 96 micropuits contient les réactifs suivants :

- 12 x 8 micropuits coâtés avec les anticorps de la protéine S (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml de tampon pour échantillon (solution bleu vert) ; contient de l'azide de sodium (Sample Diluent III).
- 3 flacons de 0,5 ml de plasma de référence lyophilisé, avec feuille de dosage (Reference Plasma).
- 12 ml de conjugué anti-protéine S PR (solution rouge) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml de substrat (TMB et H₂O₂) (One-component Substrate).
- 15 ml de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) (Stopping Solution).
- 30 ml de concentré de lavage (33X SPTP avec 0,01 % de Tween 20). Remarque : le concentré de lavage peut présenter une turbidité qui n'affecte pas la performance du composant et doit disparaître lors de la préparation de la solution de travail (Wash Concentrate).
- 2 ml de réactif de protéine S libre (PEG)

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

1. Les produits d'origine humaine utilisés pour préparer le plasma de référence inclus dans ce kit ont été testés et vérifiés négatifs pour les anticorps anti-HBsAg, anti-HCV et anti-HIV-I & II selon les tests requis par la FDA. Cependant, tous les dérivés de sang humain, y compris les échantillons des patients, doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.
5. La solution substrat à un composant peut causer une irritation des yeux et de la peau. Une absorption à travers la peau est possible. Utiliser des gants pour manipuler le substrat et se laver soigneusement après la manipulation. Tenir les réactifs éloignés des sources de chaleur. Éviter tout contact avec des agents oxydants.
6. Le tampon pour échantillon contient de l'azide de sodium à titre d'agent conservateur. L'azide de sodium s'est avéré former des azides de plomb et de cuivre lorsqu'il est laissé au contact de ces métaux. Ces azides métalliques sont explosifs. Toute solution contenant de l'azide doit être abondamment rincée à l'eau afin d'éviter l'accumulation d'azides métalliques explosifs dans la plomberie.
7. Certains composants sont étiquetés avec la mention suivante :
Irritant pour les yeux (R 36). Éviter le contact avec la peau (S 24). Éviter le contact avec les yeux (S 25). En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste (S 26). En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette (S 46).

Irritant . Biologisches Risiko .

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

La matrice de l'échantillon doit être constituée de plasma prélevé avec 3,2 % ou 3,8 % de citrate de sodium à titre d'anticoagulant. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et l'échantillon doit être immédiatement centrifugé. Retirer le plasma et stocker entre 2 et 8°C jusqu'au moment où le dosage peut être effectué. S'il n'est pas dosé dans les huit heures du prélèvement, l'échantillon doit être stocké à -70°C et dosé dans le mois.

MODE D'EMPLOI

Matériel fourni

Kit d'antigène monoclonal de la protéine S REAADS ; voir la liste complète sous "Réactifs".

Matériel requis mais non fourni

- Plasma de contrôle de la protéine S (totale et/ou libre) : Suivre les instructions du fabricant pour reconstituer le plasma de contrôle choisi en vue de son utilisation et stocker ainsi qu'il est recommandé
- Eau pure pour analyse (1l) pour préparer la solution mère SPTP/Tween, pour reconstituer le plasma de référence et pour mettre au zéro ou effacer le lecteur de plaque durant l'étape finale du dosage
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de délivrer entre 5 et 1 000 µl, avec embout approprié
- Articles en verre convenant à la manipulation de petits volumes
- Flacon ou bouteille de 1 litre
- Des pissettes, de préférence munies d'un goulot partiellement découpé pour autoriser un débit élargi, ou bien un système de lavage automatique ou semi-automatique
- Gants à usage unique, de préférence non talqués

- Spectrophotomètre de lecture de plaque capable de lire l'absorbance à 450 nm (avec une référence à 650 nm si disponible)
- Pipettes multicanaux capables d'alimenter 8 puits simultanément
- Tubes de microdilution pour la préparation des échantillons des patients
- Centrifuge

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons de plasma et les réactifs à température ambiante (18 à 26°C) et bien mélanger avant l'utilisation, éviter la formation de mousse. Remettre dès que possible tous les échantillons et réactifs inutilisés dans le réfrigérateur (2 à 8°C).
2. Toutes les dilutions de plasma de référence, de plasma de contrôle à utiliser choisi et d'échantillons des patients doivent être effectuées juste avant leur utilisation pour le dosage.
3. Un puits d'eau à blanc doit être inclus dans chaque dosage. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté à ce puits. Ajouter à la place à ce puits 200 µl d'eau pure pour analyse immédiatement avant de lire la plaque dans le spectrophotomètre. Le lecteur de plaque doit être programmé sur le zéro ou à vide sur ce puits d'eau.
4. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution mère dans le fond des micropuits à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. L'utilisation de solution mère dans le puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de micro-titration.
5. IMPORTANT : L'élimination imparfaite des résidus SPTP/Tween 20 risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanaux capable d'alimenter 8 puits simultanément. Cela accélère la procédure et permet de mieux uniformiser la durée d'incubation et de réaction de tous les puits.
7. Respecter impérativement la durée des étapes. Tous les plasmas de référence dilués, contrôles et échantillons doivent être ajoutés en cinq minutes au plus. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. Toutes les étapes d'incubation commencent au moment de l'addition du réactif ou de l'échantillon.
9. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit s'effectuer au même rythme et dans le même ordre.
10. Une température d'incubation s'écartant de la température ambiante (18 à 26°C) peut causer des résultats erronés.
11. Éviter toute contamination des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser les réactifs au delà de la date de péremption.
13. Les micropuits coatés, le conjugué et le substrat sont des composants spécifiques d'un lot, ne pas les utiliser avec des kits d'autres lots.

Préparation des réactifs

1. Solution mère – sérum physiologique tamponné au phosphate (SPTP)/Tween 20 : Mesurer 30 ml de concentré de lavage (SPTP 33x/Tween 20) et diluer dans de l'eau pure pour analyse afin d'obtenir 1 litre. Le pH de la solution finale doit être de $7,35 \pm 0,1$. Stocker la solution mère non utilisée entre 2 et 8°C. Jeter si la solution montre des signes de contamination.
2. Reconstituer le plasma de référence en ajoutant 0,5 ml d'eau pure pour analyse. Agiter doucement pour mélanger. Laisser reposer 10 minutes pour une dissolution complète avant l'utilisation. Reste stable 8 heures si stocké entre 2 et 6°C.
3. Reconstituer le plasma de contrôle selon les instructions du fabricant et stocker ainsi qu'il est recommandé.

Procédure de dosage

1. Retirer toutes les barettes de micropuits qui ne seront pas utilisées du cadre et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
2. Doser en double chaque dilution de plasma de référence pour la protéine S totale et libre. La détermination en double des échantillons des patients et des contrôles est aussi recommandée. Un puits doit être utilisé pour le réactif à blanc : du tampon pour échantillon sans sérum est ajouté au puits ainsi qu'expliqué à l'étape 8 de cette section. Ce puits sera traité de la même manière qu'un contrôle ou un échantillon de patient dans les étapes suivantes du dosage. Un puits d'eau à blanc doit être inclus avec chaque plaque ; il doit rester vide jusqu'à l'ajout de 200 µl d'eau pure pour analyse à la fin du dosage, immédiatement avant la lecture de la plaque. Le puits d'eau à blanc sert à la mise au zéro du lecteur de plaque.
3. **Prétraitement pour la détermination de la protéine S libre** : tous les échantillons de plasma à doser pour la protéine S libre (plasma de référence, contrôles et échantillons des patients) doivent être prétraités au polyéthylène glycol (PEG) avant de mettre en place le dosage de la protéine S libre. Ne pas diluer les échantillons de plasma avant le prétraitement au PEG. Ajouter 15 µl de réactif de protéine S libre (PEG) à 85 µl de contrôle ou de plasma patient. Afin d'obtenir suffisamment de liquide surnageant pour préparer la courbe de référence (95 µl), ajouter 45 µl de PEG à 255 µl de plasma de référence. Agiter et placer sur de la glace durant 30 minutes. Centrifuger pendant 10 minutes à 3 000 t/min. Utiliser le Surnageant pour préparer les dilutions pour la courbe et les échantillons ainsi que décrit aux étapes 5 et 6.
4. **Prédiluer comme suit tous les plasmas pour la détermination de la protéine S totale** (dilution 1:2 dans du tampon pour échantillon) :
Plasma de référence : ajouter 100 µl de plasma de référence à 100 µl de tampon pour échantillon.
Contrôles et échantillons des patients : ajouter 20 µl de plasma à 20 µl de tampon pour échantillon.
Bien mélanger. Ces prédilutions servent à la préparation des dilutions de travail de la protéine S totale des étapes 5 et 6.
5. Préparer six dilutions de référence ainsi que décrit dans le tableau ci-dessous. Les dosages de la protéine S totale et libre utilisent des courbes de référence distinctes. Pour la **protéine S totale**, préparer un jeu de dilutions en utilisant le plasma de référence prédilué (étape 4). Pour la **protéine S libre**, préparer un second jeu de dilutions en utilisant le plasma de référence traité au PEG (étape 3).

VOLUME Plasma de référence		VOLUME Tampon pour échantillon		*Niveau de référence
30 µl	+	500 µl	=	150%
20 µl	+	500 µl	=	100%
15 µl	+	500 µl	=	75%
10 µl	+	500 µl	=	50%
10 µl	+	1 000 µl	=	25%
10 µl	+	2 000 µl	=	12,5%

* La valeur du niveau de référence ne doit être utilisée que pour tracer la courbe de référence.

6. Préparer comme suit des dilutions de travail des contrôles et échantillons des patients :
Protéine S totale : ajouter 20 µl de plasma de contrôle ou patient prédilué (dilution 1:2 de l'étape 4) à 500 µl de tampon pour échantillon.
Protéine S libre : ajouter 20 µl de plasma de contrôle ou patient traité au PEG (de l'étape 3) à 500 µl de tampon pour échantillon.
(Remarque : ces dilutions correspondent aux dilutions de plasma de référence relatives à 100 %.)
7. Bien mélanger, puis ajouter 100 µl des dilutions de travail (plasmas de référence x 6, contrôles et échantillons des patients) aux micropuits appropriés pour la détermination de la protéine S totale et libre.
8. Ajouter 100 µl de tampon pour échantillon au puits du réactif à blanc. Laisser vide le puits destiné à l'eau à blanc.

9. Laisser incuber 40 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter le liquide des échantillons. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits.
10. Laver 4 fois à l'aide de solution mère de travail (SPTP/Tween 20). Chaque puit doit être rempli de solution mère à chaque lavage. L'utilisation de solution mère dans le puits vide destiné à servir de puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. Retourner les micropuits entre chaque lavage pour évacuer le liquide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Faire pression sur le centre de la partie supérieure et de la partie inférieure du portoir afin de retenir les barrettes au cours du lavage. Éponger sur du papier absorbant pour éliminer les résidus de liquide de lavage. Ne pas laisser sécher les puits.
11. Ajouter 100 µl de conjugué (rouge) à chaque puits (excepté le puits d'eau à blanc).
12. Laisser incuber 10 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter la solution conjuguée.
13. Laver 4 fois à l'aide de solution mère de travail (SPTP/Tween 20) ainsi qu'à l'étape 10. La présence de solution mère dans le puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. Après le dernier lavage, retourner la plaque d'un mouvement sec du poignet et éponger le liquide restant sur du papier absorbant. Ne pas laisser sécher les puits.
14. Ajouter 100 µl de solution substrat dans chaque puits (excepté le puits d'eau à blanc) et laisser incuber 10 minutes à température ambiante. Ajouter de la solution substrat aux puits à un rythme constant. Une couleur bleue se développe dans les puits avec échantillon positif.
15. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) à chaque puits (excepté le puits d'eau à blanc) pour arrêter la réaction enzymatique. Veiller à ajouter la solution d'arrêt aux puits dans le même ordre et au même rythme que la solution substrat. La solution substrat bleue devient jaune et la solution substrat incolore reste incolore. Ne pas ajouter de solution d'arrêt au puits d'eau à blanc. À la place, ajouter dans le puits d'eau à blanc 200 µl d'eau pure pour analyse. Annuler ou mettre au zéro le lecteur de plaque sur le puits d'eau à blanc. Lire la D.O. de chaque puits à 450 nm au regard d'un filtre de référence à 650 nm (si disponible). Pour un résultat optimal, la D.O. doit être mesurée dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

Résultats

1. Calculer la D.O. moyenne des doubles dilutions de plasma de référence, des contrôles et des échantillons des patients.
2. Reporter les valeurs de la D.O. moyenne obtenues pour chaque dilution du plasma de référence (abscisse) sur la valeur correspondante du niveau de référence (ordonnée). Il est préférable d'utiliser une courbe semi-logarithmique ou point par point, mais on peut aussi utiliser une courbe logarithmique. Préparer des courbes séparées pour la détermination de la protéine S totale et libre.
3. Utiliser la D.O. moyenne pour déterminer les valeurs de contrôle et patient relatives sur la courbe ; on peut aussi calculer par régression linéaire à partir de la courbe de référence.
4. Pour calculer la valeur de l'antigène de la protéine S totale ou libre en % de la normale, multiplier les valeurs de contrôle et patient relatives obtenues sur la courbe de référence appropriée par la valeur assignée correspondante du plasma de référence (voir valeur du dosage page).

Par exemple :*

Valeur patient relative (sur la courbe de référence) : 40

Valeur assignée du plasma de référence (sur valeur du dosage page) : 105 % de la normale

Valeur réelle de l'antigène de la protéine S patient (en % de la normale) : $40 \times 1,05 = 42 \%$

* L'exemple s'applique au calcul de la protéine S aussi bien totale que libre.

5. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis (voir Contrôle qualité) avant de communiquer les résultats des tests.

CONTRÔLE QUALITÉ

1. La D.O. moyenne obtenue pour le réactif à blanc doit être \leq à 0,1 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur l'eau. Une valeur supérieure à 0,1 indique une contamination ou que la plaque a été mal lavée.
2. Les valeurs de densité optique individuelles pour les doubles des contrôles ou des échantillons des patients ne doivent pas différer de plus de 20 % de la valeur moyenne des échantillons dont les résultats d'absorbance sont supérieurs à 0,200.
3. Les valeurs d'antigène de la protéine S (aussi bien totale que libre) obtenues pour les contrôles doivent être comprises dans les plages de dosage immunoenzymatique assignées du fabricant. De petites variations occasionnelles peuvent être tolérées.
4. Chaque laboratoire doit déterminer régulièrement ses propres plages de référence pour ce dosage.

VALEURS NORMALES¹¹

Plage normale : Les valeurs de protéine S totale et libre sont exprimées en pourcentage relatif (%) par rapport à une réserve de plasma normal. La plage normale de la protéine S totale pour ce dosage est de 60 à 150 %. La plage normale de la protéine S libre pour ce dosage est de 50 à 130 %. Ces plages sont cohérentes avec les plages normales publiées dans la littérature et rapportées par les autres dosages commercialisés.^{6,10} Pour un résultat précis, on peut devoir diluer et doser à nouveau les échantillons dont les valeurs dépassent la plage de la courbe de référence.

LIMITES DU TEST

Les valeurs obtenues de protéine S constituent seulement une aide au diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic. Les patients avec déficit homozygote congénital de la protéine S sont rares et peuvent présenter un niveau non détectable de protéine S, tandis que ceux atteints d'un déficit hétérozygote présentent en général un niveau inférieur à 50 % de la normale. Un déficit de protéine S acquis peut être observé dans de nombreux cas cliniques : nouveau-né (niveau 20 à 35 % inférieur à celui de l'adulte), maladie hépatique, diabète sucré, grossesse, traitement contraceptif oral ou anticoagulant oral et coagulation intravasculaire disséminée (DIC). On peut constater une augmentation du niveau de protéine S chez les patients présentant un syndrome néphrotique.⁵⁻¹⁰

Un prélèvement ou un traitement de laboratoire incorrect risque d'épuiser ou de diminuer la protéine S des échantillons de plasma.

Comme pour tout dosage utilisant un anticorps d'origine animale (p. ex. souris, lapin, chèvre etc.) pour capturer une molécule cible, il y a un risque d'interférence dans le sérum ou le plasma de patients ayant été exposés à des préparations contenant des anticorps animaux dans le cadre d'un diagnostic ou d'un traitement. Ces patients peuvent présenter des valeurs faussement élevées ou basses.

GARANTIE

Ce produit est garanti fonctionner ainsi que décrit dans la notice jointe au conditionnement. Corgenix, Inc. dénie toute garantie implicite d'aptitude à la vente ou de conformité à une utilisation particulière et Corgenix, Inc. ne sera en aucun cas responsable d'aucun dommage consécutif.

Pour contacter le service technique ou client aux États-Unis : téléphone 1-800-729-5661 (depuis les États-Unis) ou +303-457-4345 (en dehors des États-Unis) ; télécopie +303-457-4519 ; e-mail technicalsupport@corgenix.com ; sinon, contactez un distributeur autorisé de Corgenix.

**READS®
PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT**

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

INDICACIONES

Un enzimoimmunoensayo (ELISA) para la determinación cuantitativa de la proteína S antigénica total y libre en plasma humano citratado.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo de la proteína S antigénica es un ELISA de tipo sándwich. Para llevarlo a cabo, se recubren placas de poliestireno de 96 micropocillos con un anticuerpo de captura específico para la proteína S humana. El plasma diluido del paciente se incuba en los pocillos, lo que permite que las proteínas S se unan a los anticuerpos de la proteína S antihumana de la superficie de los micropocillos. Las placas se lavan para retirar las proteínas no retenidas u otras moléculas plasmáticas. La proteína S retenida se cuantifica utilizando anticuerpos de detección de la proteína S antihumana conjugados con enzimas peroxidasa (HRP). Tras la incubación, los conjugados no retenidos se retiran mediante lavado. Se añade un sustrato cromógeno de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para desarrollar una reacción coloreada. La intensidad del color se mide en unidades de densidad óptica (D.O.) con un espectrofotómetro a 450 nm. Los porcentajes de concentración relativos de proteína S en el plasma del paciente se determinan respecto a una curva preparada a partir del plasma de referencia incluido con el equipo.

Para medir la proteína S libre, se añade polietilenglicol (PEG) a las muestras de plasma antes de comenzar el ensayo para precipitar el complejo proteínico de unión C4b de la proteína S. El sobrenadante que contiene la proteína S libre puede examinarse junto con la muestra de plasma no tratada. Los resultados obtenidos de las muestras de plasma diluido no pretratadas con PEG representan la concentración total de proteína S de esa muestra. Las concentraciones total (muestras no tratadas) y libre (muestras tratadas con PEG) de proteína S se determinan siguiendo el mismo procedimiento de ensayo descrito anteriormente utilizando curvas de referencia separadas.

REACTIVOS

Consérvelos entre 2 y 8°C. No los congele.

Cada prueba de la proteína S antigénica de 96 micropocillos READS contiene los siguientes reactivos:

- 12x8 micropocillos recubiertos de anticuerpos de la proteína S antihumana (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml de diluyente de muestras (solución azul-verde); contienen azida sódica (Sample Diluent III).
- 3 frascos de 0,5 ml de plasma de referencia liofilizado, con hoja de ensayo (Reference Plasma).
- 12 ml de conjugado de proteína S antihumana y HRP (solución roja) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml de sustrato (TMB y H₂O₂) (One-component Substrate).
- 15 ml de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) (Stopping Solution).
- 30 ml de concentrado de lavado (PBS 33x con Tween 20 al 0,01%). Nota: en el concentrado de lavado puede aparecer turbidez que no afectará a la actuación de los componentes y desaparecerá cuando se prepare la dilución de trabajo (Wash Concentrate).
- 2 ml de reactivo para proteína S libre (PEG)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

1. El material de origen humano empleado para preparar el plasma de referencia incluido con este equipo se ha examinado y resultó negativo en las pruebas de los antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg), de la hepatitis C (HCV) y de los VIH I y II requeridas por la FDA. Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de los pacientes, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No use la pipeta con la boca.
3. No fume, coma o beba en áreas donde se manipulen especímenes o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables al manipular los reactivos del equipo y lávese las manos minuciosamente después de su uso.
5. La solución de sustrato de un componente puede causar irritación ocular o cutánea. Es posible la absorción a través de la piel. Use guantes cuando manipule sustrato y lávese minuciosamente las manos después de su uso. Mantenga este reactivo lejos de fuentes inflamables. Evite el contacto con agentes oxidantes.
6. El diluyente de muestras contiene azida sódica como conservante. Se ha observado que la azida sódica forma azidas de plomo y cobre cuando se deja en contacto con estos metales. Estas azidas metálicas son explosivas. Todas las soluciones que contengan azida deben lavarse bien con abundante agua para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en el sistema de tuberías.
7. Algunos componentes están rotulados con lo siguiente:
Irritante para los ojos (R 36). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico (S 26). En caso de ingestión, busque inmediatamente atención médica y muestre este envase o etiqueta (S 46).

Irritante . Rischio biologico .

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES

Como muestra debe emplearse el plasma obtenido con citrato de sodio al 3,2 ó 3,8% como anticoagulante. La sangre debe extraerse por venopunción, y la muestra ha de centrifugarse inmediatamente. Extraiga el plasma y consérvelo entre 2 y 8°C hasta que pueda realizarse el análisis. Si la muestra no se examina en las ocho horas posteriores a la obtención, deberá conservarse a -70°C y examinarse antes de un mes.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales provistos

Prueba de la proteína S antigénica REAADS; véase una lista completa en “Reactivos”.

Materiales necesarios pero no suministrados

- Plasma de control para proteína S (total o libre): Reconstituya el plasma de control seleccionado para utilizarlo según las instrucciones del fabricante y consérvelo de la forma recomendada
- Agua destilada (1 litro) para preparar solución de lavado de PBS y Tween, para reconstituir el plasma de referencia y para poner a cero o borrar la lectura de la placa durante el paso final del ensayo
- Probetas
- Pipetas de precisión capaces de dispensar entre 5 y 1000 microlitros, con puntas apropiadas
- Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
- Matraz o botella de 1 litro
- Botellas de lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, o un sistema automático o semiautomático de lavado
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin talco

- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se encuentra disponible)
- Pipetas multicanaux capaces de dispensar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos
- Tubos de microdilución para la preparación de la muestra del paciente
- Centrifugadora

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de plasma y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente (entre 18 y 26 °C) y mézclelos bien antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma. Devuelva todas las muestras y reactivos sin usar al almacenamiento refrigerado (entre 2 y 8 °C) en cuanto sea posible.
2. Todas las diluciones del plasma de referencia, el plasma de control elegido y las muestras de los pacientes deben prepararse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.
3. En cada placa debe dejarse un pocillo testigo agua. No deben añadirse muestras ni reactivos del equipo a este pocillo. En su lugar, añada 200 µl de agua destilada a este pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. El lector de placas debe programarse para que la densidad óptica del pocillo del blanco se sustraiga de las densidades ópticas del resto de los pocillos.
4. Una buena técnica de lavado es fundamental para el funcionamiento correcto de este ensayo. El lavado adecuado se logra mejor si se dirige un flujo de solución de lavado a presión apretando una botella de plástico de punta ancha dentro del fondo de los micropocillos. La solución de lavado en el pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. También puede utilizarse un sistema de lavado automático de microplacas.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de PBS y Tween 20, la solución de sustrato puede desarrollar un color inadecuado.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de dispensar a 8 pocillos simultáneamente. Esto agiliza el proceso y proporciona tiempos de reacción e incubación más uniformes a todos los pocillos.
7. Es fundamental controlar estrictamente el tiempo de todos los pasos. Todas las diluciones del plasma de referencia, los controles y las muestras deben añadirse en un plazo máximo de 5 minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede añadirse en este periodo de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubación comienza a partir de la aplicación del último reactivo o muestra.
9. El añadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26 °C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminación de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios.
12. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
13. Los micropocillos recubiertos, el conjugado y el sustrato son componentes específicos del lote, y no deben emplearse con lotes diferentes del equipo.

Preparación del reactivo

1. Solución de lavado (solución buffer de fosfato [PBS] y Tween 20): Mida 30 ml de concentrado de lavado (PBS 33x y Tween 20) y dilúyalos en agua destilada hasta obtener un litro de solución. El pH de la solución final debe ser $7,35 \pm 0,1$. Conserve la solución de PBS y Tween 20 sin usar entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación.
2. Reconstituya el plasma de referencia añadiendo 0,5 ml de agua destilada. Remuévalo ligeramente para que se mezcle. Para que se disuelva por completo, déjelo reposar 10 minutos antes de utilizarlo. Se mantendrá estable durante 8 horas cuando se conserve entre 2 y 6 °C.
3. Reconstituya el plasma de control apropiado según las instrucciones del fabricante y consérvelo de la forma recomendada.

Procedimiento del ensayo

1. Retire del marco las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.
2. Analice cada dilución de plasma de referencia por duplicado para determinar la proteína S total y libre. Para analizar las muestras de control o de los pacientes también se recomienda realizar las determinaciones por duplicado. Un pocillo debe procesarse como reactivo testigo; a este pocillo se añadirá diluyente de muestras sin suero, tal como se explica en el paso 8 de este apartado. Este pocillo se tratará de la misma forma que las muestras de control o de pacientes en los siguientes pasos del ensayo. Debe incluirse un pocillo testigo de agua con cada placa que debe permanecer vacío hasta que se añadan 200 µl de agua destilada al completar el ensayo, inmediatamente antes de la lectura de la placa. El pocillo testigo de agua debe usarse para poner a cero el lector de placas.
3. **Pretratamiento para la determinación de la proteína S libre:** todas las muestras de plasma en las que se vaya a determinar la proteína S libre (plasma de referencia, controles y muestras de los pacientes) deben pretratarse con polietilenglicol (PEG) antes de preparar el ensayo de la proteína S libre. No diluya las muestras de plasma antes del pretratamiento con PEG. Añada 15 µl de reactivo para proteína S libre (PEG) a 85 µl de plasma de control o del paciente. Para obtener suficiente sobrenadante para preparar la curva de referencia (95 µl), añada 45 µl de PEG a 255 µl de plasma de referencia. Agítelo con un agitador vortex y colóquelo en hielo durante 30 minutos. Centrifúguelo durante 10 minutos a 3000 rpm. Utilice el sobrenadante para preparar las diluciones de la curva y de muestra, tal como se describe en los pasos 5 y 6.
4. **Prediluya todos los plasmas necesarios para la determinación de la proteína S total** (dilución al 1:2 en diluyente de muestras) de la forma siguiente:
Plasma de referencia: añada 100 µl de plasma de referencia a 100 µl de diluyente de muestras.
Controles y muestras de los pacientes: añada 20 µl de plasma a 20 µl de diluyente de muestras. Mezcle bien. Estas prediluciones se utilizan para preparar las diluciones de trabajo necesarias para la determinación de la proteína S total en los pasos 5 y 6.
5. Prepare seis diluciones de referencia tal como se describe en la tabla siguiente. Para los ensayos de la proteína S total y libre se emplean curvas de referencia separadas. Para la **proteína S total**, prepare una serie de diluciones con plasma de referencia prediluido (paso 4). Para la **proteína S libre**, prepare una segunda serie de diluciones con plasma de referencia tratado con PEG (paso 3).

<u>Volumen de plasma de referencia</u>		<u>Volumen de diluyente de muestras</u>		<u>*Nivel de referencia</u>
30 µl	+	500 µl	=	150%
20 µl	+	500 µl	=	100%
15 µl	+	500 µl	=	75%
10 µl	+	500 µl	=	50%
10 µl	+	1000 µl	=	25%
10 µl	+	2000 µl	=	12,5%

* El valor del nivel de referencia sólo se utiliza para construir la curva de referencia.

6. Prepare diluciones de trabajo de las muestras de control y de los pacientes de la siguiente manera:
Proteína S total: añada 20 µl de plasma prediluido de control o de los pacientes (la dilución al 1:2 del paso 4) a 500 µl de diluyente de muestras.
Proteína S libre: añada 20 µl de plasma de control o de los pacientes tratado con PEG (del paso 3) a 500 µl de diluyente de muestras.
(Nota: estas diluciones corresponden a la dilución del plasma de referencia relativa al 100%.)
7. Mézclelo todo bien y añada 100 µl de las diluciones de trabajo (plasmas de referencia x 6, controles y muestras del paciente) a los micropocillos apropiados para llevar a cabo las determinaciones de la proteína S total y libre.
8. Añada 100 µl de diluyente de muestras al pocillo testigo de reactivo. Deje vacío el pocillo testigo de agua.

9. Incúbase durante 40 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche el líquido de muestra. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
10. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo (PBS y Tween 20). Cada pocillo debe llenarse con solución de lavado en cada uno de los lavados. La solución de lavado en el pocillo vacío que se va a utilizar como pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciar el líquido. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. El marco debe presionarse en el centro por la parte superior e inferior para que no se caigan los módulos de micropocillos durante el lavado. Seque con papel secante para retirar los restos de líquido de lavado. No debe permitirse que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
11. Añada 100 µl de conjugado (rojo) a cada pocillo (excepto al pocillo testigo de agua).
12. Incúbase durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche la solución conjugada.
13. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo (PBS y Tween 20), como en el paso 10. La solución de lavado del pocillo testigo de agua no interfiere en el procedimiento. Mediante un movimiento seco, escurra el líquido del pocillo y séquelo con papel absorbente tras el lavado final. No permita que los pocillos se sequen.
14. Añada 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo (con excepción del pocillo testigo de agua) e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente. Añada solución de sustrato a los pocillos a un ritmo uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
15. Añada 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo (con excepción del pocillo testigo de agua) para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir la solución de parada a los pocillos en el mismo orden y al mismo ritmo con el que se añadió la solución de sustrato. La solución de sustrato azul se volverá amarilla y el sustrato incoloro permanecerá igual. No añada solución de parada al pocillo testigo de agua. En su lugar, añada 200 µl de agua destilada al pocillo testigo de agua. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto al pocillo testigo de agua. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm, respecto a un filtro de referencia de 50 nm (si se encuentra disponible). Para obtener un resultado óptimo, los valores de la D.O. deben leerse durante los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Resultados

1. Calcule las D.O. medias de los duplicados de las diluciones del plasma de referencia, de los controles y de las muestras de los pacientes.
2. Trace las D.O. medias obtenidas con cada dilución del plasma de referencia (eje x) respecto al valor correspondiente del nivel de referencia (eje y). Se recomienda utilizar un gráfico semi-log o punto a punto, aunque también puede emplearse uno log-log. Prepare curvas separadas para las determinaciones de la proteína S total y libre.
3. Utilice las D.O. medias para determinar los valores relativos de controles y pacientes a partir del gráfico; también puede utilizar la regresión lineal para calcular dichos valores a partir de la curva de referencia.
4. Para calcular los niveles de proteína S antigénica total o libre en porcentajes de lo normal, multiplique los valores relativos de controles y pacientes obtenidos a partir de la curva de referencia apropiada por el valor asignado correspondiente del plasma de referencia (consulte la probar información).

Por ejemplo:*

Valor relativo del paciente (de la curva de referencia): 40

Valor asignado del plasma de referencia (de la probar información): 105% de lo normal

Valor real de proteína S antigénica (en porcentaje de lo normal): $40 \times 1,05 = 42\%$

* El ejemplo es válido para los cálculos de la proteína S tanto total como libre.

5. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (ver Control de calidad) antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

CONTROL DE CALIDAD

1. La D.O. media del testigo de reactivo debe ser $< 0,1$ cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto al pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,1 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.
2. Los valores individuales de la D.O. de los duplicados de los controles y las muestras de los pacientes deben estar dentro del 20% del valor medio de la D.O. en el caso de muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
3. Los valores de proteína S antigénica (total y libre) obtenidos con los controles deben estar dentro de los rangos del ELISA asignados por el fabricante. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos pueden ser aceptables.
4. Cada laboratorio debe determinar periódicamente su propio rango de referencia para este ensayo.

VALORES ESPERADOS¹¹

Rango normal: Los valores de proteína S total y libre se expresan en porcentajes relativos (%) de los del plasma normal combinado. El rango normal de la proteína S total en este ensayo es de un 60 a un 150%. El rango normal de la proteína S libre en este ensayo es de un 50 a un 130%. Estos rangos son similares a los rangos normales citados en la bibliografía y en las especificaciones de otros ensayos disponibles en el mercado.^{6,10} Las muestras que obtengan valores superiores al rango de la curva de referencia pueden tener que diluirse y volver a examinarse para obtener resultados precisos.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Las concentraciones de proteína S obtenidas en este ensayo constituyen únicamente una ayuda diagnóstica. Cada médico debe interpretar estos resultados basándose en los antecedentes del paciente, datos obtenidos en la exploración física y otros procedimientos diagnósticos. Los pacientes con deficiencia homocigótica congénita de proteína S son infrecuentes, y pueden presentar niveles no detectables de proteína S; los pacientes con deficiencia heterocigótica suelen tener niveles inferiores a 50% de lo normal. La deficiencia adquirida de la proteína S está presente en muchos cuadros clínicos: recién nacidos (con niveles de un 20 a un 35% inferiores a los de los adultos), hepatopatías, diabetes mellitus, embarazo, tratamientos con anticonceptivos orales o anticoagulantes orales y coagulación intravascular diseminada (CID). Los pacientes con síndrome nefrótico podrían presentar altos niveles de proteína S.⁵⁻¹⁰

La proteína S de las muestras de plasma puede agotarse o degradarse inadvertidamente si no se utiliza un método de obtención o un procesamiento de laboratorio apropiados. Como en todos los ensayos que utilizan anticuerpos de origen animal (p. ej., ratones, conejos, cabras, etc.) para capturar una molécula determinada, cabe la posibilidad de que haya interferencias en el suero o plasma de los pacientes a los que se les haya administrado preparados que contengan anticuerpos animales con fines diagnósticos o terapéuticos. En estos pacientes pueden observarse valores espurios altos o bajos.

GARANTÍA

Se garantiza que este producto funcionará según se describe en este prospecto. Corgenix, Inc. desautoriza cualquier garantía implícita de comerciabilidad o aptitud para un uso particular, y en ningún caso Corgenix, Inc. se hará responsable de daños emergentes.

Para obtener servicio técnico o de atención al cliente en los EE.UU., llame al 1-800-729-5661. Fuera de los EE.UU., llame al +303-457-4345 o envíe un fax al +303-457-4519 o un mensaje por correo electrónico a: technicalsupport@corgenix.com, o bien póngase en contacto con un distribuidor autorizado de Corgenix.

**REAADS®
PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT**

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione quantitativa dell'antigene della proteina S totale e libera nel plasma umano citrato.

PRINCIPIO DEL TEST

Il dosaggio dell'antigene della proteina S è un saggio ELISA a sandwich. Un anticorpo di cattura specifico per la proteina S umana viene usato per rivestire piastre di polistirolo a 96 pozzetti. Il plasma diluito, prelevato da pazienti, viene incubato nei pozzetti, consentendo alle proteine S di legarsi agli anticorpi anti-proteine S umane presenti sulla superficie dei pozzetti. Le piastre vengono quindi lavate per eliminare le proteine non legate o altre molecole di plasma. La determinazione quantitativa della proteina S legata viene eseguita utilizzando anticorpi di individuazione anti-proteina S umana coniugati con perossidasi di rafano (HRP). Dopo l'incubazione, il coniugato non legato viene eliminato mediante lavaggio. Per sviluppare una reazione colorata, si aggiunge un substrato cromogeno a base di tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H₂O₂). L'intensità del colore si misura in unità di densità ottica (O.D.) con uno spettrofotometro a 450 nm. Le concentrazioni percentuali relative di proteina S nel plasma da pazienti vengono determinate rispetto ad una curva preparata con il plasma di riferimento incluso nel kit.

Per misurare la proteina S libera, si aggiunge PEG ai campioni di plasma prima di iniziare il dosaggio, per precipitare il complesso proteina S-proteina legante C4b. La frazione di sopranatante che contiene la proteina S libera può essere analizzata insieme al campione di plasma non trattato. I risultati ottenuti dai campioni di plasma diluito non pretrattato con polietilenglicole (PEG) sono rappresentativi della concentrazione di proteina S totale per quei campioni. Entrambe le concentrazioni di proteina totale (non trattata) e libera (trattata con PEG) vengono determinate mediante la procedura di dosaggio descritta qui sopra, utilizzando curve di riferimento separate.

REAGENTI

Conservare a 2 – 8°C. Non congelare.

Ogni kit REAADS per il dosaggio dell'antigene della proteina S, a 96 pozzetti, contiene i seguenti reagenti:

- 12 x 8 pozzetti rivestiti di anticorpi anti-proteina S umana (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml di diluente per campioni (soluzione blu-verde); contiene sodio azide (Sample Diluent III).
- 3 flaconi x 0,5 ml di plasma di riferimento liofilizzato, con scheda di dosaggio (Reference Plasma).
- 12 ml di coniugato anti-proteina S umana (soluzione rossa) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml di substrato (TMB and H₂O₂) (One-component Substrate).
- 15 ml di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico) (Stopping Solution).
- 30 ml di concentrato di lavaggio (33X PBS con 0,01% di detergente tipo Tween 20). N.B. Il concentrato di lavaggio può esibire un aspetto torbido che non influisce sulle prestazioni dei componenti e che dovrebbe scomparire durante la preparazione della diluizione pronta all'uso (Wash Concentrate).
- 2 ml di reagente per proteina S libera (PEG)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*

1. Il materiale di origine umana usato per preparare il plasma di riferimento incluso in questo kit è stato analizzato in osservanza dei requisiti dell'FDA ed è risultato negativo per gli anticorpi anti-HBsAg, HCV e HIV 1 e 2. Tuttavia, tutti gli emoderivati di origine umana, inclusi i campioni da pazienti, devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si maneggiano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. La soluzione di substrato mono-componente può causare irritazione agli occhi e alla cute. È possibile l'assorbimento attraverso la cute. Usare i guanti quando si maneggia il substrato e lavarsi bene le mani subito dopo. Tenere i reagenti lontano da fonti di ignizione. Evitare il contatto con agenti ossidanti.
6. Il diluente per campioni contiene sodio azide come conservante. È stato riportato che il sodio azide può formare azidi di rame e di piombo quando viene lasciato a contatto con questi metalli. Tali composti azidici sono esplosivi. Tutte le soluzioni a base di azide devono essere sciacquate con abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche esplosive nelle tubature.
7. Irritante per gli occhi (R 36). Evitare il contatto con la pelle (S 24). Evitare il contatto con gli occhi (S 25). In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico (S 26). In caso di ingestione, consultare immediatamente un medico, mostrandogli il contenitore o l'etichetta (S46).

Irritante . Riesgo biológico .

ACQUISIZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Come matrice dei campioni, usare plasma raccolto con 3,2% o 3,8% di citrato di sodio come anticoagulante. Il sangue deve essere prelevato mediante venipuntura e il campione deve essere centrifugato immediatamente. Rimuovere il plasma e conservarlo a 2 – 8°C fino al momento di eseguire l'analisi. Se il campione non viene analizzato entro 8 ore dal prelievo, conservarlo a -70°C e analizzarlo entro un mese.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit REAADS per il dosaggio dell'antigene della proteina S; per un elenco completo, vedere "Reagenti".

Materiali richiesti ma non forniti

- Plasma di controllo per la proteina S (totale e/o libera) – per ricostituire il plasma di controllo selezionato per l'uso, seguire le istruzioni della ditta produttrice e conservarlo come raccomandato
- Acqua distillata (circa 1 litro) per preparare la soluzione di lavaggio PBS/Tween 20, per ricostituire il plasma di riferimento e per tarare o azzerare il lettore della piastra nella fase finale del dosaggio
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione in grado di erogare quantità comprese tra 5 e 1000 microlitri, con le punte appropriate
- Vetreteria assortita adatta a manipolare piccoli volumi di liquidi
- Beuta o flacone da 1 litro
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con la punta leggermente indietro per allargare il getto, o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico
- Guanti monouso, senza talco (raccomandati)
- Spettrofotometro per piastra in grado di rilevare l'assorbimento a 450 nm (possibilmente a 650 nm, se disponibile)
- Pipette multicanali per versare in 8 pozzetti simultaneamente
- Provette per microdiluizione da usare per la preparazione dei campioni da pazienti
- Centrifuga

Note procedurali

1. Portare i campioni di plasma e i reagenti a temperatura ambiente (18 – 26°C) a mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Riportare tutti i prelievi e i reagenti non utilizzati nel congelatore (2 – 8°C) quanto prima.
2. Tutte le diluizioni del plasma di riferimento, del plasma di controllo selezionato per l'uso e dei campioni da pazienti devono essere preparate immediatamente prima di essere usate nel dosaggio.
3. Preparare un pozzetto bianco per ogni piastra. In questo pozzetto non bisogna aggiungere campioni o reagenti del kit. Aggiungere invece al pozzetto 200 µl di acqua distillata immediatamente prima di leggere la piastra nello spettrofotometro. Questo pozzetto con l'acqua servirà a tarare o ad azzerare il lettore della piastra.
4. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante per la riuscita ottimale del dosaggio. Per un lavaggio adeguato dirigere un getto vigoroso di soluzione di lavaggio erogata da un flacone di plastica morbida con una punta larga nel fondo dei pozzetti. La presenza di soluzione di lavaggio nel bianco non interferirà con la procedura. È anche possibile utilizzare un sistema di lavaggio automatico per piastre per microtitolazione.
5. **IMPORTANTE** – I residui di PBS/Tween 20 possono causare uno sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale che possa versare in 8 pozzetti simultaneamente. Ciò aumenta la velocità dal test e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
7. Un controllo accurato del tempo in tutte le fasi è importantissimo. Tutte le diluizioni del plasma di riferimento, i controlli, e i campioni vanno aggiunti entro cinque minuti. Il volume dei campioni non deve essere maggiore dalla quantità che può essere aggiunta entro questi cinque minuti.
8. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione comincia quando è terminata l'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere effettuata alla stessa velocità e con la stessa sequenza.
10. Le temperature di incubazione più alte o più basse della normale temperatura ambiente (18 – 26°C) possono contribuire a dar luogo a risultati errati.
11. Quando si aprono i fiale originali e si prelevano le aliquote, evitare la contaminazione dei reagenti.
12. Non utilizzare componenti dal kit che abbiano superato la data di scadenza.
13. I pozzetti rivestiti, il coniugato e il substrato sono componenti che fanno parte di un lotto specifico e non devono essere usati con kit di lotti diversi.

Preparazione dei reagenti

1. Soluzione di lavaggio – soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)/Tween 20. Misurare 30 ml di concentrato di lavaggio (33X PBS/Tween 20) e diluirlo a 1 litro con acqua distillata. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione PBS/Tween 20 non utilizzata a 2 – 8°C. Eliminare la soluzione se mostra segni di contaminazione.
2. Ricostituire il plasma di riferimento aggiungendo 0,5 ml di acqua distillata. Roteare leggermente per miscelare. Lasciare riposare per 10 minuti prima dell'uso, per dissolvere completamente. Il composto è stabile per 8 ore se conservato a 2 – 6°C.
3. Per ricostituire il plasma di controllo appropriato, seguire le istruzioni della ditta produttrice e conservarlo come raccomandato.

Procedura di dosaggio

1. Togliere dall'apposito telaio tutte le strisce di pozzetti che non verranno usate, e conservarle nella sacca in dotazione.
2. Analizzare in duplicato ciascuna diluizione di plasma di riferimento per la determinazione della proteina S totale e libera. Si consiglia di eseguire determinazioni in duplicato anche per quanto riguarda i campioni da pazienti e i controlli. Analizzare un pozzetto come bianco reagente; dispensare nel pozzetto il diluente per campioni senza siero, come spiegato nel passaggio 8 di questa sezione. Questo pozzetto sarà trattato come un controllo o un campione prelevato dal paziente in tutte le fasi successive del dosaggio. Con ogni piastra occorre includere un pozzetto bianco, che dovrà rimanere vuoto finché non si aggiungono 200 µl di acqua distillata al termine del dosaggio, immediatamente prima della lettura della piastra. Questo bianco va utilizzato per azzerare il lettore della piastra.

3. **Pretrattamento per la determinazione della proteina S libera:** tutti i campioni di plasma da analizzare per la proteina S libera (plasma di riferimento, controlli e campioni da pazienti) devono essere pretrattati con polietilenglicole (PEG) prima di predisporre il dosaggio della proteina S libera. Non diluire i campioni di plasma prima del pretrattamento con PEG. Aggiungere 15 µl di reagente per proteina S libera (PEG) a 85 µl di controllo o plasma prelevato da pazienti. Per ottenere una quantità di sopranatante sufficiente a preparare la curva di riferimento (95 µl), aggiungere 45 µl di PEG a 255 µl di plasma di riferimento. Agitare con vortex e mettere in ghiaccio per 30 minuti. Centrifugare per 10 minuti a 3000 rpm. Usare il sopranatante per preparare la curva e le diluizioni dei campioni, come descritto nei passaggi 5 e 6.
4. **Prediluire tutte le aliquote di plasma per la determinazione della proteina S totale** (diluizione 1:2 in diluente per campioni) nel modo seguente:
Plasma di riferimento: aggiungere 100 µl di plasma di riferimento a 100 µl di diluente per campioni;
Controlli e campioni da pazienti: aggiungere 20 µl di plasma a 20 µl di diluente per campioni.
 Miscelare accuratamente. Queste prediluizioni servono a preparare le diluizioni pronte all'uso per la proteina S totale, descritte nei passaggi 5 e 6.
5. Preparare sei diluizioni di riferimento, come descritto nella tabella seguente. Per i dosaggi della proteina S totale e libera vengono utilizzate curve di riferimento separate. Per la **proteina S totale**, preparare una serie di diluizioni usando plasma di riferimento prediluito (passaggio 4). Per la **proteina S libera**, preparare una seconda serie di diluizioni usando plasma di riferimento pretrattato con PEG (passaggio 3).

Volume del plasma di riferimento		Volume del diluente per campioni		*Livello di riferimento
30 µl	+	500 µl	=	150%
20 µl	+	500 µl	=	100%
15 µl	+	500 µl	=	75%
10 µl	+	500 µl	=	50%
10 µl	+	1000 µl	=	25%
10 µl	+	2000 µl	=	12,5%

* Valore del livello di riferimento da usare solo per costruire la curva di riferimento

6. Preparare come segue le diluizioni pronte all'uso dei controlli e dei campioni da pazienti.
Proteina S totale: aggiungere 20 µl di controllo o plasma prediluito (diluizione 1:2 come descritto nel passaggio 4) a 500 µl di diluente per campioni.
Proteina S libera: aggiungere 20 µl di controllo o plasma pretrattato con PEG (come descritto nel passaggio 3) a 500 µl di diluente per campioni.
 (N.B. Queste diluizioni corrispondono alla diluizione relativa al 100% del plasma di riferimento.)
7. Mescolare accuratamente e aggiungere 100 µl di diluizioni pronte all'uso (plasma di riferimento x 6, controlli e campioni da pazienti) ai pozzetti appropriati per le determinazioni della proteina S totale e libera.
8. Aggiungere 100 µl di diluente per campioni al pozzetto bianco reagente. Lasciare vuoto il pozzetto bianco.
9. Far incubare per 40 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di coniugato. Evitare la contaminazione degli altri pozzetti con i prelievi.
10. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio pronta all'uso (PBS)/Tween 20. Ciascun pozzetto deve essere riempito con soluzione di lavaggio per lavaggio. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto vuoto del bianco non interferirà con la procedura. Capovolgere i pozzetti tra un lavaggio e l'altro e svuotare il liquido. Con un movimento deciso del polso scuotere il liquido nei pozzetti causandone la fuoriuscita. Il telaio dei pozzetti va schiacciato al centro in alto e in basso per trattenere i pozzetti durante il lavaggio. Asciugare le ultime gocce di liquido con carta assorbente. Evitare che i pozzetti si asciughino tra le varie fasi.
11. Aggiungere 100 µl di coniugato (rosso) a ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco).

12. Far incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di coniugato.
13. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio pronta all'uso (PBS)/Tween 20) come indicato nel passaggio 10. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto bianco non interferisce con la procedura. Drenare il liquido con un movimento a scatto e asciugare con carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Evitare che i pozzetti si asciughino.
14. Aggiungere 100 µl di substrato a ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco) e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Aggiungere il substrato nei pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con prelievi positivi si svilupperà un colore blu.
15. Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto (0,36 acido solforico N) a ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco) per fermare la reazione enzimatica. Fare attenzione ad aggiungere ai pozzetti la soluzione di arresto nello stesso ordine ed alla stessa velocità con cui è stata aggiunta la soluzione di substrato. La soluzione blu di substrato diventa gialla, mentre il substrato incolore rimane tale. Non aggiungere la soluzione di arresto nel pozzetto bianco. Al pozzetto bianco aggiungere invece 200 µl di acqua distillata. Tarare o azzerare il lettore della piastra confrontandolo al pozzetto bianco. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm, confrontandola ad un filtro di riferimento a 650 nm (se disponibile). Per ottenere risultati ottimali, i valori della densità ottica devono essere misurati entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

Risultati

1. Calcolare il valore medio della densità ottica per i duplicati delle diluizioni del plasma di riferimento, dei controlli e dei campioni da pazienti.
2. Tracciare un grafico del valore medio della densità ottica ottenuto per ciascuna diluizione del plasma di riferimento (asse x) rispetto al valore corrispondente del livello di riferimento (asse y). Si consiglia un grafico semi-log, o da punto a punto, sebbene sia possibile usare anche un grafico log-log. Preparare curve separate per le eterminazioni della proteina S totale e libera.
3. Utilizzando il valore medio della densità ottica, determinare in base al grafico i valori relativi del controllo e del paziente, oppure usare la regressione lineare per seguire il calcolo in base alla curva di riferimento.
4. Per calcolare i livelli di antigene della proteina S totale o libera come percentuale (%) del livello normale, moltiplicare i valori relativi del controllo e del paziente, ricavati dalla curva di riferimento appropriata, per il corrispondente valore assegnato del plasma di riferimento (vedere analisi qualitativa foglio).

Ad esempio:*

Valore relativo del paziente (curva di riferimento): 40

Valore assegnato del plasma di riferimento (analisi qualitativa foglio): 105% del valore normale

Valore effettivo dell'antigene della proteina S del paziente (come % del valore normale): $40 \times 1,05 = 42\%$

* L'esempio riguarda le determinazioni della proteina S sia totale che libera.

5. Assicurarsi che siano stati soddisfatti tutti i parametri di controllo di qualità (vedere Controllo di qualità) prima di riportare i risultati del test.

CONTROLLO DI QUALITÀ

1. Quando lo spettrofotometro è stato tarato sul pozzetto bianco, la densità ottica media del bianco reagente deve essere < 0,1. Valori più alti di 0,1 potrebbero indicare una possibile contaminazione del reagente, o insufficiente lavaggio della piastra.
2. I valori individuali della densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni da pazienti devono rimanere entro il 20% della densità ottica media per valori di assorbanza superiori a 0,200.
3. I valori di antigene della proteina S (totale e libera) ottenuti per i controlli devono essere compresi nei range ELISA assegnati dalla ditta produttrice. Tuttavia, piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi intervalli possono essere accettabili.
4. Ogni laboratorio deve determinare periodicamente il proprio range di riferimento per questo dosaggio.

VALORI ATTESI¹¹

Valori di riferimento: I valori di proteina S totale e libera vengono espressi come percentuale relativa (%) rispetto al pool di plasma normale. Il range normale della proteina S totale per questo dosaggio è di 60 – 150%. Il range normale della proteina S libera per questo dosaggio è di 50 – 130%. Questi range sono coerenti con quelli normali pubblicati nella letteratura attinente e riportati da altri sistemi di dosaggio disponibili in commercio.^{6,10} Per ottenere risultati accurati, i campioni con valori superiori al range della curva di riferimento possono essere diluiti e rianalizzati.

LIMITI DEL TEST

Le concentrazioni di proteina S ottenute con questi dosaggi sono solo uno strumento di ausilio per la diagnosi. Ogni medico deve interpretare risultati in funzione dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altri procedimenti diagnostici. I casi di insufficienza omozigotica congenita di proteina S sono rari e, nei soggetti affetti, i livelli di proteina S possono essere non determinabili, mentre nei pazienti con insufficienza eterozigotica i livelli sono generalmente inferiori al 50% del valore normale. L'insufficienza acquisita di proteina S è riscontrabile in varie condizioni cliniche: neonati (livelli del 20 - 35% inferiori a quelli degli adulti), epatopatie, diabete mellito, gravidanza, somministrazione per via orale di contraccettivi o anticoagulanti e coagulazione intravascolare disseminata (CID). Livelli aumentati di proteina S sono osservabili anche nei pazienti con sindrome nefrosica.⁵⁻¹⁰

La proteina S presente nei campioni può essere inavvertitamente diminuita o degradata a causa di errori durante il prelievo del campione o il trattamento in laboratorio. Come per qualsiasi dosaggio che utilizza anticorpi di origine animale (come topo, coniglio, capra, ecc.) per catturare una molecola bersaglio, esiste la possibilità di interferenza nel siero o nel plasma di pazienti che sono stati esposti, per motivi diagnostici o terapeutici, a preparazioni contenenti anticorpi di origine animale. In questi pazienti è possibile osservare valori falsamente elevati o ridotti.

GARANZIA












Si garantisce l'efficacia di questo prodotto secondo la descrizione fornita nel foglietto illustrativo. Corgenix, Inc. nega qualsiasi garanzia di commerciabilità o idoneità per usi particolari e in nessuna circostanza Corgenix, Inc. si riterrà responsabile di eventuali danni indiretti.

Per richiedere l'assistenza tecnica o mettersi in contatto con il servizio di assistenza clienti negli Stati Uniti, dall'interno degli USA chiamare il numero 1-800-729-5661. Dagli altri paesi, chiamare il numero +303-457-4345. È anche possibile inviare un fax al numero +303-457-4519 o inviare un messaggio e-mail a technicalsupport@corgenix.com o rivolgersi ad un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. DiScipio RG, Davie EW. Characterization of Protein S; a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma. *Biochemistry* 18:899-904, 1979.
2. Dahlback B. Purification of human vitamin K-dependent Protein S and its limited proteolysis by thrombin. *Biochem J* 209:837-846, 1983.
3. Walker FJ. Protein S and the Regulation of Activated Protein C. *Semin Thromb Hemost* 10:131-138, 1984.
4. Dahlback B. Protein S and C4b-Binding Protein: Components involved in the regulation of the Protein C Anticoagulant System. *Thromb Haemost* 66:49-61, 1991.
5. Comp PC, Noxon RR et al. Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 74:2082-2088, 1984.
6. Walker FJ. Protein S and Thrombotic Disease. *PSEBM* 200:285-295, 1992.
7. Gladson CL, et al. The frequency of type I heterozygous Protein S and Protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost* 59:18-22, 1988.
8. Alving BM, Comp PC. Recent advances in understanding clotting and evaluating patients with recurrent thrombosis. *Am J Obstet Gynecol* 167:1184-1191, 1992.
9. Deutz-Terlouw PP, Ballering L, et al. Two ELISA's for measurement of Protein S, and their use in the laboratory diagnosis of Protein S deficiency. *Clin Chimica Acta* 186:321-334, 1989.
10. Comp-PC. Laboratory evaluation of Protein S status. *Semin Thromb Hemost* 16:177-181, 1990.
11. Data on File.

SYMBOL LEGEND

										
Manufacturer	Authorized Representative	In vitro diagnostic medical device	Batch Code	Use by/ Expiry Date	Temperature Limitation	Irritant	Biological Risk	Catalog Number	European Conformity	Consult Instructions for Use/ Package Insert
Hersteller	Bevoll-mächtigter	In-vitro-Diagnostikum	Chargennummer	Verfallsdatum	Temperatur-beschränkungen	Reizend	Biologisches Risiko	Katalognummer	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten
Fabriqué par	Représentant agréé	Dispositif de diagnostic in vitro	Code de Lot	Utiliser jusqu' à/ Date de péremption	Limites de température	Irritant	Risque biologique	Numéro de catalogue	Conformité aux normes européennes	Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement
Fabricado por	Representante autorizado	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	Código de Lote	Usar antes de/ Fecha de caducidad	Limitación de temperatura	Irritante	Riesgo biológico	Número de catálogo	Conformidad europea	Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase
Prodotta da	Rappresentante autorizzato	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Codice del lotto	Scade il/ data di scadenza	Limite di temperatura	Irritante	Rischio biologico	Numero di catalogo	Conformità europea	Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo



MT Promedt Consulting GmbH
 Altenhofstraße 80
 D-66386 St. Ingbert/Germany



Corgenix, Inc.
 11575 Main Street, Suite 400
 Broomfield, Colorado 80020, USA

READS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.

© 2007, Corgenix, Inc.

13036901 07
 Effective: 2007-08-10