

## PROTEIN C ANTIGEN TEST KIT

*In-vitro*-Diagnostikum

Diese Packungsbeilage dient ausschließlich zu Informationszwecken. Bei der Testdurchführung die mit jedem Kit mitgelieferte Packungsbeilage beachten.

**ANWENDUNGSGEBIET**

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) zur quantitativen Bestimmung von Protein C Antigen in Zittrathumanplasma.

**TESTPRINZIP**

Beim Protein C Antigen Test handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Die 96 Mikrovertiefungen der Polystyrolplatten sind mit Capture-Antikörpern beschichtet, die spezifisch mit HumanProtein C reagieren. Bei der Inkubation von verdünntem Patientenplasma in den Mikrovertiefungen wird das verfügbare Protein C an die Antihuman-Protein C-Antikörper auf der Oberfläche der Mikrovertiefungen gebunden. Die Platten werden gewaschen, um nichtgebundene Proteine und andere Moleküle aus dem Plasma zu entfernen. Gebundenes Protein C wird mit Hilfe von Antihuman-Protein C-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 C Antigen in Patientenplasma wird anhand einer Kurve bestimmt, die mit Hilfe des im Kit enthaltenen Referenzplasmas erstellt wurde (in %).

**REAGENZIEN**

Bei 2 – 8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren!

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

- Mit Antihuman-Protein C-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 C-HRP-Konjugat (blaue 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 phosphatgepufferte Kochsalzlösung 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).

**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, HIV-I und HIV 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: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R 22). Reizt die Augen und die Haut (R 36/38). Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden (S 24/25). Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren (S 26). Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen (S 36).

**PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG**

Als Probenmatrix sollte Plasma verwendet werden, dem Natriumzitrat (3,2% oder 3,8%) als Antikoagulantium beigelegt 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 C Antigen Testkit; siehe „Reagenzien“ mit einer vollständigen Auflistung.

**Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien**

- Kontrollplasma für Protein C: das zur Verwendung gewählte Kontrollplasma entsprechend den Anleitungen des Herstellers rekonstituieren und lagern
- Analysenreines Wasser (1 l) zur Herstellung der PBS/Tween 20-Waschlösung, zur Rekonstitution von Referenzplasma 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

**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 beigefügt. Stattdessen werden in diese Vertiefung direkt vor dem Ablesen der Mikrotiterplatte 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 ± 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 8 Stunden stabil. 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 testen. Für die Patienten- und Kontrollproben werden ebenfalls Doppelbestimmungen empfohlen. Eine Vertiefung sollte als Blindprobe verwendet werden. Probenverdünner ohne Serum wird wie in Schritt 7 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. Alle Plasmaproben wie folgt vorverdünnen (1:2 Verdünnung mit Probenverdünner):  
Referenzplasma: 100 µl Referenzplasma zu 100 µl Probenverdünner pipettieren  
Kontrollen und Patienten-Probe: 20 µl Plasma zu 20 µl Probenverdünner pipettieren  
 Gut durchmischen. Diese Vorverdünnungen werden zur Herstellung der Arbeitsverdünnungen in den Schritten 4 und 5 verwendet.
4. Anhand der 1:2 Referenzplasmaverdünnung aus Schritt 3 wie nachfolgend beschrieben sechs Arbeitsreferenzverdünnungen herstellen.

Volumen Referenzplasma (1:2)		Volumen Probenverdünner	=	*Referenzkonzentrationswert
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

5. Zum Herstellen von Arbeitsverdünnungen der Kontroll- und Patientenproben 20 µl des vorverdünnten Plasmas (1:2 Verdünnung aus Schritt 3) zu 500 µl Probenverdünner pipettieren. (Hinweis: Diese Verdünnungen entsprechen der 100% Referenzplasmaverdünnung).
6. Gründlich durchmischen und 100 µl der Arbeitsverdünnungen (Referenzplasmen, Kontrollen und Patientenproben) in die betreffenden Mikrovertiefungen pipettieren.
7. 100 µl des Probenverdünners in die für das Reagenz vorgesehene Vertiefung pipettieren. Die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung bleibt leer.
8. Es wird 40 Minuten bei Zimmertemperatur 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.
9. 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 Waschlösigkeit durch Umdrehen der Vertiefungen 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.
10. In jede Vertiefung (mit Ausnahme der für den Substratleerwert vorgesehenen) 100 µl Konjugat (blau) pipettieren.
11. Dann wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert.
12. Wie in Schritt 9 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!
13. In jede Vertiefung (mit Ausnahme der für den Substratleerwert vorgesehenen) 100 µl Substrat pipettieren und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. HS enthaltende Vertiefungen färben sich blau.
14. 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, der zur Verwendung gewählten 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 log-log-Darstellung oder Punkt-zu-Punkt-Darstellung, eine halblogarithmische Auftragung ist jedoch ebenfalls möglich.
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 Protein C Antigen (in % relativ zu Normalwert) die aus der Eichkurve erhaltenen relativen Werte für Kontrollen und Patientenproben mit dem zugehörigen Wert für das REAADS Referenzplasma multiplizieren (siehe Fläschchenetikett).

### Beispiel:

Relativer Patientenwert (aus Eichkurve): 40

Zugehöriger Referenzplasmawert (vom Fläschchenetikett): 105% des Normalwerts

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

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 kleiner als 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% vom durchschnittlichen OD abweichen.
3. Die für die Kontrollen erhaltenen Werte für Protein C Antigen sollten innerhalb des vom Hersteller für ELISA-Tests empfohlenen Bereichs liegen. Gelegentliche, geringe Abweichungen von diesem Bereich können toleriert werden.
4. Jedes Labor sollte regelmäßig den eigenen Referenzbereich für diesen Test festlegen.

## NORMALWERTE<sup>9</sup>

Normalbereich: Die Konzentration des Protein C Antigens wird im Allgemeinen in Prozent (%) relativ zu einem Pool von Normalplasma angegeben. Der Normalbereich bei Verwendung normaler Plasmaproben mit dem REAADS Protein C Antigen Test betrug 72 – 160% (Mittelwert 110%, Std. abw. 24%). Dieser Bereich entspricht den in der Literatur veröffentlichten und von anderen Testherstellern angegebenen Normalbereichen.<sup>6,8</sup> Proben, deren Werte oberhalb des Bereichs der Eichkurve liegen, müssen u. U. verdünnt und erneut gemessen werden, um das richtige Ergebnis zu erhalten.

## GRENZEN DES TESTS

Die Werte der Konzentration von freiem Protein C Antigen, die von 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. Patienten mit kongenitaler homozygoter Protein C Defizienz können unter der Nachweisgrenze liegende Konzentrationen an Protein C aufweisen. Patienten mit heterozygoter Defizienz haben in der Regel Werte zwischen 30% und 60% des Normalwerts. Eine erworbene Protein C Defizienz kann bei Neugeborenen (Konzentrationen von 20 – 50% unter den Werten Erwachsener), schweren Lebererkrankungen, Therapie mit oralen Antikoagulantien, in der postoperativen Phase, bei disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC), Antiphospholipid-Syndrom, und anderen Krankheitsbildern auftreten.<sup>6-8</sup> Nierenkranke Patienten können erhöhte Protein C Werte aufweisen.

Durch Fehler bei der Blutabnahme oder beim Verarbeiten der Plasmaproben im Labor kann Protein C unbeabsichtigterweise 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](mailto:technicalsupport@corgenix.com). Sie können sich auch mit einem autorisierten Corgenix-Händler in Verbindung setzen.



