

CE ZYMUTEST TOTAL PROTEIN S

ARK021A

(Complete one step ELISA kit for the assay of Total Protein S)

For in vitro diagnostic use only



Manufactured by Hyphen BioMed.

Last revision: 26/12/2005

INTENDED USE:

The ZYMUTEST Total Protein S kit is a one step, two-site immuno-assay, for measuring human Total Protein S in plasma, or in any fluid where Total Protein S can be present.

ASSAY PRINCIPLE:

First, the immunoconjugate, which is a monoclonal antibody specific for both forms of Protein S (free or complexed with C4b-Binding Protein) coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced into the microwells coated with another monoclonal antibody also specific for both Protein S forms. Then, the diluted tested plasma or biological fluid is immediately introduced, and the immunological reaction starts. When present, the Protein S (free or complexed with C4b-BP) binds onto the monoclonal antibody coated solid phase through one epitope, and fixes the second monoclonal antibody coupled to HRP by another epitope. Following a washing step, the peroxidase substrate, 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine (TMB), in presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. When the reaction is stopped with Sulfuric Acid, a yellow colour is obtained. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human Total Protein S in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where Protein S must be measured.

REAGENTS:

- COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with a mouse monoclonal antibody specific for the two forms of human Protein S, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
- SD:** 2 vials containing 50 ml of Protein S-Sample Diluent, ready to use (contains calcium).
- Cal:** 3 vials of Plasma Protein S calibrator, (normal plasma calibrated with a reference plasma pool), lyophilised, prediluted 1:50.
Each vial, when restored with 2 ml of Protein S-Sample Diluent, allows obtaining the plasma calibrator, already diluted 1:50. The exact Total Protein S concentration is indicated on the flyer provided in the kit.
- CI:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised Protein S Control I, (Plasma, high)
- CII:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised Protein S Control II, (Plasma, low)
Note: The Total Protein S concentrations and acceptancy ranges for control plasma I and II, and calibrator, can vary from lot to lot, but are precisely indicated for each lot on the flyer provided in the kit.
- IC:** 3 vials of Anti-(h)-Total-Protein S-HRP immunoconjugate, a mouse monoclonal antibody coupled to HRP, lyophilised.
- CD:** 1 vial of 15 ml of Protein S Conjugate Diluent, ready to use.
- WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated Protein S Wash Solution (contains calcium).
- TMB:** 1 vial of 25 ml of peroxidase substrate: 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine, containing hydrogen peroxide. Ready to use.
- SA:** 1 vial of 6 ml of 0.45 M Sulfuric Acid (Stop solution). Ready to use.
Note: Use only components from a same kit lot number. Do not mix components from different lots when running the assay.

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- 8-channel or repeating pipette allowing dispensing 50-300 µl.
- 1-channel pipettes at variable volumes from 0 to 20 µl, 20 to 200 µl and 200 to 1000 µl.
- Micro ELISA plate washing equipment and shaker.
- Micro ELISA plate reader with a wavelength set up at 450 nm.
- Distilled water.

REAGENTS PREPARATION, STORAGE AND STABILITY:

In their original packaging box, before use, when stored at 2-8°C, the unopened reagents are stable until the expiration date printed on the box.

- Micro ELISA plate:** open the plastic pouch and take off the required amounts of 8 well strips for the test series. When out of the pouch, the strips must be used within 30 minutes. Unused strips can be stored at 2-8°C for 4 weeks in their original aluminium pouch, in presence of the desiccant, hermetically closed and protected from any moisture, and stored in the provided microplate storage bag (minigrip).
- Protein S-Sample Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. It contains 0.05% Kathon CG.
- Plasma Protein S calibrator:** restore each vial with 2 ml of Protein S-Sample Diluent, in order to obtain the calibrator plasma, containing the Total PS concentration "C%", already diluted 50 fold. This solution is stable for at least 8 hours at room temperature.
- Protein S Control I (human plasma, high):** restore with 0.5 ml distilled water.
- Protein S Control II (human plasma, low):** restore with 0.5 ml distilled water.

Note: when restored, Protein S controls are stable for 8 hours at room temperature, 24 hours at 2-8°C or 2 months frozen at -20°C or below.

Warning: Plasma Protein S calibrator(3) and controls (4&5) are prepared with normal human plasma. This latter was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

- Anti-(h)-Total-Protein S-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with 4 ml of Protein S Conjugate Diluent. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial gently in order to homogenize the content. The restored conjugate is stable for at least 24 hours at room temperature or for at least 4 weeks at 2-8°C.
- Protein S Conjugate Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. It contains 0.05% Kathon CG.
- Protein S Wash Solution:** Incubate the vial for 15-30 minutes in a water bath at 37°C until complete dissolution of solids, when present. Shake the vial and dilute the amount required 1:20 in distilled water (the 50 ml contained in the vial allow preparing 1 liter of Wash Solution). The Protein S Wash Solution must be stored at 2-8°C in its original vial and used within 4 weeks following opening. The diluted Wash Solution must be used within 7 days, when protected from any contamination and stored at 2-8°C. It contains 0.05% Kathon CG. This Protein S Wash Solution contains calcium and must be used for Protein S assay.
- TMB substrate:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use.
- Stop solution :** 0.45 M Sulfuric Acid, ready to use.

Cautions: Sulfuric Acid, although diluted to 0.45M is caustic. As for any similar chemical, handle Sulfuric Acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

Note: Bring the kit at room temperature, at least 30 min. before use. Store the unused reagents at 2-8°C.

The stability studies performed at 30°C show that the reagents keep their performances and can be shipped at room temperature without any damage

PROCEDURE:

Specimen collection:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma should be tested within 8 hours or stored frozen at -20°C or below for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within 4 hours.

Tested plasma or sample:

The sample must be tested diluted fifty fold (1:50) in the Protein S-Sample Diluent. For expected Protein S concentrations > 100 %, plasma or samples must be tested at a higher dilution, i.e 1:100 or more. If the dilution factor is D, concentrations obtained must then be multiplied by the complementary dilution factor which is D:50 (i.e. x2 for 1/100 etc...). For low Protein S levels (<10%) the sample can be tested at a lower dilution D', and the concentration obtained must be divided by 50:D'.

Plasma Protein S controls I and II must be tested at 1:50 dilution.

D.750.02/ZY/021A



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Calibration:

Total Protein S concentrations are expressed as % of a normal pooled human plasma. For the Total Protein S assay, the 100% concentration corresponds to a normal pooled human plasma diluted 1:50, which is the standard assay dilution. Using the Protein S calibrator provided in the kit (2 ml of plasma calibrator already prediluted 1:50 and with a Total Protein S concentration "C" indicated, for each lot of reagents, on the flyer provided in the kit), prepare the following standard solutions:

Total Protein S concentration (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of Protein S calibrator	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. of Protein S-Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Mix gently for a complete homogenisation. The standard dilutions are stable for at least 4 hours at room temperature.

Assay procedure:

Remove the required number of strips from the aluminium pouch, for the series of measures to be performed. Then, put the strips in the frame provided. In the different wells of the micro ELISA plate, introduce the reagents and perform the various assay steps as indicated on the following table:

Reagent	Volume	Procedure
Immunoconjugate anti-(h)-Total Protein S-HRP. (Restored with 4 ml of Protein S Conjugate Diluent)	100 µl	Introduce the Anti-(h)-Total Protein S- HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells
Protein S calibrator or tested sample or Protein S Sample Diluent (blank)	100 µl	Introduce immediately the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well
Mix gently on a plate shaker or manually and incubate for 1 hour at room temperature		
Protein S Wash Solution (20 fold diluted in distilled water).	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument. (a)
TMB/H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. Nota: The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (b, c).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (d)		
0.45 M Sulfuric Acid (5)	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45M sulfuric acid (c).
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450). Subtract the blank value.		

Nota:
Distribute calibrators, controls and tested specimen as rapidly as possible (within 10 minutes), in order to obtain an homogeneous immunological kinetics for antigen binding. A too long delay between the distribution of the first and the last wells may induce an influence of immunological kinetics and produce wrong results

- Only the specific Protein S Washing Solution, which contains calcium, must be used, for this assay, as the monoclonal antibodies are calcium dependent.
- Never let the plates empty between the addition of the reagents or following the washing step. The next reagent must be added within 3 minutes, in order to prevent the plate from drying, which could damage the immobilized components. If necessary, keep the plate filled with Wash Solution and empty it just before the introduction of the next reagent. The washing instrument must be adjusted in order to wash the plates gently, and to avoid a too drastic emptying, which could lower plate reactivity.
- For addition of the TMB substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

RESULTS:

Users must construct their own calibration curve, obtained using their standard dilutions (see flyer).

On a linear graph paper plot the **Total Protein S concentrations (%)** on abscissa and the corresponding absorbances (**A450**) on ordinates.

From the curve obtained, deduce directly the Total Protein S concentration in samples tested at the standard 1:50 dilution. When higher dilutions are used (i.e D), the Total Protein S concentration must be multiplied by the complementary dilution factor (i.e. D:50). When lower dilutions are used (i.e. D'), the concentration obtained must be divided by 50:D'.

For **controls I and II**, the concentrations are directly deduced from the calibration curve.

Alternatively, an ELISA software (i.e. Dynex, Biolise, etc...) can be used for the calculation of concentrations.

EXPECTED RANGE:

- The Total Protein S concentration in normal human plasma is usually in the range 70–150%. The concentration is higher in males than in females. It tends to increase with age, and with blood lipid concentration.

BIOCHEMISTRY

- The Protein S concentration in normal human plasma is of about 25 µg/ml (1). About 40% (i.e. 10 µg/ml) is in the Free form and 60% (i.e. 15 µg/ml) circulates in blood as a non-covalent complex with C4b-BP. Only the Free form has an anticoagulant activity as the cofactor of Activated Protein C.
- Protein S is synthesized in liver. It is a vitamin K dependent glycoprotein, with a molecular weight of 80,000 daltons. The balance between the free form and the C4b-BP bound form of protein S plays an important role because only the Free Protein S is active. In the early stages of inflammatory diseases, Free Protein S concentration is decreased as a result of an elevation of C4b-BP. Protein S is decreased in dicoumarol or L-asparaginase therapy, and in hepatic diseases.

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

- Total Protein S concentrations are decreased in type I Protein S deficiencies.
- Transitory Free Protein S deficiencies are observed during the early stages of inflammatory diseases, as a result of increased C4b-BP concentrations, which form complexes with Protein S. However, the Total Protein S is normal or increased.
- Abnormal range for Total Protein S is <70%. However, this cut off value must be analysed respectively to the patient context (age, gender, therapy, lipid metabolism, etc...), when diagnosing a Protein S deficiency.

APPLICATIONS:

- Diagnosis of Protein S deficiencies (congenital, acquired or transitory).
 - Type I deficiency: Partial deficiency of total and Free Protein S antigen.
 - Type II deficiency: Normal total and Free Protein S antigen, reduced activity.
 - Type III deficiency: Normal total antigen, decreased activity and free antigen.
- Assay of Protein S in clinical studies.

CHARACTERISTICS

The ZYMUTEST Total Protein S assay is specific for both forms of Protein S (free or complexed with C4b-BP), and is designed with 2, calcium dependent, monoclonal antibodies, which bind as well as to free Protein S as to complexes with C4b-BP.

- Dynamic range: 0 to about 100%.
- Detection threshold ≤ 5%.
- Intra-assay CV: 3-8%.
- Inter-assay CV: 5-10%.
- No significant interference of heparin up to 2 IU/ml, of bilirubin up to 0.1 mg/ml and of haemoglobin up to 10 mg/ml.
- Reference material: International Standard for Protein S (93/590) and normal plasma pools.

REFERENCES:

- Faioni E., Valsecchi C., Palla A., Taioli E., Razzari C., Mannucci P. : Free Protein S Deficiency is a Risk Factor for Venous Thrombosis : *Thromb. Haemost.*, 1997, 78, 1343-46
- Henkens C.AA., Bom V.S., Van der Schaaf W., Pelsma P.M., Smit Sibinga C.T., Kam P.S., Van der Meer J. : Plasma Levels of Protein S, Protein C, and Factor X : Effects of sex, Hormonal State and Age : *Thromb. Haemost.*, 1995, 74, 1271-75
- Aiach M., Borgel D., Gaussem P., Emmerich J., Alhenc-gelas M., Gandrille S. : Protein C and Protein S deficiencies. *Sem. in Hemat.*, 1997, 34, 205-17.
- Schwartz H.P., Fischer M., Hopmeier P., Batard M.A., and Griffin J.H. : Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease: *Blood*, 1984, 64, 1297-1300.

ZYMUTEST TOTAL PROTEIN S

Ref. ARK021A



(Kit completo para ELISA de una etapa para el ensayo de proteína S total)

ANIARA

Fabricado por: HYPHEN BioMed

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.

Última revisión: 26/12/2005

USO PREVISTO:

El kit ZYMUTEST Total Protein S es un inmunoensayo de doble anticuerpo y de una sola etapa para la medición de proteína S total humana en plasma, o en cualquier líquido en el que la proteína S total pueda estar presente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO:

En primer lugar, el inmunoconjugado, que es un anticuerpo monoclonal específico de ambas formas de proteína S (libre o formando complejo con proteína de unión C4b) unido a peroxidasa de rábano (HRP), se introduce en los micropocillos recubiertos con otro anticuerpo monoclonal también específico de ambas formas de proteína S. A continuación, se introduce inmediatamente el plasma analizado diluido o el líquido biológico y empieza la reacción inmunológica. Cuando está presente, la proteína S (libre o formando complejo con C4b-BP) se une a la fase sólida recubierta del anticuerpo monoclonal a través de un epítipo y fija el segundo anticuerpo monoclonal unido a HRP mediante otro epítipo. Después de una etapa de lavado, se añade el sustrato de peroxidasa, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y aparece un color azul. Cuando se detiene la reacción con ácido sulfúrico, se obtiene un color amarillo. La intensidad del color obtenido es directamente proporcional a la concentración de proteína S total humana en la muestra analizada.

MUESTRA ANALIZADA:

- Plasma humano anticoagulado con citrato trisódico.
- Cualquier líquido biológico en el que deba medirse la proteína S.

REACTIVOS:

1. **RECUBRIMIENTO (COAT): microplaca de ELISA**, con 12 tiras de 8 pocillos, recubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón específico de las dos formas de proteína S humana, y luego estabilizada. La placa se suministra envasada en una bolsa de aluminio herméticamente sellada que contiene desecante.
2. **DM (SD): 2 viales con 50 ml de diluyente de muestras de proteína S**, listo para usar (contiene calcio).
3. **Cal:** 3 viales de **calibrador de proteína S plasmática** (plasma normal calibrado con una mezcla de plasma de referencia), liofilizado, prediluido 1:50. Cada vial, cuando se reconstituye con 2 ml de diluyente de muestras de proteína S, permite obtener el calibrador de plasma, ya diluido 1:50. La concentración exacta de proteína S total se indica en el folleto suministrado con el kit.
4. **CI:** 1 vial con 0,5 ml de **control I de proteína S** liofilizado (plasma, alto).
5. **CI:** 1 vial con 0,5 ml de **control II de proteína S** liofilizado (plasma, bajo).
Nota: las concentraciones de proteína S total y los intervalos de aceptación de los controles I y II plasmáticos y del calibrador pueden variar entre lotes, pero se indican con precisión para cada lote en el folleto suministrado con el kit.
6. **IC:** 3 viales de **inmunoconjugado de HRP-anticuerpo anti-proteína S total (h)**, un anticuerpo monoclonal de ratón unido a HRP, liofilizado.
7. **DC (CD):** 1 vial de 15 ml de **diluyente de conjugado de proteína S**, listo para usar.
8. **SL (WS):** 1 vial de 50 ml de **solución de lavado de proteína S (contiene calcio)** concentrada 1:20.
9. **TMB:** 1 vial de 25 ml de sustrato de peroxidasa: **3,3',5,5'-tetrametilbencidina** con peróxido de hidrógeno, listo para usar.
10. **AS (SA):** 1 vial de 6 ml de **ácido sulfúrico 0,45 M** (solución de parada), listo para usar.

Nota: solo deben utilizarse componentes de un mismo número de lote de kits. No mezclar componentes de diferentes lotes para realizar el ensayo.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS:

- Pipeta de 8 canales o de repetición para dispensar 50-300 µl.
- Pipetas de 1 canal a volúmenes variables de 0 a 20 µl, de 20 a 200 µl y de 200 a 1.000 µl.
- Equipo de lavado y agitador para microplacas de ELISA.
- Lector de microplacas de ELISA con una longitud de onda establecida en 450 nm.
- Agua destilada.

PREPARACIÓN, ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS:

Los reactivos sin abrir, en el embalaje original, antes del uso y almacenados a 2-8 °C, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja.

1. **Microplaca de ELISA:** abrir la bolsa de plástico y sacar la cantidad de tiras de 8 pocillos necesaria para la serie de pruebas. Una vez fuera de la bolsa, las tiras deben utilizarse en un plazo de 30 minutos. Las tiras no utilizadas pueden

almacenarse a 2-8 °C durante 4 semanas en la bolsa de aluminio original, que debe contener desecante, estar herméticamente cerrada y protegida de la humedad, y almacenarse en la bolsa de almacenamiento de microplaca suministrada (Minigrip).

2. **Diluyente de muestras de proteína S:** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante 4 semanas, almacenado a 2-8 °C, siempre que se evite cualquier contaminación bacteriana durante el uso. Contiene Kathon CG al 0,05%.
3. **Calibrador de proteína S plasmática:** reconstituir cada vial con 2 ml de diluyente de muestras de proteína S para obtener el plasma del calibrador, que contiene la concentración "C%" de PS total, ya diluido 1:50. Esta solución es estable durante al menos 8 horas a temperatura ambiente.
4. **Control I de proteína S** (plasma humano, alto): reconstituir con 0,5 ml de agua destilada.
5. **Control II de proteína S** (plasma humano, bajo): reconstituir con 0,5 ml de agua destilada.

Nota: una vez reconstituidos, los controles de proteína S son estables durante 8 horas a temperatura ambiente, 24 horas a 2-8 °C o 2 meses congelados a una temperatura de -20 °C o inferior.

Advertencia: el calibrador de proteína S plasmática (3) y los controles (4 y 5) se preparan con plasma humano normal. Este último se ha analizado con métodos aprobados para la detección de anticuerpos anti-VIH y anti-VHC y de antígeno HBsAg, y ha dado negativo. Sin embargo, no existe ninguna prueba que pueda excluir por completo la presencia de agentes infecciosos. Cualquier producto de origen humano debe manipularse con todas las precauciones necesarias, como si fuera potencialmente infeccioso.

6. **Inmunoconjugado de HRP-anticuerpo anti-proteína S total (h):** cada vial debe reconstituirse con 4 ml de diluyente de conjugado de proteína S. Dejar que el sedimento se disuelva por completo antes del uso, y agitar el vial suavemente para homogeneizar el contenido. El conjugado reconstituido es estable durante al menos 24 horas a temperatura ambiente o durante al menos 4 semanas a 2-8 °C.
7. **Diluyente de conjugado de proteína S:** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante 4 semanas, almacenado a 2-8 °C, siempre que se evite cualquier contaminación bacteriana durante el uso. Contiene Kathon CG al 0,05%.
8. **Solución de lavado de proteína S:** incubar el vial durante 15-30 minutos en un baño María a 37 °C hasta la completa disolución de los sólidos, cuando están presentes. Agitar el vial y diluir la cantidad necesaria en proporción 1:20 en agua destilada (los 50 ml contenidos en el vial permiten preparar 1 litro de solución de lavado). La solución de lavado de proteína S debe almacenarse a 2-8 °C en su vial original y utilizarse en las 4 semanas posteriores a su apertura. La solución de lavado diluida debe usarse antes de 7 días, si se protege de cualquier contaminación, y almacenarse a 2-8 °C. Contiene Kathon CG al 0,05%. Esta solución de lavado de proteína S contiene calcio y debe utilizarse para el ensayo de proteína S.
9. **Sustrato TMB:** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante 4 semanas, almacenado a 2-8 °C, siempre que se evite cualquier contaminación bacteriana durante el uso.
10. **Solución de parada:** ácido sulfúrico 0,45 M, listo para usar.

Precauciones: el ácido sulfúrico, aunque diluido a 0,45 M, es cáustico. Al igual que con cualquier sustancia química parecida, el ácido sulfúrico debe manipularse con sumo cuidado. Evitar cualquier contacto con la piel y los ojos. Llevar gafas y guantes de protección durante la manipulación.

Nota: dejar que el kit alcance la temperatura ambiente, al menos 30 minutos antes del uso. Almacenar los reactivos no utilizados a 2-8 °C.

Los estudios de estabilidad realizados a 30 °C muestran que los reactivos mantienen su rendimiento y pueden ser transportados a temperatura ambiente sin sufrir daños.

PROCEDIMIENTO:

Obtención de muestras:

La sangre debe recogerse en un recipiente con anticoagulante citrato 0,109 M (en proporción 9:1); tras una centrifugación de 20 minutos a 2.500 g, se decanta el plasma sobrenadante; el plasma citratado debe analizarse en un plazo de 8 horas o almacenarse congelado a una temperatura de -20 °C o inferior durante un período de hasta 6 meses, y descongelarse durante 15 minutos a 37 °C justo antes del uso. La muestra descongelada debe analizarse antes de 4 horas.

Muestra o plasma analizado:

La muestra debe analizarse diluida en proporción 1:50 en el diluyente de muestras de proteína S. Para concentraciones previstas de proteína S > 100%, el plasma o las muestras deben analizarse a una dilución más alta (1:100 o superior). Si el factor de dilución es D, entonces las concentraciones obtenidas deben multiplicarse por el factor de dilución complementario, que es D:50 (es decir, x2 para 1:100, etc.). Para niveles

D.750.21/ZY/021A



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

bajos de proteína S (< 10%), la muestra puede analizarse a una dilución más baja D', y la concentración obtenida debe dividirse por 50:D'.
Los controles I y II de proteína S plasmática deben analizarse a una dilución 1:50.

Calibración:

Las concentraciones de proteína S total se expresan en forma de porcentaje de una mezcla de plasma humano normal. Para el ensayo de proteína S total, la concentración al 100% corresponde a una mezcla de plasma humano normal diluido 1:50, que es la dilución de ensayo estándar.

Utilizando el calibrador de proteína S suministrado con el kit (2 ml de calibrador de plasma ya prediluido 1:50 y con una concentración "C" de proteína S total indicada, para cada lote de reactivos, en el folleto suministrado con el kit), preparar las soluciones estándar siguientes:

Concentración de proteína S total (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volumen de calibrador de proteína S	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,05 ml	0 ml
Volumen de diluyente de muestras de proteína S	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	0,9 ml	0,95 ml	1 ml

Mezclar suavemente para una homogeneización completa.

Las diluciones estándar son estables durante al menos 4 horas a temperatura ambiente.

Procedimiento de ensayo:

Extraer de la bolsa de aluminio el número de tiras necesarias para la serie de determinaciones que deben realizarse. A continuación, colocar las tiras en el soporte suministrado. Introducir los reactivos en los diferentes pocillos de la microplaca de ELISA y llevar a cabo las distintas etapas del ensayo según se indica en la tabla siguiente:

Reactivo	Volumen	Procedimiento
Inmunoconjugado de HRP-anticuerpo anti-proteína S total (h) (reconstituido con 4 ml de diluyente de conjugado de proteína S)	100 µl	Introducir el inmunoconjugado de HRP-anticuerpo anti-proteína S total (h) en los pocillos de la microplaca de ELISA.
Calibrador de proteína S, muestra analizada o diluyente de muestras de proteína S (blanco)	100 µl	Introducir inmediatamente las soluciones estándar o las muestras analizadas en el pocillo correspondiente de la microplaca de ELISA.
Mezclar suavemente en un agitador de placas o de forma manual e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.		
Solución de lavado de proteína S (diluida 1:20 en agua destilada)	300 µl	Realizar 5 lavados sucesivos utilizando el equipo de lavado (a).
Sustrato TMB/H ₂ O ₂	200 µl	Inmediatamente después del lavado, introducir el sustrato en los pocillos. Nota: la distribución del sustrato, fila a fila, debe ser precisa y a intervalos temporales exactos (b, c).
Incubar durante 5 minutos exactos a temperatura ambiente (18-25 °C) (d).		
Ácido sulfúrico 0,45 M (5)	50 µl	Siguiendo exactamente los mismos intervalos de tiempo que para la adición de sustrato, detener la formación de color añadiendo el ácido sulfúrico 0,45 M (c).
Esperar durante 10 minutos para permitir que el color se establezca y medir la absorbancia a 450 nm (A450). Restar el valor del blanco.		

Nota:

Distribuir los calibradores, los controles y la muestra analizada lo más rápido posible (en 10 minutos) con el fin de obtener una cinética inmunológica homogénea para la unión de antígeno. Una demora demasiado larga entre la distribución de los primeros y los últimos pocillos puede dar lugar a una influencia de la cinética inmunológica y producir resultados erróneos.

- Para este ensayo solo debe utilizarse la solución de lavado de proteína S específica, que contiene calcio, puesto que los anticuerpos monoclonales dependen del calcio.
- No dejar nunca las placas vacías entre la adición de los reactivos o después de la etapa de lavado. El siguiente reactivo debe añadirse antes de 3 minutos para evitar que la placa se seque, lo que podría dañar los componentes inmovilizados. En caso necesario, llenar la placa con solución de lavado y vaciarla justo antes de introducir el siguiente reactivo. El equipo de lavado debe ajustarse para proporcionar un lavado suave de las placas y evitar un vaciado demasiado brusco, lo que podría disminuir la reactividad de la placa.
- Para la adición del sustrato TMB, el intervalo de tiempo entre cada fila debe ser preciso y determinarse con exactitud. Debe procederse del mismo modo al parar la reacción.
- Evitar exponer la placa a la luz solar directa durante las incubaciones, y especialmente durante la aparición del color. Puede utilizarse un agitador para microplacas de ELISA.
- En caso de lecturas biométricas, puede utilizarse una longitud de onda de referencia a 690 nm o a 620 nm.

RESULTADOS:

Los usuarios deben crear su propia curva de calibración, obtenida utilizando sus diluciones estándar (ver el folleto).

En un papel milimetrado, representar gráficamente las **concentraciones de proteína S total (%)** en el eje de abscisas y las absorbancias correspondientes (**A450**) en el eje de ordenadas.

A partir de la curva obtenida, deducir directamente la concentración de proteína S total en muestras analizadas a la **dilución 1:50 estándar**. Cuando se utilizan diluciones más altas (es decir, D), la concentración de proteína S total debe multiplicarse por el factor de dilución complementario (es decir, D:50). Cuando se utilizan diluciones más bajas (es decir, D'), la concentración obtenida debe dividirse por 50:D'.

Para los **controles I y II**, las concentraciones se deducen directamente de la curva de calibración.

Como alternativa, puede utilizarse un software de ELISA (es decir, Dynex, Biolise, etc.) para el cálculo de las concentraciones.

INTERVALO PREVISTO:

- La concentración de proteína S total en plasma humano normal suele situarse en el intervalo 70–150%. La concentración es más alta en hombres que en mujeres. Tiende a aumentar con la edad y con la concentración de lípidos en sangre.

BIOQUÍMICA:

- La concentración de proteína S en plasma humano normal es de aproximadamente 25 µg/ml (1). Aproximadamente un 40% (es decir, 10 µg/ml) se halla en la forma libre, y un 60% (es decir, 15 µg/ml) circula en la sangre como un complejo no covalente con C4b-BP. Solo la forma libre presenta actividad anticoagulante como cofactor de la proteína C activada.
- La proteína S se sintetiza en el hígado. Es una glucoproteína que depende de la vitamina K, con un peso molecular de 80.000 Da. El equilibrio entre la forma libre y la forma unida a C4b-BP de la proteína S desempeña una función importante, puesto que solo la proteína S libre está activa. En los estadios iniciales de enfermedades inflamatorias disminuye la concentración de proteína S libre como resultado del aumento de C4b-BP. La proteína S disminuye en el tratamiento con dicumarol o L-asparaginasa, y en las enfermedades hepáticas.

VARIACIONES PATOLÓGICAS:

- Las concentraciones de proteína S total disminuyen en las deficiencias de proteína S tipo I.
- Se observan deficiencias transitorias de proteína S libre durante los estadios iniciales de enfermedades inflamatorias, como resultado del aumento de las concentraciones de C4b-BP, que forman complejos con proteína S. Sin embargo, las concentraciones de proteína S total son normales o mayores.
- Un intervalo < 70% de proteína S total es anormal. Sin embargo, este valor de corte debe analizarse en relación con el contexto del paciente (edad, sexo, tratamiento, metabolismo lipídico, etc.) al diagnosticar una deficiencia de proteína S.

APLICACIONES:

- Diagnóstico de deficiencias de proteína S (congénita, adquirida o transitoria).
 - Deficiencia de tipo I: deficiencia parcial de antígeno de proteína S total y libre.
 - Deficiencia de tipo II: antígeno de proteína S total y libre normal, actividad reducida.
 - Deficiencia de tipo III: antígeno total normal, disminución de la actividad y antígeno libre.
- Ensayo de proteína S en estudios clínicos.

CARACTERÍSTICAS:

El ensayo ZYMUTEST Total Protein S es específico de ambas formas de proteína S (libre o formando complejo con C4b-BP), y está diseñado con 2 anticuerpos monoclonales dependientes del calcio que se unen tanto a la proteína S libre como a los complejos con C4b-BP.

- Intervalo dinámico: de 0% a aproximadamente 100%
- Umbral de detección: ≤ 5%
- CV intraensayo: 3-8%
- CV interensayo: 5-10%
- Sin interferencia significativa de heparina hasta 2 UI/ml, de bilirrubina hasta 0,1 mg/ml y de hemoglobina hasta 10 mg/ml.
- Material de referencia: estándar internacional de proteína S (93/590) y mezclas de plasma normal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Faioni E., Valsecchi C., Palla A., Taioli E., Razzari C., Mannucci P.: Free Protein S Deficiency is a Risk Factor for Venous Thrombosis: Thromb. Haemost., 1997, 78, 1343-46
- Henkens C.A.A., Bom V.S., Van der Schaaf W., Pelsma P.M., Smit Sibinga C.T., Kam P.S., Van der Meer J.: Plasma Levels of Protein S, Protein C, and Factor X: Effects of sex, Hormonal State and Age: Thromb. Haemost., 1995, 74, 1271-75
- Aiach M., Borgel D., Gaussem P., Emmerich J., Alhenc-gelas M., Gandrille S.: Protein C and Protein S deficiencies. Sem. in Hemat., 1997, 34, 205-17.
- Schwartz H.P., Fischer M., Hopmeier P., Batard M.A., and Griffin J.H.: Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease; Blood, 1984, 64, 1297-1300.