



ZYMUTEST PROTEIN C

ARK027A

(Complete ELISA kit for the assay of human Protein C)



Manufactured by Hyphen BioMed.

For in vitro diagnostic use only

Last revision: 07/05/2005

INTENDED USE:

The ZYMUTEST Protein C kit is a highly sensitive two-site immuno-assay for measuring human Protein C in citrated plasma, or in any biological fluid where Protein C can be present.

ASSAY PRINCIPLE:

In a first step, the diluted test sample is introduced into a microwell coated with a polyclonal antibody specific for human Protein C. When present, this protein is captured onto the solid phase. Following a washing step, the immunoconjugate, a rabbit polyclonal antibody, specific for human Protein C, and coupled to horse-radish-peroxidase (HRP), is introduced, and binds to free epitopes of immobilized PC. Following a new washing step, the peroxidase substrate, 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 Protein C in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where Protein C must be assayed.

REAGENTS:

1. **COAT:** Micro ELISA plate containing 12 strips of 8 wells, coated with a rabbit polyclonal antibody specific for human Protein C, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
2. **SD:** 2 vials containing 50 ml of **Sample Diluent**, ready to use.
3. **CAL:** 3 vials of **Plasma PC Calibrator**, lyophilised. When restored with 2 ml of Sample Diluent, a plasma containing a concentration "C" (expressed in %) of human PC is obtained. This concentration (in the range 110-150% according to the lot), established by reference to the NIBSC international standard, is accurately determined for each lot.
4. **CI:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised **PC Control I** (human plasma, high).
5. **CII:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised **PC Control II** (human plasma, low).

Note: The Protein C 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.

6. **IC:** 3 vials of **Anti-(H)-PC-HRP-immunoconjugate**, a rabbit polyclonal antibody specific for human Protein C coupled to HRP, lyophilised.
7. **CD:** 1 vial of 25 ml of **Conjugate Diluent**, ready to use.
8. **WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated **Wash Solution**.
9. **TMB:** 1 vial of 25 ml peroxidase substrate: 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine containing hydrogen peroxide; ready to use
10. **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. Do not mix components from different lots of kits, 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.

1. **Micro ELISA plate:** open the plastic pouch and take off the required amount 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).
2. **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. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
3. **Plasma PC Calibrator:** restore each vial with 2 ml of Sample Diluent in order to obtain a plasma containing a PC concentration "C", already diluted 1:50 (fifty fold). This solution is stable for at least 24 hours at room temperature or 72 hours at 2-8°C.
4. **PC Control I** (human plasma, high): restore with 0.5 ml distilled water.
5. **PC Control II** (human plasma, low): restore with 0.5 ml distilled water.

Note: Following reconstitution, control plasmas I and II are stable 24 hours at Room Temperature (18-25°C), or 72 hours at 2-8°C. They can be kept frozen at -20°C or colder for up to 2 months.

Warning: Plasma PC 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.

6. **Anti-(H)-PC-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with 7.5 ml of 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.
7. **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. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
8. **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 to prepare 1 liter of Wash Solution). The 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. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
9. **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.
10. **Stop solution:** It is 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 at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature without 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 24 hours or stored frozen at -20°C or colder for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within 8 hours.

EDTA collected human plasma may also be used. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

D.750.02/ZY/027A



8580 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

Tested plasma or sample or controls:

The sample must be tested diluted **fifty fold (1:50)** in the Sample Diluent. For expected Protein C concentrations higher than "C" (in %), plasma or samples must be tested at a higher dilution, ie **1:100 (D=100)**, or more. For low or very low Protein C concentrations lower dilutions can be used.

Controls I and II must be tested diluted **fifty fold (1:50)**, with Sample Diluent

Calibration:

Using the Plasma PC Calibrator, with a PC concentration "C" (in the range 110-150% according to the lot used), provided in the kit, prepare the following standard solutions.

Protein C concentration (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of Plasma PC calibrator at C	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05ml	0 ml
Vol. of Sample diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95ml	1 ml

Mix gently for a complete homogenisation.

The standard solutions are stable for at least **8 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
Calibrator dilutions or diluted tested sample or sample diluent (blank)	200µl	Introduce the Calibrator solutions or the tested sample in the corresponding micro ELISA wells (a).
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (c).
Conjugate (anti PC polyclonal antibody coupled with peroxidase). Restored with 7.5 ml of conjugate diluent.	200 µl	Introduce the Anti-(H)-PC- HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells.(c)
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (c).
TMB/H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. Note: The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (c,d).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (b)		
0.45 M Sulfuric Acid	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45 M sulfuric Acid (d).
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450) (e) . Subtract the blank values.		

Note:

- Distribute calibrators, controls and tested specimen as rapidly as possible, in order to obtain an homogeneous immunological kinetics for PC binding. A too long delay (>15 min) between the distribution of the first and the last wells may induce an influence of immunological kinetics and produce wrong results.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used.
- 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.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

RAPID PROCEDURE (ONE STEP METHOD)

The highly sensitive ZYMUTEST Protein C can also be performed with a one step method. All reagents must be restored as for the two-step method, with the exception of anti-PC-HRP immunoconjugate (IC), which must be restored with **2 ml** of Conjugate Diluent (CD).

Tested plasma must be assayed at a **fifty fold (1:50)** dilution or at higher dilutions in Sample Diluent (SD). Controls must be diluted at a **fifty fold (1:50)** dilution as for plasmas, as for the two-step method. The immunoconjugate is introduced (**50µL**) in the microwells of the ELISA plate, followed by the introduction of **200µL** of the calibration solution or the diluted plasma. Following a **1 hour** incubation at room temperature and a washing step, the colour development with TMB (**200µl/well**) is allowed developing for **5 min**, and is then stopped with **50 µl** of 0.45M sulfuric acid (SA). **A450** is then measured. Washing and operating cautions, as well as results interpretation, are the same as recommended for the two step method.

EXPRESSION OF RESULTS:

- On a linear graph paper plot the Protein C concentrations, in %, on abscissae and the corresponding absorbances (**A450**) on ordinates, in order to establish the calibration curve. The curve can also be drawn using a bilogarithmic coordinate.
- Users must construct their own calibration curve, obtained using their calibrator dilutions (See model on the flyer). From the curve obtained, deduce directly the PC concentration for the tested sample. For obtaining the PC concentration in a sample tested at a higher or lower dilution, this value must be multiplied by **D:50** (i.e. $\times 2$ for **D=100**, or $\times 0.40$ for **D=20**...).
- 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:

- By definition, the 100 % Protein C concentration corresponds to the concentration in a normal human citrated plasma pool, obtained by pooling plasmas from healthy males or females aged from 18 to 55 years, and out of any medication or disease. The Protein C concentration in adults is usually between 70 and 140%.
- The Protein C concentration is decreased in neonates. It is then independent from age or gender.

BIOCHEMISTRY:

Plasma protein C is a vitamin-K dependent protein, with a molecular weight of about 60KD. Protein C is present in plasma, at a concentration of 4-5µg/ml, as a proenzyme, which, once activated by thrombin, in the presence of thrombomodulin, calcium and phospholipids, inhibits and regulates coagulation. Protein S acts as a cofactor of activated Protein C, which then cleaves Factors Va and VIIIa, thus neutralizing their coagulant activity. Protein C action is very efficient in micro blood circulation, where the thrombomodulin density is dramatically increased respectively to blood volume.

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

- A Protein C concentration ≤ 60 % indicates the presence of a deficiency, which must be confirmed by another measurement, or on another sample collected from the patient.
 - Protein C deficiencies can be:
 - Acquired: observed in hepatic diseases, or during dicoumarol therapy, or in DIC, or with auto-antibodies.
 - Congenital: they are then associated to recurrent venous thromboses.
- Protein C deficiencies can be quantitative (type I) or qualitative (Type II).

APPLICATIONS:

- Assay of Protein C in clinical samples, for diagnosing deficiencies or as a disease marker or as indicative value for therapeutic follow-up.

ASSAY CHARACTERISTICS:

- The assay is calibrated against the NIBSC international standard for Protein C.
- There is no interference of Rheumatoid Factor.
- No Prozone effect was observed for Protein C concentrations up to 100µg/ml, using the recommended protocol.
- Dynamic range: 0 to about 130% PC.
- Detection threshold $\leq 5\%$.
- Intra-assay CV: 3-8%.
- Inter-assay CV: 5-10%.
- No significant interference is observed for heparin concentrations < 2 IU/mL, bilirubin concentrations < 0.05 mg/ml, and haemoglobin concentrations < 5 mg/ml.

REFERENCES:

- Dahlback B., Villoutreix B.O., Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. J. Thromb. Haemost., 1, 1525-34, (2003).
- Pabinger I. : Clinical relevance of Protein C. Blut 53, 63-75 (1986).
- Horellou M.H., Van Dreden P., Conand J., Samama M. : Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux. Feuille Biol., 26, 27-31, (1985).
- Stenflo J. : Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis, 10, 2, 109-121, (1984).
- Esmon C.T., Esmon N.L. : Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis, 10, 2, 122-133, (1984).
- Manucci P.M. , Vignano S. : Deficiencies of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet, 2, 463-467, (1982).

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.

Última revisión: 07/05/2005

USO PREVISTO:

El kit ZYMUTEST Protein C es un inmunoensayo de doble anticuerpo altamente sensible para la medición de proteína C humana en plasma citratado, o en cualquier líquido en el que la proteína C pueda estar presente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO:

En una primera etapa, se introduce la muestra analizada diluida en un micropocillo recubierto con un anticuerpo policlonal específico de proteína C humana. Cuando está presente, esta proteína es capturada en la fase sólida. Después de una etapa de lavado, se añade el inmunoconjugado, que es un anticuerpo policlonal de conejo específico de proteína C humana unido a peroxidasa de rábano (HRP), y se une a epítopos libres de PC inmovilizada. Después de una nueva etapa de lavado, se añade el sustrato de peroxidasa, 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 C en la muestra analizada.

MUESTRA ANALIZADA:

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

REACTIVOS:

1. **RECUBRIMIENTO (COAT): microplaca de ELISA**, con 12 tiras de 8 pocillos, recubierta con un anticuerpo policlonal de conejo específico de proteína C 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**, listo para usar.
3. **CAL:** 3 viales de **calibrador de PC plasmática**, liofilizados. Una vez reconstituidos con 2 ml del diluyente de muestras, se obtiene un plasma que contiene una concentración "C" (expresada en %) de PC humana. Esta concentración (en el intervalo de 110-150% según el lote), establecida tomando como referencia el estándar internacional del NIBSC, se determina con exactitud para cada lote.
4. **CI:** 1 vial con 0,5 ml de **control I de PC** liofilizado (plasma humano, alto).
5. **CII:** 1 vial con 0,5 ml de **control II de PC** liofilizado (plasma humano, bajo).

Nota: las concentraciones de proteína C 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-PC(h)**, un anticuerpo policlonal de conejo específico de proteína C humana unido a HRP, liofilizado.
7. **DC (CD): 1 vial de 25 ml de diluyente de conjugado**, listo para usar.
8. **SL (WS): 1 vial de 50 ml de solución de lavado** 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 lote de kits. No mezclar componentes de diferentes lotes de kits 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 (Minigríp).

2. **Diluyente de muestras:** 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. Este reactivo contiene Kathon CG al 0,05%.
3. **Calibrador de PC plasmática:** reconstituir cada vial con 2 ml de diluyente de muestras para obtener un plasma que contenga una concentración "C" de PC, ya diluido 1:50. Esta solución es estable durante al menos 24 horas a temperatura ambiente o 72 horas a 2-8 °C.
4. **Control I de PC** (plasma humano, alto): reconstituir con 0,5 ml de agua destilada.
5. **Control II de PC** (plasma humano, bajo): reconstituir con 0,5 ml de agua destilada.

Nota: Tras la reconstitución, los plasmas de control I y II son estables durante 24 horas a temperatura ambiente (18-25 °C), o 72 horas a 2-8 °C. Pueden conservarse congelados a una temperatura de -20 °C o inferior durante un período de hasta 2 meses.

Advertencia: el calibrador de PC 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-PC(h):** cada vial debe reconstituirse con 7,5 ml de diluyente de conjugado. 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:** 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. Este reactivo contiene Kathon CG al 0,05%.
8. **Solución de lavado:** 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 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. Este reactivo contiene Kathon CG al 0,05%.
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:** está 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 a 30 °C muestran que los reactivos 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 24 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 8 horas.

También puede utilizarse plasma humano obtenido con EDTA. Las condiciones de almacenamiento son las mismas que para el plasma citratado.

Plasma, muestra o controles analizados:

La muestra debe analizarse diluida en proporción 1:50 en el diluyente de muestras. Para concentraciones previstas de proteína C superiores a "C" (en %), el plasma o las

D.750.21/ZY/027A

muestras deben analizarse a una dilución más alta (es decir, **1:100 (D=100) o superior**). Para concentraciones bajas o muy bajas de proteína C, pueden utilizarse diluciones más bajas.

Los **controles I y II** deben analizarse diluidos en proporción **1:50** en el diluyente de muestras.

Calibración:

Utilizando el **calibrador de PC plasmática** suministrado con el kit, con una concentración "C" de PC (en el intervalo de 110-150% según el lote utilizado), preparar las soluciones estándar siguientes:

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

Mezclar suavemente para una homogeneización completa.

Las soluciones estándar son estables durante al menos **8 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
Diluciones del calibrador, muestra analizada diluida o diluyente de muestras (blanco)	200 µl	Introducir las soluciones del calibrador o la muestra analizada en el pocillo correspondiente de la microplaca de ELISA (a).
Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Solución de lavado (diluida 1:20 en agua destilada)	300 µl	Realizar 5 lavados sucesivos utilizando el equipo de lavado (c).
Conjugado (anticuerpo policlonal anti-PC unido a peroxidasa). Reconstituido con 7,5 ml de diluyente del conjugado.	200 µl	Introducir el inmunoconjugado de HRP-anticuerpo anti-PC(h) en los pocillos de la microplaca de ELISA (c).
Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Solución de lavado (diluida 1:20 en agua destilada)	300 µl	Realizar 5 lavados sucesivos utilizando el equipo de lavado (c).
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 (c, d).
Incubar durante 5 minutos exactos a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Ácido sulfúrico 0,45 M	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 (d).
Esperar durante 10 minutos para permitir que el color se estabilice y medir la absorbancia a 450 nm (A450) (e) . Restar los valores del blanco.		

Nota:

- Distribuir los calibradores, los controles y las muestras analizadas lo más rápido posible con el fin de obtener una cinética inmunológica homogénea para la unión de PC. Una demora demasiado larga (> 15 min) entre la distribución de los primeros y los últimos pocillos puede dar lugar a una influencia de la cinética inmunológica y producir resultados erróneos.
- 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.
- 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.
- En caso de lecturas biométricas, puede utilizarse una longitud de onda de referencia a 690 nm o a 620 nm.

PROCEDIMIENTO RÁPIDO (MÉTODO DE UNA ETAPA):

El ensayo altamente sensible ZYMUTEST Protein C también puede realizarse con un método de una etapa. Deben reconstituirse todos los reactivos al igual que para el método de dos etapas, a excepción del inmunoconjugado (IC) de HRP-anticuerpo anti-PC, que debe reconstituirse con **2 ml** de diluyente de conjugado (DC).

El plasma analizado debe ensayarse diluido **1:50**, o a diluciones más altas, en diluyente de muestras (DM). Los controles deben diluirse en proporción **1:50** al igual que los

plasmas, del mismo modo que en el método de dos etapas. Se introduce el inmunoconjugado (**50 µl**) en los pocillos de la microplaca de ELISA y, posteriormente, se añaden **200 µl** de la solución de calibración o el plasma diluido. Tras **1 hora** de incubación a temperatura ambiente y una etapa de lavado, se deja que aparezca el color con TMB (**200 µl/pocillo**) durante **5 minutos** y, a continuación, se detiene con **50 µl** de ácido sulfúrico 0,45 M (AS). Luego se mide el valor **A450**. Las precauciones de funcionamiento y lavado, así como la interpretación de los resultados, son las mismas que las que se recomiendan para el método de dos etapas.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS:

- En un papel milimetrado, representar gráficamente las concentraciones de proteína C (en %) en el eje de abscisas y las absorbancias correspondientes (**A450**) en el eje de ordenadas para establecer la curva de calibración. La curva también puede dibujarse en coordenadas bilogárficas.
- Los usuarios deben crear su propia curva de calibración, obtenida utilizando sus diluciones del calibrador (ver el modelo en el folleto). A partir de la curva obtenida, deducir directamente la concentración de PC de la muestra analizada. Para obtener la concentración de PC en una muestra analizada a una dilución más alta o más baja, este valor debe multiplicarse por **D:50** (es decir, **x2 para D=100**, o **x0,40 para D=20...**).
- 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:

- Por definición, la concentración de proteína C del 100% corresponde a la concentración en una mezcla de plasma humano normal citratado, obtenido de la mezcla de plasmas de hombres o mujeres sanos, con edades comprendidas entre los 18 y los 55 años, que no estaban enfermos ni recibían medicación alguna. La concentración de proteína C en adultos suele situarse entre el 70% y el 140%.
- La concentración de proteína C en recién nacidos es menor. Así pues, es independiente de la edad o el sexo.

BIOQUÍMICA:

La proteína C plasmática es una proteína dependiente de la vitamina K, con un peso molecular aproximado de 62 kD. La proteína C está presente en el plasma a una concentración de 4-5 µg/ml en forma de proenzima que, una vez activada por la trombina, en presencia de trombomodulina, calcio y fosfolípidos, inhibe y regula la coagulación. La proteína S actúa como cofactor de la proteína C activada, que luego escinde los factores Va y VIIIa y con ello neutraliza su actividad coagulante. La acción de la proteína C es muy eficaz en la microcirculación sanguínea, donde la densidad de la trombomodulina aumenta considerablemente respecto al volumen de sangre.

VARIACIONES PATOLÓGICAS:

- Una concentración de proteína C \leq 60% indica la presencia de una deficiencia, que debe confirmarse mediante otra determinación o con otra muestra obtenida del paciente.
 - Las deficiencias de proteína C pueden ser:
 - Adquiridas: se observan en enfermedades hepáticas, durante el tratamiento con dicumarol o en la CID, o con autoanticuerpos.
 - Congénitas: en este caso están asociadas a trombosis venosas recurrentes.
- Las deficiencias de proteína C pueden ser cuantitativas (tipo I) o cualitativas (tipo II).

APLICACIONES:

- Ensayo de proteína C en muestras clínicas, para diagnosticar deficiencias, como marcador de enfermedad o como valor indicativo de seguimiento terapéutico.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO:

- El ensayo está calibrado frente a un estándar internacional del NIBSC para proteína C.
- Sin interferencias de anticuerpos reumatoideos.
- No se observó el efecto prozona con concentraciones de proteína C de hasta 100 µg/ml, utilizando el protocolo recomendado.
- Intervalo dinámico: de 0% a aproximadamente 130% PC
- Umbral de detección: \leq 5%
- CV intraensayo: 3-8%
- CV interensayo: 5-10%
- No se observan interferencias significativas en las concentraciones de heparina < 2 UI/ml, las concentraciones de bilirrubina < 0,05 mg/ml y las concentraciones de hemoglobina < 5 mg/ml.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Dahlbäck B., Villoutreix B.O., Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. J. Thromb. Haemost., 1, 1525-34, (2003).
- Pabinger I.: Clinical relevance of Protein C. Blut 53, 63-75 (1986).
- Horellou M.H., Van Dreden P., Conanrd J., Samama M.: Intérêt du dosage de la Protéine C dans les accidents thromboemboliques veineux. Feuil. Biol., 26,27-31, (1985).
- Stenflo J.: Structure and Function of Protein C. Semin. Thromb. Haemostasis, 10,2, 109-121, (1984).
- Esmon C.T., Esmon N.L.: Protein C activation. Semin. Thromb. Haemostasis, 10,2, 122-133, (1984).
- Manucci P.M., Vignano S.: Deficiencias of Protein C, an inhibitor of blood coagulation. Lancet, 2, 463-467, (1982).

D.750.27/ZY/027A