

READS®
MONOCLONAL FREE PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of 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, down-regulating 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, the ELISA format allows automation with commonly available laboratory instrumentation.

Measurement of plasma levels of both Total and Free Protein S are useful in determining the type of defect in patients with Protein S deficiency. Historically, ELISA procedures measuring Protein S used a polyclonal antibody specific to both the free and bound forms of Protein S. The addition of polyethylene glycol (PEG) to precipitate the bound Protein S in the patient sample allowed determination of levels of free Protein S. While the PEG precipitation procedure allows the measurement of Free Protein S, it is non-specific, time consuming, and difficult to perform accurately.^{11,12} This assay utilizes a monoclonal antibody specific for Free Protein S in an ELISA format to measure Free Protein S directly, without PEG precipitation.^{13,14}

PRINCIPLE OF THE TEST

The Monoclonal Free Protein S Antigen assay is a sandwich ELISA. A capture monoclonal antibody specific for human Free Protein S is coated to 96-microwell polystyrene plates. Diluted patient plasma is incubated in the wells, allowing any available Free Protein S to bind to the anti-human Free Protein S monoclonal antibody on the microwell surface. The plates are washed to remove unbound proteins or other plasma molecules. Bound Free Protein S is quantitated using horseradish peroxidase (HRP) conjugated polyclonal 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 450 nm. Free Protein S relative percent concentrations in patient plasma are determined against a curve prepared from the reference plasma provided with the kit. The lyophilized assayed reference plasma is prepared from a frozen pool of citrated normal plasma and standardized against the Secondary Standard for Coagulation/International Society in Thrombosis and Haemostasis (SSC/ISTH) preparation, which is calibrated to World Health Organization (WHO) standards.

REAGENTS

Store at 2 - 8°C. Do Not Freeze.

Each REAADS Monoclonal Free Protein S Antigen (96-microwell) Test Kit contains the following reagents:

- 12 x 8 Mouse Monoclonal antibody to human Free Protein S coated microwells.
- 60 mL Sample Diluent (blue-green solution); contains sodium azide.
- 3 x 0.5 mL Lyophilized Reference Plasma, with assay sheet.
- 12 mL Rabbit Anti-human Protein S HRP Conjugate (red solution).
- 13 mL Substrate (TMB and H₂O₂).
- 15 mL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid).
- 30 mL 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.

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. 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).

Warning . 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. Avoid hemolysis. Remove the plasma and store at 2 - 8°C until testing can be performed. If not tested within eight hours of collection, the sample should be stored at -70°C and tested within one month.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided

REAADs Monoclonal Free Protein S Antigen Test Kit; see “Reagents,” for a complete listing.

Materials Required but not Supplied

- Free Protein S Control Plasma. Reconstitute Control Plasma selected for use following manufacturer’s instructions, and store as recommended.
- Reagent grade water (1 L) 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 450 nm (with a 650 nm 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 200 µL 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.

- Coated microwells, conjugate, and substrate are lot specific components that should not be used with different kit lots.

Reagent Preparation

- Wash Solution [33X phosphate buffered saline (PBS)/Tween 20]: Measure 30 mL Wash Solution and dilute to 1 liter with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused Wash Solution at 2 - 8°C. Discard if solution shows signs of contamination.
- Reconstitute Reference Plasma by adding 0.5 mL 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 - 8°C. Reconstitute appropriate control plasma following manufacturer's instructions, and store as recommended.

Assay Procedure

- Remove any microwell strips that will not be used from the frame and store them in the bag provided.
- Assay each reference plasma dilution in duplicate for 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 6 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 200 μ L 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.
- Prepare six **reference plasma** dilutions as described in the table below.

<u>Volume Reference Plasma</u>		<u>Volume Sample Diluent</u>		<u>*Reference Level (%)</u>
30 μ L	+	500 μ L	=	150
20 μ L	+	500 μ L	=	100
15 μ L	+	500 μ L	=	75
10 μ L	+	500 μ L	=	50
10 μ L	+	1000 μ L	=	25
10 μ L	+	2000 μ L	=	12.5

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

- Prepare working dilutions of **control and patient samples**, as follows:
Add 20 μ L control or patient plasma to 500 μ L Sample Diluent.
(Note: these dilutions correspond to the 100% relative reference plasma dilution.)
- Mix thoroughly, and add 100 μ L of the working dilutions (reference plasmas x 6, controls, and patient samples) to the appropriate microwells for Free Protein S determinations.
- Add 100 μ L of Sample Diluent to the reagent blank well. Leave the water blank well empty.
- Incubate 40 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.
- 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 and 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.
- Add 100 μ L Conjugate (red) to each well (except the water blank well).
- Incubate 10 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump the conjugate solution.

11. Wash 4 times with working wash solution (PBS/Tween 20) as in step 8. 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.
12. Add 100 μ L 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.
13. Add 100 μ L 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 200 μ L 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 450 nm, against a 650 nm 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 log-log graph is recommended, although a linear or point-to-point graph may also be used.
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 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 Free Protein S Antigen value (as % of normal): $40 \times 1.05 = 42\%$

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 less than 0.250 when the spectrophotometer has been blanked against the water well. Readings greater than 0.250 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 absorbance readings greater than 0.250.
3. Free Protein S Antigen values 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 VALUES¹⁵

Normal Range: Free Protein S values are expressed in relative percent (%) as compared to pooled normal plasma. The normal range for Free Protein S for this assay is 50 - 150%. 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 CHARACTERISTICS¹⁵

Detection range:

The detection range for REAADS Monoclonal Free Protein S Antigen assay is 6 - 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 Free 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 table below, shows a mean intra-assay CV of 6.0% for Free Protein S across three lots. In addition, 30 commercially prepared plasma samples with Free Protein S levels spanning the entire detection range of the assay were tested in duplicate across three 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 intra-assay CV for duplicates was 4.7% for Free Protein S.

Inter-assay precision:

Eight (8) in-house control samples (prepared by mixing commercially immunodepleted citrated plasma and commercial healthy-donor citrated plasma samples) with values ranging from 29 - 56% were tested in duplicate on three lots to determine assay precision between lots. The mean inter-assay CV was 5.2% for Free Protein S, as seen in the table.

Intra-assay precision (variability within a plate)	Free Protein S range (% of normal)	Free Protein S CV range (3 pilot lots)
Replicates (x16):	109-118%	2.2-6.1%
	59-65%	3.8-9.4%
	44-47%	3.9-10.4%
Overall mean CV:		6.0%
Duplicates: Overall mean CV:	entire range	4.7%
Inter-assay precision (variability between lots)		
Duplicates:	30-58%	3.7-6.4%
Overall mean CV:		5.2%

Linearity:

Protein S reference plasma sample dilutions (prepared as directed in the package insert) demonstrate curves with a mean coefficient of determination (r-squared) of 0.994 when tested on three lots of REAADS Monoclonal Free Protein S Antigen Test Kit.

Accuracy:

Accuracy was determined by testing mixtures of Protein S reference plasma with predetermined values on REAADS Monoclonal Free Protein S Antigen assay and calculating the recovery of theoretical values. The overall mean percent recovery across three lots was 101.2% for Free Protein S, with an average variation of 4.6%.

LIMITATIONS OF THE TEST

The Free 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

The reactivity of the monoclonal capture antibody used in this assay has been evaluated and confirmed to be specific for human Free Protein S. The effect of hemolysis, icterus or lipemia on the performance of the test has not been fully investigated, but may interfere with assay results and should be considered in the interpretation of patient results.

Plasma samples can be inadvertently depleted or degraded of Free 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®
MONOCLONAL FREE PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT**

In-vitro-Diagnostikum

ANWENDUNGSGEBIET

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

TESTPRINZIP

Beim Test mit monoklonalen Antikörpern gegen freies Protein S Antigen handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Die 96 Mikrovertiefungen der Polystyrolplatten sind mit monoklonalen Capture-Antikörpern beschichtet, die spezifisch mit freiem HumanProtein S reagieren. Bei der Inkubation von verdünntem Patientenplasma in den Mikrovertiefungen wird das verfügbare freie Protein S an die monoklonalen Antihuman-Antikörper gegen freies Protein S auf der Oberfläche der Mikrovertiefungen gebunden. Die Platten werden gewaschen, um nichtgebundene Proteine und andere Moleküle aus dem Plasma zu entfernen. Gebundenes freies Protein S wird mit Hilfe von polyklonalen 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 (H₂O₂) 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 freiem Protein S in Patientenplasma wird anhand einer Kurve bestimmt, die mit Hilfe des im Kit enthaltenen Referenzplasmas erstellt wurde (in %). Das lyophilisierte, geprüfte Referenzplasma wird aus einem Pool gefrorenen Normal-Zitratplasmas hergestellt und gegen den Sekundärstandard für Koagulation der International Society in Thrombosis and Haemostasis (SSC/ISTH) standardisiert, der seinerseits mit den Standards der WHO (Weltgesundheitsorganisation) kalibriert wurde.

REAGENZIEN

Bei 2 - 8°C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder REAADS Testkit mit monoklonalen Antikörpern gegen freies Protein S Antigen (96-Mikrovertiefungen) enthält die folgenden Reagenzien:

- Mit maus-monoklonalen-Antikörpern gegen freies HumanProtein S beschichtete Mikrovertiefungen (12 x 8) (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml Probenverdünner (blaugrüne Lösung); enthält Natriumazid (Sample Diluent III).
- 3 x 0,5 ml lyophilisiertes Referenzplasma mit Testblatt (Reference Plasma).
- 12 ml Kaninchen-Antihuman-Protein S-HRP-Konjugat (rote Lösung) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml Substrat (TMB und H₂O₂) (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).

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. 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).

Waarschuwing . Biologisches Risiko .

PROBEENTNAHME 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. Hämolyse vermeiden. 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 Testkit mit monoklonalen Antikörpern gegen freies Protein S Antigen; siehe „Reagenzien“ mit einer vollständigen Auflistung.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Kontrollplasma für freies Protein S: 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 zum Abpipettieren von 5 bis 1000 µl
- 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 Platten, 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 lastikspritzflasche 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 [33X phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)/Tween 20]: 30 ml Waschlösung abmessen und auf 1 Liter mit analysenreinem Wasser auffüllen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte $7,35 \pm 0,1$ sein. Nicht verwendete Waschlösung bei 2-8°C aufbewahren. Bei ersten Anzeichen einer Kontamination ist die Lösung zu verwerfen.
2. Das Referenzplasma durch Zugabe von 0,5 ml analysenreinem Wassers rekonstituieren. Zum Durchmischen vorsichtig mit Drehbewegung schütteln. Vor Verwendung 10 Minuten stehen lassen, damit eine vollständige Auflösung gewährleistet ist. Bei Lagerung zwischen 2-8°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 Referenzplasmalösung doppelt auf freies Protein S testen. Für die Patienten- und Kontrollproben werden ebenfalls Doppelbestimmungen empfohlen. Eine Vertiefung sollte als Blindprobe dienen. Der Probenverdünner ohne Serum wird wie in Schritt 6 dieses Abschnitts erklärt in die Vertiefung pipettiert. Diese Vertiefung wird im weiteren Testablauf wie eine Kontrolle bzw. Patienten-Probe behandelt. In jeder Platte ist eine Vertiefung für den Substratleerwert zu reservieren; diese Vertiefung bleibt bis zum Ende des Tests leer, erst direkt vor dem Auswerten der Platte wird sie mit 200 µl analysenreinem Wasser gefüllt. Der Substratleerwert wird zur Nulleinstellung des Mikrotiterplatten-Lesegeräts verwendet.
3. Entsprechend den Angaben in der nachfolgenden Tabelle sechs **Referenzplasmaverdünnungen** 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

4. Wie nachfolgend beschrieben Arbeitsverdünnungen **der Kontroll- und Patientenproben** herstellen: 20 µl Kontroll- oder Patientenplasma zu 500 µl Probenverdünner pipettieren.
(Hinweis: Diese Verdünnungen entsprechen der relativen 100% Referenzplasmaverdünnung).
5. Gründlich durchmischen und 100 µl der Arbeitsverdünnungen (Referenzplasmen x 6, Kontrollen und Patientenproben) zur Bestimmung des freien Protein S in die betreffenden Mikrovertiefungen pipettieren.
6. 100 µl des Probenverdünners in die für die Blindprobe vorgesehene Vertiefung pipettieren. Die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung bleibt leer.
7. 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.
8. Viermal mit Arbeitswaschlösung (PBS/Tween 20) waschen. Jede Vertiefung sollte bei jedem Waschvorgang mit Waschlösung gefüllt werden. Die Waschlösung in der leeren Vertiefung, die für den Substratleerwert vorgesehen ist, stört den Ablauf des Tests nicht. Nach jedem Waschschritt wird die Waschflüssigkeit 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 Waschschritten nicht austrocknen.
9. In jede Vertiefung (mit Ausnahme der für den Substratleerwert vorgesehenen) 100 µl Konjugat (rot) pipettieren.
10. Es wird 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert.
11. Wie in Schritt 8 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!

12. 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.
13. 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 blaue 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 log-log-Darstellung, aber eine lineare oder Punkt-zu-Punkt-Darstellung ist 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 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 Plasmaanalyse-Referenzblatt in der Packungsbeilage).

Beispiel:

Relativer Patientenwert (aus Eichkurve): 40

Zugehöriger Referenzplasmawert (aus Plasmaanalyse-Referenzblatt): 105% des Normalwerts

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

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

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Wenn das Spektrophotometer gegen Wasser auf null gestellt wurde, muss die mittlere OD der Blindprobe kleiner als 0,250 sein. Höhere Werte können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Platte bedingt sein.
2. Bei Proben mit einer Extinktion von mehr als 0,250 sollten die einzelnen OD-Werte der Doppelbestimmungen der Kontrollen oder Patientenproben nicht mehr als 20% von der durchschnittlichen OD abweichen.
3. Für die Kontrollen erhaltene Werte für freies Protein S Antigen sollten innerhalb des vom Hersteller für ELISA-Tests festgelegten Bereichs liegen. Gelegentliche, geringe Abweichungen von diesem Bereich können toleriert werden.
4. Jedes Labor sollte regelmäßig den eigenen Referenzbereich für diesen Test festlegen.

NORMALWERTE¹⁵

Normalbereich: Die Konzentration des freien Protein S wird in Prozent (%) relativ zu einem Pool von Normalplasma angegeben. Der Normalbereich für freies Protein S in diesem Test beträgt 50 - 150%. 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 gemessen werden, um das richtige Ergebnis zu erhalten.

GRENZEN DES TESTS

Die Werte der Konzentration des freien Protein S, 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

Die Reaktivität der in diesem Test verwendeten monoklonalen Capture-Antikörper wurde überprüft und als spezifisch für freies Humanprotein S befunden. Mögliche Auswirkungen von Hämolyse, Ikterus, oder Lipidämie auf das Leistungsvermögen des Tests wurden nicht untersucht, diese Zustände könnten jedoch die Testergebnisse verfälschen und müssen bei der Interpretation der Werte in Betracht gezogen werden.

Durch Fehler bei der Blutabnahme oder beim Verarbeiten der Plasmaproben im Labor kann freies 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®
MONOCLONAL FREE 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 libre dans le plasma humain citraté.

PRINCIPE DU TEST

Le dosage monoclonal de l'antigène de la protéine S libre est un dosage immunoenzymatique en sandwich. Une couche d'anticorps monoclonal de capture spécifique de la protéine S libre 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 libre isponible se lier à l'anticorps monoclonal anti-protéine S libre à la surface des micropuits. Les plaques sont lavées afin de retirer les protéines non liées et autres molécules du plasma. La protéine S libre liée est quantifiée à l'aide d'un anticorps de détection polyclonal anti-protéine S conjugué à la peroxydase du raifort (PR). Après incubation, le conjugué non lié est enlevé par lavage. Un substrat chromogène de tétraméthylbenzidine (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 libre dans le plasma patient est déterminée sur une courbe établie à l'aide du plasma de référence fourni dans le kit. Le plasma de référence lyophilisé dosé est préparé à partir d'une réserve de plasma citraté normal congelé et normalisé selon la préparation de la Norme secondaire de coagulation/Société internationale de thrombose et d'hémostase (SSC/ISTH), qui est étalonnée selon les normes de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

RÉACTIFS

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

Chaque kit d'antigène monoclonal de la protéine S libre REAADS (96-micropuits) contient les réactifs suivants :

- 12 x 8 micropuits coatés avec les anticorps monoclonaux de la protéine S libre (d'origine souris) (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) (d'origine lapine) (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).

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. 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).

Avertissement . Risque biologique .

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. Éviter l'hémolyse. 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 libre REAADS ; voir la liste complète sous « Réactifs ».

Matériel requis mais non fourni

- Plasma de contrôle de la protéine S 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 (1 l) 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 unique puits d'eau à vide doit être inclus sur chaque plaque pour chaque lot de tests. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté à ce puit. Ajouter à la place à ce puit 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 33X sérum physiologique tamponné au phosphate (SPTP)/Tween 20 : Mesurer 30 ml de solution mère 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 8°C. Reconstituer le plasma de contrôle selon les instructions du fabricant et stocker ainsi qu'il est recommandé.

Procédure de dosage

1. Retirer du cadre toutes les barettes de micropuits qui ne seront pas utilisées et les ranger dans le sac fourni à cet effet.

- Doser en double chaque dilution de plasma de référence pour la protéine S libre. La détermination en double des échantillons des patients et des contrôles est aussi recommandée. Un puits doit être utilisé pour le blanc réactif : du tampon pour échantillon sans sérum est ajouté au puits ainsi qu'expliqué à l'étape 6 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.
- Préparer six dilutions de **plasma de référence** ainsi que décrit dans le tableau ci-dessous.

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

- Préparer comme suit des dilutions de travail des **contrôles et échantillons des patients** :
Ajouter 20 µl de plasma de contrôle ou patient à 500 µl de tampon pour échantillon.
(Remarque : ces dilutions correspondent aux dilutions de plasma de référence relatives à 100%.)
- 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 libre.
- Ajouter 100 µl de tampon pour échantillon au puits de blanc réactif. Laisser vide le puits destiné à l'eau à blanc.
- Laisser incubé 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.
- Laver 4 fois à l'aide de solution mère de travail (SPTP/Tween 20). Chaque puits 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 de 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 entre les étapes.
- Ajouter 100 µl de conjugué (rouge) à chaque puits (excepté le puits d'eau à blanc).
- Laisser incubé 10 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter la solution conjuguée.
- Laver 4 fois à l'aide de solution mère de travail (SPTP/Tween 20), ainsi que décrit à l'étape 8. 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 her les puits entre les étapes.
- Ajouter 100 µl de solution substrat dans chaque puits (excepté le puits d'eau à blanc) et laisser incubé 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.

13. 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 colore. 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 logarithmique, mais on peut aussi utiliser une courbe linéaire ou point par point.
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 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 la feuille de dosage plasmatique de référence figurant sur la notice).

Par exemple:

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

Valeur assignée du plasma de référence (provenant de la feuille de dosage plasmatique de référence): 105 % de la normale

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

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 blanc réactif doit être inférieure à 0,250 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur l'eau. Une valeur supérieure à 0,250 peut indiquer que le réactif a été contaminé 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 0,250.
3. Les valeurs d'antigène de la protéine S 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 NORMALES¹⁵

Plage normale : Les valeurs de protéine S libre sont exprimées en pourcentage relatif (%) par rapport à une réserve de plasma normal. La plage normale de la protéine S libre pour ce dosage est de 50 à 150 %. 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 de concentration de protéine S libre obtenues 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

La réactivité de l'anticorps de capture monoclonal utilisé dans ce dosage a été évaluée et confirmée être spécifique de la protéine S libre. Les effets de l'hémolyse, de l'ictère ou de la lipémie sur la performance du dosage n'ont pas été entièrement étudiés, mais ils peuvent interférer avec le résultat du dosage et doivent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats du patient. Un prélèvement ou un traitement de laboratoire incorrect risque d'épuiser ou de diminuer la protéine S libre 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.

REAADS®
MONOCLONAL FREE PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

INDICACIONES

Un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa de la proteína S antigénica libre en plasma humano citratado.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo de la proteína S antigénica monoclonal libre es un ELISA de tipo sándwich. Para llevarlo a cabo se recubren placas de poliestireno de 96 micropocillos con un anticuerpo monoclonal de captura específico para la proteína S humana libre. El plasma diluido del paciente se incuba en los pocillos, lo que permite que las proteínas S libres se unan a los anticuerpos monoclonales de la proteína S antihumana libre de la superficie de los micropocillos. Las placas se lavan para retirar las proteínas no retenidas u otras moléculas plasmáticas. La proteína S libre retenida se cuantifica utilizando anticuerpos de detección de la proteína S antihumana policlonal 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 libre en el plasma de los pacientes se determinan respecto a una curva preparada a partir del plasma de referencia incluido con el equipo. El plasma de referencia liofilizado analizado está preparado a partir de una combinación congelada de plasma normal citratado y estandarizado respecto al preparado del Estándar Secundario de Coagulación de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (SSC/ISTH), que está calibrado por las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

REACTIVOS

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

Cada prueba de la proteína S antigénica monoclonal libre (96-micropocillos) REAADS contiene los siguientes reactivos:


- 12 x 8 micropocillos recubiertos de anticuerpos monoclonales de la proteína S humana libre (ratones) (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml de diluyente de muestras (solución azul-verde); contienen azida sódica (Sample Diluent III).
- 3 x 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) (Ileporino) (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).

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 ni beba en áreas donde se manipulen muestras o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables al manipular los reactivos del equipo y lávese las manos minuciosamente después de su uso.
5. 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).

Advertencia . Riesgo biológico .

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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. Evite la hemólisis. 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 monoclonal libre REAADS; véase una lista completa en “Reactivos”.

Materiales necesarios pero no suministrados

- Plasma de control para proteína S 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 multicanal 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 alcancen la 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 al 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 las soluciones simultáneamente a 8 pocillos. Esto agiliza el proceso y proporciona tiempos de reacción e incubación más uniformes en 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 período 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) 33x y Tween 20]: Mida 30 ml de solución de lavado 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 lavado 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 8°C. 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 libre. También se recomienda realizar determinaciones por duplicado para analizar las muestras de control y de los pacientes. Un pocillo debe procesarse como reactivo testigo; a este pocillo se añadirá diluyente de muestras sin suero, tal como se explica en el paso 6 de este apartado. Este pocillo se trata 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. Prepare seis diluciones de **plasma de referencia** tal como se describe en la tabla siguiente.

Volumen de plasma de referencia		Volumen de diluyente de muestras		*Nivel de Referencia (%)
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 debe utilizarse para construir la curva de referencia

4. Prepare diluciones de trabajo de las **muestras de control y de los pacientes** de la siguiente manera:
Añada 20 µl de plasma de control o de los pacientes a 500 µl de diluyente de muestras.
(Nota: estas diluciones corresponden a la dilución del plasma de referencia relativa al 100%.)
5. 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 libre.
6. Añada 100 µl de diluyente de muestras al pocillo testigo de reactivo. Deje vacío el pocillo testigo de agua.
7. Incube 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.
8. 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.
9. Añada 100 µl de conjugado (rojo) a cada pocillo (excepto al pocillo testigo de agua).
10. Incúbase durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche la solución conjugada.
11. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo (PBS y Tween 20), como en el paso 8. 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.

12. 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.
13. 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 650 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 log-log, aunque también puede emplearse uno lineal o punto a punto.
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 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 hoja del ensayo de plasma de referencia incluida en el prospecto del envase).

Por ejemplo:

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

Valor asignado del plasma de referencia (de la hoja del ensayo de plasma de referencia): 105% de lo normal

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

5. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (véase "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 inferior a 0,250 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto al pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,250 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 a menos de un 20% por encima o por debajo del valor medio de la D.O. en el caso de muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,250.
3. Los valores de proteína S antigénica libre obtenidos con los controles deben estar dentro de los rangos de 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 ESPERADOS¹⁵

Rango normal: Los valores de proteína S libre se expresan en porcentajes relativos (%) de los del plasma normal combinado. El rango normal de la proteína S libre en este ensayo es de un 50 a un 150%. 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 libre 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

Se ha determinado la reactividad del anticuerpo monoclonal de captura empleado en este ensayo y se ha confirmado que es específica de la proteína S humana libre. No se ha investigado a fondo el efecto de la hemólisis, la ictericia o la lipidemia en el comportamiento de la prueba, pero es posible que interfieran y deban tenerse en consideración al interpretar los resultados de los pacientes.

La proteína S libre 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®
MONOCLONAL FREE PROTEIN S ANTIGEN TEST KIT

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

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

PRINCIPIO DEL TEST

Il dosaggio monoclonale dell'antigene della proteina S libera è un saggio ELISA a sandwich. Un anticorpo monoclonale di cattura specifico per la proteina S umana libera viene usato per rivestire piastre di polistirolo a 96 pozzetti. Il plasma diluito, prelevato da pazienti, viene incubato nei pozzetti, consentendo alle proteine S libere disponibili di legarsi agli anticorpi monoclonali anti-proteine S umane libere 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 in fase libera viene eseguita utilizzando anticorpi policlonali 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 libera nel plasma da pazienti vengono determinate rispetto ad una curva preparata con il plasma di riferimento incluso nel kit. Il plasma di riferimento analizzato e liofilizzato viene preparato da pool di plasma normale citrato congelato e standardizzato rispetto alla preparazione basata sul Secondary Standard for Coagulation/International Society in Thrombosis and Haemostasis (SSC/ISTH) (Standard secondario di coagulazione/Società internazionale di trombosi ed emostasi), calibrata in base agli standard dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

REAGENTI



Conservare a 2 - 8°C. Non congelare.

Ogni kit REAADS per il dosaggio monoclonale dell'antigene della proteina S libera (96-pozzetti) contiene i seguenti reagenti:

- 12 x 8 pozzetti rivestiti di anticorpi (topo) monoclonali anti-proteina S umana libera (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml di diluente per campioni (soluzione blu-verde); contiene sodio azide (Sample Diluent III).
- 3 x 0,5 ml di plasma di riferimento liofilizzato, con scheda di dosaggio (Reference Plasma).
- 12 ml di coniugato di anticorpi (leporini) anti-proteina S umana e HRP (soluzione rossa) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml di substrato (TMB and H₂O₂) (One-component Substrate).
- 15 ml di soluzione di arresto (0,36 acido solforico N) (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).

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. Alcuni componenti sono etichettati come segue:
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).
Avvertimento . Rischio biologico .

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. Evitare l'emolisi. Rimuovere il plasma e conservarlo a 2 - 8°C fino al momento di eseguire l'analisi. Se il campione non viene analizzato entro otto ore dal prelievo, conservarlo a -70°C e analizzarlo entro un mese.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

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

Materiali richiesti ma non forniti

- Plasma di controllo della proteina S 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
- Vetreria 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 lettura di piastre in grado di leggere l'assorbanza a 450 nm (con riferimento di 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) e mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Riporre immediatamente tutti i campioni e i reagenti non utilizzati nel congelatore (2 - 8°C).
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 200 µl di acqua distillata al pozzetto 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 fondamentale ai fini della riuscita 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 pozzetto 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 in grado di dispensare simultaneamente in 8 pozzetti. Ciò accelera l'esecuzione di questa procedura e consente di sottoporre tutti i pozzetti a tempi di incubazione e di reazione uniformi.
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 nella stessa sequenza.
10. Temperature di incubazione superiori o inferiori alla temperatura ambiente (18 - 26°C) possono dar luogo ad artefatti.
11. Quando si aprono le fiale originali e per il prelievo delle 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 [33X di soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)/Tween 20]. Misurare 30 ml di soluzione di lavaggio e diluirla a 1 litro con acqua distillata. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione di lavaggio inutilizzata a 2 - 8°C. In caso di contaminazione, eliminare la soluzione.
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 - 8°C. 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 riporle nella busta in dotazione.
2. Analizzare in duplicato ciascuna diluizione di plasma di riferimento per la determinazione della proteina S 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 6 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 fino all'aggiunta di 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. Preparare sei diluizioni di **plasma di riferimento**, come descritto nella tabella seguente.

<u>Volume del plasma di riferimento</u>		<u>Volume del diluente per campioni</u>		<u>*Livello di Riferimento (%)</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

* Il valore del livello di riferimento serve solo per costruire la curva di riferimento

4. Preparare come segue le diluizioni pronte all'uso dei **controlli e dei campioni da pazienti**.
Aggiungere 20 µl di controllo o di plasma da pazienti a 500 µl di diluente per campioni.
(N.B. Queste diluizioni corrispondono alla diluizione relativa al 100% del plasma di riferimento.)
5. 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 libera.
6. Aggiungere 100 µl di diluente per campioni al pozzetto bianco reagente. Lasciare vuoto il pozzetto bianco.
7. 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.
8. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio pronta all'uso (PBS)/Tween 20. Per il lavaggio, ciascun pozzetto deve essere riempito con soluzione di lavaggio. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto 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.
9. Aggiungere 100 µl di coniugato (rosso) a ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco).
10. Far incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di coniugato.
11. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio pronta all'uso (PBS)/Tween 20 come indicato nel passaggio 8. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto bianco non interferisce con la procedura. Scuotere la piastra per eliminare il liquido e picchiettarla su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Evitare che i pozzetti si asciughino.

12. 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.
13. Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto (0,36 acido solforico N) a ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco) per arrestare 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 al pozzetto bianco. Aggiungere invece al pozzetto bianco 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 log-log, sebbene sia possibile usare anche un grafico lineare o da punto a punto.
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 eseguire il calcolo in base alla curva di riferimento.
4. Per calcolare i livelli di antigene della proteina S libera come percentuale (%) del livello normale, moltiplicare i valori relativi del controllo e dei pazienti, ricavati dalla curva di riferimento appropriata, per il corrispondente valore assegnato del plasma di riferimento (vedere il foglio del Saggio su plasma di riferimento, incluso nel foglio illustrativo del prodotto).

Ad esempio:

valore relativo del paziente (curva di riferimento): 40

valore assegnato del plasma di riferimento (dal foglio del Saggio su plasma di riferimento):

105% del valore normale

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

5. Prima di riportare i risultati del test, assicurarsi che siano stati soddisfatti tutti i parametri di controllo di qualità (vedere la sezione Controllo di qualità).

CONTROLLO DI QUALITÀ

1. Quando lo spettrofotometro è stato tarato sul pozzetto bianco, la densità ottica media del bianco reagente deve essere inferiore a 0,250. Valori più alti di 0,250 potrebbero indicare una possibile contaminazione del reagente o un 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 0,250.
3. I valori di antigene della proteina S 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 ATTESI¹⁵

Range di riferimento: I valori di proteina S libera vengono espressi come percentuale relativa (%) rispetto al pool di plasma normale. Il range normale della proteina S libera per questo dosaggio è di 50 - 150%. 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.

LIMITAZIONI DEL TEST

Le concentrazioni di proteina S libera 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 reattività dell'anticorpo monoclonale di cattura usato in questo dosaggio è stata valutata e ne è stata confermata la specificità per la proteina S libera umana. Non è stata ancora completata la valutazione degli effetti dell'emolisi, dell'ittero o della lipemia sulle prestazioni del test; tali condizioni possono tuttavia interferire con i risultati del dosaggio e vanno tenute in considerazione quando si interpretano i risultati dei pazienti.

La proteina S presente nei campioni può essere inavvertitamente diminuita o degradata a causa di errori durante il prelievo del campione o l'analisi di 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, Nixon 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. Murdock PJ, Brooks S, Mellars G, Cheung G, Jacob D., Owens DL, Parmar M, Riddell A. A simple monoclonal antibody based ELISA for free Protein S, Comparison with PEG precipitation. *Clin Lab Haem* 19, 111-114, 1997.
12. Aillaud MF, Pouymayou K, Brunet D, Parrot G, Alessi MC, Amiral J, Juhan-Vague I. New direct assay of free Protein S antigen applied to diagnosis of Protein S deficiency. *Thrombosis and Haemostasis* 5 (2), 284-285, 1996.
13. Amiral J, Grosley M, Boyer-Neumann C, Marfaing-Koka A, Peynaud-Debayle E, Wolf M, Meyer D. New direct assay of free Protein S antigen using two distinct monoclonal antibodies specific for the free form. *Blood Coag Fibrinolysis* 5, 179-186, 1994.
14. Wolf M, Boyer-Neumann C, Peynaud-Debayle E, Marfaing-Koka A, Amiral J, Meyer D. Clinical application of a direct assay of free Protein S antigen using monoclonal antibodies. A study of 59 cases. *Blood Coag Fibrinolysis* 5, 187-192, 1994.
15. Data on File.

SYMBOL LEGEND

											
Manufacturer	Authorized Representative	In vitro diagnostic medical device	Batch Code	Use by/ Expiry Date	Temperature Limitation	Warning	Caution	Biological Risk	Catalog Number	European Conformity	Consult Instructions for Use/ Package Insert
Hersteller	Bevoll-mächtiger	In-vitro-Diagnostikum	Chargennummer	Verfallsdatum	Temperatur-beschränkungen	Waarschuwing	Voorzichtigheid	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	Avertissement	Prudence	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	Advertencia	Precaución	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	Avvertimento	Cautela	Rischio biologico	Numero di catalogo	Conformità europea	Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo



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



Corgenix, Inc.
 11575 Main Street, Suite 400
 Broomfield, Colorado 80020, USA
REAADS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.
 © 2015, Corgenix, Inc.

13051901 09
 Effective: 2015-08-29

THIS PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK