

Instructions For Use

Protein C Rocket EID

Cat. No. 5357

EID en fusée, antigène de la protéine C
Fiche technique

Protein C-Antigen Rocket-EID
Anleitung

Rocket EID per l'antigene della proteina C
Istruzioni per l'uso

EID Rocket del antigeno de la proteína C
Instrucciones de uso

Contents

English	1
Français	8
Deutsch	15
Italiano	22
Español	29



INTENDED PURPOSE

The Protein C Rocket EID (electroimmunodiffusion) procedure is intended for the quantitative determination of plasma protein C antigen by Laurell rocket electrophoresis^{1,2}.

Protein C is a vitamin K dependent plasma protein that functions as a regulator of fibrin formation. In its activated form, it inhibits thrombin formation by the inactivation of activated factors V and VIII^{3,4}. A deficiency of protein C constitutes a thrombotic risk factor^{5,6} of which superficial thrombophlebitis is the most common clinical feature. The virtual absence of plasma protein C has led to fatal thrombosis in neonates⁸.

The Helena Protein C Rocket EID Procedure is performed in a 1% agarose gel medium containing an antiserum specific for protein C. After the plasma specimens are applied to the wells in the agarose, electrophoresis is used to migrate the proteins into the antibody field. A rocket-shaped precipitin pattern forms along the axis of migration. The length of this rocket pattern is proportional to the antigen concentration.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for *in-vitro* diagnostic use only - **DO NOT INGEST**. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheets for risk and safety phrases and disposal information. Plasma products have been screened and found negative (unless otherwise stated on the kit box or vial) for the presence of Hepatitis B Antigen (HbsAg) HIV 1 and 2 antibody and HCV antibody, however they should be handled with the same precautions as a human plasma sample.

COMPOSITION**1. Protein C Antigen Rocket Plates (Cat. No. 5357)**

Contains sheep or goat antibody to human protein C incorporated into agarose in Tris-tricine buffer⁸ and sodium azide as preservative. To prevent the formation of toxic vapors, sodium azide should not be mixed with acidic solutions.

Preparation: Remove the plate from the protective packaging and allow 5-20 minutes for the agarose to reach 15...30°C.

2. Tris-tricine Buffer (Cat. No. 5358 - not included)

Diluted buffer contains 0.08 M Tris and 0.024 M tricine.

Preparation: Dilute one package of buffer to 1000ml with deionized or distilled water. The buffer is ready for use when all material is completely dissolved.

3. Rocket Stain (Cat. No. 5362 - not included)

Rocket Stain is Coomassie Brilliant Blue stain.

Preparation: Dissolve the contents of the vial in 450ml deionized water, 450ml methanol and 100ml acetic acid. Mix thoroughly and filter before use if necessary.

4. Other kit components

Each kit contains Instructions For Use, a rocket ruler and report form.

STORAGE AND SHELF LIFE

Unopened reagents are stable until the given expiry date when stored under conditions indicated on the vial or kit label.

1. Protein C Antigen Rocket Plates (Cat. No. 5357)

Rocket Plates **MUST** be stored at 2...6°C and maintained in moist condition within the bag.

DO NOT FREEZE. The plates are stable until the expiry date indicated on the package.

Signs of Deterioration: Discard the plate if dry in appearance or if the wells are not round. A crystalline appearance indicates the agarose has been frozen.

2. Tris-tricine Buffer (Cat. No. 5358)

The packaged buffer should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C.

Signs of Deterioration: Discard packaged buffer if the material shows signs of dampness or discoloration. Discard diluted buffer if it becomes turbid.

3. Rocket Stain (Cat. No. 5362)

The stain should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label.

Signs of Deterioration: If methanol evaporation occurs, a metallic sheen will be visible on the stain surface. Discard the stain if it does not adequately stain protein rockets as described in this procedure.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 5358 Tris - Tricine Buffer

Cat. No. 5362 Rocket Stain

Cat. No. 5185 SARP reference plasma

Cat. No. 1283 / 4063 Zip Zone Chamber / Titan Gel Chamber

Cat. No. 5014 Development Weight

Cat. No. 1520 EWS Power Supply

Cat. No. 9015 Sponge Wicks

Cat. No. 5037 Blotter Pads

Cat. No. 1558 TITAN GEL Multi-staining Set

Cat. No. 9025 IEP VuBox

Cat. No. 5116 I.O.D. - Incubator, Oven, Drier

Cat. No. 6210, 6211 Microdispenser and Tubes (10µl)

Lint free tissue

Destain solution: Mix 200ml deionized water, 200ml methanol and 50ml glacial acetic acid.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Plastic or siliconised glass should be used throughout. Blood (9 parts) should be collected into 3.2% or 3.8% sodium citrate anticoagulant (1 part). Separate plasma after centrifugation at 2000-3000xg for 15 minutes. Plasma should be kept at 2...6°C. Testing should be completed within 2 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for one month. Thaw quickly at 37°C prior to testing. Do not keep at 37°C for more than 5 minutes.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

NOTE: Remove the plate from the refrigerator, allow approximately 5-20 minutes for the plate to reach 15...30°C and for excess moisture to be absorbed before use.

1. Reconstitute one vial of S.A.R.P. with 1.0ml deionized or distilled water. Make dilutions for preparation of the Standard Curve as follows:

Percent Activity	Dilution	Parts S.A.R.P.	Parts 0.85% Saline
100%	Use reconstituted S.A.R.P. undiluted		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12.5%	1:8	1	7

2. Dilute each patient sample and control with 0.85% saline. Prepare a 1:2 dilution (1 part patient sample and 1 part saline) and a 1:4 dilution (1 part patient plasma and 3 parts saline). Additional dilutions may be necessary depending on the patient history. Suspected abnormal samples may need to be tested undiluted.
3. **Preparation:**
 - If using Zip Zone Chamber:** Pour 200ml of Tris-tricine Buffer into each of the outer sections of the chamber (requires a total of 400ml buffer) and place one sponge wick in the buffer along each inner wall of the chamber.
 - If using TITAN GEL Chamber:** Pour 65ml Tris-tricine buffer into each inner section of the chamber.
4. Remove any excess buffer from the wells of the plate. **NOTE:** Excess moisture on the plate can result in poor rockets.
5. Apply 10 μ l of each dilution of the patient samples and controls to the designated wells. **NOTE:** Standard curve samples must be run on each plate. Duplicate applications of patient samples are advisable. When applying the samples to the plate wells, do not allow the pipette tip to touch the sides of the wells as this may cause damage.
6. Allow 5 minutes for specimens to diffuse into the agarose.
7. **Electrophoresis:**
 - If using Zip Zone Chamber:** Place the plate, agarose side down, into the chamber on the sponge wicks. Place the application point (wells) toward the cathode (negative) side of the chamber.
 - If using TITAN GEL Chamber:** Place the plate into the inner section of chamber, agarose side down, by gently squeezing the gel into place. Position the gel(s) so that the edges of the agar are in the buffer and the wells are toward the cathode (-) side of the chamber.
8. Electrophorese the plates at a constant current of 16mA per plate for 3 hours.
9. Following electrophoresis, remove the plates from the chamber. Discard the chamber buffer after each run. **NOTE:** Use the TITAN GEL Multi-Staining Set (Cat. No. 1558) as a staining and rinsing chamber.
10. Rinse the plate with deionized or distilled water and wash it in 0.85% saline overnight with gentle stirring.
11. Following the overnight wash, rinse the plate with deionized or distilled water.
12. Place the plate on a flat surface, agarose side up. Cover the agarose with a single, lint-free tissue.
13. Place 2-3 Blotter Pads and a Development Weight on the plate for 15 minutes and remove.
14. Dry the plate in a drying oven at 60...70°C for 10-20 minutes. **DO NOT** over dry plates. The plate will be transparent when completely dry. **NOTE:** If a dryer/oven is not available, the plates may be covered with wet lint-free tissues and allowed to dry at 15...30°C overnight or under a fan for 3 hours at 15...30°C as climate requires.
15. Following drying, stain the plate by immersing it in Rocket Stain for 20 minutes.
16. Place the plate in destain solution for 1-3 minutes. **NOTE:** Destaining is complete as soon as the background sufficiently clears in order to easily distinguish rocket peaks. **NOTE:** Excessive destaining may fade the rockets making correct measurements difficult. If over destaining does occur, repeat Step F.7. and stain the rockets again.
17. Rinse the plate twice in purified water for 5-10 minutes each rinse.
18. Dry the plates at 37°C for 5 minutes or at 15...30°C until dry.

- Place the plate on the Helena I.E.P. VuBox using a piece of white paper in the bottom of the VuBox for easier viewing of the rockets. Mark the apex of each rocket peak with marker.
- Using the Helena Rocket Ruler, measure the length of each peak in millimeters. The peak is measured from the top of each well to the apex of the rocket.
- Plot the values of the standard curve versus each rocket height on the Rocket Antigen Report Form or on 3 cycle semi-logarithmic paper. Draw the line of best fit for the four points. See Figures 1 and 2 in INTERPRETATION OF RESULTS for an example of a completed Rocket Plate and a standard curve drawn on a Rocket Antigen Report Form.

INTERPRETATION OF RESULTS

Read the patient values from the standard curve and multiply each by the appropriate dilution factor. If Rocket Reference Plasma is used to prepare the standard curve, the patient value read from that curve must be multiplied by the assigned Protein C Antigen value of the appropriate lot of Rocket Reference Plasma as well as the dilution factor.

Patient value from curve = 30%

Dilution factor = 2

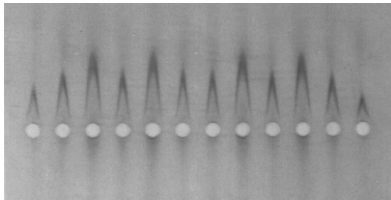
S.A.R.P. assigned value = 98%

Actual Patient Factor

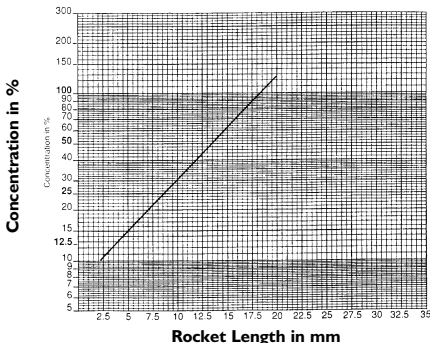
Protein C Antigen = $30\% \times 2 \times 0.98 = 58.8\%$

Patient samples with Protein C Antigen levels greater than the range of the standard curve, must be reassayed using the appropriate dilutions.

Figure 1: Rocket patterns on a Protein C Antigen Rocket Plate.



The lengths of the rockets (in millimeters) of the standard dilutions are used to prepare the standard curve. Patient results are read from the curve.

Figure 2: A representative standard curve prepared with S.A.R.P. on 3 cycle semi-logarithmic paper.**QUALITY CONTROL**

Each laboratory should establish a quality control program. Normal and abnormal control plasmas should be tested prior to each batch of patient samples, to ensure satisfactory instrument and operator performance. If controls do not perform as expected, patient results should be considered invalid.

Helena BioSciences supply the following controls available for use with this product:

Cat. No. 5301 S.A.C.-1

Cat. No. 5302 S.A.C.-2

REFERENCE VALUES

Reference values can vary between laboratories depending on the techniques and systems in use. For this reason each laboratory should establish it's own normal range but be aware that there is currently no accepted international standard for Protein C antigen..

Protein C antigen values are usually expressed in relative percentages compared to a pooled normal plasma standard. The expected normal range for protein C antigen run by rocket electrophoresis has been reported at 65-129%⁸ with newborns showing less than 50% levels. Bertina et al. , reported a range of 65-145% in healthy individuals with diminished levels found following anticoagulant therapy. There is apparently no difference in protein C antigen levels between healthy males and females⁹.

Helena tested 39 plasmas of presumed healthy men and women. The results were as follows:

$$\bar{X} = 101\%$$

$$SD = 24$$

$$\text{Range} = 53 - 149\%$$

LIMITATIONS

Most patients with congenital protein C deficiency show diminished levels of both immunologic and functional activity, the so-called type I deficiency⁷. However, the finding of several patients with normal levels of protein C antigen and diminished functional protein C activity, type II deficiency⁷, makes the diagnosis more difficult. The Helena procedure will detect only the type I deficiencies.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision Studies

Within-Run: A control plasma was tested in replicate on one plate with the following results.

$$\begin{aligned}n &= 8 & \bar{X} &= 91.8\% \\ & & SD &= 2.83 \\ & & CV\% &= 3.0\end{aligned}$$

Run-to-Run: A control plasma was tested in replicate on four different plates giving the following data.

$$\begin{aligned}n &= 26 & \bar{X} &= 85.2\% \\ & & SD &= 6.47 \\ & & CV\% &= 8.0\end{aligned}$$

Comparison Studies

Correlation studies were done on 43 normal and abnormal patient samples with the Helena Protein C method and the reference Protein C method. The study yielded an excellent linear regression equation and correlation coefficient.

$$\begin{aligned}n &= 43 & Y &= 0.614X + 27.006 \\ & & r &= 0.937 \\ & & X &= \text{Helena's Protein C} \\ & & Y &= \text{Reference Protein C method}\end{aligned}$$

BIBLIOGRAPHY

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest 29 Suppl 124, 21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Nesheim, M.E., Canfield, W.M., Kisiel, W., Mann, K.G. Studies of the Capacity of Factor Xa to Protect Factor Va from Inactivation by Activated Protein C. J Biol Chem, 257:1443-1447, 1982.
4. Marljar, R.A., Kleiss, A.J., Griffin, J.H. Human Protein C: Inactivation of Factor V and VIII in Plasma by the Activated Molecule. Ann N.Y. Acad Sci, 370:303-310, 1981.
5. Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmermann, T.S., Kleiss, A.J. Wideman, C. Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease. J Clin Invest, 68:1370-1373, 1981.
6. Broekmans, A.W., Veltkamp, J.J., Bertina, R.M. Congenital Protein C Deficiency and Venous Thrombo-embolism. A Study in Three Dutch Families. N Engl J Med, 309:340-344, 1983.
7. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency. Thromb Haemostas, 51:1-5, 1984.

8. Seligsohn, U., Berger, A., Abend, M., Rubin, L., Attias, D., Zivelin, A., Rapaport, S.I. Homozygous Protein C Deficiency Manifested by Massive Venous Thrombosis in the Newborn. *N Engl J Med*, 310:559-562, 1984.
9. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. *Thromb Haemostas*, 50:810-813, 1983.

UTILISATION

La méthode d'électro-immunodiffusion (EID) en fusée de la protéine C est utilisée pour la détermination quantitative des antigènes de la protéine C moyennant électrophorèse en fusée par la méthode de Laurell^{1,2}.

La protéine C est une protéine plasmatique vitamine K dépendante qui agit en tant que régulateur de la formation de fibrine. La forme activée inhibe la formation de thrombine en désactivant les facteurs V et VIII activés^{3,4}. Un déficit en protéine C constitue un facteur de risque thrombotique^{5,6} dont la thrombophlébite superficielle est la manifestation clinique la plus courante⁷. L'absence quasi totale de protéine C dans le plasma conduit à une thrombose mortelle chez les nouveau-nés⁸.

La méthode d'EID en fusée de la protéine C Helena est réalisée sur un gel d'agarose à 1% contenant un antisérum spécifique de la protéine C. Une fois que les échantillons de plasma sont déposés dans les puits d'agarose, une électrophorèse est mise en œuvre pour faire migrer les protéines dans la zone des anticorps. Un arc de précipitation en forme de fusée se développe le long de l'axe de migration. La longueur de cette fusée est proportionnelle à la concentration en antigène.

PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostique *in vitro* uniquement. **NE PAS INGÉRER.** Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination. Un dépistage des produits à base de plasma a été réalisé et a donné un résultat négatif (sauf indication contraire sur la boîte du kit ou sur le flacon) pour les antigènes de l'hépatite B (AgHBs), les anticorps anti VIH 1 et 2 et les anticorps anti VHC ; il est malgré tout nécessaire de les manipuler avec les mêmes précautions que pour les échantillons de plasma humain.

COMPOSITION

1. Plaques d'EID en fusée, antigène de la protéine C (réf. 5357)

Contient des anticorps, d'origine ovine ou caprine, anti protéine C humaine incorporés à l'agarose dans un tampon tris-tricine et de l'azide de sodium comme conservateur. Afin d'éviter la formation de vapeurs toxiques, l'azide de sodium ne doit pas être mélangé avec des solutions acides.

Préparation : Enlever la plaque de l'emballage de protection et attendre 5-20 minutes que la température de l'agarose s'équilibre entre 15...30°C.

2. Tampon tris-tricine (réf. 5358, non inclus)

Le tampon dilué contient du tris à 0,08 M et de la tricine à 0,024 M.

Préparation : Diluer un sachet de tampon dans 1000ml d'eau désionisée ou distillée. Le tampon est prêt à l'emploi lorsque la dissolution est complète.

3. Colorant d'EID en fusée (réf. 5362, non inclus)

Le colorant pour l'EID en fusée est du bleu de Coomassie brillant.

Préparation : Dissoudre le contenu d'un flacon avec 450ml d'eau désionisée, 450ml de méthanol et 100ml d'acide acétique. Bien mélanger et filtrer avant utilisation si nécessaire.

4. Autres composants du kit

Chaque kit contient une fiche technique, une règle à fusée et une fiche de résultats.

STOCKAGE ET CONSERVATION

Les flacons de réactif non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée s'ils sont conservés dans les conditions indiquées sur l'étiquette du kit ou du flacon.

1. Plaques d'EID en fusée, antigène de la protéine C (réf. 5357)

Les plaques d'EID en fusée doivent être conservées entre 2...6°C dans l'emballage pour maintenir l'humidité. **NE PAS CONGELER.** Elles sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Signes de détérioration : Jeter la plaque si elle a séché ou si les puits ne sont pas ronds. Un aspect cristallin de l'agarose indique qu'elle a été congelée.

2. Tampon tris-tricine (réf. 5358)

Le tampon non reconstitué doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C.

Signes de détérioration : Jeter le tampon non reconstitué s'il présente des signes d'humidité ou de décoloration. Jeter le tampon reconstitué s'il devient trouble.

3. Colorant d'EID en fusée (réf. 5362)

Le colorant doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Signes de détérioration : En cas d'évaporation de méthanol, la surface du colorant émet un reflet brillant métallique. Jeter le colorant s'il ne colore pas correctement les fusées de protéines comme indiqué dans le protocole.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 5358 Tampon tric-tricine

Réf. 5362 Colorant d'EID en fusée

Réf. 5185 Plasma de référence SARP

Réf. 1283 / 4063 Chambre Zip Zone / Chambre Titan Gel

Réf. 5014 Poids à développement

Réf. 1520 Générateur EWS

Réf. 9015 Éponges de contact

Réf. 5037 Blocs buvards

Réf. 1558 Kit de multi-coloration TITAN GEL

Réf. 9025 Dispositif de visualisation IEP VuBox

Réf. 5116 Appareil IOD (incubateur, étuve, sécheur)

Réf. 6210, 6211 Micropipette et capillaires (10ml)

Papier absorbant non pelucheux

Solution décolorante : Mélanger 200ml d'eau désionisée, 200ml de méthanol et 50ml d'acide acétique glacial.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre silicé. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 2000-3000 x g pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre 2...6°C. L'analyse doit être terminée dans les 2 heures suivant le prélèvement de l'échantillon ; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20°C ou un mois à -70°C. Décongeler rapidement à 37°C avant de réaliser l'analyse. Ne pas laisser à 37°C plus de 5 minutes.

MÉTHODOLOGIE

REMARQUE : Sortir la plaque du réfrigérateur et attendre environ 5-20 minutes pour que sa température s'équilibre entre 15...30°C et que l'excès d'humidité soit absorbé.

1. Reconstituer un flacon de SARP en ajoutant 1,0ml d'eau distillée ou désionisée. Réaliser les dilutions suivantes afin de préparer la courbe d'étalonnage :

Activité en %	Dilution	Vol. de SARP	Vol. de solution physiologique à 0,85%
100%	Utiliser du SARP reconstitué non dilué		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12,5%	1:8	1	7

2. Diluer chaque échantillon patient et contrôle avec de la solution physiologique à 0,85%. Préparer une dilution au 1:2 (1 volume d'échantillon patient plus 1 volume de solution physiologique) et une dilution au 1:4 (1 volume de plasma du patient plus 3 volumes de solution physiologique). Il est possible que d'autres dilutions soient nécessaires suivant les cas. Il est possible qu'il soit nécessaire d'analyser les échantillons soupçonnés anormaux sans les diluer.

3. Préparation :

Chambre Zip Zone : Verser 200ml de tampon tris-tricine dans chaque compartiment extérieur de la chambre (vous avez besoin de 400ml de tampon au total) et placer une éponge de contact dans le tapon, le long de chaque paroi intérieure de la chambre.

Chambre TITAN GEL : Verser 65ml de tampon tris-tricine dans chaque compartiment intérieur de la chambre.

4. Éliminer tout excès de tampon dans les puits de la plaque. **REMARQUE :** Une humidité excessive sur les plaques risque de produire des fûsées de mauvaise qualité.
5. Déposer 10 μ l de chaque dilution d'échantillon patient et de contrôle dans les puits appropriés. **REMARQUE :** Il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage pour chaque plaque. Il est conseillé de déposer en double les échantillons patients. Lors du dépôt des échantillons dans les puits de la plaque, veiller à ce que l'embout de la pipette ne touche pas les parois des puits car ils risqueraient d'être endommagés.
6. Attendre 5 minutes que les échantillons diffusent dans l'agarose.

7. Électrophorèse :

Chambre Zip Zone : Placer la plaque, agarose vers le bas, dans la chambre sur les éponges de contact. Orienter le point de dépôt (puits) vers la cathode (pôle négatif) de la chambre.

Chambre TITAN GEL : Placer la plaque dans le compartiment intérieur de la chambre, agarose vers le bas, en appliquant une légère pression pour mettre le gel en place. Placer le ou les gels de sorte que les bords du gel soient dans le tampon et que les puits soient orientés vers la cathode (-) de la chambre.

8. Faire migrer les plaques à un courant constant de 16mA par plaque pendant 3 heures.
9. Une fois l'électrophorèse terminée, enlever les plaques de la chambre. Jeter le tampon de la chambre après chaque analyse. **REMARQUE :** Utiliser le kit de multi-coloration TITAN GEL (réf. 1558) comme chambre de coloration et de rinçage.
10. Rincer la plaque avec de l'eau désionisée ou distillée et la laver avec de la solution physiologique à 0,85% pendant toute une nuit sous agitation douce.

EID EN FUSÉE, ANTIGÈNE DE LA PROTÉINE C

11. Une fois ce lavage terminé, rincer la plaque avec de l'eau désionisée ou distillée.
12. Placer la plaque, agarose vers le haut, sur une surface plane. Couvrir l'agarose avec un papier absorbant non pelucheux.
13. Placer 2 ou 3 blocs buvards et un poids à développement sur la plaque pendant 15 minutes puis les enlever.
14. Sécher la plaque dans une étuve de séchage entre 60...70°C pendant 10–20 minutes. Ne pas trop sécher la plaque. Elle doit être transparente une fois sèche. **REMARQUE** : Si vous ne disposez pas d'étuve de séchage ou de dispositif similaire, il est possible de couvrir la plaque avec un papier absorbant non pelucheux humide et laisser sécher entre 15...30°C toute la nuit ou 3 heures sous un ventilateur.
15. Une fois le séchage terminé, colorer la plaque en la plongeant dans le colorant d'EID en fusée pendant 20 minutes.
16. Placer la plaque dans la solution décolorante pendant 1 à 3 minutes. **REMARQUE** : La décoloration est terminée dès que le fond de bande se distingue suffisamment des pics des fusées. **REMARQUE** : Une décoloration excessive risquerait d'estomper les fusées, ce qui rendrait les mesures plus difficiles. S'il se produit une décoloration excessive, répéter l'étape 15 et colorer à nouveau les fusées.
17. Rincer la plaque dans deux bains d'eau distillée de 5 à 10 minutes chacun.
18. Sécher la plaque à 37°C pendant 5 minutes ou entre 15...30°C jusqu'à ce qu'elle soit sèche.
19. Placer la plaque dans le dispositif de visualisation Helena IEP VuBox en plaçant une feuille de papier blanc en bas de l'appareil pour mieux visualiser les fusées. Marquer le pic de chaque fusée avec un marqueur.
20. Mesurer à l'aide de la règle à fusée Helena la longueur de chaque pic en millimètres. La mesure doit s'effectuer entre la partie supérieure de chaque puits et le sommet de la fusée.
21. Tracer, point par point, une courbe d'étalonnage représentant la longueur de chaque fusée en fonction des valeurs des étalons sur la fiche de résultats des antigènes par EID en fusée ou sur du papier semi-logarithmique à 3 modules.

Déterminer la droite de meilleur ajustement à partir des quatre points. Les figures 1 et 2 de la section INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS sont des exemples de plaque terminée et de courbe d'étalonnage tracée sur la fiche des résultats des antigènes par EID en fusée.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lire les résultats du patient à partir de la courbe d'étalonnage et les multiplier par le facteur de dilution correspondant. Si du plasma de référence pour EID en fusée est utilisé pour préparer la courbe d'étalonnage, les résultats du patient déterminés à partir de cette courbe doivent être multipliés par le taux assigné au plasma de référence ainsi que par le facteur de dilution.

Résultat du patient à partir de la courbe = 30%

Facteur de dilution = 2

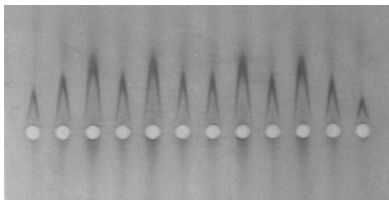
Taux assigné au SARP = 98%

Facteur réel du patient

Antigène de la protéine C = $30\% \times 2 \times 0,98 = 58,8\%$

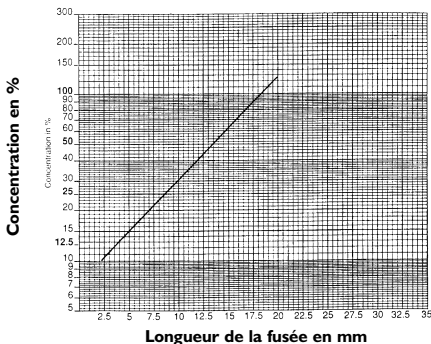
Les échantillons présentant des taux d'antigène de protéine C dépassant l'intervalle de la courbe d'étalonnage doivent être analysés à nouveau en utilisant des dilutions appropriées.

Figure 1 : Fusées sur une plaque d'EID en fusée pour les antigènes de la protéine C.



Les longueurs des fusées (en millimètres) des dilutions d'étalons sont utilisées pour préparer la courbe d'étalonnage. Les résultats du patient sont obtenus à partir de la courbe.

Figure 2 : Courbe d'étalonnage représentative préparée sur avec du plasma SARP sur du papier semi-logarithmique à 3 modules.



CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité. Les plasmas de contrôle, normaux et anormaux, doivent être testés avant chaque lot d'échantillons patients afin de s'assurer que l'instrument et l'opérateur offrent des performances satisfaisantes. S'ils ne donnent pas les résultats prévus, les résultats du patient doivent être considérés comme non valables.

Helena BioSciences distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit :

Réf. 5301 SAC-1

Réf. 5302 SAC-2

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les valeurs de référence peuvent varier d'un laboratoire à l'autre suivant les techniques et les systèmes utilisés. C'est pour cette raison qu'il appartient à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs usuelles, mais il faut savoir qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune valeur usuelle mondialement admises pour l'antigène de la protéine C.

Le taux d'antigène de la protéine C est en général exprimé en un pourcentage relatif par rapport à un pool de plasma normal. Un intervalle normal attendu pour les antigènes de la protéine C par électro-immunodiffusion en fusée de 65–129% a déterminé⁶ avec un taux inférieur à 50% chez les nouveau-nés. Bertina, et al.⁷ a signalé des valeurs usuelles de 65–145% chez les individus sains et une diminution du taux chez les patients sous anticoagulants. Il n'y a apparemment pas de différence entre les femmes et les hommes sains.

Helena a analysé 39 plasmas provenant de donneurs, hommes et femmes, présumés sains. Voici les résultats correspondants :

Taux moyen = 101%
Écart-type = 24
Intervalle = 53 – 149%

LIMITES

La plupart des patients ayant un déficit congénital en protéine C ont un taux d'activité, aussi bien immunologique que fonctionnelle, diminué : il s'agit du déficit de type I⁷. Cependant, pour le déficit de type II⁷, l'existence d'un taux normal d'antigène de la protéine C et d'une activité fonctionnelle diminuée chez certains patients rend difficile le diagnostic. La méthode Helena ne détecte que les déficits de type I.

PERFORMANCES

Études de précision

Intra-analyse : Un plasma de contrôle a été analysé plusieurs fois sur une plaque et voici les résultats:

n = 8 Taux moyen = 91,8%
 Écart-type = 2,83
 CV% = 3,0

Inter-analyse : Un plasma de contrôle a été analysé plusieurs fois sur quatre plaques différentes et voici les résultats :

n = 26 Taux moyen = 85,2%
 Écart-type = 6,47
 CV% = 8,0

Études de comparaison

Des études de corrélation ont été réalisées avec 43 échantillons de patients, normaux et anormaux, en utilisant la méthode Helena Protéine C et une méthode de référence pour la protéine C. L'étude a fourni un coefficient de corrélation et une équation de régression linéaire excellents.

$$n = 43$$

$$Y = 0,614X + 27,006$$

$$r = 0,937$$

X = Méthode Helena Protéine C

Y = Méthode de référence pour la protéine C

BIBLIOGRAPHIE

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest 29 Suppl 124, 21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Nesheim, M.E., Canfield, W.M., Kiesel, W., Mann, K.G. Studies of the Capacity of Factor Xa to Protect Factor Va from Inactivation by Activated Protein C. J Biol Chem, 257:1443-1447, 1982.
4. Marlar, R.A., Kleiss, A.J., Griffin, J.H. Human Protein C: Inactivation of Factor V and VIII in Plasma by the Activated Molecule. Ann N.Y. Acad Sci, 370:303-310, 1981.
5. Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmermann, T.S., Kleiss, A.J. Wideman, C. Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease. J Clin Invest, 68:1370-1373, 1981.
6. Broekmans, A.W., Veltkamp, J.J., Bertina, R.M. Congenital Protein C Deficiency and Venous Thrombo-embolism. A Study in Three Dutch Families. N Engl J Med, 309:340-344, 1983.
7. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency. Thromb Haemostas, 51:1-5, 1984.
8. Seligsohn, U., Berger, A., Abend, M., Rubin, L., Attias, D., Zivelin, A., Rapaport, S.I. Homozygous Protein C Deficiency Manifested by Massive Venous Thrombosis in the Newborn. N Engl J Med, 310:559-562, 1984.
9. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Thromb Haemostas, 50:810-813, 1983.

ANWENDUNGSBEREICH

Die Protein C Rocket-EID (Elektroimmundiffusion) Methode ist zur quantitativen Bestimmung von Plasmaprotein C-Antigen durch Laurell Rocket-Elektrophorese bestimmt^{1,2}.

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Plasmaprotein, das als ein Regulator bei der Fibrinbildung eine Rolle spielt. In seiner aktivierten Form hemmt es die Thrombinbildung durch Inaktivieren der aktivierten Faktoren V und VIII³. Ein Mangel an Protein C stellt ein Thrombose-Risikofaktor dar^{5,6}, wobei die oberflächliche Thrombophlebitis das häufigste klinische Erscheinungsbild ist⁷. Das tatsächliche Fehlen von Plasmaprotein C bei Neugeborenen hat zu Thrombosen mit Todesfolge geführt⁸.

Das Helena Protein C-Rocket-EID Verfahren wird in einem 1% Agarose-Gel-Medium, das ein spezifisches Protein C-Antiserum enthält, durchgeführt. Nachdem die Plasmaproben in die Stanzlöcher der Agarose pipettiert wurden, werden die Proteine mit Elektrophorese in den Antikörperbereich diffundiert. Entlang der Migrationsachse bildet sich ein raketenförmiges Präzipitationsmuster. Die Länge dieses „Rocket“-Musters entspricht dabei der Antigenkonzentration.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Reagenzien dieses Kits sind nur zur *in-vitro* Diagnostik bestimmt. – **NICHT EINNEHMEN.** Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Siehe die Sicherheitsdatenblätter mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie Informationen zur Entsorgung. Die Plasmaprodukte sind mit negativem Befund auf Hepatitis B Antigen (HBsAg), HIV-1 und HIV-2 Antikörper und HCV-Antikörper getestet worden (wenn nicht auf Kit-Verpackung oder Fläschchen anders bezeichnet). Sie sollten trotzdem mit derselben Vorsicht wie humane Plasmaproben behandelt werden.

INHALT

1. Protein C-Antigen Rocket-Platten (Kat. Nr. 5357)

Enthält Antikörper gegen humanes Protein C von Schaf oder Ziege eingebettet in Agarose in einem Tris-Tricine-Puffer⁹ und Natriumazid als Konservierungsmittel. Zur Vermeidung toxischer Dämpfe sollte Natriumazid nicht mit säurehaltigen Lösungen vermischt werden.

Vorbereitung: Die Platte aus der Schutzverpackung nehmen und die Agarose 5-20 Minuten auf 15...30°C aufwärmen lassen.

2. Tris-Tricine-Puffer (Kat. Nr. 5358 – nicht mitgeliefert)

Verdünnter Puffer enthält 0,08 mol Tris und 0,024 mol Tricine.

Vorbereitung: Eine Packung Puffer mit entionisiertem oder destilliertem Wasser auf 1000ml verdünnen. Der Puffer ist gebrauchsfertig, wenn das ganze Material vollständig aufgelöst ist.

3. Rocket-Farbstoff (Kat. Nr. 5362 - nicht mitgeliefert)

Der Rocket-Farbstoff besteht aus Coomassie Brilliant Blue.

Vorbereitung: Den Inhalt eines Fläschchens in 450ml entionisiertes Wasser, 450ml Methanol und 100ml Essigsäure auflösen. Sehr gut mischen und falls nötig filtrieren.

4. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung, einen Rocket-Lineal und ein Befundformblatt.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Ungeöffnete Reagenzien sind unter den auf Verpackung oder Fläschchen angegebenen Lagerbedingungen bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

1. Protein C-Antigen Rocket-Platten (Kat. Nr. 5357)

Die Rocket-Platten müssen feucht im Beutel bei 2...6°C gelagert werden. **NICHT EINFRIEREN.** Die Platten sind bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil.

Anzeichen für Verfall: Die Platten verwerfen, wenn sie angetrocknet oder die Vertiefungen nicht ganz rund sind. Kristallisierung weist darauf hin, dass die Agarose eingefroren wurde.

2. Tris-Tricine-Puffer (Kat. Nr. 5358)

Der verpackte Puffer sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verdünnter Puffer ist bei 15...30°C für 2 Monate stabil.

Anzeichen für Verfall: Verpackten Puffer verwerfen, wenn er Anzeichen von Feuchtigkeit oder Verfärbung zeigt. Verdünnten Puffer verwerfen, wenn er trübe aussieht.

3. Rocket-Farbstoff (Kat. Nr. 5362)

Der Farbstoff sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

Anzeichen für Verfall: Verdunstung von Methanol hinterlässt auf der Farbstoffoberfläche einen metallischen Schimmer. Farbstoff verwerfen, sollte er die Protein-Rockets nicht ausreichend, wie in diesem Verfahren beschrieben, anfärben.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 5358 Tris-Tricine-Puffer

Kat. Nr. 5362 Rocket-Farbstoff

Kat. Nr. 5185 SARP Referenzplasma

Kat. Nr. 1283 / 4063 Zip Zone Kammer / Titan-Gel Kammer

Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

Kat. Nr. 1520 EWS Netzteil

Kat. Nr. 9015 Pufferschwämme

Kat. Nr. 5037 Blotter Pads

Kat. Nr. 1558 TITAN GEL Multifärbe-Set

Kat. Nr. 9025 IEP VuBox

Kat. Nr. 5116 I.O.D. - Inkubator, Trockenschrank, Trockner

Kat. Nr. 6210, 6211 Mikrodispenser und Röhrchen (10ml)

Fusselreie Papiertücher

Entfärbelösung: 200ml entionisiertes Wasser, 200ml Methanol und 50ml Eisessig mischen.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Plastik oder Silikonglas verwenden. Blut (9 Teile) sollte in 3,2% oder 3,8% Natriumcitrat als Antikoagulan (1 Teil) entnommen werden. 15 Minuten bei 2000-3000 g zentrifugieren und Plasma abpipettieren. Plasma bei 2...6°C lagern. Plasma sollte innerhalb von 2 Stunden verarbeitet oder tief gefroren bei -20°C für 2 Wochen oder -70°C für einen Monat gelagert werden. Vor dem Testen schnell bei 37°C auftauen. Nicht länger als 5 Minuten bei 37°C belassen.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

BITTE BEACHTEN: Platte aus dem Kühlschrank nehmen, circa 5-20 Minuten auf 15...30°C aufwärmen lassen und überschüssige Feuchtigkeit vor Gebrauch aufsaugen.

- Ein Fläschchen S.A.R.P. mit 1,0ml destilliertem oder entionisiertem Wasser rekonstituieren. Zur Herstellung der Standardkurve Verdünnungen wie folgt herstellen:

Prozent Aktivität	Verdünnung	Teile S.A.R.P.	Teile 0,85 % Kochsalz
100%		rekonstituiertes S.A.R.P., unverdünnt verwenden	
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12.5%	1:8	1	7

- Patientenproben und Kontrolle mit 0,85 % Kochsalz verdünnen. Eine 1:2 Verdünnung (1 Teil Patientenprobe und 1 Teil Kochsalz) und eine 1:4 Verdünnung (1 Teil Patientenplasma und 3 Teile Kochsalz) vorbereiten. Je nach Patientenanamnese können weitere Verdünnungen erforderlich sein. Proben mit Verdacht auf abnormale Werte müssen möglicherweise unverdünnt getestet werden.

3. Vorbereitung:

Bei Verwendung einer Zip Zone Kammer: 200ml Tris-Tricine-Puffer in jede der äußeren Kammerbereiche gießen (benötigt insgesamt 400ml Puffer) und je einen Schwammstreifen in den Puffer längs der inneren Kammerwand legen.

Bei Verwendung der TITAN GEL Kammer: 65ml Tris-Tricine-Puffer in jede der inneren Kammerbereiche gießen.

- Überschüssigen Puffer aus den Stanzlöchern der Platte entfernen. Bitte beachten: Überschüssige Flüssigkeit auf der Platte kann zu schlechten Ergebnissen führen.
- 10µl Patientenproben- oder Kontroll-Verdünnung in die vorgesehenen Stanzlöcher geben. **BITTE BEACHTEN:** Auf jeder Platte müssen Proben für die Standardkurve mitlaufen. Ein Doppelansatz der Patientenproben wird empfohlen. Beim Pipettieren der Proben in die Stanzlöcher der Platte darauf achten, dass die Pipettenspitze nicht die Wände berührt, da das Gel dadurch beschädigt werden kann.
- Die Proben 5 Minuten in die Agarose diffundieren lassen.

7. Elektrophorese:

Bei Verwendung einer Zip Zone Kammer: Die Platte mit der Agarose-Seite nach unten auf die Schwammstreifen in die Kammer legen. Der Applikationspunkt (Stanzlöcher) zeigt dabei zur Kathoden-Seite (negativ) der Kammer.

Bei Verwendung der TITAN GEL Kammer: Die Platte mit der Agarose-Seite nach unten durch sanftes Hineindrücken in den inneren Kammerbereich legen. Das Gel / die Gele so positionieren, dass die Kanten des Agars im Puffer und die Stanzlöcher zur Kathodeseite (-) der Kammer zeigen.

- Die Elektrophorese der Platten bei einem Konstantstrom von 16 mA pro Platte 3 Stunden laufen lassen.
- Die Platten nach Elektrophorese aus der Kammer nehmen. Den Kammerpuffer nach jedem Lauf verwerfen. **BITTE BEACHTEN:** Das TITAN GEL Multifärbe-Set (Kat. Nr. 1558) als Färbe- und Spülkammer verwenden.

10. Die Platte mit entionisiertem oder destilliertem Wasser abspülen und in 0,85% Kochsalz über Nacht unter sanfter Bewegung waschen.
11. Nach dem Waschvorgang über Nacht die Platte noch mal mit entionisiertem oder destilliertem Wasser abspülen
12. Die Platte mit der Agarose-Seite nach oben auf eine gerade Oberfläche legen. Die Agarose mit einem einzigen, fusselfreien Papiertuch abdecken.
13. Für 15 Minuten 2-3 Blotter Pads mit einem Entwicklungsgewicht darauf auf die Platte legen und wieder entfernen.
14. Die Platte 10-20 Minuten in einem Trockenschrank bei 60...70°C trocknen. Die Platten nicht zu lange trocknen lassen. Vollständig getrocknet ist die Platte transparent. **BITTE BEACHTEN:** Steht kein Trockenschrank zur Verfügung können die Platten, abgedeckt mit nassen, fusselfreien Papiertücher über Nacht bei 15...30°C trocknen oder 3 Stunden bei 15...30°C je nach Klimalage.
15. Nach dem Trocknen die Platte durch Eintauchen in den Rocket-Farbstoff 20 Minuten färben.
16. Die Platte 1-3 Minuten in Entfärbelösung geben. **BITTE BEACHTEN:** Sobald der Hintergrund für ein leichtes Differenzieren der Rockets klar genug ist, ist der Entfärbeprozess beendet. **BITTE BEACHTEN:** Übermäßiges Entfärben kann die Rockets verblassen lassen und damit eine korrekte Messung erschweren. Bei einem übermäßigen Entfärben den Schritt F.7. wiederholen und die Rockets neu anfärben.
17. Die Platte zweimal für jeweils 5-10 Minuten in destilliertem Wasser spülen.
18. Die Platten bei 37°C 5 Minuten trocknen lassen oder bei 15...30°C bis sie trocken sind.
19. Die Platte auf die Helena I.E.P. VuBox legen, der zuvor zum leichteren Ablesen der Rockets ein Bogen weißes Papier untergelegt wurde. Die Spitze der einzelnen Rockets mit einem Marker markieren.
20. Mit dem Helena Rocket-Lineal die Länge der einzelnen Peaks in Millimeter messen. Ein Peak wird von der oberen Kante des Stanzlochs bis zur Spitze des Rockets gemessen.
21. Die Werte der Standardkurve gegen die einzelnen Rocket-Längen auf dem Rocket Antigen-Befundblatt oder 3-zyklischen halblogarithmischem Papier auftragen.

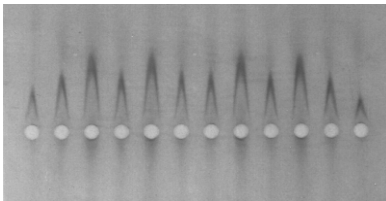
Durch diese vier Punkte eine Ausgleichsgerade ziehen. Siehe Abbildungen 1 und 2 unter AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE für ein Beispiel einer fertigen Rocket-Platte und einer auf einem Rocket Antigen-Befundblatt erstellten Standardkurve.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

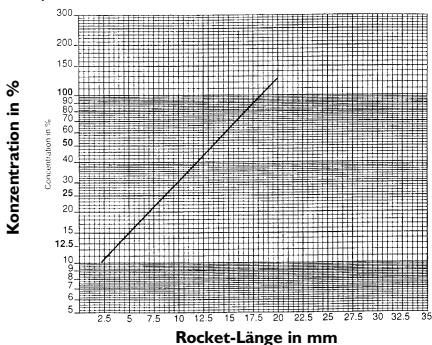
Patientenwerte aus der Standardkurve ablesen und jeden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multiplizieren. Bei Verwendung von Rocket Referenzplasma für die Standardkurve muss der aus dieser Kurve abgelesene Patientenwert mit dem zugeordneten Wert des Protein C-Antigens der entsprechenden Charge des Rocket Referenzplasmas sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Patientenwert aus der Kurve = 30 %
 Verdünnungsfaktor = 2
 S.A.R.P. zugeordneter Wert = 98 %
 Tatsächlicher Patienten-Faktor
 Protein C-Antigen = $30 \% \times 2 \times 0,98 = 58,8 \%$

Patientenproben mit Werten von Protein C-Antigen außerhalb des Bereichs der Standardkurve müssen in entsprechender Verdünnung wiederholt getestet werden.

Abbildung 1: Rocket-Muster einer Protein C-Antigen Rocket-Platte.

Die Länge der Rockets (in Millimeter) der Standard-Verdünnungen werden zur Erstellung der Standardkurve verwendet. Die Patientenwerte liest man aus dieser Kurve ab.

Abbildung 2: Eine repräsentative, mit S.A.R.P. hergestellte Standardkurve auf 3-zyklischem halblogarithmischem Papier.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor muss für eine eigene Qualitätskontrolle sorgen. Vor jeder Testreihe mit Patientenproben müssen normale und abnormale Kontrollplasmen getestet werden, um eine zufrieden stellende Geräteleistung und Bedienung zu gewährleisten. Liegen die Kontrollen außerhalb des Normbereichs, sind die Patientenergebnisse nicht zu verwenden.

In Verbindung mit diesem Produkt bietet Helena BioSciences die folgenden Kontrollen an:

Kat. Nr. 5301 S.A.C.-1

Kat. Nr. 5302 S.A.C.-2

REFERENZWERTE

Referenzwerte können je nach Technik und verwendetem System von Labor zu Labor unterschiedlich sein. Aus diesem Grund sollte jedes Labor seinen eigenen Normalwertbereich erstellen, wohl wissend, dass es zurzeit noch keinen akzeptierten internationalen Standard für das Protein C-Antigen gibt.

Die Werte des Protein C-Antigens werden in der Regel als relative Prozentsätze im Vergleich mit einem gepoolten, normalen Plasma-Standard ausgedrückt. Der erwartete Normalbereich für Protein C-Antigen mittels Rocket-Elektrophorese ist als 65-129% angegeben worden⁸, wobei Neugeborenen Werte von unter 50% aufweisen. Bertina u. a.⁷ berichten bei gesunden Personen mit verminderten Werten nach einer Antikoagulationstherapie von einem Bereich zwischen 65-145%. Es gibt anscheinend zwischen gesunden Männern und Frauen keinen Unterschied in den Protein C-Antigen Werten⁹.

Helena hat 39 Plasmen von anscheinend gesunden Männern und Frauen getestet. Folgende Testergebnisse wurden gemessen:

$$\bar{X} = 101\%$$

$$s = 24$$

$$\text{Bereich} = 53 - 149\%$$

EINSCHRÄNKUNGEN

Die meisten Patienten mit angeborenem Protein C-Mangel zeigen verringerte Werte sowohl in der immunologischen als auch funktionalen Aktivität, dem so genannten Typ I-Mangel⁷. Befunde mehrerer Patienten mit normalen Protein C-Antigen Werten und verringerter funktionaler Protein C-Aktivität, dem Typ II-Mangel⁷, erschweren jedoch die Diagnose. Mit dem Verfahren von Helena kann nur der Typ I-Mangel nachgewiesen werden.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Präzisionsstudien

Innerhalb eines Laufs: Ein Kontrollplasma wurde wiederholt auf einer Platte mit folgenden Ergebnissen getestet.

$$n = 8$$

$$\bar{X} = 91,8\%$$

$$s = 2,83$$

$$\text{VK \%} = 3,0$$

Von Lauf zu Lauf: Ein Kontrollplasma wurde wiederholt auf vier verschiedenen Platten mit folgenden Daten getestet.

$$n = 26$$

$$\bar{X} = 85,2\%$$

$$s = 6,47$$

$$\text{VK \%} = 8,0$$

Vergleichsstudien

An 43 normalen und abnormalen Patientenproben wurden Korrelationsstudien mit der Helena Protein C-Methode und einer Protein C-Referenzmethode durchgeführt. Die Studie ergab eine sehr gute lineare Regressionsgleichung und einen eben solchen Korrelationskoeffizienten.

$$n = 43 \quad Y = 0,614X + 27,006$$
$$r = 0,937$$

X = Helena Protein C-Methode
Y = Protein C-Referenzmethode

LITERATUR

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest 29 Suppl 124, 21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Nesheim, M.E., Canfield, W.M., Kisiel, W., Mann, K.G. Studies of the Capacity of Factor Xa to Protect Factor Va from Inactivation by Activated Protein C. J Biol Chem, 257:1443-1447, 1982.
4. Marlar, R.A., Kleiss, A.J., Griffin, J.H. Human Protein C: Inactivation of Factor V and VIII in Plasma by the Activated Molecule. Ann N.Y. Acad Sci, 370:303-310, 1981.
5. Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmermann, T.S., Kleiss, A.J. Wideman, C. Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease. J Clin Invest, 68:1370-1373, 1981.
6. Broekmans, A.W., Veltkamp, J.J., Bertina, R.M. Congenital Protein C Deficiency and Venous Thrombo-embolism. A Study in Three Dutch Families. N Engl J Med, 309:340-344, 1983.
7. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency. Thromb Haemostas, 51:1-5, 1984.
8. Seligsohn, U., Berger, A., Abend, M., Rubin, L., Attias, D., Zivelin, A., Rapaport, S.I. Homozygous Protein C Deficiency Manifested by Massive Venous Thrombosis in the Newborn. N Engl J Med, 310:559-562, 1984.
9. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Thromb Haemostas, 50:810-813, 1983.

PRINCIPIO

La procedura Rocket EID della proteina C (elettroimmunodiffusione) è concepita per la determinazione quantitativa dell'antigene della proteina C nel plasma mediante rocket elettroforesi di Laurell^{1,2}.

La proteina C è una proteina plasmatica, vitamina K-dipendente, che funge da regolatore della formazione di fibrina. Nella forma attiva, inibisce la formazione di trombina inattivando i fattori attivati V e VIII^{3,4}. Una carenza di proteina C costituisce un fattore di rischio trombotico^{5,6} del quale la tromboflebite superficiale è la caratteristica clinica più comune⁷. L'assenza effettiva di proteina C plasmatica ha determinato trombosi letale in neonati⁸.

La procedura rocket EID per la proteina C Helena è praticata in un terreno con gel di agarosio all'1% contenente un antisiero specifico per la proteina C. Dopo aver applicato i campioni di plasma ai pozzetti nell'agarosio, si utilizza l'elettroforesi per far migrare le proteine nel campo dell'anticorpo. Lungo l'asse di migrazione si costituisce un pattern della precipitina a forma di razzo (rocket). La lunghezza di tale pattern a forma di razzo è proporzionale alla concentrazione di antigene.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica *in vitro* - **NON INGERIRE**. Indossare i guanti durante la manipolazione di tutti i componenti del kit. Fare riferimento alle schede tecniche e ai dati di sicurezza per le avvertenze sulla sicurezza e sui rischi e per le informazioni sullo smaltimento. I prodotti plasmatici sono stati esaminati dando esito negativo (salvo diversamente indicato sulla confezione del kit o sul flacone) relativamente alla presenza dell'antigene dell'epatite B (HbsAg), dell'anticorpo anti-HIV 1 e 2 e dell'anticorpo anti-HCV; questi prodotti devono tuttavia essere manipolati con le stesse misure precauzionali adottate per un campione di plasma umano.

COMPOSIZIONE

1. Piastre rocket per l'antigene della proteina C (Cod. N. 5357)

Ogni piastra contiene anticorpo di ovino o caprino diretto verso la proteina C incorporata nell'agarosio in tampone Tris-tricina⁸ e sodio azide come conservante. Per prevenire la formazione di vapori tossici, la sodio azide non deve essere miscelata con soluzioni acide.

Preparazione: Estrarre la piastra dalla confezione di protezione e lasciare trascorrere 5-20 minuti finché l'agarosio non raggiunge 15...30°C.

2. Tampone Tris-tricina (Cod. N. 5358 - non compreso)

Il tampone diluito contiene 0,08 M di Tris e 0,024 M di tricina.

Preparazione: Diluire una confezione di tampone a 1000ml con acqua deionizzata e distillata. Il tampone è pronto per l'uso non appena tutto il materiale appare completamente disciolto.

3. Colorazione rocket (Cod. N. 5362 - non compreso)

La colorazione Rocket è Coomassie Brilliant Blue.

Preparazione: Dissolvere il contenuto di un flacone in 450ml di acqua deionizzata, 450ml di metanolo e 100ml di acido acetico. Miscelare bene e filtrare prima dell'uso se necessario.

4. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene le istruzioni per l'uso, una riga per i rocket e un modulo di resoconto.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I reagenti non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati nelle condizioni riportate sul flacone o sull'etichetta del kit.

1. Piastre rocket per l'antigene della proteina C (Cod. N. 5357)

Le piastre rocket devono essere conservate a 2...6°C e mantenute in condizioni di umidità all'interno della busta. **NON CONGELARE.** Le piastre sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Segni di deterioramento: Gettare la piastra se è secca e se i pozzetti non sono rotondi. Un aspetto cristallino è indicativo di un congelamento dell'agarosio.

2. Tampone Tris-tricina (Cod. N. 5358)

Il tampone confezionato deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C.

Segni di deterioramento: Gettare il tampone confezionato se il materiale mostra segni di umidità o scolorimento. Gettare il tampone diluito se diventa torbido.

3. Colorazione rocket (Cod. N. 5362)

Il colorante deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Segni di deterioramento: Se il metanolo evapora, sarà visibile una lucentezza metallica sulla superficie del colorante. Gettare il colorante se non colora adeguatamente i rocket di proteine come descritto in questa procedura.

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

Cod. N. 5358 Tampone Tris - Tricina

Cod. N. 5362 Colorazione Rocket

Cod. N. 5185 Plasma di riferimento SARP

Cod. N. 1283 / 4063 Camera Zip Zone / Camera Titan Gel

Cod. N. 5014 Peso di sviluppo

Cod. N. 1520 Alimentatore EWS

Cod. N. 9015 Stuessli di spugna

Cod. N. 5037 Compresse per Blotter

Cod. N. 1558 Set a più coloranti TITAN GEL

Cod. N. 9025 IEP VuBox

Cod. N. 5116 I.F.E. - Incubatore, forno, essiccatore

Cod. N. 6210, 6211 Microdispenser e provette (10ml)

Salvietta non filacciosa

Soluzione decolorante: Miscelare 200ml di acqua deionizzata, 200ml di metanolo e 50ml di acido acetico glaciale.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro siliconizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodio citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 2000-3000 x g per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a 2...6°C. I test devono essere completati entro 2 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per un mese. Decongelare rapidamente a 37°C prima di eseguire i test. Non conservare a 37°C per oltre 5 minuti.

PROCEDURA

NOTA: Togliere la piastra dal frigorifero, lasciare trascorrere circa 5-20 minuti affinché la piastra raggiunga 15...30°C e l'umidità in eccesso venga assorbita prima dell'uso.

1. Ricostituire un flacone di S.A.R.P. con 1,0ml di acqua distillata o deionizzata. Eseguire le diluizioni per la preparazione della curva standard nel seguente modo:

Attività percentuale	Diluizione	Parti S.A.R.P.	Parti di salina allo 0,85%
100%	Usare S.A.R.P. ricostituita non diluita		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12.5%	1:8	1	7

2. Diluire ogni campione di paziente ed ogni controllo salina allo 0,85%. Preparare una diluizione 1:2 (1 parte di campione paziente e 1 parte di salina) ed una diluizione 1:4 (1 parte di plasma paziente e 3 parti di salina). in base all'anamnesi del paziente possono rendersi necessarie ulteriori diluizioni. I campioni anomali sospetti possono richiedere l'esecuzione del test senza diluizione.

3. Preparazione:

Se si usa la camera Zip Zone: Versare 200ml di tampone Tris-tricina in ognuna delle sezioni esterne della camera (in totale sono necessari 400ml di tampone) e mettere uno stuello di spugna nel tampone lungo ogni parete interna della camera.

Se si usa la camera TITAN GEL: Versare 65ml di tampone Tris-tricina in ogni sezione interna della camera.

4. Eliminare ogni eccesso di tampone dai pozzetti della piastra. **NOTA:** la presenza di umidità in eccesso sulla piastra può determinare rocket scadenti.
5. Applicare 10 μ l di ogni diluizione di campioni paziente e di controlli ai pozzetti designati. **NOTA:** su ogni piastra devono essere testati campioni con curva standard. Sono consigliabili applicazioni in doppio di campioni dei pazienti. Quando i campioni vengono applicati ai pozzetti della piastra, non toccare con la punta della pipetta i lati dei pozzetti poiché potrebbero essere danneggiati.
6. Attendere 5 minuti affinché i campioni si diffondano nell'agarosio.

7. Elettroforesi:

Se si usa la camera Zip Zone: Mettere la piastra, con lato agarosio rivolto verso il basso, nella camera sugli stueili di spugna. Rivolgere il punto di applicazione (pozzetti) verso il lato del catodo (negativo) della camera.

Se si usa la camera TITAN GEL: Mettere la piastra nella sezione interna della camera, con il lato agarosio rivolto verso il basso, schiacciando delicatamente il gel nella posizione corretta. Posizionare il/i gel in modo che i margini dell'agar siano all'interno del tampone ed i pozzetti siano rivolti verso il lato catodico (-) della camera.

8. Sottoporre ad elettroforesi le piastre con una corrente costante di 16mA per piastra per 3 ore.
9. Terminata l'elettroforesi, togliere le piastre dalla camera. gettare il tampone della camera dopo ogni ciclo.

NOTA: Utilizzo del set a più coloranti TITAN GEL (Cod. N. 1558) come camera per la colorazione e il lavaggio.

ROCKET EID PER L'ANTIGENE DELLA PROTEINA C

10. Sciacquare la piastra con acqua deionizzata o distillata e lavarla in salina a 0,85% overnight con delicato moto agitato.
11. Dopo il lavaggio overnight, sciacquare la piastra con acqua deionizzata o distillata.
12. Sistemare la piastra su una superficie piana, con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto. Coprire l'agarosio con una salvietta singola non filacciosa.
13. Collocare 2-3 compresse per Blotter ed un peso di sviluppo sulla piastra per 15 minuti e quindi rimuoverle.
14. Asciugare la piastra nel forno a 60...70°C per 10-20 minuti. Non asciugare eccessivamente le piastre. La piastra sarà trasparente quando completamente asciutta. **NOTA:** Se non è disponibile un forno/essiccatrice, è possibile coprire le piastre con una salvietta inumidita non filacciosa e lasciarle asciugare a 15...30°C overnight o sotto un ventilatore per 3 ore a 15...30°C come da necessità del clima presente.
15. Terminata l'essiccazione, colorare la piastra immergendola in colorante rocket per 20 minuti.
16. Sciacquare la piastra nella soluzione decolorante per 1-3 minuti. **NOTA:** La decolorazione è completa non appena il background è sufficientemente trasparente da lasciare facilmente distinguere i picchi a forma di razzo. **NOTA:** Una decolorazione eccessiva può schiarire i rocket rendendo così difficile eseguire determinazioni corrette. Se si verifica una decolorazione eccessiva, ripetere la fase F.7. e colorare di nuovo i rocket.
17. Sciacquare la piastra due volte in acqua purificata per 5-10 minuti per ogni lavaggio.
18. Essiccare il gel a 37°C per 5 minuti o a 15...30°C finché non risulterà essiccato.
19. Riporre la piastra su I.E.P. VuBox Helena utilizzando un pezzo di carta bianca sul fondo del VuBox per facilitare la visualizzazione dei rocket. Contrassegnare l'apice di ciascun picco di rocket con un marker.
20. Con l'impiego della riga per i rocket Helena, misurare la lunghezza di ogni picco in millimetri. Il picco viene misurato dalla sommità di ogni pozzetto fino all'apice del rocket.
21. Tracciare i valori della curva standard rispetto all'altezza di ciascun rocket sul modulo di resoconto rocket dell'antigene o su carta semi-logaritmica a 3 cicli.

Tracciare la "linea di migliore adattamento" dei quattro punti. Fare riferimento alle figure 1 e 2 nella INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI per un esempio di una piastra rocket completa ed una curva standard tracciata su un modulo di resoconto rocket antigene.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sulla curva standard leggere i valori del paziente e moltiplicarli per il fattore di diluizione corretto. Se si usa plasma di riferimento rocket per preparare la curva standard, il valore del paziente letto su tale curva deve essere moltiplicato per il valore assegnato dell'antigene della proteina C appartenente al rispettivo lotto di plasma di riferimento rocket ed anche per il fattore di diluizione.

Valore del paziente ottenuto dalla curva = 30%

Fattore di diluizione = 2

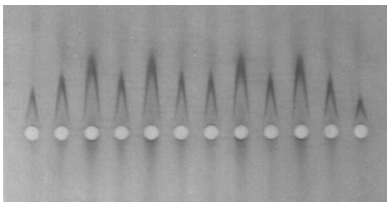
Valore S.A.R.P. assegnato = 98%

Fattore effettivo del paziente

Antigene proteina C = 30% x 2 x 0,98 = 58,8%

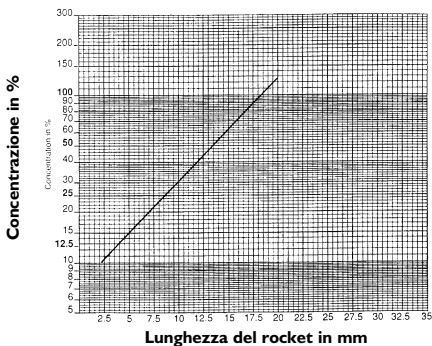
I campioni dei pazienti con livelli di antigene proteina C superiori al range della curva standard devono essere ridosati con l'impiego della diluizione adeguate.

Figura 1. Pattern rocket su una piastra rocket per l'antigene della proteina C.



Per preparare la curva standard si utilizzano le lunghezze dei rocket (in millimetri) delle diluizioni standard. I risultati del paziente sono leggibili sulla curva.

Figura 2. Curva standard rappresentativa preparata con S.A.R.P. su carta semi-logaritmica a 3 cicli.



CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmi di controllo normali e anomali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che per l'operatore. Qualora i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi.

Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

Cod. N. 5301 S.A.C.-1

Cod. N. 5302 S.A.C.-2

VALORI DI RIFERIMENTO

I valori di riferimento possono variare tra i singoli laboratori in funzione delle tecniche e dei sistemi utilizzati. Per questa ragione ogni laboratorio deve stabilire un proprio range normale con la consapevolezza che attualmente non esiste uno standard internazionale accettato per l'antigene proteina C.

I valori di attività della proteina C vengono solitamente espressi in percentuali relative rispetto ad uno standard di plasma normale in pool. Il range normale previsto per l'antigene della proteina C ottenuto con rocket elettroforesi è stato registrato con valori del 65-129%⁸ in neonati con livelli inferiori al 50%. Bertina et al.⁷ hanno segnalato un range di 65-145% in soggetti sani con livelli ridotti riscontrati in seguito a terapia anticoagulante. Apparentemente non esiste differenza nei livelli di antigene della proteina C tra soggetti sani di sesso maschile e femminile.⁹

Helena ha testato 39 plasmi di uomini e donne supposti sani. I risultati ottenuti sono i seguenti:

$$\begin{aligned}\bar{X} &= 101\% \\ SD &= 24 \\ \text{Range} &= 53-149\%\end{aligned}$$

LIMITI

La maggior parte dei pazienti con carenza di proteina C congenita presenta livelli ridotti sia di attività immunologica che funzionale, la cosiddetta carenza di tipo I⁷. Tuttavia, i livelli normali di antigene della proteina C e la diminuzione dell'attività funzionale della proteina C, riscontrati in parecchi pazienti, carenza di tipo II⁷, rendono la diagnosi più difficile. La procedura Helena rileva solo la deficienza di tipo I.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI STUDI DI PRECISIONE

Entro la serie: È stato testato un plasma di controllo in repliche su una piastra con i risultati riportati di seguito.

$$\begin{aligned}n &= 8 & \bar{X} &= 91,8\% \\ & & SD &= 2,83 \\ & & CV\% &= 3,0\end{aligned}$$

Serie per serie: È stato testato un plasma di controllo in repliche su quattro piastre diverse che ha dato i seguenti risultati.

$$\begin{aligned}n &= 26 & \bar{X} &= 85,2\% \\ & & SD &= 6,47 \\ & & CV\% &= 8,0\end{aligned}$$

Studi comparativi

Sono stati condotti studi di correlazione su 43 campioni di pazienti normali ed anomali con il metodo per proteina C Helena ed il metodo per proteina C di riferimento. Dallo studio sono emerse un'equazione di regressione lineare ed un coefficiente di correlazione ottimi.

$$n = 43$$
$$Y = 0,614X + 27,006$$
$$r = 0,937$$

X = Proteina C Helena
Y = Metodi proteina C di riferimento

BIBLIOGRAFIA

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest 29 Suppl 124, 21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Nesheim, M.E., Canfield, W.M., Kiesel, W., Mann, K.G. Studies of the Capacity of Factor Xa to Protect Factor Va from Inactivation by Activated Protein C. J Biol Chem, 257:1443-1447, 1982.
4. Marlar, R.A., Kleiss, A.J., Griffin, J.H. Human Protein C: Inactivation of Factor V and VIII in Plasma by the Activated Molecule. Ann N.Y. Acad Sci, 370:303-310, 1981.
5. Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmermann, T.S., Kleiss, A.J. Wideman, C. Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease. J Clin Invest, 68:1370-1373, 1981.
6. Broekmans, A.W., Veltkamp, J.J., Bertina, R.M. Congenital Protein C Deficiency and Venous Thrombo-embolism. A Study in Three Dutch Families. N Engl J Med, 309:340-344, 1983.
7. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency. Thromb Haemostas, 51:1-5, 1984.
8. Seligsohn, U., Berger, A., Abend, M., Rubin, L., Attias, D., Zivelin, A., Rapaport, S.I. Homozygous Protein C Deficiency Manifested by Massive Venous Thrombosis in the Newborn. N Engl J Med, 310:559-562, 1984.
9. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Thromb Haemostas, 50:810-813, 1983.

USO PREVISTO

El procedimiento de EID Rocket de la proteína C (electroinmunodifusión) está previsto para la determinación cuantitativa del antígeno de la proteína C plasmática mediante electroforesis rocket de Laurell^{1,2}.

La proteína C es una proteína plasmática dependiente de la vitamina K que funciona como regulador de la formación de fibrina. En su forma activada, inhibe la formación de trombina mediante la inactivación de los factores activados V y VIII^{3,4}. Una deficiencia de la proteína C constituye un factor de riesgo trombotico^{5,6} del cual la tromboflebitis superficial es la característica clínica más frecuente⁷. La ausencia virtual de proteína C plasmática ha conducido a trombosis mortal en neonatos⁸.

El procedimiento de EID Rocket de proteína C de Helena se realiza en un medio de gel de agarosa al 1% con un antisuero específico para la proteína C. Después de que las muestras de plasma se apliquen a los pozos en la agarosa, se usa la electroforesis para hacer migrar las proteínas hacia el campo del anticuerpo. Se forma un patrón de precipitina en forma de cohete a lo largo del eje de migración. La longitud de este patrón de cohete es proporcional a la concentración de antígeno.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos contenidos en este kit son sólo para uso diagnóstico. **NO SE DEBEN INGERIR.** Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos, avisos de seguridad y consejos para su eliminación. Se han estudiado los productos plasmáticos y han resultado negativos (a menos que se indique otra cosa en la caja del kit o en el vial) para la presencia de antígeno de la hepatitis B (HbsAg), anticuerpos frente a VIH 1 y VIH 2 y anticuerpo del VHC, aunque deben manejarse con las mismas precauciones que una muestra de plasma humano.

COMPOSICIÓN

1. Placas Rocket de antígeno de la proteína C (Nº Cat. 5357)

Contiene anticuerpo de oveja o carnero a la proteína C humana incorporado a la agarosa en tampón Tris-tricina⁹ y azida sódica como conservante. Para evitar la formación de vapores tóxicos, no debe mezclarse azida de sodio con soluciones ácidas.

Preparación: Sacar la placa del envase protector y dejar transcurrir 5-20 minutos para que la agarosa alcance los 15...30°C.

2. Tampón de Tris-tricina (Nº Cat. 5358, no incluido)

El tampón diluido contiene 0,08 M de Tris y 0,024 M de tricina.

Preparación: Diluir un paquete de tampón en 1000ml de agua desionizada o destilada. El tampón está listo para usar cuando todo el material está completamente disuelto.

3. Colorante Rocket (Nº Cat. 5362 – no incluido)

El colorante Rocket es colorante azul brillante Coomassie.

Preparación: Disolver el contenido de un vial en 450ml de agua desionizada, 450ml de metanol y 100ml de ácido acético. Mezclar bien y filtrar antes de usar, si fuera necesario.

4. Otros componentes del kit

Cada kit contiene instrucciones de uso, una regla de cohete y un formulario de informe.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

Los reactivos no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se conservan en las condiciones indicadas en el vial o en la etiqueta del kit.

1. Placas de Rocket de antígeno de proteína C (Nº Cat. 5357)

Las placas Rocket deben conservarse a 2...6°C y mantenerse en condición húmeda dentro de la bolsa. **NO CONGELAR.** Las placas permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el paquete.

Signos de deterioro: Desechar la placa si parece que está seca o si los pozos no son redondos. Una apariencia cristalina indica que la agarosa se ha congelado.

2. Tampón de Tris-tricina (Nº Cat. 5358)

El tampón envasado debe almacenarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El tampón diluido permanece estable durante 2 meses a 15...30°C.

Signos de deterioro: Desechar el tampón envasado si el material muestra signos de humedad o decoloración. Desechar el tampón diluido si se hace turbio.

3. Colorante Rocket (Nº Cat. 5362)

El colorante ha de almacenarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.

Signos de deterioro: Si se evapora el metanol, se podrá apreciar un brillo metálico en la superficie del colorante. Desechar el colorante si no tiñe adecuadamente los cohetes de proteínas como se describe en este procedimiento.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº Cat. 5358 Tampón de Tris - Tricina

Nº Cat. 5362 Colorante Rocket

Nº Cat. 5185 Plasma de referencia SARP

Nº Cat. 1283 / 4063 Cámara Zip Zone / Cámara Titan Gel

Nº Cat. 5014 Peso de desarrollo

Nº Cat. 1520 Fuente de alimentación EWS

Nº Cat. 9015 Mechales de esponja

Nº Cat. 5037 Láminas secantes

Nº Cat. 1558 Equipo de Multicolorante TITAN GEL

Nº Cat. 9025 VuBox IEP

Nº Cat. 5116 I.O.D.: Incubador, Horno, Secador

Nº Cat. 6210, 6211 Microdispensador y tubos (10ml)

Tejido carente de pelusa

Solución decolorante: Mezclar 200ml de agua desionizada, 200ml de metanol y 50ml de ácido acético glacial.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Debe usarse siempre plástico o vidrio silicizado. Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% 50 minutos. El plasma debe conservarse a 2...6°C. Las pruebas deberían terminarse en 2 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20°C durante 2 semanas o -70°C durante un mes. Descongelar rápidamente a 37°C antes de realizar la prueba. No conservar a 37°C durante más de 5 minutos.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

NOTA: Sacar la placa del refrigerador, dejar transcurrir aproximadamente 5-20 minutos para que la placa alcance los 15...30°C y para que se absorba cualquier exceso de humedad antes de utilizarla.

1. Reconstituir un vial de S.A.R.P con 1,0 ml de agua destilada o desionizada. Realizar diluciones para preparar la Curva estándar como sigue:

Porcentaje actividad	Dilución	Partes S.A.R.P.	Partes solución salina al 0,85%
100%	Usar S.A.R.P. reconstituido, no diluido		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12.5%	1:8	1	7

2. Diluir cada control y muestra de paciente con solución salina al 0,85%. Preparar una dilución 1:2 (1 parte muestra del paciente y 1 parte solución salina) y una dilución 1:4 (1 parte plasma del paciente y 3 partes solución salina). Es posible que sea necesario realizar diluciones adicionales dependiendo de los antecedentes del paciente. Las muestras con sospecha de ser anormales podrían tener que ser estudiadas sin diluir.

3. Preparación:

Si se utiliza una Cámara Zip Zone: Verter 200ml de tampón de Tris-tricina en cada una de las secciones exteriores de la cámara (es necesario en total 400ml de tampón) y colocar una mecha de esponja en el tampón en cada una de las paredes internas de la cámara.

Si se utiliza una Cámara TITAN GEL: Verter 65ml de tampón de Tris-tricina en cada una de las secciones internas de la cámara.

4. Retirar cualquier exceso de tampón de los pozos de la placa. **NOTA:** El exceso de humedad en la placa puede producir malos cohetes.
5. Aplicar 10µl de cada dilución de las muestras del paciente y controles en los pozos designados. **NOTA:** Deben realizarse curvas estándar en cada placa. Se recomienda realizar aplicaciones duplicadas de las muestras del paciente. Al aplicar las muestras a los pozos de la placa, no dejar que la punta de la pipeta toque los laterales de los pozos ya que se podrían producir daños.
6. Dejar transcurrir 5 minutos para que las muestras se difundan en la agarosa.

7. Electroforesis:

Si se utiliza una Cámara Zip Zone: Colocar la placa, con la agarosa hacia abajo, en la cámara con las mechas de esponja. Colocar el punto de aplicación (pozos) hacia el lado del cátodo (-) de la cámara.

Si se utiliza una Cámara TITAN GEL: Colocar la placa en la sección interna de la cámara, con la agarosa hacia abajo, apretando con suavidad el gel para colocarlo. Situar el(los) gel(es) de forma que los bordes de la agarosa estén en el tampón y los pozos estén situados hacia el lado del cátodo (-) de la cámara.

8. Realizar la electroforesis de las placas a una corriente constante de 16 mA por placa durante 3 horas.
9. Después de la electroforesis, sacar las placas de la cámara. Desechar el tampón de la cámara después de cada desarrollo.

NOTA: Usar el Equipo de multicoloración TITAN GEL (Nº Cat. 1558) como cámara de coloración y aclarado.

10. Aclarar la placa con agua desionizada o destilada y dejarla lavando por la noche en una solución salina al 0,85% agitándola suavemente.
11. Después de haberlo lavado por la noche, aclarar la placa con agua desionizada o destilada.
12. Colocar la placa sobre una superficie plana, con la agarosa hacia arriba. Cubrir la agarosa con un paño sin pelusa.
13. Colocar 2-3 láminas secantes y un peso de desarrollo sobre la placa durante 15 minutos y retirar.
14. Secar la placa en un horno de secado a 60...70°C durante 10-20 minutos. No secar en exceso las placas. Cuando la placa esté transparente, estará completamente seca. **NOTA:** Si el secador/horno no está disponible, pueden cubrirse las placas con paños sin pelusa húmedos y dejarlas secar a 15...30°C toda la noche o colocarlas bajo un ventilador durante 3 horas a 15...30°C, según requiera el clima.
15. Después del secado, teñir la placa sumergiéndola en el Colorante Rocket durante 20 minutos.
16. Colocar la placa en la solución decolorante durante 1-3 minutos. **NOTA:** La decoloración finaliza en cuanto el fondo se aclare lo suficiente para poder distinguir fácilmente los picos del cohete. **NOTA:** Si se decolora en exceso, puede perderse el color de los cohetes con lo que resultaría difícil realizar una medición correcta. En caso de que se decolore demasiado, volver a repetir el paso F0,7, y colorear los cohetes de nuevo.
17. Aclarar la placa dos veces en agua destilada durante 5-10 minutos cada vez.
18. Secar las placas a 37°C durante 5 minutos o a 15...30°C hasta que se sequen.
19. Colocar la placa en el VuBox I.E.P. de Helena usando un fragmento de papel blanco en la parte inferior del VuBox para ver más fácilmente los cohetes. Marcar el vértice de cada pico de cohete con rotulador.
20. Usando, la regla de cohete Helena, medir la longitud de cada pico en milímetros. El pico se mide desde la parte superior de cada pozo al vértice del cohete.
21. Representar los valores de la curva estándar frente a la altura de cada cohete en el impreso de informe del antígeno del cohete o en papel semilogarítmico de 3 ciclos.

Dibujar la línea de mejor ajuste para los cuatro puntos. Ver las Figuras 1 y 2 en INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS para ver un ejemplo de Placa Rocket terminada y una curva estándar dibujada en un Impreso de Informe de Antígeno Rocket.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Leer los valores del paciente desde la curva estándar y multiplicar cada uno de ellos por el factor de dilución apropiado. Si se usa el Plasma de Referencia de Rocket para preparar la curva estándar, el valor del paciente leído de esa curva debe multiplicarse por el valor asignado de antígeno de la proteína C del lote adecuado de Plasma de referencia Rocket así como el factor de dilución.

Valor del paciente de la curva = 30%

Factor de dilución = 2

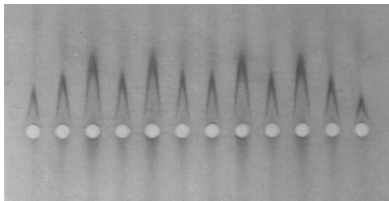
Valor asignado S.A.R.P. = 98%

Factor real del paciente

Antígeno de proteína C = $30\% \times 2 \times 0,98 = 58,8\%$

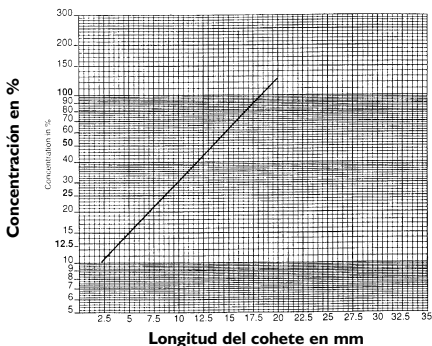
Las muestras de paciente con niveles de antígeno de proteína C superiores al intervalo de la curva estándar deben volver a estudiarse utilizando las diluciones apropiadas.

Figura 1: Patrones de Rocket en una placa de Rocket de antígeno de proteína C.



Se usan las longitudes de los cohetes (en milímetros) de las diluciones estándar para elaborar la curva estándar. Los resultados del paciente se leen a partir de la curva.

Figura 2: Una curva estándar representativa elaborada con S.A.R.P. en papel semilogarítmico de 3 ciclos.



CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad. Los controles normales y anormales deben estudiarse antes de cada lote de muestras del paciente, para asegurar un funcionamiento adecuado del instrumento y el operador. Si los controles no se realizan como se esperaba, los resultados del paciente deben considerarse inválidos.

Helena BioSciences suministra los siguientes controles disponibles para usar con este producto:

Nº Cat. 5301 S.A.C. -1

Nº Cat. 5302 S.A.C. -2

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debería establecer su propio intervalo normal pero hay que tener en cuenta que actualmente no hay ningún estándar internacional aceptado para el antígeno de Proteína C.

Los valores del antígeno de la proteína C suelen expresarse en porcentajes relativos en comparación con un estándar de plasma normal acumulado. El intervalo normal esperado para el antígeno de la proteína C estudiado mediante electroforesis de cohete ha sido comunicado como 65-129%⁸ y los neonatos muestran niveles menores de 50%. Bertina, y cols.⁷ comunicaron un intervalo del 65-145% en individuos sanos en los que se encuentran niveles reducidos después del tratamiento anticoagulante. Aparentemente no existe ninguna diferencia en los niveles de antígeno de proteína C entre hombres sanos y mujeres sanas.

Helena realizó pruebas con 39 plasmas de hombres y mujeres presuntamente sanos. Los resultados fueron los siguientes:

$$\bar{X} = 101\%$$

$$DE = 24$$

$$\text{Intervalo} = 53-149\%$$

LIMITACIONES

La mayoría de los pacientes con deficiencia congénita de proteína C muestran niveles reducidos de actividad inmunológica y funcional, la denominada deficiencia de tipo I⁷. Sin embargo, el hallazgo de varios pacientes con niveles normales de antígeno de la proteína C y disminución de la actividad funcional de la proteína C, deficiencia de tipo II⁷, dificulta el diagnóstico. El procedimiento de Helena detectará únicamente las deficiencias de tipo I.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Estudios de precisión

Dentro de cada prueba: Se estudió un plasma de control por duplicado en una placa con los siguientes resultados.

$$n = 8$$

$$\bar{X} = 91,8\%$$

$$DE = 2,83$$

$$\%CV = 3,0$$

Entre pruebas: Se estudió un plasma de control por duplicado en cuatro placas diferentes y se obtuvieron los siguientes resultados.

$$n = 26$$

$$\bar{X} = 85,2\%$$

$$DE = 6,47$$

$$\%CV = 8,0$$

Estudios comparativos

Se realizaron estudios de correlación con 43 muestras de paciente normales y anormales con el método de Proteína C de Helena y el método de Proteína C de referencia. El estudio dio una ecuación de regresión lineal y un coeficiente de correlación excelentes.

$$n = 43$$
$$Y = 0,614X + 27,006$$
$$r = 0,937$$

X = Proteína C de Helena
Y = Método de Proteína C de referencia

BIBLIOGRAFÍA

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest 29 Suppl 124, 21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Nesheim, M.E., Canfield, W.M., Kisiel, W., Mann, K.G. Studies of the Capacity of Factor Xa to Protect Factor Va from Inactivation by Activated Protein C. J Biol Chem, 257:1443-1447, 1982.
4. Marlar, R.A., Kleiss, A.J., Griffin, J.H. Human Protein C: Inactivation of Factor V and VIII in Plasma by the Activated Molecule. Ann N.Y. Acad Sci, 370:303-310, 1981.
5. Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmermann, T.S., Kleiss, A.J. Wideman, C. Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease. J Clin Invest, 68:1370-1373, 1981.
6. Broekmans, A.W., Veltkamp, J.J., Bertina, R.M. Congenital Protein C Deficiency and Venous Thrombo-embolism. A Study in Three Dutch Families. N Engl J Med, 309:340-344, 1983.
7. Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-Van Es, C., Van Wijngaarden, A. The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency. Thromb Haemostas, 51:1-5, 1984.
8. Seligsohn, U., Berger, A., Abend, M., Rubin, L., Attias, D., Zivelin, A., Rapaport, S.I. Homozygous Protein C Deficiency Manifested by Massive Venous Thrombosis in the Newborn. N Engl J Med, 310:559-562, 1984.
9. Pabinger-Fasching, I., Bertina, R.M., Lechner, K., Niesser, H., Korninger, Ch. Protein C Deficiency in Two Austrian Families. Thromb Haemostas, 50:810-813, 1983.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-1424P 2007/05 (3)