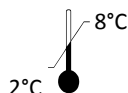


ACTICLOT® Protein S

REF 843L



EC

REP

Obelis s.a
Bd. Général Wahis 53, 1030 Brussels, BELGIUM

INTENDED USE

ACTICLOT® Protein S is a functional clotting assay intended for the quantitative determination of Protein S activity in human plasma. The assay is for *in vitro* diagnostic use.

PRINCIPLE

The ACTICLOT Protein S assay is a clotting-based plasma assay. In the assay, dilutions of patient plasma are mixed with Protein S depleted plasma. A reagent that contains factor Xa, activated Protein C and phospholipids is added to the mixture. Following a 5-minute incubation period, calcium chloride is added to initiate clot formation. Under these conditions, the prolongation of the clotting time is directly proportional to the concentration of Protein S in the patient plasma.

BACKGROUND

DiScipio and colleagues first identified human Protein S (S for Seattle) in 1977.¹ Human Protein S is a single chain glycoprotein of 635 amino acids (69,000 kD) that circulates in plasma at a concentration of about 320 nM. The active Protein S gene has 15 exons and spans more than 80 kilobases on Chromosome 3.² Protein S is a vitamin K-dependant protein primarily synthesized in the liver but also in the endothelium and possibly in megakaryocytes. It is possible that all three sources of Protein S play a significant role in regulating haemostasis.

Protein S did not appear to be the zymogen precursor of a serine proteinase and no function was known until 1980 when Walker reported that the bovine Protein S functions as a cofactor for activated Protein C in the inactivation of activated factor V.³ The biologic importance of the regulation of coagulation by the pathway involving Protein C, Protein S and thrombomodulin has been substantiated by clinical studies. An association between thrombosis and partial deficiencies of Protein S has been documented in certain families.^{4,5,6} Protein S has been also found on the surface of endothelial cells and platelets.⁷ Approximately 60% of Protein S in human plasma is tightly bound to C4b-binding protein, therefore, plasma levels of Protein S may not completely reflect its bioavailability.⁸ This complex has no anticoagulant cofactor activity. It has been suggested that Protein S may have a role in the complement system by mediating the association of C4b-binding protein (C4bBP) with cell surfaces that have been damaged or activated to expose negatively charged phospholipids.⁹ This may represent another important regulatory mechanism for Protein S.

REAGENTS

- R1 4 vials ACTICLOT Activator Reagent (each vial contains 1 mL lyophilised material containing human activated Protein C, bovine factor Xa, and rabbit brain phospholipid).
- R2 4 vials Protein S Depleted Plasma (each vial contains 1 mL of lyophilised human plasma that has been depleted of Protein S by immunoadsorption on a column of immobilized goat antibody to human Protein S).
- R3 2 vials Sample Dilution Buffer, 10X Concentrate (2.5 mL concentrate, which upon dilution contain 0.2 M NaCl, 0.03 M HEPES and a sufficient quantity of Polybrene® † to neutralize up to 1.2 U/mL heparin in a plasma sample).
- R4 2 vials Protein S Control Plasma (each vial contains 0.5 mL of citrated lyophilised normal human plasma whose Protein S clotting activity level has been determined and is printed on the vial label).

This kit contains sufficient reagents for 40-160 test points, depending on whether performed by manual or automated method and the type of instrument utilized.

WARNING

Each donor unit used in the preparation of the activator reagent, depleted and control plasmas has been tested by an FDA cleared method and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). As no known test method can offer complete assurance that HBsAg, HCV, HIV-1 or other infectious agents are absent, this reagent should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. Observe good laboratory hygiene practices.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Automated photo-optical coagulation analyser, or mechanical clot timer, or stopwatch
0.025 M Calcium chloride solution
Type I deionised water
Incubator or water bath at 37°C
25 mL graduated cylinder
100-1000 µL variable volume pipette
Graph paper
Centrifuge (capable of 2,500 x g)

REAGENT RECONSTITUTION AND STABILITY

Unreconstituted reagents are stable until the expiration date indicated on the vial label, when stored at 2° - 8° C.

A. ACTICLOT Activator Reagent (R1)

Reconstitute with 1 mL Type I deionised water. Let stand at room temperature (18° - 25°C) for 20 minutes for complete dissolution. Store at 2° - 8°C and use within 4 hours. Reconstituted Activator Reagent may be frozen for:

	30 days
	-20°C

B. Protein S Depleted Plasma (R2)

Reconstitute with 1 mL Type I deionised water. Mix gently and let stand at room temperature for 20 minutes for complete dissolution. Store at 2° - 8°C and use within 4 hours. Reconstituted Depleted Plasma may be frozen for:

	30 days
	-20°C

C. Sample Dilution Buffer (R3)

Dilute contents of one vial to 25 mL with Type I deionised water. Store for:

	30 days
	2° - 8°C

D. Protein S Control Plasma (R4)

Reconstitute with 0.5 mL Type I deionised water. Mix gently and let stand at room temperature for 20 minutes for complete dissolution. Transfer to a plastic test tube. Reconstituted reagent is stable for:

	1 hour
	2° - 8°C

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

See "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008¹⁰. Plasma collection should be performed as follows:

1. Collect 9 volumes of blood in 1 volume of 0.1 M trisodium citrate.
2. Centrifuge the blood sample at 2,500 x g for 15 minutes.
3. Plasma should be stored at 2° to 8°C and assayed within 2 hours. Alternatively, plasma may be stored for:

	1 month
	-20°C

4. Frozen plasma may be thawed once at 37°C, 30 minutes before use.

TRACEABILITY OF CONTROL MATERIALS

Information regarding traceability of control materials is available upon request from BioMedica Diagnostics.¹¹

QUALITY CONTROL

The Protein S Control plasma included in the kit has been evaluated against an internationally recognized reference preparation and may be tested as part of the laboratory quality control program for this assay. Control plasma should be included in the run whenever freshly reconstituted reagents are used. The Protein S level obtained for each control plasma should fall within the range specified by the vendor or laboratory. If the control sample fails to yield Protein S levels within the ranges specified, the run should be repeated. Contact BioMedica Diagnostics if repeated runs of controls fail to yield Protein S levels within acceptable limits.

ASSAY CALIBRATION

A new standard curve must be constructed each time the assay is performed. Pooled normal plasma (PNP) from at least 20 normal donors, which has been collected in the same manner as the plasma to be tested, should be used for the preparation of the assay standards. Commercially prepared reference plasma in which the Protein S level has been determined may also be used. Prepare the Protein S standards, control and patient plasma samples just before testing, as follows:

Standards and Samples – Recommended Dilutions

Protein S Standard Curve	PNP or Reference Plasma	Dilution Buffer
100%	100 µL	900 µL
50%	500 µL of 100% standard	500 µL
0%†	None	1000 µL
Patient and Control Plasma Samples	Patient and Control Plasma	Dilution Buffer
100%	50 µL	450 µL

† On some automated instruments; the lowest point will be a minimal dilution (approx. 12.5%) and not a "true" 0% standard.

Store diluted standards and samples on wet ice and test within 30 minutes.

ASSAY PROCEDURE

1. Transfer ACTICLOT Activator Reagent and Calcium chloride to the 37°C reagent wells of a clot timer instrument. Incubate for at least two minutes.
2. Add 0.1 mL Protein S Depleted Plasma and 0.1 mL test plasma dilution to a coagulation cuvette. Incubate for 2 minutes at 37°C.
3. Add 0.1 mL prewarmed ACTICLOT Activator Reagent to the cuvette. Incubate for exactly 5 minutes at 37°C.
4. Add 0.1 mL prewarmed Calcium Chloride. Start the timer and record the clotting time. Run each test sample and control in duplicate and average the duplicate results.

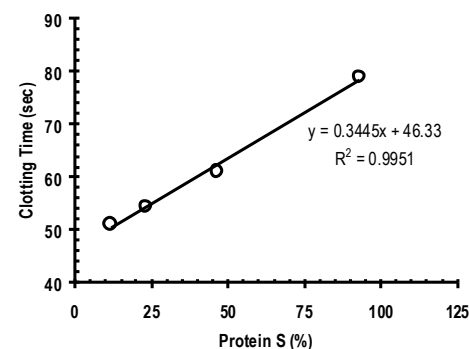
Note: To ensure accurate and reproducible results, use calibrated pipetting devices and observe the recommended procedures with particular emphasis on incubation times and temperatures.

CALIBRATION CURVE

Plot the percent Protein S activity of the calibration standards (x-axis) versus the mean clotting time (y-axis) on linear graph paper. Draw the line of best fit between the resulting points. For the patient and control samples, determine the percent Protein S activity by interpolating from the standard curve. In those patient samples with lupus anticoagulants or with abnormally high Protein S activity in which multiple dilutions were used, correct the Protein S level with the dilution factor. If the corrected Protein S levels still do not agree, the patient sample most likely has a very strong inhibitor for which an accurate activity level cannot be determined with this assay.

Sample Calibration Curve

The calibration curve shown below is for example only. Users must construct a new standard curve each time the assay is performed. Do not use the sample curve below.



LIMITATIONS AND INTERFERENCES

The presence of heparin greater than 1.2 U/mL in the patient sample, or the presence of lupus anticoagulants in the sample, may affect the assay results by prolonging the clotting time, giving an artificially high Protein S value. These samples should be tested at multiple dilutions to correct this effect.¹¹

Functional assays for Protein S can be influenced by the presence of factor V Leiden mutation in the patient, as this condition inhibits the Protein S enhanced inactivation of factor Va by activated Protein C.

This test should not be used as the sole means of diagnosis. Standard coagulation testing regimen should be followed.

EXPECTED VALUES

The value for Protein S is usually expressed as a relative percent compared to the value of a standard or pooled normal plasma. The expected normal range for Protein S is 55-160%.¹² However, each laboratory should determine its own normal range.¹³ Males have 10%-15% more plasma Protein S than females, and the concentration increases somewhat with age in both genders.⁹ A decrease in Protein S is associated with an increased incidence of thromboembolism.¹⁴ A decrease in Protein S activity does not necessarily indicate a decrease in Protein S plasma concentration. As Protein S (total) is present in plasma as free protein and as protein bound to C4bBP, only the free Protein S acts as a cofactor for activated Protein C. When the Protein S activity is decreased, it is important to establish the plasma levels of both free Protein S and C4bBP bound Protein S. Three types of congenital Protein S deficiency have been described, as summarized in Table 1.¹⁵

Table 1

DEFICIENCY TYPE	TOTAL PROTEIN S	FREE PROTEIN S	PROTEIN S ACTIVITY
I	∇ ^b	∇	∇
II	↔ ^a	↔	∇
III	↔	∇	∇

a: ↔ = is normal

b: ∇ = is at a reduced level

Levels of Protein S may also be decreased in liver disease and during anticoagulant therapy. In addition, Protein S activity and free Protein S antigen may be reduced in inflammatory disease, in which the levels of C4bBP are elevated.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The end-user should establish product performance characteristics for the specific method or instrumentation used. Studies using an automated analyser with photo-optical detection produced the results shown below¹¹.

Accuracy

A study performed using another commercially available Protein S kit gave a correlation coefficient of 0.868 for 78 samples tested, with a regression equation of $y = 0.913x + 17.2$.

Precision

The following coefficients of variation (CV's) were observed:

Protein S Level	Intra-Assay CV	Inter-Assay CV
Normal Plasma (87%)	3.0%	5.9%
Abnormal Plasma (42%)	2.3%	5.1%

Sensitivity

ACTICLOT Protein S is designed to give a linear standard curve for Protein S levels between 0 and 100% when plotted as directed.

[†]Polybrene® is a registered trademark of Abbott Laboratories.

REFERENCES

1. Discipio, R. G., *et al.* A comparison of human Prothrombin, factor IX (Christmas Factor) factor X (Stuart Factor) and Protein S. *Biochemistry* 1977, **16**: 698-706.
2. Schmidel, D. K. Organization of the human Protein S genes. *Biochemistry* 1990, **16**: 7845-7852.
3. Walker, F. J. Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. *Journal of Biological Chemistry* 1980, **255**: 5521-5524.
4. Comp, P. C., *et al.* Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *Journal of Clinical Investigations* 1984, **74**: 2082-2088.
5. Broekmans, A. W., *et al.* Hereditary Protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. *Thrombosis and Haemostasis* 1985, **53**: 273-277.

6. Kamiya, T., *et al.* Inherited deficiency of Protein S in a Japanese family with recurrent venous thromboembolism. A study of three generations. *Blood* 1986, **67**: 406-410.
7. Schwarz, H. P., *et al.* Identification and quantification of Protein S in human platelets. *Blood* 1985, **66**: 1452-1455.
8. Dahlbäck, Björn. Interaction between vitamin K-dependant Protein S and the complement C4b-binding protein. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1984, **10**: 139-148.
9. Broze, G. J., *et al.* Biochemistry and Physiology of Protein C, Protein S, and Thrombomodulin. In: Colman, *et al.*, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Third Edition* 1994. Philadelphia, PA: J. B. Lippincott Company, 259-275.
10. *Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition*, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.
11. Data on file at Sekiusi Diagnostics, LLC, Stamford, CT 06902.
12. Boyer-Neumann, C., *et al.* Comparison of functional assays for Protein S. *Thrombosis and Haemostasis* 1993, **70**: 946-950.
13. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory – second edition. *NCCLS/CLSI Document C28-A2* June 2000; Vol. 20, No. 13
14. Bertina, R. M. Hereditary Protein S deficiency. *Haemostasis* 1995, **15**: 241-246.
15. Hathaway, W. E. and Goodnight, Jr., S. H. *Disorders of Hemostasis and Thrombosis: A Clinical Guide*. McGraw-Hill 1993, p. 350.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

ACTICLOT® Protein S ist ein funktionaler Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung der Protein-S-Aktivität in Humanplasma.

TESTPRINZIP

Der ACTICLOT Protein S Assay ist ein auf Gerinnung basierender Plasmatest. Die verdünnten Plasmaproben werden mit Protein-S-freiem Plasma gemischt. Der Mischung werden dann ein Faktor-Xa-haltiges Reagenz, aktiviertes Protein C und Phospholipide zugesetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wird Kalziumchlorid zugegeben, um die Gerinnungsbildung auszulösen. Unter diesen Bedingungen ist die Verlängerung der Gerinnungszeit direkt proportional zur Protein-S-Konzentration in der Plasmaprobe.

HINTERGRUND

DiScipio *et al.* identifizierten im Jahre 1977 erstmals das humane Protein S (S steht für Seattle).¹ Humanes Protein S ist ein einkettiges Glykoprotein aus 635 Aminosäuren (69.000 kD), das mit einer Konzentration von etwa 320 nM im Plasma zirkuliert. Das aktive Protein-S-Gen hat 15 Exone und liegt auf Chromosom 3 über mehr als 80 Kilobasen verteilt.² Protein S ist ein Vitamin-K-abhängiges Protein, das primär in der Leber synthetisiert wird, aber auch im Endothelium und möglicherweise in den Megakaryozyten. Es ist möglich, dass alle drei Protein-S-Quellen eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der Hämostase spielen.

Protein S schien nicht der Zymogenvorläufer einer Serinproteinase zu sein und seine Funktion war bis 1980 unbekannt, als Walker berichtete, dass bovines Protein S bei der Inaktivierung des aktivierten Faktor V als Cofaktor des aktivierten Protein C fungiert.³ Die biologische Bedeutung der Gerinnungsregulierung durch das auf den Aktivierungsweg wirkende Protein C, Protein S und Thrombomodulin wurde schon bald danach durch klinische Studien belegt. In manchen Familien konnte ein Zusammenhang zwischen Thrombose und partiellem Protein-S-Mangel dokumentiert werden.^{4,5,6} Protein S ließ sich auch auf der Oberfläche von Endothelzellen und Thrombozyten nachweisen⁷. Rund 60% des Protein-S-Anteils im menschlichen Plasma ist eng an C4b-bindendes Protein gebunden; daher reflektiert die Plasmakonzentration von Protein S möglicherweise nicht vollständig seine Bioverfügbarkeit⁸. Dieser Komplex weist keine gerinnungshemmende Cofaktor-Aktivität auf. Es wird vermutet, dass Protein S im Komplementsystem eine Rolle spielt, indem es die Anlagerung von C4b-bindendem Protein (C4bBP) an Zelloberflächen vermittelt, auf denen infolge einer Beschädigung oder Aktivierung der Oberfläche negativ geladene Phospholipide freiliegen⁹. Dies könnte eine weitere wichtige Regulierungsfunktion von Protein S darstellen.

REAGENZEN

- R1 ACTICLOT Aktivator-Reagenz: 4 Fläschchen mit je 1 mL lyophilisiertem Material (enthält humanes aktiviertes Protein C, bovines Faktor Xa und Phospholipid aus Kaninchenhirn).
- R2 Protein-S-freies Plasma: 4 Fläschchen mit je 1 mL durch Immunadsorption auf einer Säule von immobilisiertem Ziegenantikörper gegen humanes Protein S von Protein S befreitem lyophilisiertem Humanplasma.
- R3 Probenverdünnungspuffer (10fach konzentriert): 2 Fläschchen mit je 2,5 mL Konzentrat, das nach Rekonstitution 0,2 mol/L NaCl, 0,03 mol/L HEPES und ausreichend Polybrene®[†] für die Neutralisierung von bis zu 1,2 E/mL Heparin in einer Plasmaprobe enthält.
- R4 Protein-S-Kontrollplasma: 2 Fläschchen mit je 0,5 mL zitiertem lyophilisiertem humanem Normalplasma mit einer bekannten und auf dem Etikett angegebenen Protein-S-Gerinnungsaktivität.

* Das Kit enthält ausreichend Reagenzien für 40-160 Prüfpunkte, je nachdem, ob die Testdurchführung manuell oder automatisiert durchgeführt wird und welches Gerät hierfür verwendet wird.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Alle für die Herstellung von Aktivatorreagenz, Protein-S-freiem Plasma und Kontrollplasma verwendeten Spenden wurden mit Hilfe einer von der FDA lizenzierten Methode auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Virus (HCV) und Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) getestet und für negativ befunden. Da sich HBsAg, HCV, HIV-1 und andere Infektionserreger derzeit mit keiner bekannten Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen lassen, muss dieses Reagenz als potentiell infektiös betrachtet und entsprechend gehandhabt werden, wie bei humanen Serum- und Blutproben üblich.

WEITERE BENÖTIGTE REAGENZIEN UND GERÄTE

Automatischer photooptischer Gerinnungsanalyzer, mechanischer Gerinnungszeitmesser oder Stoppuhr
0,025 mol/L Kalziumchloridlösung
Deionisiertes Wasser (Typ I)
Inkubator oder Wasserbad (37°C)
Messzylinder (25 mL)
Pipette mit variablem Volumen (100-1000 µL)
Millimeterpapier
Zentrifuge (geeignet für 2500 x g)

REKONSTITUTION UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Nicht rekonstituierte Reagenzien bleiben bei Lagerung von 2°-8° C bis auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

A. ACTICLOT Aktivator-Reagenz (R1)

Mit 1 mL deionisiertem Wasser (Typ I) rekonstituieren. Bis zur völligen Auflösung 20 Minuten bei Zimmertemperatur (18°-25°C) stehen lassen. Dann bei 2°-8°C aufbewahren und innerhalb von 4 Stunden verwenden. Das rekonstituierte Aktivator-Reagenz kann gefroren gelagert werden bei:

	30 Tage
	-20°C

B. Protein-S-Freies Plasma (R2)

Mit 1 mL deionisiertem Wasser (Typ I) rekonstituieren. Vorsichtig mischen und bis zur völligen Auflösung 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen. Dann bei 2°-8°C aufbewahren und innerhalb von 4 Stunden verwenden. Das rekonstituierte Reagenz kann eingefroren gelagert werden bei:

	30 Tage
	-20°C

C. Probenverdünnungspuffer (R3)

Den Inhalt eines Fläschchens mit deionisiertem Wasser (Typ I) auf 25 mL auffüllen (1:10 Verdünnung). Das rekonstituierte Reagenz kann gelagert werden bei:

	30 Tage
	2° - 8°C

D. Protein-S-Kontrollplasma (R4)

Mit 0,5 mL deionisiertem Wasser (Typ I) rekonstituieren. Vorsichtig mischen und bis zur völligen Auflösung 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen. In ein Plastik-Teströhrchen übertragen. Das rekonstituierte Reagenz ist haltbar bei:

	1 Stunde
	2° - 8°C

PROBENNAHME

Siehe hierzu auch die CLSI-Veröffentlichung H21-A5, Vol. 28, Nr. 5 vom 2008¹⁰ mit dem Titel "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays" (Entnahme, Transport und Verarbeitung von Blutproben für Gerinnungstests und Durchführung von Gerinnungstests). Die Gewinnung der Plasmaprobe ist wie folgt durchzuführen:

- 9 Teile Blut in ein Teil 0,1 mol/L Trinitriumzitrats abnehmen.
- Bei Probe bei 2500 x g 15 Minuten lang zentrifugieren.
- Das Plasma sollte bei 2°-8°C aufbewahrt und innerhalb 2 Stunden getestet werden. Alternativ kann das Plasma auch gelagert werden:

	1 Monat
	-20°C

- Gefrorenes Plasma 30 Minuten vor Gebrauch bei 37°C auftauen. Plasma nur einmal auftauen.

RÜCKFÜHRBARKEIT DES KONTROLLMATERIALS

Informationen zur Rückführbarkeit des Kontrollmaterials sind bei BioMedica Diagnostics auf Anfrage erhältlich.¹¹

QUALITÄTSKONTROLLE

Das Protein-S-Kontrollplasma im Testkit wurde gegen ein international anerkanntes Referenzpräparat geprüft und kann als Teil des Qualitätskontrollprogramms des Labors für diesen Test analysiert werden. Das Kontrollplasma sollte immer dann mitgeführt werden, wenn frisch rekonstituierte Reagenzien eingesetzt werden. Der für jedes Kontrollplasma erzielte Protein-S-Wert muss innerhalb des vom Lieferanten oder Labors angegebenen Bereichs liegen. Liegen die gemessenen Protein-S-Konzentrationen des Kontrollplasmas außerhalb des Bereichs, muss die Testdurchführung wiederholt werden. Falls wiederholt beim Kontrollplasma Protein-S-Werte außerhalb des akzeptablen Bereichs ermittelt werden, wenden Sie sich bitte an BioMedica Diagnostics.

ASSAYKALIBRIERUNG

Bei jeder Testdurchführung muss eine neue Standardkurve ermittelt werden. Zur Herstellung der Assaystandards sollte gepooltes Normalplasma (PNP) von mindestens 20 normalen Spendern verwendet werden, das auf die gleiche Weise gewonnen wurde wie die zu testenden Plasmaproben. Es kann auch kommerziell produziertes Referenzplasma mit einer bekannten Protein-S-Konzentration benutzt werden. Die Protein-S-Standards, das Kontrollplasma und die Patientenproben unmittelbar vor der Testdurchführung wie folgt herstellen:

Standards und Proben – Empfohlene Verdünnungen

Protein-S-Standardkurve	PNP oder Referenzplasma	Verdünnungspuffer
100%	100 µL	900 µL
50%	500 µL of 100% standard	500 µL
0%*	None	1000 µL
Patientenproben und Kontrollplasma	Patientenproben und Kontrollplasma	Verdünnungspuffer
100%	50 µL	450 µL

* Bei automatisierten Geräten ist der niedrigste Punkt eine Mindestverdünnung (ca. 12,5%), kein „echter“ 0%-Standard.

Die Verdünnungen auf Nasseis lagern und innerhalb von 30 Minuten testen.

TESTVERFAHREN

- ACTICLOT Aktivator-Reagenz und Kalziumchlorid in die 37°C warmen Reagenzienvertiefungen eines Gerinnungszeitmessers übertragen. Mindestens 2 Minuten inkubieren.
- 0,1 mL Protein-S-freies Plasma und 0,1 mL verdünntes Testplasma in eine Gerinnungsküvette geben. 2 Minuten bei 37°C inkubieren.
- Der Küvette 0,1 mL vorgewärmtes ACTICLOT Aktivator-Reagenz zugeben. Exakt 5 Minuten bei 37°C inkubieren.
- 0,1 mL vorgewärmtes Kalziumchlorid zugeben. Zeitmesser starten und Gerinnungszeit messen. Jede Patientenprobe und Kontrolle doppelt testen und den Durchschnitt der beiden Ergebnisse ermitteln.

Hinweis: Zur Gewährleistung exakter und reproduzierbarer Ergebnisse müssen kalibrierte Pipettiergeräte verwendet werden. Die empfohlene Arbeitsanweisung insbesondere hinsichtlich der Inkubationszeiten und -temperaturen exakt beachten.

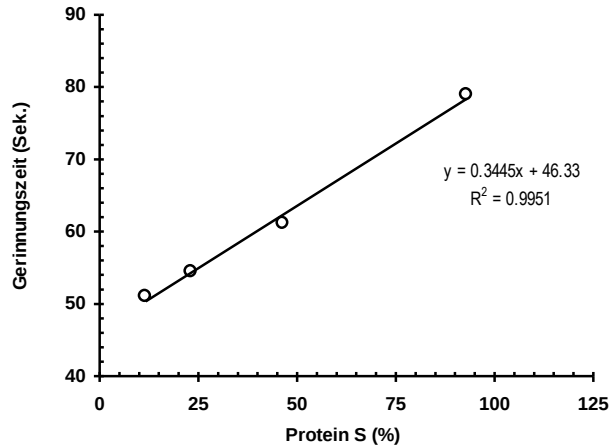
KALIBRIERKURVE

Stellen Sie die prozentuale Protein-S-Aktivität der Kalibrierstandards (x-Achse) im Verhältnis zur mittleren Gerinnungszeit (y-Achse) auf linearem Millimeterpapier dar. Ziehen Sie die Gerade zwischen den resultierenden Punkten nun so, dass die Summe der Abweichungen am geringsten ist („line of best fit“).

Bestimmen Sie für die Patientenproben und Kontrollen die prozentuale Protein-S-Aktivität durch Interpolation von der Standardkurve. Korrigieren Sie bei Patientenproben mit Lupus-Antikoagulans oder abnorm erhöhter Protein-S-Aktivität, bei denen mehrfache Verdünnungen verwendet wurden, den Protein-S-Wert um den Verdünnungsfaktor. Falls die korrigierten Protein-S-Werte immer noch nicht übereinstimmen, liegt in der Patientenprobe mit hoher Wahrscheinlichkeit ein starker Hemmstoff vor, so dass sich die exakte Aktivität anhand dieses Assays nicht ermitteln lässt.

Muster Einer Kalibrierkurve

Die unten abgebildete Kalibrierkurve ist lediglich ein Beispiel. Der Benutzer des Tests muss bei jeder Testdurchführung eine neue Standardkurve ermitteln. Nicht die nachstehende Beispielkurve verwenden!



BESCHRÄNKUNGEN UND STÖRUNGEN

Das Vorliegen von Heparin in einer Konzentration von über 1,2 U/mL in der Patientenprobe sowie das Vorliegen von Lupus-Antikoagulanzen in der Probe kann das Testergebnis beeinflussen und die Gerinnungszeit verlängern, so dass ein künstlich erhöhter Protein-S-Wert ermittelt wird. Diese Proben sollten zur Korrektur dieses Effekts bei mehrfachen Verdünnungen getestet werden.¹¹

Funktionale Protein-S-Assays können durch das Vorliegen einer Faktor-V-Leiden-Mutation beeinflusst werden, da dies die durch Protein S geförderte Inaktivierung des Faktors Va durch aktiviertes Protein C hemmt.

Dieser Test sollte nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden. Die Standard-Verfahrensvorschriften für Gerinnungstests sind einzuhalten.

ERWARTETE WERTE

Der Protein-S-Wert wird im allgemeinen als relativer Prozentsatz des Wertes eines Standard- oder gepoolten Normalplasmas angegeben. Der erwartete Normalbereich für Protein S liegt bei 55-160%.¹² Jedes Labor sollte jedoch seinen eigenen Normalbereich ermitteln.¹³ Bei Männern liegt die Protein-S-Konzentration im Plasma um 10%-15% höher als bei Frauen, und bei beiden Geschlechtern nimmt die Konzentration mit steigendem Lebensalter leicht zu.⁹ Der Rückgang des Protein-S-Wertes bedeutet eine erhöhte Inzidenz von Thrombembolien.¹⁴ Der Rückgang der Protein-S-Aktivität bedeutet nicht unbedingt einen Rückgang der Protein-S-Konzentration im Plasma. Gesamt-Protein S liegt im Plasma in Form von freiem Protein und an C4bBP gebundenes Protein vor. Nur der freie Protein-S-Anteil agiert als Cofaktor für aktiviertes Protein C. Bei verminderter Protein-S-Aktivität ist es wichtig, die Plasma-Konzentrationen von freiem Protein S und an C4bBP gebundenem Protein S zu bestimmen. Es sind drei Typen von kongenitalen Protein-S-Mängeln bekannt, die in Tabelle 1 dargestellt sind¹⁵:

Tabelle 1

MANGELTYP	GESAMT PROTEIN S	FREIES PROTEIN S	PROTEIN S AKTIVITÄT
I	▽ ^b	▽	▽
II	↔ ^a	↔	▽
III	↔	▽	▽

a: ↔ = normal

b: ▽ = verminderte Konzentration

Die Protein-S-Konzentration kann auch bei Lebererkrankungen und während der Therapie mit Antikoagulanzen vermindert sein. Außerdem können Protein-S-Aktivität und Freies-Protein-S-Antigen bei inflammatorischen Erkrankungen mit erhöhten C4bBP-Spiegeln vermindert sein.

LEISTUNGSMERKMALE

Der Benutzer sollte für die jeweils benutzte Methode und das jeweilige Gerät seine eigenen Leistungsmerkmale ermitteln. Untersuchungen mit einem automatisierten Analyzer mit photo-optischem Nachweis erzielten folgende Ergebnisse:¹¹

Genauigkeit

Die Untersuchung mit einem alternativen kommerziell erhältlichen Protein-S-Testkit ergab bei 78 getesteten Proben einen Korrelationskoeffizienten von 0,868 bei einer Regressionsgleichung von $y = 0,913x + 17,2$.

Präzision

Es wurden folgende Variationskoeffizienten (VK's) ermittelt:

Protein-S-Konzentration	VK zwischen den Testläufen	VK innerhalb des Testlaufs
Normalplasma (87%)	3,0%	5,9%
abnormes Plasma (42%)	2,3%	5,1%

Empfindlichkeit

ACTICLOT Protein S ergibt bei grafischer Darstellung wie angegeben bei Protein-S-Konzentrationen zwischen 0% und 100% eine lineare Standardkurve.

[†]Polybrene® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Abbott Laboratories.

LITERATURHINWEISE

- Discipio, R. G., et al. A comparison of human Prothrombin, factor IX (Christmas Factor) factor X (Stuart Factor) and Protein S. *Biochemistry* 1977, **16**: 698-706.
- Schmidel, D. K. Organization of the human Protein S genes. *Biochemistry* 1990, **16**: 7845-7852.
- Walker, F.J., 1980. Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 5521-5524.
- Comp, P. C., et al. Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *Journal of Clinical Investigations* 1984, **74**: 2082-2088.
- Broekmans, A. W., et al. Hereditary Protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. *Thrombosis and Haemostasis* 1985, **53**: 273-277.
- Kamiya, T., et al. Inherited deficiency of Protein S in a Japanese family with recurrent venous thromboembolism. A study of three generations. *Blood* 1986, **67**: 406-410.
- Schwarz, H. P., et al. Identification and quantification of Protein S in human platelets. *Blood* 1985, **66**: 1452-1455.
- Dahlbäck, Björn. Interaction between vitamin K-dependant Protein S and the complement C4b-binding protein. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1984, **10**: 139-148.
- Broze, G. J., et al. Biochemistry and Physiology of Protein C, Protein S, and Thrombomodulin. In: Colman, et al., eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Third Edition* 1994. Philadelphia, PA: J. B. Lippincott Company, 259-275.
- Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; *Approved Guideline-Fifth Edition*, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.
- Daten erhältlich von BioMedica Diagnostics, Stamford, CT 06902.
- Boyer-Neumann, C., et al. Comparison of functional assays for Protein S. *Thrombosis and Haemostasis* 1993, **70**: 946-950.
- How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory – second edition. *NCCLS/CLSI Document C28-A2* June 2000; Vol. 20, No. 13.
- Bertina, R. M. Hereditary Protein S deficiency. *Haemostasis* 1995, **15**: 241-246.
- Hathaway, W. E. and Goodnight, Jr., S. H. *Disorders of Hemostasis and Thrombosis: A Clinical Guide*. McGraw-Hill 1993, p. 350.

FRANCAIS

UTILISATION

L'ACTICLOT® Protéine S, référence 843L, est une méthode coagulante permettant le dosage quantitatif de l'activité Protéine S dans le plasma humain citraté. Ce dosage est à usage de diagnostic in vitro.

PRINCIPE

L'ACTICLOT® Protéine S est un test plasmatique de coagulation. Des dilutions de plasmas normaux sont réalisées dans un plasma déficient en Protéine S. Les plasmas ainsi dilués sont alors activés par un réactif contenant du facteur Xa, de la Protéine C activée et des phospholipides. Après 5 minutes d'incubation, la formation de caillot est déclenchée par l'addition de chlorure de calcium. Dans ces conditions, l'allongement du temps de coagulation est directement proportionnel à la concentration en Protéine S présente dans le plasma.

RESUME

Discipio et al, ont été les premiers à identifier la Protéine S (S pour Seattle) en 1977¹. La Protéine S humaine est une glycoprotéine (Chaîne simple) de 635 acides aminés (69 000 kD) circulants dans le plasma à une concentration d'environ 320 nM. Le gène de la forme active de la Protéine S possède 15 exons et s'étend sur plus de 80 Kilobases sur le chromosome 3². La protéine S est une protéine vitamine K dépendante, synthétisée en premier lieu dans le foie mais aussi dans l'endothélium et probablement dans les mégacaryocytes. Il est possible que ces trois sources de Protéine S jouent un rôle significatif dans la régulation de l'hémostase.

La Protéine S n'est pas le précurseur du zymogène d'une serine protéase et aucune fonction ne lui était connue jusqu'en 1980 lorsque Walker a décrit les fonctions de la Protéine S bovine comme étant un cofacteur de la Protéine C activée dans l'inactivation de Facteur V activé³. L'importance biologique de la régulation de la coagulation utilisant la voie de la Protéine C, de la Protéine S et de la thrombomoduline a été confirmée par des études cliniques. Une association entre Thrombose et déficit en Protéine S a été rapportée et bien documentée dans certaines familles^{4,5,6}. La Protéine S a aussi été retrouvée sur la surface des cellules endothéliales et des plaquettes⁷. Environ 60% de la Protéine S dans le plasma humain est complexée à la C4b-BP. Cependant, le taux de Protéine S plasmatique dans le plasma peut ne pas totalement refléter sa biodisponibilité⁸. Ce complexe n'a pas d'activité anticoagulante. Il a été supposé que la Protéine S pouvait avoir un rôle dans le système du complément par la médiation de sa fixation à la C4b-BP à la surface des cellules endothéliales détruites ou activées exposant les phospholipides de charge négative⁹. Ceci peut constituer une autre voie importante du mécanisme de régulation de la Protéine S.

REACTIFS

Le coffret contient tous les réactifs nécessaires à la réalisation de 40 tests quand ils sont effectués par méthode manuelle.

- R1 ACTICLOT® : Réactif d'activation (R1)** : 4 flacons de 1 ml, lyophilisés. Chaque flacon contient de la Protéine C activée humaine, du facteur Xa bovin et des phospholipides extraits de cerveau de lapin.
- R2 Plasma déficient en Protéines S (R2)** : 4 flacons de 1 ml, lyophilisés. Chaque flacon contient 1 ml de plasma humain dépleté en Protéine S par immuno-adsorption sur colonne de gel agarose couplée à des anticorps anti-Protéine S humaine obtenus chez la chèvre.
- R3 Tampon de dilution des échantillons (10 fois concentré) (R3)** : 2 flacons de 2,5 ml (10x concentré) ; après reconstitution ces flacons contiennent : NaCl 0,2 M, Hépés 0,03 M et du polybrène® en quantité suffisante pour neutraliser 1,2 U/ml d'héparine dans l'échantillon de plasma.
*Polybrène® est une marque déposée des laboratoires Abbott.
- R4 Plasma contrôle Protéine S (R4)** : 2 flacons de 0,5 ml, lyophilisés. Chaque flacon contient 0,5 ml de plasma humain normal citraté dont le taux d'activité en Protéine S est déterminé précisément. Ce taux est indiqué sur le flacon.

Le coffret permet la réalisation de 40-160 tests, en fonction de la réalisation du dosage par méthode manuelle ou automatique et en fonction du type d'instrument utilisé.

Attention : En utilisant des tests homologués, les plasmas utilisés pour la préparation du réactif activateur, du plasma déficient en Protéine S et du plasma contrôle ont été trouvés négatifs en antigène de surface de l'Hépatite B (HBsAg), en anticorps dirigés contre le virus de l'Hépatite C, ou les virus du SIDA Type 1 et 2 (HIV-1 et HIV-2). Aucune méthode ne peut assurer totalement l'absence de contamination des produits issus du sang humain par le HBsAg, le HIV-1 et -2 ou d'autres agents pathogènes. Il est donc recommandé d'utiliser ces produits de la même façon et avec les mêmes précautions que pour tout échantillon humain potentiellement infecté.

Le réactif activateur de l'ACTICLOT® Protéine S et le tampon de dilution des échantillons contiennent de faibles quantités d'azide de sodium (NaN₃) qui peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI

Automate de coagulation, chronomètre
Solution chlorure de calcium (CaCl₂) à 0,025 M.
Eau distillée de Type I.
Bain-marie à 37°C ou incubateur
Epruvette de 25 ml.
Pipette à volume variable de 100 à 1000 µl.
Papier millimétré.
Centrifugeuse (avec possibilité de centrifuger à 2500g)

PREPARATION DES REACTIFS ET STABILITE

Tous les réactifs non reconstitués et conservés à 2-8°C sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les flacons.

- Réactif d'activation : R1** : Reconstituer par 1 ml d'eau distillée de Type I.
Laisser stabiliser à température ambiante (18-25°C) pendant 20 minutes pour une dissolution complète.
Conservé à 2-8°C, le réactif est stable pendant 4 heures.
Une nouvelle courbe d'étalonnage devra être effectuée pour chaque série de tests.
Le réactif reconstitué peut être conservé à -20°C pendant 30 jours.
- Plasma humain déficient en Protéine S : R2**: Reconstituer par 1 ml d'eau distillée de Type I.
Mélanger délicatement et laisser stabiliser 20 minutes à température ambiante pour une dissolution complète.
Conservé dans la glace pilée et utiliser dans les 4 heures suivant la reconstitution.
Le plasma reconstitué peut être conservé à -20°C pendant 30 jours.
- Tampon de dilution de l'échantillon : R3**: Diluer au 1/10 en eau distillée de Type I (2,5 ml de tampon concentré et compléter à 25 ml avec de l'eau distillée).
Conservé à 2-8°C pendant 30 jours.
- Plasma contrôle Protéine S (humain) : R4**: Reconstituer par 0,5 ml d'eau distillée de Type I.
Mélanger délicatement et laisser stabiliser 20 minutes à température ambiante pour une dissolution complète.
Transférer le plasma reconstitué dans un tube plastique.
Le réactif reconstitué est stable 1 heure à 2-8°C.

RECUEIL DES ECHANTILLONS

Se référer aux recommandations du GEHT et du CLSI pour de plus amples informations sur la collecte, le transport et la conservation des échantillons : Approved Guideline- Fifth Edition, CLSI Document H21-A5, vol 28, N°5, 2008.¹⁰

La préparation du plasma doit être réalisée selon le protocole suivant :

Prélever 9 volumes de sang dans 1 volume de Citrate Trisodique 0,109 M

Centrifuger à 2500 g pendant 15 minutes.

Le plasma doit être conservé à 2-8°C et testé dans les 2 heures. Il est possible de conserver le plasma à -20°C pendant 30 jours pour dosage ultérieur. Dans ces conditions, le plasma sera décongelé à 37°C pendant 30 minutes avant utilisation.

CONTROLE DE QUALITE

Toute information sur la traçabilité du contrôle des réactifs est disponible sur demande auprès d'BioMedica Diagnostics.¹¹
Le plasma contrôle inclus dans le coffret a été mesuré contre un standard interne de référence et est utilisé comme contrôle de qualité pour ce dosage.

Les plasmas de contrôle Protéine S inclus dans le coffret peuvent être utilisés comme contrôles de qualité au laboratoire.

Les contrôles devront être utilisés pour chaque nouvelle reconstitution des réactifs et pour nouvelle série de dosages.

Les taux de Protéine S obtenus pour chaque contrôle devront être compris dans l'intervalle de confiance spécifié dans la notice ou imprimé sur les flacons. Si le contrôle de qualité ne correspond pas aux valeurs attendues, les dosages devront être recommencés. Dans le cas où les contrôles ne donnent pas des taux satisfaisants après vérification, contacter la société A.D.F. BioMedical.

COURBE D'ETALONNAGE

Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être réalisée lors de toute nouvelle série de dosage.

Un pool de plasma normal (PPN), prélevé dans les mêmes conditions que les échantillons à doser, peut être utilisé pour la préparation de la gamme d'étalonnage de la Protéine S. Les plasmas d'au moins 20 donneurs devront être utilisés pour la préparation de ce pool.

Un plasma de référence à taux de Protéine S connu peut également être utilisé.

Pour les dosages de Protéine S, les plasmas sont testés dilués au 1/10. La dilution au 1/10 du pool de plasmas normaux correspond à 100% de Protéine S.

Préparer la gamme d'étalonnage de la Protéine S, le plasma pour le contrôle de qualité et les plasmas à doser, extemporanément et de la façon suivante:

Courbe d'étalonnage	Pool de plasma ou plasma de référence	Tampon de dilution
100 %	100 µl	900 µl
50 %	500 µl du point 100 %	500 µl
0 %*	0	1000 µl
Plasma à doser et plasmas contrôle	Plasma à doser et plasmas contrôle	Tampon de dilution
100 %	50 µl	450 µl

Conserver les échantillons ainsi préparés dans la glace pilée pendant 30 minutes.

*Sur automate, le point le plus bas doit correspondre à la dilution minimale (approx 12.5%) et non le point 0% du standard.

MODE OPERATOIRE

- 1. Placer le réactif d'activation et la solution de CaCl₂ (0,025M) à 37°C. Incuber pendant au moins 2 minutes.
- 2. Introduire 0,1 ml de plasma déficient en Protéine S et 0,1 ml de la dilution de plasma à tester dans un tube à hémolysé. Incuber 2 minutes à 37°C.
- 3. Ajouter 0,1 ml de réactif d'activation, préalablement incubé à 37°C, dans le tube. Incuber très exactement 5 minutes à 37°C.
- 4. Ajouter 0,1 ml de CaCl₂ (0,025M) préalablement incubé, à 37°C. Déclencher le chronomètre et noter le temps de coagulation. Effectuer tous les tests et les contrôles en double et prendre la moyenne des 2 temps.

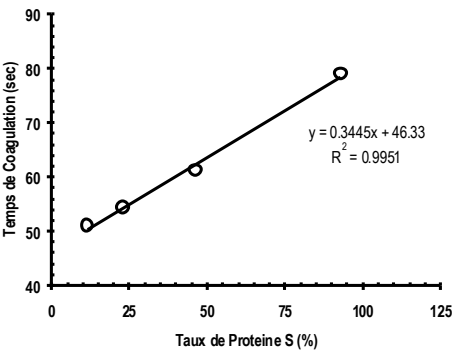
Note : Pour garantir des résultats précis et reproductibles utiliser des pipettes étalonnées et observer les procédures recommandées en veillant particulièrement aux temps d'incubation et à la température.

COURBE D'ETALONNAGE

- 1. Sur papier millimétré reporter :
 - En abscisse, le pourcentage (%) d'activité de la Protéine S de chaque point d'étalonnage.
 - En ordonnée, la moyenne des 2 temps de coagulation obtenus pour chaque point de la gamme.
 - Tracer la droite d'étalonnage.
- 2. Pour chaque échantillon testé ou contrôlé, déterminer le pourcentage d'activité de la Protéine S par extrapolation de la courbe d'étalonnage.
- 3. Pour les patients présentant un lupus anticoagulant ou une activité de la Protéine S anormalement élevée pour lesquels de multiples dilutions ont été utilisées calculer le taux de la Protéine S en multipliant le résultat obtenu par les facteurs complémentaires de dilution.

Si les taux de Protéine S corrigés ne conviennent toujours pas, l'échantillon du patient est susceptible de comporter un très fort inhibiteur dont le degré précis d'activité ne peut être déterminé par le biais de ce test.

La courbe d'étalonnage ci-dessous est donnée à titre d'exemple et ne doit être utilisée en aucun cas. Une courbe d'étalonnage doit être tracée pour chaque série de dosages.



LIMITES DE LA PROCEDURE

La présence d'héparine à un taux supérieur à 1,20 UI/ml ou d'anticoagulant lupique dans les échantillons peut interférer sur les résultats. Dans ce cas, un temps de coagulation allongé peut être obtenu, et un taux artificiellement augmenté de Protéine S peut en être déduit. Les échantillons contenant un anticoagulant de type lupique doivent être testés à des dilutions plus importantes¹¹.

Le test fonctionnel de mesure de la Protéine S peut être influencé par la présence du Facteur V Leiden muté chez le patient, dans ce cas, il n'y a plus inactivation du facteur Va par la protéine C activée.

Ce test ne doit pas être utilisé comme le seul test de diagnostic. Des tests de coagulation standards devront être réalisés en parallèle.

Valeurs attendues

Le taux de Protéine S est exprimé en pourcentage, comparativement à la valeur d'un standard ou d'un pool de plasma normal. La zone normale attendue pour la Protéine S est de 55 à 160%¹². Toutefois, chaque laboratoire doit établir sa propre zone normale¹³.

Les taux de Protéine S sont de 10 à 15% plus fort chez l'homme que chez la femme, le taux de Protéine S augmente avec l'âge chez l'homme et chez la femme⁹.

Une diminution du taux de Protéine S est associée à une augmentation du risque thromboembolique¹⁴. Une diminution de l'activité Protéine S n'indique pas nécessairement une diminution de la concentration protéique plasmatique en Protéine S. La Protéine S (totale) est présente dans le plasma sous forme libre ou liée à la C4bBP. Seule la Protéine S libre agit comme cofacteur de la Protéine C activée.

Lors d'une baisse de l'activité Protéine S, il est important de définir le taux de Protéine S libre et liée dans le plasma à la C4b-BP. Trois types de déficit congénital en Protéine S ont été décrits et sont résumés dans le tableau¹⁵ ci-dessous :

Type de déficit	Protéine S totale	Protéine S libre	Activité Protéine S
I	↓	↓	↓
Ila	=	↓	↓
Ilb	=	=	↓

Légende : "=" : Taux normal ; "↓" : taux diminué

Les taux de Protéine S peuvent aussi être diminués dans les affections hépatiques et durant un traitement anticoagulant oral. De même, l'activité Protéine S et la Protéine S libre peuvent être diminuées dans les états inflammatoires où la C4bBP est élevée.

PERFORMANCES

L'utilisateur doit vérifier les performances du réactif en fonction des méthodes et de l'instrument utilisé. L'analyse des performances du réactif Acticlot® Protéine S sur un automate à détection optique a donné les résultats ci-dessous¹¹.

Précision:

L'évaluation comparative avec un autre réactif commercialisé pour l'activité de la protéine S a montré un coefficient de corrélation de 0,868 sur 78 échantillons testés, avec la droite de régression : $y = 0.913x + 17.2$. Les coefficients de variation suivants ont été obtenus :

Taux de Protéine S	CV Inter-essai	CV Intra-essai
Plasma Normal 87%	3.0 %	5.9%
Plasma Anormal 42%	2.3 %	5.1 %

Sensibilité:

Une courbe d'étalonnage linéaire est obtenue pour des taux de Protéine S compris entre 0 et 100 % lorsque la courbe est tracée comme indiquée.

REFERENCES

- 1. Discipio, R.G., et al. A comparison of human Prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart Factor) and Protein S. Biochemistry 1977, **16**: 696-706.
- 2. Schmidel, D.K. Organization of the human Protein S genes. Biochemistry 1990, **16**: 7845-7852.
- 3. Walker, F.J. Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. Journal of Biological Chemistry 1980, **255**: 5521-5524.
- 4. Comp, P.C., et al. Familial Protein S deficiency is associated with a recurrent thrombosis. Journal of Clinical investigations 1984, **74**: 2082-2088.
- 5. Broekmans, A. W., et al. Hereditary Protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. Thrombosis and Haemostasis 1985, **53**: 273-277.

6. Kamiya, T., et al Inherited deficiency of Protein S in a Japanese family with recurrent venous thromboembolism. A study of three generations. *Blood* 1986, **67**: 406-410.
7. Schwarz, H. P., et al. Identification and quantification of Protein S in human platelets. *Blood* 1985, **66**:1452-1455.
8. Dahlbäck, Björn Interaction between Vitamin K-dependant Protein S and the complement C4b-binding protein. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 1984, **10**:139-148.
9. Broze, G.J., et al. Biochemistry and Physiology of Protein C, Protein S and thrombomodulin. In: *Colman, et al., eds Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and Clinical Practice, third Edition* 1994 Philadelphia, PA, J.B. Lippincott Company, 259-275.
10. *Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition*, CLSI Document H21-A5, Vol 28, No 5, 2008.
11. Data on file at Sekiusi Diagnostics, LLC, Stamford, CT 06902.
12. Boyer-Neumann, C., et al. Comparison of functional assays for Protein S. *Thrombosis and Haemostasis* 1993, **70**: 946-950.
13. How to define and Determine reference intervals in the Clinical Laboratory - second edition NCCLS/CLSI Document C28-A2 June 2000, Vol 20, No 13.
14. Bertina, R.M. Hereditary Protein S deficiency. *Haemostasis* 1985; **15**: 241-245.
15. Hathaway, W.E. and Goodnight, Jr, S.H. *Disorders of haemostasis and thrombosis: A clinical Guide*. McGraw- Hill 1993, p 350.

ESPAÑOL

USO PROPUESTO

ACTICLOT® Proteína S es un ensayo funcional de coagulación para la determinación cuantitativa de la actividad de la proteína S en el plasma humano.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo ACTICLOT Proteína S es un test plasmático basado en el principio de la coagulación. En el ensayo, diluciones de plasma del paciente son mezcladas con plasma libre de proteína S. A la mezcla se le añade un reactivo que contiene factor Xa, proteína C activada y fosfolípidos. Tras un periodo de incubación de 5 minutos, se añade cloruro de calcio para provocar la coagulación. En estas condiciones, la prolongación del tiempo de coagulación es directamente proporcional a la concentración de proteína S en la muestra de plasma del paciente.

INFORMACIÓN GENERAL

En 1977 DiScipio et al. identificaron por primera vez la proteína S (S de Seattle) humana.¹ La proteína S humana es una glucoproteína monocadena compuesta por 635 aminoácidos (69 000 kD) que circula en el plasma a una concentración de aprox. 320 nmol/L. El gen activo de la proteína S presenta 15 exonas y se extiende por más de 80 kilobases sobre el cromosoma 3.² La proteína S es una proteína dependiente de la vitamina K, que es sintetizada principalmente en el hígado, pero también en el endotelio y posiblemente en los megacariocitos. Es posible que estas tres fuentes de las cuales deriva la proteína S desempeñen una función importante en la regulación de la hemostasis.

La proteína S no parecía ser el precursor cínico de una proteinasa serina y su función fue desconocida hasta 1980, cuando Walker expuso que la proteína S bovina actuaba como cofactor para la proteína C activada en el proceso de inactivación del factor V activado.³ Estudios clínicos confirmaron pronto la importancia biológica de la regulación de la coagulación por parte de la vía metabólica en la que están involucradas la proteína C, a la proteína S y la trombomodulina. En ciertas familias se ha podido documentar una relación entre la trombosis y la carencia parcial de proteína S.^{4,5,6} La proteína S ha sido hallada también en la superficie de células endoteliales y de trombocitos.⁷ Alrededor del 60% de la proteína S presente en el plasma humano está estrechamente ligado a la proteína unida a C4b; los niveles plasmáticos de proteína S pueden por lo tanto no reflejar completamente su biodisponibilidad.⁸ Este complejo no presenta ninguna actividad de cofactor anticoagulante. Se supone que la proteína S puede estar implicada en el sistema del complemento actuando como intermediario de la asociación entre la proteína unida a C4b (C4bBP) y las superficies de la célula expuestas, como consecuencia de haber sido dañadas o activadas, a fosfolípidos con carga negativa.⁹ Esto podría representar otro mecanismo importante de regulación de la proteína S.

REACTIVOS

- R1 ACTICLOT Reactivo activador: 4 viales de 1 mL cada una de material liofilizado (contiene proteína C humana activada, factor Xa bovino y fosfolípido de cerebro de conejo).
- R2 Plasma libre de proteína S: 4 viales de 1 mL cada una de plasma humano liofilizado que ha sido liberado de proteína S mediante inmuoabsorción sobre una columna de anticuerpos caprinos inmovilizados contra la proteína S humana.
- R3 Tampón de dilución para la muestra (concentrado 10X): 2 viales de 2,5 mL cada una de concentrado, el cual, tras la reconstitución, contiene 0,2 mol/L de NaCl, 0,03 mol/L de HEPES y una cantidad suficiente de Polybrene®[†] para neutralizar hasta 1,2 U/mL de heparina en una muestra de plasma.

- R4 Plasma de control de proteína S: 2 viales de 0,5 mL cada una de plasma humano normal liofilizado y citratado cuya actividad coagulante de proteína S ha sido determinada y viene indicada en la etiqueta.

*El presente kit contiene suficientes reactivos para efectuar de 40 a 160 determinaciones, dependiendo de si éstos se realizan manual o automáticamente y en función del tipo de instrumento que se utilice.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS PARA LOS USUARIOS

Todas las unidades de sangre donada empleadas para la fabricación del reactivo activador del plasma libre de proteína S y del plasma de control han sido testadas mediante un método homologado por la FDA y calificadas como no reactivas al antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), al virus de la Hepatitis C (HCV) y al virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 (HIV-1). Dado que ninguno de los métodos analíticos actualmente conocidos permite garantizar completamente la ausencia de HBsAg, HCV, HIV-1 u otros agentes infecciosos, este reactivo debe considerarse como potencialmente infeccioso y ser tratado según las recomendaciones aplicables al suero y a las muestras de sangre humana.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

Analizador automático foto-óptico de coagulación, coagulómetro mecánico o cronómetro
Solución de cloruro de calcio de 0,025 mol/L
Agua desionizada del tipo I
Incubadora o baño de agua (37°C)
Cilindro graduado de 25 mL
Pipeta para dispensar volúmenes variables de 100 a 1000 µL
Papel milimetrado
Centrifugadora (capacidad: 2.500 x g)

RECONSTITUCIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Si se conservan a una temperatura comprendida entre los 2° y los 8° C, los reactivos no reconstituidos se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la ampolla.

A. ACTICLOT Reactivo Activador (R1)

Reconstituir con 1 mL de agua desionizada del tipo I. Para garantizar una completa disolución, dejarlo 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Conservarlo a 2° - 8°C y utilizarlo dentro de las 4 horas siguientes. El reactivo activador ya reconstituido puede ser mantenido congelado a:

	30 días
	-20°C

B. Plasma Libre de Proteína S (R2)

Reconstituir con 1 mL de agua desionizada del tipo I. Mezclar cuidadosamente y dejarlo 20 minutos a temperatura ambiente para garantizar una completa disolución. Conservarlo a 2° - 8°C y utilizarlo dentro de las 4 horas siguientes. El plasma puede ser conservado congelado a:

	30 días
	-20°C

C. Tampón de Disolución Para La Muestra (R3)

Diluir el contenido de una vial a 25 mL de agua desionizada del tipo I. Conservar a:

	30 días
	2° - 8°C

D. Plasma de Control de Proteína S (R4)

Reconstituir con 0,5 mL de agua desionizada del tipo I. Mezclar cuidadosamente y dejarlo 20 minutos a temperatura ambiente para garantizar una completa disolución. Transferirlo a un tubo de ensayo de plástico. El reactivo reconstituido es estable para:

	1 hora
	2° - 8°C

TOMA DE MUESTRAS

Consulte el documento H21-A5 del CLSI, vol. 28, n° 5, 2008, con el título "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays"¹⁰, (Toma, transporte y proceso de muestras de sangre para tests de coagulación y para la realización de ensayos de coagulación). La toma de muestras de plasma deberá realizarse del siguiente modo:

1. Tomar 9 volúmenes de sangre en 1 volumen de 0,1 mol/L de citrato trisódico.
2. Centrifugar a una velocidad de 2.500 x g durante 15 minutos.
3. El plasma deberá ser conservado a 2°-8°C y analizado dentro de las 2 horas siguientes a la toma. Como alternativa, el plasma puede ser conservado a:

	1 mes
	-20°C

4. El plasma puede ser descongelado a 37°C, 30 minutos antes del uso. El plasma puede ser descongelado una sola vez.

TRAZABILIDAD DE LOS MATERIALES DE CONTROL

Si lo desea, solicite a BioMedica Diagnostics información relativa a la trazabilidad de los materiales de control.¹¹

CONTROL DE CALIDAD

El plasma de control de proteína S contenido en el kit ha estado evaluado en base a un preparado de referencia internacionalmente reconocido y puede ser analizado como parte integrante del programa de control de calidad vigente en el respectivo laboratorio para el presente ensayo. El plasma de control deberá ser incluido en el procedimiento analítico cuando sean utilizados reactivos recién reconstituidos. El nivel de concentración de proteína S obtenida para cada plasma de control debe encontrarse dentro del rango especificado por el respectivo proveedor o laboratorio. En caso contrario, debe repetirse el ensayo. Si el nivel de concentración de proteína S obtenido para cada plasma de control se sitúa repetidamente fuera de los límites de aceptabilidad especificados, rogamos ponerse en contacto con BioMedica Diagnostics.

CALIBRACIÓN DEL ENSAYO

Cada vez que se efectúe el ensayo es necesario determinar una nueva curva estándar. Para la preparación de los estándares del ensayo se utilizará un pool de plasma normal (PNP), proveniente de 20 donantes normales como mínimo, y tomado de la misma manera que las muestras de plasma que deban ser analizadas. Se puede utilizar también plasma de referencia preparado comercialmente con un nivel de concentración de proteína S conocido. Inmediatamente antes de proceder a los análisis, preparar los estándares de proteína S, el plasma de control y las muestras de plasma de los pacientes procediendo como se indica a continuación:

Estándares y Muestras - Diluciones recomendadas

Curva estándar de proteína S	PNP o plasma de referencia	Tampón de dilución
100%	100 µL	900 µL
50%	500 µL del estándar 100%	500 µL
0% [‡]	Ninguno	1000 µL
Muestras de pacientes y plasma de control	Plasma de paciente y control	Tampón de dilución
100%	50 µL	450 µL

[‡] En el caso de aparatos automáticos, el punto más bajo corresponde a una dilución mínima (aprox. 12,5%) y no a un "verdadero" estándar 0%.

Conservar las diluciones sobre hielo mojado y analizar dentro de los 30 minutos siguientes.

PROCEDIMIENTO

1. Transferir el reactivo activador ACTICLOT y el cloruro de calcio a los pozuelos de los reactivos calentados a 37°C de un coagulómetro. Incubar durante 2 minutos como mínimo.
2. Agregar en una cubeta de coagulación 0,1 mL de plasma libre de proteína S y 0,1 mL de plasma de ensayo diluido. Incubar a 37°C durante 2 minutos.
3. Agregar en la cubeta 0,1 mL del reactivo activador ACTICLOT precalentado. Incubar a 37°C durante 5 minutos exactos.
4. Agregar 0,1 mL de cloruro de calcio precalentado. Poner en marcha el cronómetro y anotar el tiempo de coagulación. Analizar por duplicado cada muestra del ensayo y cada control y calcular el valor medio de los resultados obtenidos.

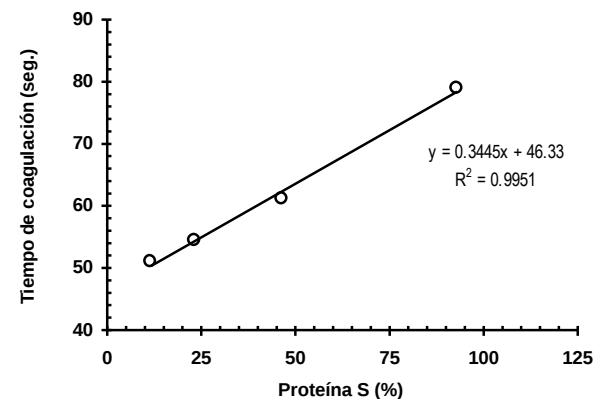
Nota: Para garantizar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados, se deben utilizar dispositivos de pipeta calibrados y atenerse exactamente a las indicaciones expuestas aquí para el procedimiento, en particular las que conciernen la duración y las temperaturas de incubación.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Trazar en el papel milimetrado la actividad expresada en porcentajes de la proteína S de los estándares de calibración (eje x) respecto al tiempo medio de coagulación (eje y). Entre los puntos así obtenidos, trazar la recta de regresión ("line of best fit"). Determinar para las muestras de los pacientes y muestras de control la actividad porcentual de la proteína S interpolando los datos obtenidos en la curva estándar. En las muestras de pacientes con anticoagulante lúpico o bien con actividad de proteína S anormalmente elevada, y para los cuales han sido utilizadas diluciones múltiples, corregir el nivel de proteína S en base al factor de dilución. Si los niveles de proteína S corregidos continúan sin coincidir con los valores previstos, es muy probable que la muestra del paciente contenga un potente agente inhibidor que hace imposible determinar la actividad exacta mediante este ensayo.

Ejemplo de Curva de Calibración

La curva de calibración mostrada a continuación sirve sólo de ejemplo. Cada vez que se efectúe un ensayo es necesario crear una nueva curva estándar. ¡No emplear la curva que aparece como ejemplo a continuación!



LIMITACIONES Y INTERFERENCIAS

La presencia de heparina en la muestra del paciente en concentraciones superiores a 1,2 U/mL, así como la presencia de anticoagulante lúpico puede influir en el resultado del ensayo y prolongar el tiempo de coagulación, dando lugar en consecuencia a un valor de proteína S artificialmente elevado. Para neutralizar este efecto, las muestras se deben analizar con diluciones múltiples.¹¹

La presencia de una mutación Leiden del factor V en el paciente puede incidir en el ensayo funcional para la determinación de la proteína S, dado que esta condición inhibe, a causa de la proteína C activada, una mejor inactivación del factor Va favorecido por la proteína S.

No utilizar el presente ensayo como único instrumento de diagnóstico. Respetar las prescripciones estándares relativas a los ensayos coagulativos.

VALORES PREVISTOS

El valor de la proteína S se expresa generalmente como un porcentaje relativo del valor de un plasma estándar o de un plasma normal procedente de un pool. El rango normal de valores que se espera obtener para la proteína S es de 55-160%.¹² Sin embargo, cada laboratorio deberá determinar su propio rango de normalidad.¹³ En los hombres la concentración de proteína S en el plasma es un 10%-15% mayor que en las mujeres. Esta concentración aumenta ligeramente con la edad, en ambos sexos.⁹ La disminución de la concentración de proteína S está asociada a una incidencia mayor de tromboembolismo.¹⁴ La disminución de la actividad de la proteína S no indica necesariamente una disminución del nivel de concentración de proteína S en el plasma. La proteína S total se halla presente en el plasma como proteína libre y como proteína ligada a C4bBP. Únicamente la proteína S libre actúa como cofactor para la proteína C activada. Si la actividad de la proteína S disminuye, es importante determinar los niveles de concentración en el plasma tanto de proteína S libre como de proteína S ligada a C4bBP. Los tres tipos conocidos de deficiencias congénitas de proteína S vienen descritos en la tabla 1.¹⁵

Tabla 1

TIPO DE DEFICIENCIA	PROTEÍNA S TOTAL	PROTEÍNA S LIBRE	PROTEÍNA S ACTIVADA
I	▽ ^b	▽	▽
II	↔ ^a	↔	▽
III	↔	▽	▽

a: ↔ = normal

b: ▽ = nivel de concentración reducido

Los niveles de concentración de proteína S pueden disminuir también en el caso de afecciones hepáticas y durante un tratamiento con anticoagulantes. Por otra parte, la actividad de la proteína S y el antígeno de la proteína S libre pueden verse reducidos en el caso de una afección inflamatoria con niveles de concentración de C4bBP elevados.

CARACTERÍSTICAS DE EJECUCIÓN

El usuario deberá establecer las características de ejecución del producto en función de cada método e instrumento específico que emplee. En estudios realizados con un analizador automático con detección foto-óptica se obtuvieron los resultados que se muestran más abajo.¹¹

Exactitud

Un estudio realizado con otro kit disponible en el mercado de proteína S, obtuvo un coeficiente de correlación de 0,868 para 78 muestras testadas, con una recta de regresión de $y = 0,913x + 17,2$.

Precisión

Se observaron los siguientes coeficientes de variación (CV):

Concentración de proteína S	CV entre secuencias de ensayos	CV durante los ensayos
Plasma normal (87%)	3,0%	5,9%
Plasma anormal (42%)	2,3%	5,1%

Sensibilidad

Conforme a las indicaciones, ACTICLOT Proteína S mantiene la linealidad entre 0 y 100%.

[†]Polybrene® es una marca registrada de Abbott Laboratories.

BIBLIOGRAFÍA

1. Discipio, R. G., *et al.* A comparison of human Prothrombin, factor IX (Christmas Factor) factor X (Stuart Factor) and Protein S. *Biochemistry* 1977, **16**: 698-706.
2. Schmidel, D. K. Organization of the human Protein S genes. *Biochemistry* 1990, **16**: 7845-7852.
3. Walker, F. J. Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. *Journal of Biological Chemistry* 1980, **255**: 5521-5524.
4. Comp, P. C., *et al.* Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *Journal of Clinical Investigations* 1984, **74**: 2082-2088.
5. Broekmans, A. W., *et al.* Hereditary Protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. *Thrombosis and Haemostasis* 1985, **53**: 273-277.
6. Kamiya, T., *et al.* Inherited deficiency of Protein S in a Japanese family with recurrent venous thromboembolism. A study of three generations. *Blood* 1986, **67**: 406-410.
7. Sschwarz, H. P., *et al.* Identification and quantification of Protein S in human platelets. *Blood* 1985, **66**: 1452-1455.
8. Dahlbäck, Björn. Interaction between vitamin K-dependant Protein S and the complement C4b-binding protein. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1984, **10**: 139-148.
9. Broze, G. J., *et al.* Biochemistry and Physiology of Protein C, Protein S, and Thrombomodulin. In: Colman, *et al.*, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Third Edition* 1994. Philadelphia, PA: J. B. Lippincott Company, 259-275.
10. *Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition*, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.
11. Datos registrados en BioMedica Diagnostics, Stamford, CT 06902.
12. Boyer-Neumann, C., *et al.* Comparison of functional assays for Protein S. *Thrombosis and Haemostasis* 1993, **70**: 946-950.
13. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory – second edition. *NCCLS/CLSI Document C28-A2* June 2000; Vol. 20, No. 13
14. Bertina, R. M. Hereditary Protein S deficiency. *Haemostasis* 1995, **15**: 241-246.
15. Hathaway, W. E. and Goodnight, Jr., S. H. *Disorders of Hemostasis and Thrombosis: A Clinical Guide*. McGraw-Hill 1993, p. 350.

ITALIANO

UTILIZZO

ACTICLOT® Proteína S è un dosaggio coagulativo "funzionale" per la determinazione quantitativa dell'attività della Proteína S nel plasma umano.

PRINCIPIO

Il dosaggio ACTICLOT Proteína S è un test plasmatico basato sul principio della coagulazione. Nel dosaggio, diluizioni di campioni di plasma prelevati da pazienti vengono miscelati con plasma privo di Proteína S. Un reagente contenente fattore Xa, Proteína C attivata e fosfolipidi viene aggiunto alla miscela. In seguito ad un periodo d'incubazione della durata di 5 minuti, viene aggiunto cloruro di calcio per dare inizio alla formazione del coagulo. In queste condizioni, il prolungamento del tempo di coagulazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di Proteína S presente nei campioni di plasma dei pazienti.

PRIORITÀ BASSA

Nel 1977 DiScipio *et al.* identificarono per primi la Proteína S (S sta per Seattle) umana.¹ La Proteína S umana è una glicoproteina a catena singola composta da 635 amminoacidi (69.000 kD) che circola nel plasma ad una concentrazione di circa 320 nmol/L. Il gene attivo della Proteína S presenta 15 esoni e si estende per più di 80 kilobasi sul cromosoma 3.² La Proteína S è una proteina vitamina K-dipendente sintetizzata principalmente nel fegato ma anche nell'endotelio e probabilmente nei megacariociti. È possibile che le tre fonti da cui deriva la Proteína S svolgano tutte un ruolo importante nella regolazione dell'emostasi.

La Proteína S non sembrava essere il precursore zimogeno di una proteinasi serinica e la sua funzione è rimasta ignota fino al 1980 quando Walker riportò che la Proteína S bovina funge da cofattore per la Proteína C attivata nel processo di inattivazione del fattore V attivato.³ Studi clinici confermarono ben presto l'importanza biologica della regolazione della coagulazione da parte della via coagulativa che coinvolge la Proteína C, la Proteína S e la trombomodulina. In certe famiglie è stata documentata un'associazione tra trombosi e carenza parziale di Proteína S.^{4,5,6} La Proteína S è stata inoltre riscontrata sulla superficie delle cellule endoteliali e nelle piastrine.⁷ All'incirca il 60% della Proteína S presente nel plasma umano è strettamente associata alla proteina legante la C4b e pertanto i livelli plasmatici di Proteína S possono non riflettere completamente la sua biodisponibilità.⁸ Questo complesso non presenta alcuna attività di cofattore anticoagulante. Si suppone che la Proteína S possa essere implicata nel sistema del complemento mediando l'associazione tra la proteina legante la C4b (C4bBP) e le superfici cellulari che, in seguito a danneggiamento o attivazione, espongono fosfolipidi a carica negativa.⁹ Ciò potrebbe rappresentare un altro importante meccanismo di regolazione della Proteína S.

REAGENTI

- R1 Reagente attivatore ACTICLOT: 4 flaconi da 1 mL ciascuno di materiale liofilizzato contenente Proteína C umana attivata, fattore Xa bovino e fosfolipide da cervello di coniglio.
- R2 Plasma privo di Proteína S: 4 flaconi da 1 mL ciascuno di plasma umano liofilizzato che è stato privato di Proteína S tramite immunoassorbimento su una colonna di anticorpi di capra immobilizzati diretti contro la Proteína S umana.
- R3 Tampone di diluizione del campione (concentrato 10x): 2 flaconi da 2,5 mL di concentrato che, una volta ricostituito, contiene 0,2 mol/L di NaCl, 0,03 mol/L di HEPES ed una quantità di Polybrene®[†] sufficiente per neutralizzare fino a 1,2 U/mL di eparina in un campione di plasma.
- R4 Plasma di controllo Proteína S: 2 flaconi da 0,5 mL ciascuno di plasma umano normale liofilizzato citrato di cui si è provveduto a determinare e a stampare sull'etichetta del flacone il livello di attività di coagulazione della Proteína S.

*Il presente kit contiene reagenti sufficienti per un numero di test che va da 40 a 160 a seconda che il test venga eseguito con metodo manuale o automatico ed in base al tipo di strumento utilizzato.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI D'IMPIEGO

Ciascuna unità di sangue donato, utilizzata nella preparazione del reagente attivatore, del plasma privo di Proteína S e del plasma di controllo, è stata testata con un metodo approvato dalla FDA ed è risultata non reattiva per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg), del virus dell'epatite C (HCV) e del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1). Nessuno dei metodi analitici conosciuti può escludere in modo assoluto la presenza di HBsAg, HCV, HIV-1 o di altri agenti infettivi; si raccomanda pertanto di trattare questo reagente come se fosse siero o campione di sangue umano potenzialmente infettivo e di adottare di conseguenza le necessarie misure di sicurezza.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Analizzatore automatico per l'esecuzione di test coagulativi con metodo foto-ottico, coagulometro meccanico oppure cronometro
Soluzione di cloruro di calcio da 0,025 mol/L
Acqua deionizzata di Tipo I
Incubatore o bagnomaria regolato a 37°C
Cilindro graduato da 25 mL
Pipetta per la dispensazione di volumi variabili da 100 a 1000 µL
Carta millimetrata, Centrifuga (capacità: 2.500 x g)

RICOSTITUZIONE DEI REAGENTI E STABILITÀ

Se conservati ad una temperatura compresa tra 2 ed 8°C, i reagenti non ricostituiti si mantengono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone.

A. Reagente Attivatore ACTICLOT (R1)

Ricostituire con 1 mL di acqua deionizzata di Tipo I. Per garantire una completa dissoluzione, lasciare riposare a temperatura ambiente (18-25°C) per 20 minuti. Conservare a 2-8°C ed utilizzare entro 4 ore. Il Reagente attivatore ricostituito può essere conservato congelato a:

	30 giorni
	-20°C

B. Plasma Privo di Proteina S (R2)

Ricostituire con 1 mL di acqua deionizzata di Tipo I. Miscelare delicatamente e lasciare riposare a temperatura ambiente per 20 minuti per garantire una completa dissoluzione. Conservare a 2-8°C ed utilizzare entro 4 ore. Il plasma può essere conservato congelato a:

	30 giorni
	-20°C

C. Tampone di Diluizione del Campione (R3)

Diluire il contenuto di un flacone a 25 mL di acqua deionizzata di Tipo I. Conservare a:

	30 giorni
	2° - 8°C

D. Plasma di Controllo Proteina S (R4)

Ricostituire con 0,5 mL di acqua deionizzata di Tipo I. Miscelare delicatamente e lasciare riposare a temperatura ambiente per 20 minuti per garantire una completa dissoluzione. Dispensare in una provetta di plastica. Se conservato ad una temperatura compresa tra 2 ed 8°C, il reagente ricostituito si mantiene stabile per un'ora.

	1 ora
	2° - 8°C

ACCUMULAZIONE E PREPARAZIONE DELL'ESEMPLARE

Consultare la sezione "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays", (Prelievo, trasporto e elaborazione di campioni di sangue per test coagulativi e la performance dei tests coagulativi), documento H21-A5 dell'CLSI, vol. 28, n. 5, 2008.¹⁰ Procedere al prelievo di campioni di plasma attenendosi alle seguenti istruzioni:

1. Prelevare 9 volumi di sangue in 1 volume di 0,1 mol/L di citrato trisodico.
2. Centrifugare ad una velocità di 2.500 x g per 15 minuti.
3. Il plasma deve essere conservato a 2-8°C ed analizzato entro 2 ore dal prelievo. In alternativa, il plasma può essere conservato a:

	1 mese
	-20°C

4. Scongelato una volta a 37°C, 30 minuti prima dell'uso.

RINTRACCIABILITÀ DEI MATERIALI DI CONTROLLO

È possibile richiedere delle informazioni relative alla rintracciabilità dei materiali di controllo presso l'American Diagnostica Inc.¹¹

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il plasma di controllo Proteina S contenuto nel kit è stato valutato in base ad una preparazione di riferimento internazionalmente riconosciuta e può essere analizzato nell'ambito del programma di controllo di qualità vigente nel rispettivo laboratorio per il presente dosaggio. Il plasma di controllo va incluso nella seduta analitica ogniqualvolta vengano utilizzati reagenti ricostituiti a fresco. La concentrazione di Proteina S ottenuta per ciascun plasma di controllo deve rientrare nel range specificato dal rispettivo fornitore o laboratorio. In caso contrario occorre ripetere la seduta analitica. Se le concentrazioni di Proteina S dei controlli non rientrano ripetutamente nei limiti di accettabilità specificati, contattare l'BioMedica Diagnostics.

Calibratura di Analisi

Ogni volta che si esegue il dosaggio è necessario costruire una nuova curva standard. Per la preparazione degli standard del dosaggio va utilizzato un pool di plasma normale (PNP) ottenuto da almeno 20 donatori normali, che sia stato prelevato allo stesso modo dei campioni di plasma da analizzare. Può essere anche utilizzato plasma di riferimento preparato in commercio con concentrazione nota di Proteina S. Preparare gli standard Proteina S, il plasma di controllo ed i campioni di plasma dei pazienti subito prima dell'analisi procedendo come di seguito descritto:

Standard e Campioni – Diluizioni raccomandate

Curva standard Proteina S	PNP o plasma di riferimento	Tampone di diluizione
100%	100 µL	900 µL
50%	500 µL di standard 100%	500 µL
0%†	Nessuno	1000 µL
Campioni di pazienti e plasma di controllo	Campioni di pazienti e plasma di controllo	Tampone di diluizione
100%	50 µL	450 µL

† Su strumenti automatici, il punto più basso corrisponde ad una diluizione minima (ca. 12,5%) e non ad un "vero" standard 0%.

Conservare le diluizioni su ghiaccio ed analizzare entro 30 minuti.

PROCEDURA

1. Dispensare il Reagente attivatore ACTICLOT ed il cloruro di calcio nei pozzetti dei reagenti regolati a 37°C di un coagulometro. Incubare per almeno 2 minuti.
2. Aggiungere in una cuvetta di coagulazione 0,1 mL di plasma privo di Proteina S e 0,1 mL di plasma diluito. Incubare per 2 minuti a 37°C.
3. Aggiungere nella cuvetta 0,1 mL di Reagente attivatore ACTICLOT preriscaldato. Incubare per 5 minuti esatti a 37°C.
4. Aggiungere 0,1 mL di cloruro di calcio preriscaldato. Avviare il cronometro e registrare il tempo di coagulazione. Analizzare in duplicato ciascun campione del test e ciascun controllo e calcolare il valore medio dei risultati ottenuti.

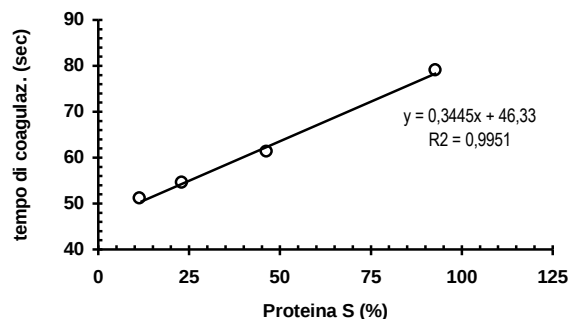
Nota: Per garantire risultati accurati e riproducibili, utilizzare dispensatori calibrati ed attenersi alle procedure raccomandate, in particolar modo per quanto riguarda i tempi e le temperature di incubazione.

CURVA DI CALIBRATURA

Tracciare su carta millimetrata lineare l'attività espressa in percentuale della Proteina S degli standard di calibrazione (asse x) rispetto al tempo di coagulazione medio (asse y). Tracciare la retta che rappresenta il miglior fittaggio tra i punti. Determinare per i campioni dei pazienti e di controllo l'attività percentuale della Proteina S per interpolazione in base alla curva standard. Nei campioni di pazienti con lupus anticoagulante o con attività di Proteina S patologicamente elevata, per i quali sono state utilizzate diluizioni multiple, correggere il livello di Proteina S in base al fattore di diluizione. Se i livelli di Proteina S corretti continuano a non corrispondere ai valori previsti, è molto probabile che nel campione del paziente sia presente un inibitore estremamente forte che rende impossibile determinarne con questo dosaggio l'attività esatta.

Curva di Calibratura del Campione

La curva di calibrazione sotto riportata è solo a scopo esemplificativo. Ogni volta che si esegue il dosaggio è necessario costruire una nuova curva standard. Non utilizzare l'esempio di curva sotto riprodotta.



LIMITI ED INTERFERENZE

La presenza nel campione del paziente di eparina a concentrazioni superiori a 1,2 U/mL oppure la presenza di lupus anticoagulante può invalidare i risultati del dosaggio prolungando il tempo di coagulazione, dando luogo di conseguenza ad un valore artificialmente elevato di Proteina S. Per neutralizzare quest'effetto, analizzare tali campioni a diluizioni multiple.¹¹

La presenza di mutazione Leiden del fattore V nel paziente può incidere sui dosaggi funzionali per la determinazione della Proteina S poiché questa condizione inibisce l'aumentata inattivazione del fattore Va esercitata dalla Proteina S mediante la Proteina C attivata.

Non utilizzare il presente test quale unico strumento di diagnosi; esso va affiancato da test coagulativi standard.

VALORI ATTESI

Il valore di Proteina S viene solitamente espresso come percentuale relativa in rapporto al valore di uno standard o di pool di plasma normale. Il range di normalità atteso per la Proteina S è 55-160%.¹² Tuttavia, ciascun laboratorio deve determinare il proprio range di normalità.¹³ La concentrazione di Proteina S nel plasma dei maschi è del 10%-15% più elevata che non nelle femmine e la concentrazione tende ad aumentare in entrambi i sessi con il progredire dell'età.⁹ Una diminuzione di Proteina S è associata ad una maggiore incidenza di tromboembolismo.¹⁴ Una riduzione dell'attività della Proteina S non indica necessariamente una riduzione della concentrazione della Proteina S nel plasma. La Proteina S (totale) è presente nel plasma come proteina libera e proteina legata a C4bBP. Soltanto la frazione libera della Proteina S funge da cofattore per la Proteina C attivata. In presenza di attività ridotta della Proteina S, è importante stabilire i livelli plasmatici sia della Proteina S libera che della Proteina S legata a C4bBP. Sono stati descritti tre tipi di carenza congenita da Proteina S, come sintetizzato nella Tabella 1.¹⁵

Tabella 1

TIPO DI CARENZA	PROTEINA S TOTALE	PROTEINA S LIBERA	ATTIVITÀ PROTEINA S
I	∇ ^b	∇	∇
II	↔ ^a	↔	∇
III	↔	∇	∇

a: ↔ = normale

b: ∇ = concentrazione ridotta

I livelli di Proteina S possono inoltre essere ridotti in presenza di epatopatia e nel corso di terapia a base di anticoagulanti. Inoltre, l'attività della Proteina S e l'antigene della Proteina S libera possono risultare ridotti in concomitanza di malattia infiammatoria caratterizzata da livelli elevati di C4bBP.

PRESTAZIONI

Spetta all'utente finale stabilire le caratteristiche di prestazione del prodotto relativamente al metodo specifico o alla strumentazione impiegata. Di seguito si riportano i risultati ottenuti da studi condotti utilizzando un analizzatore automatico con metodo di rivelazione foto-ottico.¹

Esattezza

Da uno studio eseguito utilizzando un altro kit per la Proteina S disponibile in commercio è stato ottenuto un coefficiente di correlazione di 0,868 per 78 campioni analizzati, con un'equazione di regressione di $y = 0,913x + 17,2$.

Precisione

Si sono ottenuti i seguenti coefficienti di variazione (CV):

Livello Proteina S	CV intra-dosaggio	CV inter-dosaggio
Plasma normale (87%)	3,0%	5,9%
Plasma anormale (42%)	2,3%	5,1%

Specificità

Il dosaggio ACTICLOT Proteina S è stato messo a punto per fornire una curva standard lineare per i livelli di Proteina S compresi tra lo 0 ed il 100%, se tracciata seguendo le istruzioni summenzionate.

*Polybrene® è un marchio commerciale registrato di Abbott Laboratories.

BIBLIOGRAFIA

- Discipio, R. G., et al. A comparison of human Prothrombin, factor IX (Christmas Factor) factor X (Stuart Factor) and Protein S. *Biochemistry* 1977, **16**: 698-706.
- Schmidel, D. K. Organization of the human Protein S genes. *Biochemistry* 1990, **16**: 7845-7852.
- Walker, F. J. Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. *Journal of Biological Chemistry* 1980, **255**: 5521-5524.
- Comp, P. C., et al. Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *Journal of Clinical Investigations* 1984, **74**: 2082-2088.
- Broekmans, A. W., et al. Hereditary Protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. *Thrombosis and Haemostasis* 1985, **53**: 273-277.
- Kamiya, T., et al. Inherited deficiency of Protein S in a Japanese family with recurrent venous thromboembolism. A study of three generations. *Blood* 1986, **67**: 406-410.
- Schwarz, H. P., et al. Identification and quantification of Protein S in human platelets. *Blood* 1985, **66**: 1452-1455.
- Dahlbäck, Björn. Interaction between vitamin K-dependant Protein S and the complement C4b-binding protein. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1984, **10**: 139-148.
- Broze, G. J., et al. Biochemistry and Physiology of Protein C, Protein S, and Thrombomodulin. In: Colman, et al., eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Third Edition* 1994. Philadelphia, PA: J. B. Lippincott Company, 259-275.
- Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.
- Dati su file disponibili presso la BioMedica Diagnostics.
- Boyer-Neumann, C., et al. Comparison of functional assays for Protein S. *Thrombosis and Haemostasis* 1993, **70**: 946-950.
- How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory – second edition. *NCCLS/CLSI Document C28-A2* June 2000; Vol. 20, No. 13.
- Bertina, R. M. Hereditary Protein S deficiency. *Haemostasis* 1995, **15**: 241-246.
- Hathaway, W. E. and Goodnight, Jr., S. H. *Disorders of Hemostasis and Thrombosis: A Clinical Guide*. McGraw-Hill 1993, p. 350.

PORTUGUÊS

PROPÓSITO DE UTILIZAÇÃO

O ACTICLOT® Proteina S é um teste funcional de coagulação para a determinação quantitativa da actividade da proteína S no plasma humano.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste ACTICLOT Proteina S é um teste plasmático baseado no princípio da coagulação. No teste, diluições de plasma do paciente são misturadas com plasma livre de proteína S. A esta mistura é adicionado um reagente que contém factor Xa, proteína C activada e fosfolípidos. Depois de um período de incubação de 5 minutos, adiciona-se cloreto de cálcio para provocar a coagulação. Nestas condições, o aumento do tempo de coagulação é directamente proporcional à concentração de proteína S na amostra de plasma do paciente.

INFORMAÇÃO GERAL

EM 1977 DiScipio et al. Identificaram pela primeira vez a proteína S (S de Seattle) humana.¹ A proteína S humana é uma glucoproteína de cadeia única composta por 635 aminoácidos (69 000 kD) que circula no plasma a uma concentração aproximadamente de 320 nmol/L. O gene activo da proteína S apresenta 15 exões e estende-se por mais de 80 kilobases sobre o cromossoma 3.² A proteína S é uma proteína dependente da vitamina K, que é sintetizada principalmente no fígado, mas também no endotélio e possivelmente nos megacariócitos. É possível que estas três fontes das quais deriva a proteína S desempenhem uma função importante na regulação da hemostase.

A proteína S não parecia ser o precursor de uma proteinase serina e a sua função foi desconhecida até 1980, quando Walker expôs que a proteína S bovina actuava como co-factor para a proteína C activada no processo de inactivação do factor V activado.³ Estudos clínicos confirmaram imediatamente a importância biológica da regulação da coagulação por parte da via metabólica na qual estão envolvidas a proteína C, a proteína S e a trombomodulina. Em certas famílias foi possível documentar uma relação entre a trombose e a carência parcial de proteína S.^{4,5,6} A proteína S foi encontrada também na superfície de células endoteliais e de plaquetas.⁷ Cerca de 60% da proteína S presente no plasma humano está estreitamente ligada à proteína unida a C4b; os níveis plasmáticos de proteína S podem como tal, não reflectir completamente a sua biodisponibilidade.⁸ Este complexo não apresenta nenhuma actividade de co-factor anticoagulante. Supõe-se que a proteína S possa estar implicada no sistema do complemento actuando como intermediária da associação entre a proteína unida a C4b (C4bBP) e as superfícies da célula expostas, como consequência de terem sido danificadas ou activadas, a fosfolípidos com carga negativa.⁹ Isto poderia representar um outro mecanismo importante de regulação da proteína S.

REAGENTES

- R1 ACTICLOT Reagente activador: 4 frascos de 1 mL cada um de material liofilizado (contém proteína C humana activada, factor Xa bovino e fosfolípido de cérebro de coelho).
- R2 Plasma livre de proteína S: 4 frascos de 1 mL cada um de plasma humano liofilizado que foi liberto de proteína S através de imunoabsorção sobre uma coluna de anticorpos de cabra imobilizados, contra a proteína S humana.
- R3 Tampão de diluição para a amostra (concentrado 10X): 2 frascos de 2,5 mL cada um de concentrado, o qual, após reconstituição, contém 0,2 mol/L de NaCl, 0,03 mol/L de HEPES e uma quantidade suficiente de Polybrene[®] para neutralizar até 1,2 U/mL de heparina numa amostra de plasma.
- R4 Plasma de controlo de proteína S: 2 frascos de 0,5 mL cada um de plasma humano normal liofilizado e tratado com citrato cuja actividade coagulante de proteína S foi determinada e vem indicada no rótulo.

*O presente kit contém reagentes suficientes para realizar entre 40 a 160 determinações, dependendo destes se realizarem manual ou automática mente e em função do tipo de instrumento que se utilize.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS PARA OS UTILIZADORES

Todas as unidades de sangue doadas e empregues para a produção do reagente activador do plasma livre de proteína S e do plasma de controlo foram testadas mediante um método homologado pela FDA e qualificadas como não reactivas para o antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg), para o vírus da Hepatite C (HCV) e par o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1). Uma vez que nenhum dos métodos analíticos actualmente conhecidos permite garantir completamente a ausência de HBsAg, HCV, HIV-1 ou outros agentes infecciosos, este reagente deve ser considerado como potencialmente infeccioso e ser tratado segundo as recomendações aplicáveis ao soro e às amostras de sangue humano.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Analisador automático foto-óptico de coagulação, coagulómetro mecânico ou cronómetro
Solução de cloreto de cálcio de 0,025 mol/L
Água desionizada do tipo I
Incubadora ou banho de água (37°C)
Proveta graduada de 25 mL
Pipeta para distribuir volumes variáveis de 100 a 1000 µL
Papel milimétrico
Centrifugadora (capacidade: 2.500 x g)

RECONSTITUIÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Caso se conservem a uma temperatura compreendida entre os 2° e os 8° C, os reagentes não reconstituídos mantêm-se estáveis até ao final do prazo de validade indicado no rótulo da ampola.

A. ACTICLOT Reagente Activador (R1)

Reconstituir com 1 mL de água desionizada do tipo I. Para garantir uma dissolução completa, deixar durante 20 minutos à temperatura ambiente (18-25°C). Conservar entre 2° e 8°C e utilizar no prazo seguinte de 4 horas. O reagente activador já reconstituído pode ser mantido congelado a:

	30 dias
	-20°C

B. Plasma Livre de Proteína S (R2)

Reconstituir com 1 mL de água desionizada do tipo I. Misturar cuidadosamente e deixar durante 20 minutos à temperatura ambiente para garantir uma dissolução completa. Conservar a 2° - 8°C e utilizar dentro das 4 horas seguintes. O plasma pode ser mantido congelado a:

	30 dias
	-20°C

C. Tampão de Dissolução Para a Amostra (R3)

Diluir o conteúdo de um frasco a 25 mL de água desionizada do tipo I. Conservar a:

	30 dias
	2° - 8°C

D. Plasma de controlo de proteína S (R4)

Reconstituir com 0,5 mL de água desionizada do tipo I. Misturar cuidadosamente e deixar durante 20 minutos à temperatura ambiente para garantir uma dissolução completa. Transferir para um tubo de ensaio de plástico. O reagente reconstituído é estável durante:

	1 hora
	2° - 8°C

RECOLHA DE AMOSTRAS

Consulte o documento H21-A5 do CLSI, vol. 28, nº 5, 2008, com o título "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays"¹⁰, (Recolha, transporte e processo de amostras de sangue para testes de coagulação e para a realização de testes de coagulação). A recolha de amostras de plasma deverá realizar-se do seguinte modo:

1. Recolher 9 volumes de sangue num 1 volume de 0,1 mol/L de citrato trissódico.
2. Centrifugar a uma velocidade de 2.500 x g durante 15 minutos.
3. O plasma deverá ser conservado a 2°-8°C e analisado dentro das 2 horas seguintes à recolha. Como alternativa, o plasma pode ser conservado a:

	1 mês
	-20°C

4. O plasma pode ser descongelado a 37°C, 30 minutos antes da sua utilização. O plasma pode ser descongelado unicamente uma vez.

TRAÇABILIDADE DOS MATERIAIS DE CONTROLO

Caso o deseje, solicite à BioMedica Diagnostics informação relativa à traçabilidade dos materiais de controlo.¹¹

CONTROLO DE QUALIDADE

O plasma de controlo de proteína S contido no kit foi avaliado com base numa preparação de referência internacionalmente reconhecido e pode ser analisado como parte integrante do programa de controlo de qualidade em vigor no respectivo laboratório para o presente teste. O plasma de controlo deverá ser incluído no procedimento analítico quando sejam utilizados reagentes recém reconstituídos. O nível de concentração de proteína S obtida para cada plasma de controlo deve encontrar-se dentro do intervalo especificado pelo respectivo fornecedor ou laboratório. Caso contrário, deverá repetir-se o teste. Se o nível de concentração de proteína S obtido para cada plasma de controlo se situar repetidamente fora dos limites de aceitabilidade especificados, pedimos que entre em contacto com a BioMedica Diagnostics.

CALIBRAÇÃO DO TESTE

Cada vez que se efectue um teste é necessário determinar uma nova curva padrão. Para a preparação dos padrões do teste deverá ser utilizado um pool de plasma normal (PNP), proveniente de 20 doadores normais no mínimo, e recolhido da mesma maneira que as amostras de plasma que vão ser analisadas. Pode também ser utilizado plasma de referência preparado comercialmente com um nível de concentração de proteína S conhecido. Imediatamente antes de proceder às análises, preparar os padrões de proteína S, o plasma de controlo e as amostras de plasma dos pacientes procedendo da forma indicada em seguida:

Padrões e Amostras - Diluições recomendadas

Curva padrão de proteína S	PNP ou plasma de referência	Tampão de diluição
100%	100 µL	900 µL
50%	500 µL de padrão 100%	500 µL
0%†	Nenhum	1000 µL
Amostras de pacientes e plasma de controlo	Plasma de paciente e controlo	Tampão de diluição
100%	50 µL	450 µL

† No caso de aparelhos automáticos, o ponto mais baixo corresponde a uma diluição mínima (aprox. 12,5%) e não a um "verdadeiro" padrão 0%.

Conservar as diluições sobre gelo molhado e analisar nos 30 minutos seguintes.

PROCEDIMENTO

- Transferir o reagente activador ACTICLOT e o cloreto de cálcio nos poços dos reagentes aquecidos a 37°C de um coagulómetro. Incubar durante 2 minutos no mínimo.
- Adicionar numa cuvette de coagulação 0,1 mL de plasma livre de proteína S e 0,1 mL de plasma de teste diluído. Incubar a 37°C durante 2 minutos.
- Adicionar na cuvette 0,1 mL do reagente activador ACTICLOT previamente aquecido. Incubar a 37°C durante exactamente 5 minutos.
- Adicionar 0,1 mL de cloreto de cálcio previamente aquecido. Colocar em funcionamento o cronómetro e anotar o tempo de coagulação. Analisar em duplicado cada amostra de teste e cada controlo e, calcular o valor médio dos resultados obtidos.

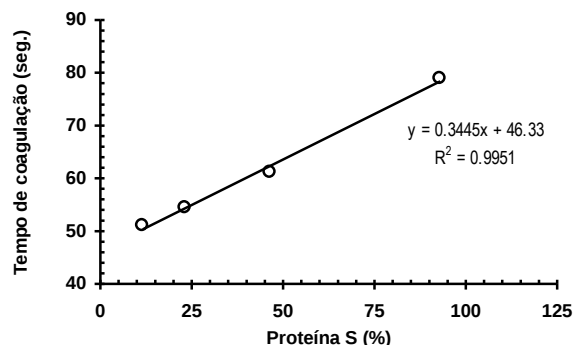
Nota: Para garantir a exactidão e o bom funcionamento dos resultados, devem ser utilizados equipamentos de pipeta calibrados e ter-se em conta exactamente os parâmetros aqui indicados para a execução, em particular, os parâmetros que dizem respeito ao tempo e às temperaturas de incubação.

CURVA DE CALIBRAÇÃO

Traçar em papel milimétrico a actividade expressa em percentagem da proteína S dos padrões de calibração (eixo dos x) em relação com o tempo médio de coagulação (eixo dos y). Com os pontos assim obtidos, traçar a recta de regressão ("line of best fit"). Determinar para as amostras dos pacientes e amostras de controlo a actividade percentual da proteína S interpolando os dados obtidos na curva padrão. Nas amostras de pacientes com anti-coagulante lúpico ou com actividade da proteína S anormalmente elevada, e para os quais foram utilizadas diluições múltiplas, corrigir o nível de proteína S com base no factor de diluição. Caso os níveis de proteína S corrigidos continuarem sem coincidir com os valores previstos, é muito provável que a amostra do paciente contenha um forte agente inibidor que torne impossível determinar a actividade exacta através deste teste.

Exemplo de Curva de Calibração

A curva de calibração apresentada em seguida serve apenas como um exemplo. Cada vez que se efectue um teste é necessário criar uma nova curva padrão. Não aplicar a curva que está aqui representada como exemplo para análise!



LIMITAÇÕES E INTERFERÊNCIAS

A presença de heparina na amostra do paciente em concentrações superiores a 1,2 U/mL, assim como a presença de anti-coagulante lúpico pode ter influência no resultado do teste e prolongar o tempo de coagulação, dando origem como consequência, a um valor de proteína S artificialmente elevado. Para neutralizar este efeito, as amostras devem ser analisadas com diluições múltiplas.¹¹

A presença de uma mutação Leiden do factor V no paciente pode incidir no teste funcional para a determinação da proteína S, uma vez que esta condição inibe, por causa da proteína C activada, uma melhor inactivação do factor Va favorecido pela proteína S.

Não utilizar o teste aqui apresentado como único instrumento de diagnóstico. Respeitar as normas padrões relativas aos testes de coagulação.

VALORES PREVISTOS

O valor da proteína S é expresso geralmente como uma percentagem relativa do valor de um plasma padrão ou de um plasma normal proveniente de um pool. O intervalo normal de valores que são esperados obter para a proteína S é entre 55-160%.¹² No entanto, cada laboratório deverá determinar o seu próprio intervalo de normalidade.¹³ Nos homens a concentração da proteína S no plasma é entre 10%-15% maior do que nas mulheres. Esta concentração aumenta ligeiramente com a idade, em ambos os sexos.⁹ A diminuição da concentração de proteína S está associada a uma maior incidência de tromboembolismo.¹⁴ A diminuição da actividade da proteína S não indica necessariamente uma diminuição do nível de concentração da proteína S no plasma. A proteína S total encontra-se presente no plasma enquanto proteína livre e como proteína ligada a C4bBP. Apenas a proteína S livre actua enquanto co-factor para a proteína C activada. Se a actividade da proteína S diminui, é importante determinar os níveis de concentração no plasma tanto da proteína S livre como da proteína S ligada a C4bBP. Os três tipos conhecidos de deficiências congénitas da proteína S vêm descritos na tabela 1.¹⁵

Tabela 1

TIPO DE DEFICIÊNCIA	PROTEÍNA S TOTAL	PROTEÍNA S LIVRE	PROTEÍNA S ACTIVADA
I	▽ ^b	▽	▽
II	↔ ^a	↔	▽
III	↔	▽	▽

a: ↔ = normal

b: ▽ = nível de concentração reduzido

Os níveis de concentração da proteína S podem também diminuir no caso de afecções hepáticas e durante um tratamento com anticoagulantes. Por outro lado, a actividade da proteína S e o antígeno da proteína S livre podem encontrar-se reduzidos no caso de uma afecção inflamatória com níveis de concentração de C4bBP elevados.

CARACTERÍSTICAS DE EXECUÇÃO

O utilizador deverá estabelecer as características de execução do produto em função de cada método e instrumento específico que utilize. Em estudos realizados com um analisador automático com detecção foto-óptica foram obtidos os resultados que se mostram mais em baixo.¹¹

Exactidão

Um estudo realizado com outro kit disponível no mercado de proteína S, obteve um coeficiente de correlação de 0,868 para 78 amostras testadas, com uma recta de regressão de $y = 0,913x + 17,2$.

Precisão

Foram observados os seguintes coeficientes de variação (CV):

Concentração de proteína S	CV entre sequências de testes	CV durante os testes
Plasma normal (87%)	3,0%	5,9%
Plasma anormal (42%)	2,3%	5,1%

Sensibilidade

De acordo com as indicações, ACTICLOT Proteína S mantém a linearidade entre 0 e 100%.

¹¹Polybrene® é uma marca registada de Abbott Laboratories.

BIBLIOGRAFIA

1. Discipio, R. G., *et al.* A comparison of human Prothrombin, factor IX (Christmas Factor) factor X (Stuart Factor) and Protein S. *Biochemistry* 1977, **16**: 698-706.
2. Schmidel, D. K. Organization of the human Protein S genes. *Biochemistry* 1990, **16**: 7845-7852.
3. Walker, F. J. Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. *Journal of Biological Chemistry* 1980, **255**: 5521-5524.
4. Comp, P. C., *et al.* Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *Journal of Clinical Investigations* 1984, **74**: 2082-2088.
5. Broekmans, A. W., *et al.* Hereditary Protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. *Thrombosis and Haemostasis* 1985, **53**: 273-277.
6. Kamiya, T., *et al.* Inherited deficiency of Protein S in a Japanese family with recurrent venous thromboembolism. A study of three generations. *Blood* 1986, **67**: 406-410.
7. Schwarz, H. P., *et al.* Identification and quantification of Protein S in human platelets. *Blood* 1985, **66**: 1452-1455.
8. Dahlbäck, Björn. Interaction between vitamin K-dependant Protein S and the complement C4b-binding protein. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1984, **10**: 139-148.
9. Broze, G. J., *et al.* Biochemistry and Physiology of Protein C, Protein S, and Thrombomodulin. In: Colman, *et al.*, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Third Edition* 1994. Philadelphia, PA: J. B. Lippincott Company, 259-275.
10. *Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition*, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.
11. Datos registrados en BioMedica Diagnostics, Stamford, CT 06902.
12. Boyer-Neumann, C., *et al.* Comparison of functional assays for Protein S. *Thrombosis and Haemostasis* 1993, **70**: 946-950.
13. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory – Second edition. *NCCLS/CLSI Document C28-A2* June 2000; Vol. 20, No. 13
14. Bertina, R. M. Hereditary Protein S deficiency. *Haemostasis* 1995, **15**: 241-246.
15. Hathaway, W. E. and Goodnight, Jr., S. H. *Disorders of Hemostasis and Thrombosis: A Clinical Guide*. McGraw-Hill 1993, p. 350.

	ENGLISH	DEUTSCH	FRANCAIS	ESPAÑOL	ITALIANO	PORTUGUÊS
	Definition of Symbols	Bedeutung der Symbole	Definizione dei simboli	Definición de símbolos	Définition des symboles	Definição de símbolos
	Consult instructions for use	Gebrauchsanleitung beachten	Lire le mode d'emploi	Consulte las instrucciones para el Uso	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte as instruções de utilização
	Refer to SDS	SDS konsultieren	Reportez-vous à SDS	Consulte SDS	Consultare la SDS	Atenção, consulte a documentação incluída
	In vitro diagnostic medical device	Medizinisches Produkt zur in vitro-Diagnostik	Dispositif de diagnostic médical in vitro	Dispositivo para diagnóstico in vitro	Dispositivo medico per diagnosi in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Manufacturer	Hergestellt durch	Fabricant	Fabricado por	Prodotto da	Fabricante
	Temperature limitation: Store at 2°C to 8°C	Bei 2°C bis 8°C lagern	Conserver à une température de 2°C à 8°C	Conservar entre 2°C y 8°C	Conservare tra 2°C e 8°C	Limites de temperatura
	Batch code / Lot number	Charge	Numéro de lot	Código de lote	Numero di lotto	Código do lote
	Expiration Date	Verfallsdatum	Date d'expiration	Fecha de caducidad	Data di scadenza	Prazo de validade
	Catalog number	Katalog-Nr	Numéro de référence dans le catalogue	Número de catálogo	Numero di catalogo	Referência de catálogo
	CE Mark	CE-Siegel	Marque CE	Marca CE	Marchio CE	Marca CE
	European Authorised Representative	Autorisierte Vertretung für Europa	Représentant européen autorisé	Representante Europeo Autorizado	Rappresentante autorizzato per l'Europa	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Contains sufficient for <n> tests	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Conteúdo suficiente para "n" ensaios