

helena | BioSciences Europe

www.helena-biosciences.com

Helena BioSciences Europe
Colima Avenue
Sunderland Enterprise Park
Sunderland
SR5 3XB

tel: +44 (0) 191 549 6064

fax: +44 (0) 191 549 6271

email: info@helena-biosciences.com

Other Helena BioSciences Europe offices:

Helena BioSciences Europe
6 Rue Charles Cros-ZAE
95320 Saint Leu La Foret
France

tel: +33 13 995 9292

fax: +33 13 995 6891

email: helena@helena.fr

Helena BioSciences Europe
Via Enrico Fermi, 24
20090 Assago (Milano)
Italy

tel: +39 02 488 1951

or +39 02 488 2141

fax: +39 02 488 2677



Instructions For Use

Protein S Clotting Assay

Cat. No. 5511

Dosage de la protéine S, test de coagulation

Fiche technique

Réf. 5511

Protein S Gerinnungs-Test

Anleitung

Kat. Nr. 5511

Dosaggio di coagulazione per la determinazione della proteina S

Istruzioni per l'uso

Cod. 5511

Valoración de coagulación de proteína S

Instrucciones de uso

No de catálogo 5511

Contents

English	1
Français	5
Deutsch	10
Italiano	15
Español	20

INTENDED PURPOSE

For the determination of functional Protein S levels in human plasma by clotting assay.

Protein S is a vitamin K-dependent protein synthesised in the liver, vascular endothelium, and megakaryocytes, which plays an important physiologic role in the Protein C Anticoagulant System^{1,2}. This anticoagulant system is one of the major regulators of haemostasis by inhibiting clot formation and by promoting fibrinolysis. Protein S functions as a cofactor for activated Protein C on the vascular membrane to facilitate the degradation of clotting factors Va and VIIIa, down-regulating clot formation. In normal plasma approximately 40% of Protein S circulates as a free molecule, while 60% is complexed with C4b, a plasma protein of the classical complement pathway³. Only Free Protein S is functionally active and able to bind to activated Protein C, while the complexed form of Protein S is not⁴.

The Helena BioSciences Protein S (clotting) assay determines the amount of functional Protein S. In this assay, dilutions of normal plasma are mixed with protein S depleted plasma. The mixed plasma is then activated by a reagent which contains activated protein C and phospholipid. After activation, clotting is initiated by the addition of calcium chloride. The prolongation of the clotting time is directly related to the concentration of the protein S in the patient plasma.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for in-vitro diagnostic use only - DO NOT INGEST. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information. Plasma products have been screened and found negative (unless otherwise stated on the kit box or vial) for the presence of Hepatitis B Antigen (HbsAg)³ HIV 1 and 2 antibody and HCV antibody; however they should be handled with the same precautions as a human plasma sample.

COMPOSITION

1. Protein S Activator

Each vial contains activated protein C, rabbit brain phospholipid and bulking agents.

Preparation: Reconstitute with 1.0ml purified water. Allow to stand for 20 minutes and mix well before use.

2. Protein S Deficient Plasma

Each vial contains 1.0ml of immunodepleted protein S deficient human plasma.

Preparation: Reconstitute with 1.0ml purified water. Allow to stand for 20 minutes and mix well before use.

3. Other kit components

Each kit contains Instructions For Use.

STORAGE AND SHELF-LIFE

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

1. Protein S Activator

Reconstituted vials are stable for up to 2 weeks at 2...6°C or 3 hours at 37°C. **DO NOT FREEZE.**

2. Protein S Deficient Plasma

Reconstituted vials are stable for 6 hours at 4°C and 1 month at -20°C if thawed only once.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Cat. No. 5375 Owrens Veronal Buffer
Cat. No. 5386 25mM calcium chloride solution
Cat. No. 5185 SARP (reference plasma)

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

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

STEP BY STEP PROCEDURE

It is recommended that tests be performed in duplicate.

a) Manual method

1. Reconstitute the required vials of reagent. Place the protein S activator reagent and 25mM calcium chloride solution into a 37°C incubator.
2. Prepare a stock standard by mixing 300µl of reference plasma with 4200µl of Owrens Veronal Buffer.

Use the stock standard immediately to make the following standard dilutions:

Stock	standard volume (µl)	Buffer volume (µl)	Activity %
1	400	0	100
2	300	100	75
3	200	200	50
4	100	300	25
5	0	400	0

3. Prepare patient and control dilutions by adding 50µl of plasma to 700µl of buffer. Keep all standard, patient and control dilutions on ice and test within 30 minutes.
4. To a coagulation cuvette add 100µl protein S deficient plasma and 100µl standard, control or patient dilution.
5. Incubate for 1 minute at 37°C.
6. Add 100µl protein S activator reagent.
7. Incubate for 2 minutes at 37°C.
8. Add 100µl calcium chloride solution and start timer.
9. Note clotting time to the nearest 0.1 seconds.
10. Plot the protein S activity (X-axis) versus clot time (Y-axis) on linear graph paper.
11. Interpolate patient and control values from the straight calibration line.

b) Automated methods

Refer to the Operator's Manual provided by the instrument manufacturer for programming instructions.

INTERPRETATION OF RESULTS

Protein S deficiency, either congenital or acquired, may lead to serious thrombotic events such as thrombophlebitis, deep vein thrombosis, or pulmonary embolism. The prevalence of Protein S deficiency has been estimated to be less than 1 case per 300 in the general population. Two-thirds of patients with a congenital deficiency of Protein S (levels less than 50% of normal) may present with venous thrombosis in young adulthood^{5,6}. In young patients (<35 years) with a history of thrombosis, the prevalence may be as high as 15% to 18%⁷. Acquired Protein S deficiency may be seen during pregnancy, oral contraceptive or oral anticoagulant therapy, liver disease, diabetes mellitus, postoperative complications, septicemia and various inflammatory syndromes⁸. A decreased Protein S activity in plasma may be the result of low concentrations or abnormal function of the Protein S molecule.

A decrease in protein S is associated with increased incidence of thromboembolism¹⁰. A decrease in protein S activity does not necessarily indicate a decrease in concentration. The laboratory diagnosis of Protein S deficiency may require both qualitative (functional) and quantitative (antigen level) determinations¹¹. Helena BioSciences provides both Total and Free Protein S ELISA's (Cat. No. 5286 / 5293).

QUALITY CONTROL

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

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

Cat. No. 5301 SAC-1

Cat. No. 5302 SAC-2

LIMITATIONS:

Lupus antibody positive samples with prolonged aPTT times may give false high protein S values and should be confirmed by free antigen assay⁹. Borderline or low functional Protein S levels on patients with F-V (Leiden) should be confirmed by free Protein S antigen assay⁹. Patients with high levels (>200%) of protein S activity should be tested at multiple dilutions to obtain accurate results. Corrected protein S levels from at least 2 dilutions must agree. Heparin at levels >2 units/ml may interfere by prolonging clot times and hence increasing apparent protein S values. Patients on warfarin may have false low protein S activity⁹.

REFERENCE VALUES

Reference values can vary between laboratories depending on the techniques and systems in use. For this reason each laboratory should establish its own normal range.

The expected normal range for protein S is gender specific⁹.

Males 85 - 157% Females 65 - 136%

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been determined by Helena BioSciences or their representatives as a guideline. Each laboratory should establish its own performance data.

Within assay reproducibility		
	Protein S Level (%)	Within assay CV (%)
n = 10	94	3.96
n = 8	52	7.21

Between assay reproducibility		
	Protein S Level (%)	Between assay CV (%)
n = 10	82	5.95
n = 8	48	7.53

Accuracy

Comparison of the Helena BioSciences Protein S (Clotting) Kit with another commercially available Protein S method (Free protein S by ELISA) showed well correlated results ($r=0.7781$).

Sensitivity

The method is sensitive to 17.6% Protein S.

Linearity

The method is designed to give a linear standard curve from 17.6%-150% protein S.

BIBLIOGRAPHY

1. DiScipio, R.G. & Davie, E.W., 'Characterisation of Protein S; a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma.' *Biochemistry*, 1979; 18:899-904.
2. Dahlback, B., 'Purification of human vitamin K-dependent Protein S and its limited proteolysis by thrombin.' *Biochem. J.* 1983; 209:837-846.
3. Walker, F.J., 'Protein S and the Regulation of Activated Protein C.' *Semin. Thromb. Hemost.*, 1984; 10:131-138.
4. Dahlback, B. 'Protein S and C4b-Binding Protein: Components involved in the regulation of the Protein C Anticoagulant System.' *Thromb. Haemost.*, 1991; 66:49-61.
5. Comp, P.C., Nixon, R.R., et al. 'Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis.' *J. Clin. Invest.*, 1984; 74:2082-2088.
6. Walker, .F.J., 'Protein S and Thrombotic Disease.' *PSEBM*, 1992; 200:285-295.
7. Gladson, C.L. et al. 'The frequency of type I heterozygous Protein S and Protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis.' *Thromb. Haemost.*, 1988; 59:18-22.
8. Alving, B.M. & Comp, P.C., 'Recent advances in understanding clotting and evaluating patients with recurrent thrombosis.' *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1992; 167:1184-1191.
9. Cooper, P., Cooper, S.M., Smith, J.M. and Makris, M. 'A New Functional Assay of Protein S - An Evaluation' In Press, February 2001.
10. Bertina, R.M., 'Hereditary protein S deficiency' *Haemostasis*, 1985; 15 : 241-245.
11. Comp. P.C. 'Laboratory evaluation of protein S status.' *Semin. Thromb. Haemost.*, 1990; 15 : 177-181.

UTILISATION

Utilisé dans la détermination du taux de protéine S fonctionnelle dans le plasma humain moyennant test de coagulation.

La protéine S est une protéine vitamine K dépendante synthétisée par le foie, l'endothélium vasculaire et les mégacaryocytes, protéine qui joue un rôle important dans le système anticoagulant de la protéine C^{1,2}.

Ce système anticoagulant est l'un des principaux régulateurs de l'hémostase en inhibant la formation de caillot et en favorisant la fibrinolyse. La protéine S, en tant que cofacteur de la protéine C activée au niveau de la membrane vasculaire, facilite la dégradation des facteurs de coagulation Va et VIIIa, exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif sur la coagulation. Dans le plasma normal, environ 40% de la protéine S circule sous forme libre tandis 60% le fait sous forme liée à la C4b, une protéine plasmatique de la voie classique d'activation du complément³. Il n'y a que la protéine S libre qui est fonctionnellement active et qui est en mesure de se lier à la protéine C activée; en revanche, la forme liée ne l'est pas⁴.

Le dosage de la protéine S (méthode de coagulation) Helena BioSciences détermine la quantité de protéine S fonctionnelle. Dans ce dosage, des dilutions de plasma normal sont mélangées avec du plasma déficient en protéine S. Le plasma mélangé est alors activé par un réactif contenant de la protéine C activée et des phospholipides. Après l'activation, la coagulation est amorcée par l'ajout de chlorure de calcium. L'allongement du temps de coagulation est en rapport direct avec la concentration en protéine S dans le plasma du patient.

PRÉCAUTIONS

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

COMPOSITION

1. **Activateur de la protéine S**

Chaque flacon contient de la protéine C activée, des phospholipides de cerveaux de lapin et des agents de remplissage.

Préparation: Reconstituer en ajoutant 1,0ml d'eau distillée. Laisser reposer 20 minutes et bien mélanger avant utilisation.

2. **Plasma déficient en protéine S**

Chaque flacon contient 1,0ml de plasma humain déficient en protéine S immunodéplétée.

Préparation: Reconstituer en ajoutant 1,0ml d'eau distillée. Laisser reposer 20 minutes et bien mélanger avant utilisation.

3. **Autres composants du kit**

Chaque kit contient une fiche technique.

STOCKAGE ET CONSERVATION

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

1. **Activateur de la protéine S**

Une fois reconstitués, les flacons sont stables 2 semaines entre 2...6°C ou 3 heures à 37°C.
NE PAS CONGELER.

2. **Plasma déficient en protéine S**

Une fois reconstitués, les flacons sont stables 6 heures à 4°C ou 1 mois à -20°C s'ils ne sont décongelés qu'une fois.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 5375 Tampon Véronal de Owren

Réf. 5386 Solution de chlorure de calcium à 25mM

Réf. 5185 SARP (plasma de référence)

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

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

MÉTHODOLOGIE

Il est recommandé de réaliser les analyses en double.

a) **Méthode manuelle**

1. Reconstituer les flacons de réactif nécessaires. Placer le réactif activateur de la protéine S et la solution de chlorure de calcium à 25mM dans un incubateur à 37°C.
2. Préparer une solution étalon mère en mélangeant 300µl de plasma de référence avec 4200µl de tampon Véronal de Owren.

Utiliser immédiatement la solution étalon de travail pour réaliser les dilutions de l'étalon suivantes:

	Volume étalon mère (µl)	Volume tampon (µl)	Activité %
1	400	0	100
2	300	100	75
3	200	200	50
4	100	300	25
5	0	400	0

3. Préparer des dilutions de l'échantillon patient et du contrôle en ajoutant 50µl de plasma à 700µl de tampon. Conserver toutes les dilutions (étalon, échantillon patient et contrôle) dans de la glace et réaliser le test dans les 30 minutes.
4. Dans une cuvette de coagulation, ajouter 100µl de plasma déficient en protéine S et 100µl de dilution étalon, contrôle ou patient.

DOSAGE DE LA PROTÉINE S, TEST DE COAGULATION

5. Incuber 1 minute à 37°C.
6. Ajouter 100µl de réactif activateur de la protéine S.
7. Incuber 2 minutes à 37°C.
8. Ajouter 100µl de solution de chlorure de calcium et démarrer un chronomètre.
9. Relever le temps de coagulation en arrondissant au dixième de seconde.
10. Tracer, point par point, une courbe représentant l'activité de la protéine S (en abscisse) en fonction de temps de coagulation (en ordonnée) sur du papier millimétré.
11. Interpoler les valeurs du contrôle et de l'échantillon patient à partir de la courbe d'étalonnage (ligne droite).

b) Méthodes automatisées

Se référer au manuel d'utilisation fourni par le fabricant de l'instrument pour avoir des instructions de programmation.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un déficit en protéine S, congénital ou acquis, peut conduire à des complications thrombotiques graves comme une thrombophlébite, une thrombose veineuse profonde ou une embolie pulmonaire. La prévalence du déficit en protéine S a été estimée inférieure à 1 cas sur 300 dans la population générale. Deux tiers des patients ayant un déficit en protéine S congénital (taux inférieur de 50% à la normale) risquent de développer une thrombose veineuse à l'âge adulte jeune^{5,6}. Chez les jeunes patients (<35 ans) avec des antécédents thrombotiques, la prévalence peut être supérieure pour se situer entre 15% et 18%⁷. Il est possible qu'un déficit en protéine S acquis soit observé au cours de la grossesse, en cas de thérapie avec contraceptifs ou anticoagulants oraux, de maladie hépatique, de diabète, de complications post-opératoires, de septicémie et de syndromes inflammatoires divers. Une diminution de l'activité de la protéine S dans le plasma peut être due à une faible concentration ou à un fonctionnement anormal de la molécule de protéine S.

Une diminution de l'activité de la protéine S est associée à une augmentation de l'incidence de thromboembolie¹⁰. Cette diminution ne signifie pas nécessairement une diminution de la concentration. Pour un diagnostic de laboratoire d'un déficit en protéine S, il est possible qu'il soit nécessaire de réaliser une détermination qualitative (fonctionnelle) et une détermination quantitative (taux d'antigène)¹¹. Helena BioSciences distribue deux tests ELISA: protéine S totale et libre (réf. 5286 / 5293).

CONTRÔLE QUALITÉ

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

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

Réf. 5301 SAC-1

Réf. 5302 SAC-2

LIMITES

Il est possible que les échantillons ayant donné un positif aux anticorps lupiques et présentant un TCA allongé donnent des résultats faussement élevés pour la protéine S. Il est nécessaire de confirmer ces valeurs moyennant dosage de l'antigène libre. Les taux limite ou faible de protéine S fonctionnelle des patients avec un F-V (Leiden) doivent être confirmés par un dosage de l'antigène de la protéine S libre. Les patients ayant des taux élevés (>200%) d'activité de la protéine S doivent être analysés avec différentes dilutions pour obtenir des résultats précis. Les taux corrigés de protéine S doivent coïncider pour au moins 2 dilutions. Il est possible que l'héparine à des taux >2 unités/ml interfère en allongeant les temps de coagulation, ce qui augmenterait les taux de protéine S de façon apparente. Les patients sous warfarine peuvent présenter une activité de la protéine S erronément faible.

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les valeurs de référence peuvent varier d'un laboratoire à l'autre suivant les techniques et les systèmes utilisés. C'est pour cette raison qu'il appartient à chaque laboratoire de déterminer sa propre plage normale.

Les valeurs usuelles de l'activité de la protéine S dépendent du sexe⁹.

Hommes 85 – 157%

Femmes 65 – 136%

PERFORMANCES

Helena BioSciences ou ses représentants ont déterminé à titre indicatif les caractéristiques de performance suivantes. Chaque laboratoire doit établir ses propres données de performance.

Reproductibilité intra-analyse		
	Taux protéine S (%)	CV intra-analyse CV (%)
n = 10	94	3,96
n = 8	52	7,21

Reproductibilité inter-analyses		
	Taux protéine S (%)	CV inter-analyses CV (%)
n = 10	82	5,95
n = 8	48	7,53

Précision

Une comparaison du kit de dosage de la protéine S (test de coagulation) Helena BioSciences avec d'autres méthodes disponibles pour les laboratoires (protéine S libre avec ELISA) a donné des résultats bien corrélés ($r=0,7781$).

Sensibilité

La méthode est sensible à partir d'un taux de protéine S de 17,6%.

Linéarité

La méthode doit donner une courbe d'étalonnage linéaire sur la plage 17,6% – 150%.

BIBLIOGRAPHIE

1. Di Scipio, R. G. & Davie, E. W., 'Characterisation of Protein S; a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma.' *Biochemistry*, 1979 ; 18 : 899-904.
2. Dahlback, B., 'Purification of human vitamin K-dependent Protein S and its limited proteolysis by thrombin.' *Biochem. J.* 1983 ; 209 : 837-846.
3. Walker, F. J., 'Protein S and the Regulation of Activated Protein C.' *Semin. Thromb. Hemost.*, 1984 ; 10 : 131-138.
4. Dahlback, B. 'Protein S and C4b-Binding Protein: Components involved in the regulation of the Protein C Anticoagulant System.' *Thromb. Haemost.*, 1991 ; 66 : 49-61.
5. Comp, P. C., Nixon, R. R., et al. 'Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis.' *J. Clin. Invest.*, 1984 ; 74 : 2082-2088.
6. Walker, .F. J., 'Protein S and Thrombotic Disease.' *PSEBM*, 1992 ; 200 : 285-295.
7. Gladson, C. L. et al.'The frequency of type I heterozygous Protein S and Protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis.' *Thromb. Haemost.*, 1988 ; 59 : 18-22.
8. Alving, B. M. & Comp, P. C., 'Recent advances in understanding clotting and evaluating patients with recurrent thrombosis.' *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1992 ; 167 : 1184-1191.
9. Cooper, P., Cooper, S. M., Smith, J. M. et Makris, M. 'A New Functional Assay of Protein S - An Evaluation' In Press, février 2001.
10. Bertina, R. M., 'Hereditary protein S deficiency' *Haemostasis*, 1985 ; 15 : 241-245.
11. Comp. P. C. 'Laboratory evaluation of protein S status.' *Semin. Thromb. Haemost.*, 1990 ; 15 : 177-181.

ANWENDUNGSBEREICH

Zur Bestimmung des funktionalen Protein S Spiegels in Humanplasma mittels Gerinnungstest.

Protein S ist ein in der Leber, dem Endothel und den Megakariozyten gebildetes, Vitamin K abhängiges Protein, das eine wichtige physiologische Rolle im Protein C-Antikoagulanz-System spielt^{1,2}. Dieses Antikoagulanz-System gehört zu den Hauptregulatoren der Hämostase, indem es Gerinnelbildung hemmt und Fibrinolyse fördert. Protein S funktioniert dabei als Ko-Faktor des aktivierten Protein C an der Gefäßwand, um den Abbau der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa zu unterstützen, und so die Gerinnelbildung nach unten zu regulieren. Dabei zirkuliert in normalem Plasma circa 40% des Protein S als freies Molekül, die restlichen 60% sind komplex an C4b gebunden, einem Plasmaprotein des klassischen Komplement-Systems³. Nur freies Protein S kann funktional agieren und sich an aktiviertes Protein C binden; das komplex gebundene Protein S hingegen nicht⁴.

Der Helena BioSciences Protein S (Gerinnungs-) Test bestimmt den Anteil an funktionalem Protein S. In diesem Test werden Verdünnungen von normalem Plasma mit Protein S-absorbiertem Plasma gemischt. Das Plasmagemisch wird dann mit einem Reagenz aktiviert, das aktiviertes Protein C und Phospholipid enthält. Nach der Aktivierung wird die Gerinnung durch Zugabe von Calciumchlorid ausgelöst. Die Verlängerung der Gerinnungszeit steht in direktem Bezug zur Protein S-Konzentration im Patientenplasma.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

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

INHALT

1. Protein S Aktivator

Jedes Fläschchen enthält aktiviertes Protein C, Phospholipid aus Kaninchenhirn und Füllmittel.

Vorbereitung: Mit 1,0ml destilliertem Wasser rekonstituieren. 20 Minuten stehen lassen und vor Gebrauch gut mischen.

2. Protein S-Mangelplasma

Jedes Fläschchen enthält 1,0ml immunabsorbiertes, humanes Protein S-Mangelplasma.

Vorbereitung: Mit 1,0ml destilliertem Wasser rekonstituieren. 20 Minuten stehen lassen und vor Gebrauch gut mischen.

3. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung.

LAGERUNG UND STABILITÄT

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

1. Protein S Aktivator

Rekonstituierte Fläschchen sind bei 2...6°C bis zu 2 Wochen oder 3 Stunden bei 37°C stabil. NICHT EINFRIEREN.

2. Protein S-Mangelplasma

Rekonstituierte Fläschchen sind bei 4°C 6 Stunden und bei -20°C 1 Monat stabil, wenn sie nur einmal aufgetaut wurden.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 5375 Owrens Veronal-Puffer

Kat. Nr. 5386 25 mmol Calciumchlorid-Lösung

Kat. Nr. 5185 SARP (Referenzplasma)

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

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

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

Es ist zu empfehlen, diesen Test im Doppelansatz durchzuführen.

a) Manuelle Methode

1. Die benötigten Reagenzienfläschchen rekonstituieren. Das Protein S-Aktivator-Reagenz und die 25 mmol Calciumchlorid-Lösung einen 37°C warmen Inkubator stellen.
2. Durch Mischen von 300µl Referenzplasma mit 4200µl Owrens Veronal-Puffer eine Stamm-Standardlösung herstellen.

Aus dieser Stammlösung sofort folgender Standardverdünnungen herstellen:

Stamm-Lösung (µl)	Standard (µl)	Puffer	Aktivität %
1	400	0	100
2	300	100	75
3	200	200	50
4	100	300	25
5	0	400	0

3. Patienten- und Kontroll-Verdünnungen durch Mischen von 50µl Plasma mit 700µl Puffer herstellen. Alle Standard-, Patienten- und Kontroll-Verdünnungen auf Eis lagern und innerhalb 30 Minuten bearbeiten.
4. In eine Gerinnungsküvette 100µl Protein S-Mangelplasma und 100µl Standard-, Kontroll- oder Patienten-Verdünnung geben.
5. 1 Minute bei 37°C inkubieren.
6. 100µl Protein S-Aktivator-Reagenz geben.
7. 2 Minuten bei 37°C inkubieren.
8. 100µl Calciumchlorid-Lösung geben und Stoppuhr starten.
9. Gerinnungszeit bis auf 0,1 Sekunden genau ablesen.
10. Die Protein S-Aktivität (x-Achse) gegen Gerinnungszeit (y-Achse) auf linearem Millimeterpapier auftragen.
11. Patienten- und Kontrollwerte aus der Kalibrationsgeraden interpolieren.

b) Automatisierte Methoden

Für Programmieranweisungen siehe Bedienungsanleitung des Geräteherstellers.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Protein S-Mangel, entweder angeboren oder erworben, kann zu schwerwiegenden thrombotischen Ereignissen führen wie Thrombophlebitis, tiefe Venenthrombose oder Lungenembolie. Die Prävalenz des Protein S-Mangels wird in der allgemeinen Bevölkerung auf unter 1 Fall von 300 geschätzt. Zwei Drittel der Patienten mit einem angeborenen Protein S-Mangel (Werte von unter 50% des Normalwerts) können sich bei jungen Erwachsenen durch Venenthrombose manifestieren^{5,6}. Bei jungen Patienten (<35 Jahren) mit Thrombose in der Anamnese, kann die Prävalenz bis zu 15-18% sein. Erworbenener Protein S-Mangel kann während der Schwangerschaft beobachtet werden, bei Einnahme oraler Verhütungsmittel oder einer oralen Antikoagulanzen-Therapie, Lebererkrankungen, Diabetes Mellitus, post-operative Komplikationen, septisches Fieber und verschiedene entzündliche Syndrome. Eine verminderte Protein S-Aktivität im Plasma kann die Folge niedriger Konzentrationen oder einer abnormalen Funktion des Protein S-Moleküls sein.

Ein vermindertes Protein S wird mit einer erhöhten Inzidenz an Thromboembolien in Verbindung gebracht. Eine verminderte Protein S-Aktivität muss nicht unbedingt eine erniedrigte Konzentration bedeuten. Die Labor-Diagnose eines Protein S-Mangels kann sowohl qualitative (funktionale) und quantitative (Antigen-Spiegel) Bestimmungen notwendig machen¹¹. Helena BioSciences bietet beide, den Gesamt- und den freien Protein S-ELISA-Test an (Kat. Nr. 5286 / 5293).

QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Kat. Nr. 5301 SAC-1

Kat. Nr. 5302 SAC-2

EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit verlängerten aPTT-Zeiten, die Lupus-Antikörper positiv sind, können falsch erhöhte Protein S-Werte ergeben und sollten durch einen freien Antigen-Test bestätigt werden. Grenzwertige oder niedrige, funktionale Protein S-Spiegel bei Patienten mit FV-„Leiden“ sollten mit dem freien Protein S-Antigen-Test bestätigt werden. Patienten mit hohen Werten (>200%) an Protein S-Aktivität sollten anhand mehrerer Verdünnungen getestet werden, um genaue Ergebnisse zu bekommen. Korrigierte Protein S-Werte mit mindestens 2 Verdünnungen müssen übereinstimmen. Heparin in Bereichen von >2 Units/ml können die Gerinnungszeiten verlängern und damit scheinbar die Protein S-Werte erhöhen. Patienten, die Warfarin nehmen, können falsche niedrige Protein S-Aktivität zeigen.

REFERENZWERTE

Referenzwerte können je nach Technik und verwendetem System von Labor zu Labor unterschiedlich sein. Aus diesem Grund sollte jedes Labor seinen eigenen Normalwertbereich erstellen.

Der erwartete Normalbereich für Protein S ist geschlechtsspezifisch⁹.

Männer 85 - 157%

Frauen 65 - 136%

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Folgende Leistungseigenschaften sind von Helena BioSciences selbst oder in ihrem Auftrag als Richtlinie bestimmt worden. Jedes Labor muss seine eigenen Werte ermitteln.

Reproduzierbarkeit innerhalb des Tests		
	Protein S Wert (%)	Innerhalb des Tests VK (%)
n = 10	94	3,96
n = 8	52	7,21

Reproduzierbarkeit zwischen den Tests		
	Protein S Wert (%)	Zwischen den Tests VK (%)
n = 10	82	5,95
n = 8	48	7,53

Genauigkeit

Der Vergleich des Helena BioSciences Protein S (Gerinnungs-) Kits mit einer anderen kommerziell erhältlichen Protein S-Methode (Freies Protein S mit ELISA) zeigte eine gute Korrelation ($r=0.7781$).

Empfindlichkeit

Die Methode ist sensitiv bis 17,6% Protein S.

Linearität

Die Methode ist zur Angabe einer linearen Standardkurve von 17,6% - 150% Protein S entwickelt worden.

LITERATUR

- DiScipio, R.G. & Davie, E.W., 'Characterisation of Protein S; a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma.' *Biochemistry*, 1979; 18:899-904.
- Dahlback, B., 'Purification of human vitamin K-dependent Protein S and its limited proteolysis by thrombin.' *Biochem. J.* 1983; 209:837-846.
- Walker, F.J., 'Protein S and the Regulation of Activated Protein C.' *Semin. Thromb. Hemost.*, 1984; 10:131-138.
- Dahlback, B. 'Protein S and C4b-Binding Protein: Components involved in the regulation of the Protein C Anticoagulant System.' *Thromb. Haemost.*, 1991; 66:49-61.
- Comp, P.C., Nixon, R.R., et al. 'Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis.' *J. Clin. Invest.*, 1984; 74:2082-2088.
- Walker, .FJ., 'Protein S and Thrombotic Disease.' *PSEBM*, 1992; 200:285-295.

7. Gladson, C.L. et al. 'The frequency of type I heterozygous Protein S and Protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis.' *Thromb. Haemost.*, 1988; 59:18-22.
8. Alving, B.M. & Comp, P.C., 'Recent advances in understanding clotting and evaluating patients with recurrent thrombosis.' *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1992; 167:1184-1191.
9. Cooper, P., Cooper, S.M., Smith, J.M. and Makris, M. 'A New Functional Assay of Protein S - An Evaluation' In Press, February 2001.
10. Bertina, R.M., 'Hereditary protein S deficiency' *Haemostasis*, 1985; 15 : 241-245.
11. Comp. P.C. 'Laboratory evaluation of protein S status.' *Semin. Thromb. Haemost.*, 1990; 15 : 177-181.

DOSAGGIO DI COAGULAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DELLA PROTEINA S

PRINCIPIO

Per la determinazione dei livelli di proteina S funzionale nel plasma umano mediante dosaggio di coagulazione.

La proteina S è una proteina dipendente dalla vitamina K che viene sintetizzata nel fegato, nell'endotelio vascolare e nei megacariociti e che svolge un importante ruolo fisiologico nel sistema anticoagulante della proteina C^{1,2}.

Questo sistema anticoagulante è uno dei principali regolatori dell'emostasi, che agisce inibendo la formazione di coaguli e stimolando la fibrinolisi. La proteina S funge da cofattore per la proteina C attivata sulla membrana vascolare, in modo tale da facilitare la degradazione dei fattori di coagulazione Va e VIIIa, regolando verso il basso la formazione di coaguli. Nel plasma normale circa il 40% della proteina S circola come molecola libera, mentre il 60% è legato al C4b, una proteina plasmatica del percorso del complemento classico³. Soltanto la proteina S libera è funzionalmente attiva e in grado di legarsi alla proteina C attivata, mentre la forma complessata della proteina S non lo è⁴.

Il dosaggio (di coagulazione) Helena BioSciences per la determinazione della proteina S consente di determinare la quantità di proteina S funzionale. In questo dosaggio le diluizioni di plasma normale sono miscelate con plasma depleto di proteina S. La miscela di plasma viene quindi attivata mediante un reagente, che contiene proteina C attivata e fosfolipide. In seguito all'attivazione, la coagulazione ha inizio al momento dell'aggiunta del calcio cloruro. Il prolungamento del tempo di coagulazione è direttamente legato alla concentrazione di proteina S nel plasma del paziente.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica in vitro - NON INGERIRE. Pulizia e disinfezione al termine di ogni utilizzo. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti. I prodotti plasmatici sono stati esaminati dando esito negativo (salvo diversamente indicato sulla confezione del kit o sul flacone) relativamente alla presenza dell'antigene dell'epatite B (HbsAg), dell'anticorpo anti-HIV 1 e 2 e dell'anticorpo anti-HCV; questi prodotti devono tuttavia essere manipolati con le stesse misure precauzionali adottate per un campione di plasma umano.

COMPOSIZIONE

1. Attivatore della proteina S

Ogni flacone contiene proteina C attivata, fosfolipide di cervello di coniglio e diluenti.

Preparazione: Ricostituire con 1,0ml di acqua distillata. Lasciare riposare per 20 minuti e miscelare bene prima dell'uso.

2. Plasma carente di proteina S

Ogni flacone contiene 1,0ml di plasma umano carente di proteina S immunodepleto.

Preparazione: Ricostituire con 1,0ml di acqua distillata. Lasciare riposare per 20 minuti e miscelare bene prima dell'uso.

3. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene un foglio procedurale.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

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

1. Attivatore della proteina S

I flaconi ricostituiti sono stabili fino a 2 settimane a 2...6°C o 3 ore a 37°C. NON CONGELARE.

2. Plasma carente di proteina S

I flaconi ricostituiti sono stabili per 6 ore a 4°C e 1 mese a -20°C se decongelati una sola volta.

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

Cod. N. 5375 Tampone Veronal di Owren

Cod. N. 5386 Soluzione di calcio cloruro 25mM

Cod. N. 5185 SARP (plasma di riferimento)

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

PROCEDURA

Si raccomanda di eseguire i test in duplicato.

a) Metodo manuale

1. Ricostituire i flaconi di reagente richiesti. Collocare il reagente attivatore della proteina S e la soluzione di calcio cloruro 25mM in un'incubatrice a 37°C.
2. Preparare uno stock standard miscelando 300µl di plasma di riferimento con 4200µl di tampone Veronal di Owren.

Utilizzare lo stock standard immediatamente per ottenere le seguenti diluizioni standard:

Stock	Volume standard	Volume tampone	% attività
1	400µl	0µl	100
2	300µl	100µl	75
3	200µl	200µl	50
4	100µl	300µl	25
5	0µl	400µl	0

3. Preparare le diluizioni del paziente e del controllo aggiungendo 50µl di plasma a 700µl di tampone. Conservare tutte le diluizioni standard, del paziente e di controllo sul ghiaccio ed eseguire i test entro 30 minuti.
4. Ad una cuvetta di coagulazione aggiungere 100µl di plasma carente di proteina S e 100µl di diluizione standard, di controllo o del paziente.
5. Incubare per 1 minuto a 37°C.
6. Aggiungere 100µl di reagente attivatore della proteina S.
7. Incubare per 2 minuti a 37°C.

DOSAGGIO DI COAGULAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DELLA PROTEINA S

8. Aggiungere 100 μ l di soluzione di calcio cloruro ed azionare il timer.
9. Annotare il tempo di coagulazione con un'approssimazione di 0,1 secondi.
10. Tracciare su carta per grafici lineari l'attività della proteina S (sull'asse X) rispetto al tempo di coagulazione (sull'asse Y).
11. Interpolare i valori del paziente e di controllo dalla linea di calibrazione retta.

b) Metodi automatici

Per le istruzioni di programmazione fare riferimento al manuale utente fornito dal produttore dello strumento.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La deficienza di proteina S, sia essa congenita o acquisita, può portare a gravi eventi trombotici quali tromboflebite, trombosi delle vene profonde o embolia polmonare. La diffusione della deficienza di proteina S nella popolazione generale è stata valutata inferiore ad 1 caso su 300. Due terzi dei pazienti affetti da deficienza di proteina S congenita (con livelli inferiori al 50% dei valori normali) possono presentare trombosi venosa durante la giovane età adulta^{5,6}. Nei pazienti giovani (<35 anni) che presentano un'anamnesi di trombosi, la diffusione può essere compresa tra il 15% e il 18%⁷. La deficienza di proteina S acquisita può essere osservata in gravidanza, durante l'assunzione di contraccettivi orali, in corso di terapia anticoagulante orale o in caso di patologie epatiche, diabete mellito, complicanze postoperatorie, setticemia e sindromi infiammatorie di vario genere⁸. Una riduzione dell'attività della proteina S nel plasma può essere attribuita a basse concentrazioni o funzione anomala della molecola della proteina S.

Una riduzione della proteina S viene associata ad una maggiore incidenza di tromboembolia¹⁰. Una riduzione dell'attività della proteina S non è necessariamente indice di diminuzione della concentrazione. La diagnosi di laboratorio della deficienza di proteina S può richiedere determinazioni sia qualitative (funzionali) sia quantitative (livello di antigene)¹¹. Helena BioSciences fornisce test ELISA per la proteina S totale e libera (Cod. N. N. 5286 / 5293).

CONTROLLO QUALITÀ

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

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

Cod. N. 5301 SAC-1

Cod. N. 5302 SAC-2

LIMITAZIONI

I campioni positivi all'anticorpo del lupus con tempi di aPTT prolungati possono fornire falsi valori elevati di proteina S e devono pertanto essere confermati mediante il dosaggio dell'antigene libero⁹. I livelli borderline o bassi di proteina S funzionale in pazienti con F-V (Leiden) devono essere confermati mediante il dosaggio dell'antigene della proteina S libera⁹. I pazienti con livelli elevati (>200%) di attività della proteina S devono essere testati a varie diluizioni per ottenere risultati precisi. I livelli di proteina S corretti, ottenuti da almeno 2 diluizioni, devono concordare. L'eparina a livelli >2 unità/ml può interferire prolungando i tempi di coagulazione ed incrementando pertanto i valori di proteina S

apparenti. I pazienti trattati con warfarin possono presentare una falsa ridotta attività di proteina S⁹.

VALORI DI RIFERIMENTO

Per la sicurezza del paziente è necessario che il sistema sia monitorato continuamente da un operatore qualificato. Per tale motivo ciascun laboratorio dovrà elaborare un proprio range normale.

Il range normale previsto per la proteina S dipende dal sesso⁹.

Uomini 85 - 157%

Donne 65 - 136%

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena BioSciences o dai propri rappresentanti a titolo di linee guida. Ciascun laboratorio dovrà pertanto elaborare i propri dati prestazionali.

Riproducibilità entro il dosaggio		
	Livello di proteina S (%)	CV entro il dosaggio (%)
n = 10	94	3.96
n = 8	52	7.21

Riproducibilità tra i dosaggi		
	Livello di proteina S (%)	CV tra i dosaggi (%)
n = 10	82	5.95
n = 8	48	7.53

Precisione

Il confronto del kit (di coagulazione) della proteina S Helena BioSciences con un altro metodo disponibile in commercio (proteina S libera mediante ELISA) ha mostrato risultati ben correlati ($r=0.7781$).

Sensibilità

Il metodo è sensibile al 17,6% di proteina S.

Linearità

Il metodo è stato studiato per fornire una curva standard lineare di proteina S tra il 17,6% e il 150%.

BIBLIOGRAFIA

1. DiScipio, R.G. & Davie, E.W., 'Characterisation of Protein S; a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma.' *Biochemistry*, 1979; 18:899-904.
2. Dahlback, B., 'Purification of human vitamin K-dependent Protein S and its limited proteolysis by thrombin.' *Biochem. J.* 1983; 209:837-846.
3. Walker, F.J., 'Protein S and the Regulation of Activated Protein C.' *Semin. Thromb. Hemost.*, 1984; 10:131-138.
4. Dahlback, B. 'Protein S and C4b-Binding Protein: Components involved in the regulation of the Protein C Anticoagulant System.', *Thromb. Haemost.*, 1991; 66:49-61.

DOSAGGIO DI COAGULAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DELLA PROTEINA S

5. Comp, P.C., Nixon, R.R., et al. 'Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis.' J. Clin. Invest., 1984; 74:2082-2088.
6. Walker, .F.J., 'Protein S and Thrombotic Disease.' PSEBM, 1992; 200:285-295.
7. Gladson, C.L. et al. 'The frequency of type I heterozygous Protein S and Protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis.' Thromb. Haemost., 1988; 59:18-22.
8. Alving, B.M. & Comp, P.C., 'Recent advances in understanding clotting and evaluating patients with recurrent thrombosis.' Am. J. Obstet. Gynecol., 1992; 167:1184-1191.
9. Cooper, P., Cooper, S.M., Smith, J.M. and Makris, M. 'A New Functional Assay of Protein S - An Evaluation' In Press, February 2001.
10. Bertina, R.M., 'Hereditary protein S deficiency' Haemostasis, 1985; 15 : 241-245.
11. Comp, P.C. 'Laboratory evaluation of protein S status.' Semin. Thromb. Haemost., 1990; 15 : 177-181.

USO PREVISTO

Para uso en la determinación de los niveles de proteína S funcional en el plasma humano mediante prueba de coagulación.

La proteína S es una proteína dependiente de la vitamina K sintetizada en el hígado, endotelio vascular y megacariocitos, que desempeña un papel fisiológico importante en el sistema anticoagulante de la proteína C^{1,2}. Este sistema anticoagulante es uno de los reguladores principales de la hemostasia al inhibir la formación de coágulos y promoviendo la fibrinólisis. La proteína S funciona como cofactor para la proteína C activada sobre la membrana vascular para facilitar la degradación de los factores de coagulación Va y VIIIa, disminuyendo la formación de coágulos. En el plasma normal, aproximadamente el 40% de la proteína S circula como molécula libre, mientras que el 60% forma complejos con la C4b, una proteína plasmática de la vía clásica del complemento³. Sólo la proteína S libre es funcionalmente activa y capaz de unirse a la proteína C activada, mientras que la forma en complejos de la proteína S no lo es.

El ensayo de la proteína S (coagulación) de Helena BioSciences determina la cantidad de proteína S funcional. En esta valoración, las diluciones del plasma normal se mezclan con el plasma deplecionado en proteína S. Luego, el plasma mixto se activa con un reactivo que contiene proteína C activada y fosfolípidos. Después de la activación, se inicia la coagulación mediante la adición de cloruro cálcico. La prolongación del tiempo de coagulación está directamente relacionada con la concentración de la proteína S en el plasma del paciente.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

COMPOSICIÓN

1. Activador de la proteína S

Cada vial contiene proteína C activada, los fosfolípidos de cerebro de conejo y agentes formadores de masa.

Preparación: Reconstituir con 1,0ml de agua destilada. Dejar reposar durante 20 minutos y mezclar bien antes de usar.

2. Plasma deficitario en proteína S

Cada vial contiene 1,0ml de plasma humano deficitario en proteína S inmunodeplecionado.

Preparación: Reconstituir con 1,0ml de agua destilada. Dejar reposar durante 20 minutos y mezclar bien antes de usar.

3. Otros componentes del kit

Cada kit contiene instrucciones de uso.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

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

1. Activador de la proteína S

Los viales reconstituidos son estables hasta 2 semanas a 2...6°C o 3 horas a 37°C. NO CONGELAR.

2. Plasma deficitario en proteína S

Los viales reconstituidos son estables hasta 6 horas a 4°C y 1 mes a -20°C, si sólo se han descongelado una vez.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº Cat. 5375 Tampón Veronal de Owren

Nº Cat. 5386 25mM solución de cloruro cálcico

Nº Cat. 5185 SARP (plasma de referencia)

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Debe usarse siempre plástico o vidrio siliconizado. Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% o al 3,8% (1 parte). Se separa el plasma después de la centrifugación a 2000 -3000 xg durante 15 minutos. El plasma debe conservarse a 2...6°C. Las pruebas deberían terminarse en 2 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20°C durante 2 semanas o -70°C durante un mes. Descongelar rápidamente a 37°C antes de realizar la prueba. No conservar a 37°C durante más de 5 minutos.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

Se recomienda realizar la pruebas por duplicado.

a) Método manual

1. Reconstituir los viales de reactivo necesarios. Colocar el reactivo activador de la proteína S y la solución de cloruro cálcico del 25 mM en un incubador de 37°C.
2. Preparar un estándar de reserva mezclando 300 ml de plasma de referencia con 4.200 ml de Tampón Veronal de Owrens.

Usar el estándar de reserva inmediatamente para hacer las siguientes soluciones estándar:

Reserva	Volumen estándar (µl)	Volumen tampón (µl)	Actividad %
1	400	0	100
2	300	100	75
3	200	200	50
4	100	300	25
5	0	400	0

3. Preparar las diluciones del paciente y control añadiendo 50ml de plasma a 700ml de tampón. Mantener todas las diluciones estándar, paciente y control sobre hielo y estudiar en 30 minutos.
4. A una cubeta de coagulación, añadir 100ml de plasma deficitario en proteína S y 100ml de dilución estándar, control o paciente.
5. Incubar durante 1 minuto a 37°C.
6. Añadir 100µl de reactivo activador de la proteína S.

7. Incubar durante 2 minutos a 37°C.
8. Añadir 100µl de solución de cloruro cálcico y poner en marcha el temporizador.
9. Anotar el tiempo de coagulación en los 0,1 segundos más próximos.
10. Representar la actividad de la proteína S (eje X) frente al tiempo de coagulación (eje Y) en papel de gráfico lineal.
11. Interpolarse los valores del paciente y control de la línea de calibración recta.

b) Métodos automáticos

Consultar el Manual del Operador suministrado por el fabricante para leer las instrucciones de programación.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La deficiencia de proteína S, congénita o adquirida, puede llevar a acontecimientos trombóticos graves, como tromboflebitis, trombosis venosa profunda o embolia pulmonar. Se ha estimado que la prevalencia de déficit de la proteína S es de menos de 1 caso por 300 en la población general. Dos tercios de los pacientes con una deficiencia congénita de proteína S (niveles menores del 50% de lo normal) pueden presentar trombosis venosa en la edad adulta joven^{5,6}. En pacientes jóvenes (<35 años) con antecedentes de trombosis, la prevalencia puede llegar hasta 15% a 18%.⁷ Puede verse deficiencia adquirida de proteína S durante el embarazo, tratamiento con anticonceptivos orales o el tratamiento anticoagulante oral, hepatopatía, diabetes mellitus, complicaciones postoperatorias, septicemia y diversos síndromes inflamatorios. Una disminución de la actividad de proteína S en el plasma puede ser consecuencia de concentraciones bajas o función anormal de la molécula de la proteína S.

Una disminución en la proteína S se asocia a aumento de la incidencia de tromboembolismo¹⁰. Una disminución de la actividad de la proteína S no indica necesariamente una disminución de la concentración. El diagnóstico de laboratorio de deficiencia de la proteína S puede precisar determinaciones tanto cualitativas (funcionales) como cuantitativas (nivel de antígeno)¹¹. Helena BioSciences proporciona ELISA tanto para proteína S total como libre (Nº Cat. 5286 / 5293).

CONTROL DE CALIDAD

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

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

Nº de catálogo 5301 SAC-1

Nº de catálogo 5302 SAC-2.

LIMITACIONES

Las muestras positivas para anticuerpos del lupus con tiempos de TTPa prolongados pueden dar valores falsamente elevados de proteína S y deben confirmarse mediante valoración de antígenos libres. Los niveles de proteína S limitofes o bajos en los pacientes con F-V (Leiden) deben confirmarse con un ensayo del antígeno de la proteína S libre. Los pacientes con niveles elevados (>200%) de la actividad de la proteína S deben estudiarse con múltiples diluciones para obtener resultados exactos. Los niveles de proteína S corregidos de al menos 2 diluciones deben coincidir. La heparina a niveles >2 unidades/ml pueden interferir prolongando los tiempos de coagulación y, por tanto, aumentando los valores aparentes de proteína S. Los pacientes con warfarina pueden tener una actividad de proteína S baja falsa.

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal.

El intervalo normal esperado para proteína S varía según el sexo.

Hombres 85 - 157%

Mujeres 65 - 136%

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Las siguientes características de rendimiento han sido determinadas por Helena BioSciences o sus representantes como guía. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de rendimiento.

Reproducibilidad dentro de cada ensayo		
	Nivel Proteína S (%)	CV dentro de cada ensayo (%)
n = 10	94	3,96
n = 8	52	7,21

Reproducibilidad entre distintos ensayos:		
	Nivel Proteína S (%)	CV entre distintos ensayos (%)
n = 10	82	5,95
n = 8	48	7,53

Exactitud

La comparación del kit de proteína S (Coagulación) de Helena BioSciences con otro método de proteína S disponible comercialmente (Proteína S libre por ELISA) mostraron resultados bien correlacionados ($r = 0,7781$).

Sensibilidad

El método es sensible hasta 17,6% de Proteína S.

Linealidad

El método está diseñado para dar una curva estándar lineal del 17,6%-150% de proteína S.

BIBLIOGRAFÍA

1. DiScipio, R.G. & Davie, E.W., 'Characterisation of Protein S; a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma.' *Biochemistry*, 1979; 18:899-904.
2. Dahlback, B., 'Purification of human vitamin K-dependent Protein S and its limited proteolysis by thrombin.' *Biochem. J.* 1983; 209:837-846.
3. Walker, F.J., 'Protein S and the Regulation of Activated Protein C.' *Semin. Thromb. Hemost.*, 1984; 10:131-138.
4. Dahlback, B. 'Protein S and C4b-Binding Protein: Components involved in the regulation of the Protein C Anticoagulant System.' *Thromb. Haemost.*, 1991; 66:49-61.
5. Comp, P.C., Nixon, R.R., et al. 'Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis.' *J. Clin. Invest.*, 1984; 74:2082-2088.
6. Walker, .F.J., 'Protein S and Thrombotic Disease.' *PSEBM*, 1992; 200:285-295.
7. Gladson, C.L. et al. 'The frequency of type I heterozygous Protein S and Protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis.' *Thromb. Haemost.*, 1988; 59:18-22.
8. Alving, B.M. & Comp, P.C., 'Recent advances in understanding clotting and evaluating patients with recurrent thrombosis.' *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1992; 167:1184-1191.
9. Cooper, P., Cooper, S.M., Smith, J.M. and Makris, M. 'A New Functional Assay of Protein S - An Evaluation' In Press, February 2001.
10. Bertina, R.M., 'Hereditary protein S deficiency' *Haemostasis*, 1985; 15 : 241-245.
11. Comp. P.C. 'Laboratory evaluation of protein S status.' *Semin. Thromb. Haemost.*, 1990; 15 : 177-181.