



HEMOCLOT Protein S Ref ACK041K

Measurement of Protein S activity using a clotting method



Manufactured By: HYPHEN BioMed

For *in vitro* diagnostic use only

Last revision: 09/05/2011

INTENDED USE:

The HEMOCLOT Protein S kit is an *in vitro* clotting assay for the quantitative determination of Protein S (PS) in human citrated plasma, with a manual or automated method.

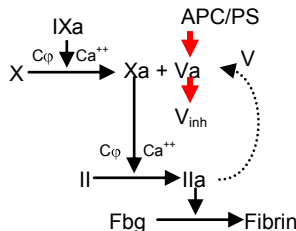
SUMMARY:

In presence of Activated Protein C (APC, for which Protein S is a cofactor), phospholipids and Calcium, Protein S inactivates Factor Va and Factor VIIIa (the activated forms of Factors V and VIII). In physiological conditions, Thrombin binds to Thrombomodulin exposed on endothelial cells and which is abundant in capillaries, and loses its procoagulant activity, whilst it acquires an anticoagulant function capable of activating Protein C to APC. APC then combines with the Free form of Protein S and this complex binds onto phospholipids surface (i.e. activated platelets) in the presence of calcium. Clotting pathways are then stopped by inactivation of Factors Va and VIIIa. This PC/PS inhibition pathway has a decreased activity if the free form of Protein S is deficient or abnormal. Congenital or acquired Protein S deficiencies are a risk factor for venous thrombosis.

ASSAY PRINCIPLE:

The HEMOCLOT Protein S method is an APTT like clotting assay, but triggered by Factor IXa in presence of phospholipids, Calcium, and of a constant an in excess amount of Activated Protein C (APC).

In the first step, the diluted assayed plasma is mixed with Protein S deficient plasma (R1). Then, the Activator Reagent (R2), in a constant and optimised concentration, is added. Clotting is initiated by the addition of Calcium (Ca²⁺). Clotting time is then recorded. Protein S being the limiting factor, there is a direct relationship, between the Protein S concentration and the corresponding clotting time.



SPECIMEN:

Citrated human plasma.

REAGENTS:

HEMOCLOT Protein S contains the reagents required for 3 series of 20 tests with manual or automated methods.

R1: Reagent 1: Protein S Deficient Plasma.

Protein S Deficient plasma, immuno-depleted, lyophilized in the presence of a heparin neutralizing agent: 3 vials (to be reconstituted with 1 ml of distilled water).

R2: Reagent 2: Activator reagent

Lyophilized material containing human Factor IXa, human APC, and phospholipids, in an optimized concentration. 3 vials (to be reconstituted with 1 ml of distilled water).

Precaution and warnings:

- Human plasma used for the preparation of the reagents was tested and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.
- All the required cautions must be respected in order to avoid any risk of ingestion or accidental introduction of reagents in body. In case of skin contact, wash extensively with water. In case of contact with a wound, address to the appropriate medical service, and indicate the biological origin and the nature of the product.
- Avoid contact with skin and eyes. Do not empty into drains. Wear suitable protective clothing.

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

Reagents:

- Distilled water, preferentially sterile.
- Calcium chloride 0.025M (eg: # AAR001A/AAR001K).
- Imidazole buffer (eg: # AAR021A/AAR021K/AAR021L); The same buffer must be used for all tests performed.
- Plasma Calibrator titrated for PS (eg: BIOPHEN Plasma Calibrator #A222101) or international or internal reference material, or reference frozen citrated normal plasma pool.
- Normal and Abnormal Quality Control Plasmas titrated for PS (eg: BIOPHEN Normal Control Plasma # A223201, and BIOPHEN Abnormal Control Plasma #A223301).

Material:

- Electromagnetic water bath or semi automatic or automatic clotting instruments.
- Calibrated pipettes and stop watch for manual methods.

STORAGE CONDITIONS:

The reagents must be stored at 2-8°C, in their original packaging box. They are then stable until the expiration date printed on the box.

Note: Stability studies for 3 weeks at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature for a short period without damage.

PREPARATION AND STABILITY OF REAGENTS:

Note: Refer to each specific instrument adaptation.

Preparation:

R1: Reagent 1: PS Deficient Plasma

Reconstitute each vial with **exactly 1 ml** of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex). Incubate at room temperature (18-25°C) for 15 min, while shaking the vial from time to time. Homogenize the content before each use.

R2: Reagent 2: Activator reagent

Reconstitute each vial with **exactly 1 ml** of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex). Incubate at room temperature (18-25°C) for 15 min, while shaking the vial from time to time. Homogenize the content before each use.

Stability:

Stability of restored reagents R1 and R2, provided that any contamination or evaporation is avoided, kept in their original vial:

- 24 hours at 2-8°C.
- 8 hours at room temperature (18-25 °C).
- 1 month at -20°C or below (before use, thaw in a water bath at 37°C until complete thawing and homogenize).

Cautions:

- In order to improve stability, reagents must be closed with their original screw cap following each use.
- Reagents must be handled with care, in order to avoid any contamination during use.
- Incubating the reconstituted vials at RT allows stabilizing the reagents, and obtaining a homogeneous reactivity.
- Take care to limit as much as possible any evaporation of the reagents during use, eg. by using chimneys.
- R1, R2 vials are closed under vacuum. Remove carefully the stopper, in order to avoid any lost of powder when opening the vials.
- For any automated method used, in any case, the established reactive ratios (respective reagent concentrations in the reactive milieu) between R1, R2 must be adhered to.
- Use only reagents from kits with the same lot number. Do not mix reagents from kits with different lots when running the assay. **Reagents R1, R2 are optimized for each lot of kits.**

PREPARATION OF PLASMA (SPECIMEN COLLECTION, HANDLING AND STORAGE):

Blood (9 volumes) must be collected on 0.109 M citrate anticoagulant (1 volume), with great care, in a silicon glass or a plastic tube. Sampling must be performed through a net venipuncture, avoiding any blood activation. Within 2 hours, blood must be centrifuged at 2,500 g for 20 min, and plasma decanted into a plastic tube, using a plastic pipette.

Storage of plasma:

- Up to 4 hours at Room Temperature (18-25°C).
- Up to 1 month frozen at -20°C or below (before use, thaw for 15 min. in a water bath at 37°C).

Refer to GEHT or NCCLS/CLSI recommendations for further instructions on specimen collection, handling and storage. Discard any sample presenting an unusual aspect.

TEST PROCEDURE:

HEMOCLOT Protein S kit is a clotting method, manual or automated. Adaptations to automates are available upon request. The assay is performed at 37°C, and the clotting time, triggered by the addition of calcium, is measured.

CALIBRATION:

- Calibration is performed with a normal pooled citrated plasma (made with plasmas from at least 30 normal individuals, males or females, aged between 18 and 55 years, and free of any medication or disease), with the assigned value of **100 % PS**. The assay includes a standard plasma dilution of **1:10**. By definition, this latter dilution of the pool represents the **100 % PS** activity. The dynamic range is from **0 to 100 % PS**. The **100 % PS** activity is then the **1:10** dilution of the **plasma pool** in imidazole buffer.
- Or the kit can also be calibrated with a commercially available plasma calibrator (eg **BIOPHEN Plasma Calibrator #A222101**), with a known PS concentration (C): the **1:10** dilution corresponds to the indicated "C" concentration. The **100%** concentration is obtained (in the assay conditions) by using the following dilution factor: **10 x C :100**.

Prepare 3 ml of the **1:10** dilution of the normal plasma pool, or of a (**10 x C :100**) dilution of the PS titrated calibrator, in imidazole buffer (eg AR021). This corresponds to **100%** PS. The calibration curve can then be obtained by preparing serial dilutions in buffer, as follows:

PS concentration	0%	25%	50%	75%	100%
Dilution	1:1	1:40	1:20	3:40	1:10
Plasma Pool 1:10	0 mL	0.250 mL	0.500 mL	0.750mL	1 mL
Imidazole buffer	1 mL	0.750 mL	0.500 mL	0.250mL	0 mL

In order to get the full assay performances, the calibration curve must be prepared just before running the assay.

D.750.02/CK/041K



7768 Service Center Drive • West Chester OH 45069
Phone: 513.770.1991 Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241 Email: info@aniara.com

www.aniara.com

TEST PLASMA:

Dilute the tested samples (and controls) 1:10 using the imidazole buffer.

For expected concentrations higher than 100%, exact values can be obtained by assaying the plasma at the 1:20 dilution, and results need then to be multiplied by 2.

Caution: to ensure optimal performances of the assay, perform all tests (calibration, samples, controls) extemporaneously and successively without interruption, and the same buffer.

ASSAY PROTOCOL:

Manual Method:

Into the **plastic** test tube, incubated at 37°C, introduce:

Assay	Manual Method
Calibrators; or 1:10 diluted plasma or control	50µl
R1 reagent preincubated at 37°C	50µl
Mix and incubate for 1 minute at 37°C	
R2 reagent preincubated at 37°C	50µl
Mix and incubate for 3 minutes at 37°C	
CaCl2 0.025M (preincubated at 37°C, and stirred)	100µl
Record Clotting Times, in seconds	CT

Automated methods:

Adaptations to various analysers are available upon request. Refer to each specific adaptation and specific cautions for each instrument.

Note: Isotonic Imidazole buffer (ref AR021) is recommended for diluting calibrators, controls and assayed plasmas for the measurement of Protein S with Hemoclot Protein S, as it corresponds to the easiest and most universal working conditions. However, the Owren Koller type buffer (ref AR003) can also be used for diluting plasmas. The same type of buffer must be used throughout the assay, for diluting calibrators, controls and plasmas.

QUALITY CONTROL:

Using commercially available quality control plasmas, titrated for PS, allows validating the calibration curve, as well as the homogeneous reactivity from run to run, when using a same lot of reagents. The calibration curve is acceptable when the concentrations measured for controls are within the acceptance range. Various control plasmas are available: **BIOPHEN Normal Control Plasma (#A223201)** and **BIOPHEN Abnormal Control Plasma (#A223301)**. Each laboratory should verify its own target value and acceptance range, in the exact working conditions, for each new lot of controls.

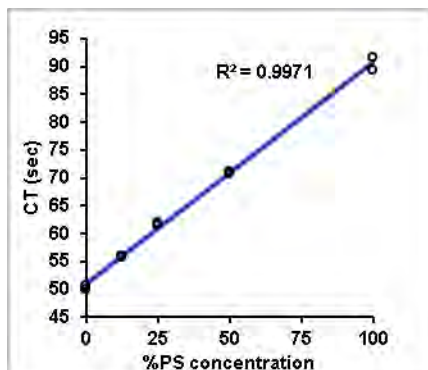
Note: A new calibration curve must be carried out for each new lot of reagents, after each important maintenance of the analyzer, or when measured values for the quality controls are out of the acceptance range determined for the method. - Each laboratory can establish its own acceptance ranges, according to the instruments and protocols used. - Include at least one quality control (at different levels) in each test series.

RESULTS:

- For the manual method, use a linear graph paper and plot on abscissae the PS concentration (%) and on ordinates the clotting times (sec). Using a linear graph paper, the assay is linear in the range 10- 100% PS.
- Calculate the "r²" value. Calibration is acceptable if: r² ≥ 0.98, and if measured values for controls are in compliance.
- The Protein S concentration in the tested sample (when assayed at the 1:10 dilution) is directly obtained from the calibration curve. Results are expressed as %, or U/ml (a normal plasma pool contains by definition 1 U/ml of Protein S activity, which in the assay yields a concentration of 100 %).
- Using automated methods, the PS concentrations are directly calculated by the analyser, respectively to the calibration curve, and the sample dilution used.
- When the assay dilution is 1:10, the PS concentration is directly read on the calibration curve. When predilutions are used, multiply the measured PS concentration by the predilution factor in order to get the concentration in the tested specimen (eg x2 for a sample tested at the 1:20 dilution).

EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curve here below, obtained using KC10 instrument, is indicated as an example only. Only the calibration curve generated for the series of measures performed must be used.



PERFORMANCES AND CHARACTERISTICS:

- Dynamic range: 10-100% PS (or depending on instrument adaptation).
- The detection threshold (measured by the "apparent" Protein S concentration, corresponding to the mean CT obtained for a PS deficient sample plus 3 standard deviations (SD)) is of about 10%.
- Specificity: PS deficient plasma is measured < 5%.
- Reproducibility: Inter assay CV on obtained clotting times are <5% (KC10, STAR).

Limitations of the procedure:

- Blood activation, during specimen collection and plasma preparation, may lead to wrong results.
- The assay can be performed in patients treated with heparin (up to 1 IU/ml), or under dicumarol therapy (PS activity is then decreased). In presence of an abnormally prolonged CT, confirming the diagnosis with another method and/or another sample collected is recommended.
- Special caution should be taken for patients with known high levels of FVIII:C, or with LA or mutated FV (R506Q mutation, FVLeiden), and results confirmed with another method (eg immunological method for Free Protein S) and considering the clinical context.
- Aprotinin inhibits Activated Protein C. The "apparent" Protein S activity could be decreased in patients treated with aprotinin. Using a different method for testing protein S (i.e. immunoassay) is then recommended.
- For a better accuracy, samples measured ≤10% can be tested at the 1:5 dilution, and obtained results divided by 2; for samples expected >100%, the 1:20 dilution can be used and obtained results multiplied by 2. If a different dilution factor from the standard 1:10 is used, the concentration must be corrected by the complementary dilution factor, i.e. x2 for 1:20, or x0.5 for 1:5).
- To ensure optimal performances of the assay, perform all assays (calibration, samples, controls) extemporaneously and successively without interruption. Working instructions must be carefully observed.
- For a same reagent lot and a same tested specimen, the Clotting Time may present variations according to the instrument used (especially between mechanical and optical clot detection), and to the clot detection sensitivity adjustment. Performances, as well as the normal range, and target values and acceptance ranges for each new lot of quality controls used, must then be confirmed (and adjusted if necessary) in the exact laboratory working conditions.

USUAL VALUES:

The 100 % Protein S concentration (or 1 Unit/ml) is the amount in a normal human citrated plasma pool, obtained by pooling plasmas from healthy males or females aged from 18 to 55 years, and out of any medication or disease. The Protein S concentration in healthy adults is usually between 60 and 140% (variable according to gender, slightly lower in females). The Protein S concentration is decreased in neonates (Premature: range 14-38%; New born: range 12-60%; 5 days old: 36%; 30 days old: 60% and up to 90 days old: 90%).

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

Protein S activity ≤ 60% indicates the presence of a deficiency, which must be confirmed by another measurement, or on another sample collected from the patient. A deficiency of Protein S activity may be congenital or acquired. It can also develop during pregnancy or in some diseases (transitory), including disseminated intravascular coagulation (DIC) and HIV infection. At the beginning of an inflammation process, Protein S activity can also be decreased. PS concentration is decreased during dicumarol treatment.

BIOCHEMISTRY:

Protein S is a vitamin K dependent human protein, synthesized in the liver, of about 69 kDa. PS is usually present in plasma at a concentration of approximately 25 µg/ml. Plasma Protein S has two presentations: about 60% (15 µg/ml) is bound to the complement component C4b β-chain while the remaining 40% is free (10 µg/ml). Only the free Protein S form presents anticoagulant activity as Activated Protein C (APC) cofactor. A factor V mutant (Factor V Leiden, carrying a single amino acid substitution on position 506 (R506Q)) is resistant to the inactivation function of the PS-APC complex.

CLINICAL INFORMATION:

Congenital deficiency:

There are three types of hereditary protein S deficiencies:

- Type I - decreased PS activity: decreased total and free PS concentrations (quantitative)
- Type II - decreased PS activity: normal free and total PS levels (qualitative).
- Type III - decreased PS activity: decreased free PS and normal total PS levels.

Acquired deficiency:

PS deficiency can also be acquired during:
- vitamin K deficiency or treatment with dicumarol/warfarin. Vitamin K dependent coagulation factors (II, VII, IX, X) are also decreased, and this generates bleeding tendency rather than thrombosis.
- systemic sex hormone therapy and pregnancy, liver disease, and certain chronic infections (eg AIDS).
PS deficiency is the underlying cause in a small proportion of cases with disseminated intravascular coagulation (DIC), deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE).
Rare deficiencies due to an acquired or transitory auto-antibody to Protein S have been reported (eg during chicken pox disease in some children).

REFERENCES:

- Walker F.J.: Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. J.Biol.Chem. 1980, 255, 5521-24.
- Comp P.C., Nixon R.R., Cooper M.R. Esmon C.T.: Familial Protein S Deficiency is Associated with recurrent Thrombosis. J.Clin.Invest. 1984, 74, 2082-88.
- D'Angelo A., Vignana-D'Angelo S., Esmon C.T., Comp P.C.: Acquired Protein S Deficiencies. J.Clin.Invest., 1988, 81, 1445-54.
- Castoldi E., Simioni P., Tormene D., Rosing J., Hackeng M.: Hereditary and Acquired Protein S deficiencies are associated With low TFPI levels in plasma. J.Thomb. Haemostas. 2009, 8, 294-300.



HEMOCLOT Protein S

Ref ACK041K

Dosage fonctionnel de la Protéine S (PS) plasmatique par méthode coagulante

A usage diagnostique in vitro exclusivement



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision : 09/05/2011

UTILISATION:

Le coffret HEMOCLOT Protein S est une méthode coagulante proposée pour la détermination quantitative de l'activité de la Protéine S (PS) dans un plasma humain citraté, in vitro, par méthode manuelle ou automatisée.

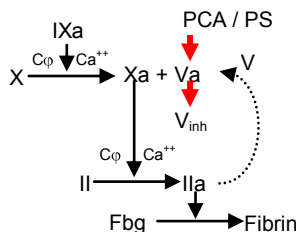
INTERÊT CLINIQUE:

La Protéine S (PS) est une protéine plasmatique, vitamine K dépendante, qui inhibe et régule la coagulation, en agissant comme cofacteur de la Protéine C activée. La Protéine C activée en présence de son cofacteur, la Protéine S, de phospholipides et de calcium inactive le Facteur Va et le Facteur VIIIa (formes actives des Facteurs V et VIII). Dans les conditions physiologiques, à la surface endothéliale, la thrombomoduline capte la thrombine libérée du caillot en formant un complexe de haute affinité inhibant les fonctions coagulantes de la thrombine. La thrombine complexée à la thrombomoduline acquiert des propriétés anticoagulantes en activant la Protéine C en Protéine C activée (PCA). La Protéine C activée se combine à la forme libre de la Protéine S et le complexe (PCA-PS) ainsi formé se fixe aux surfaces phospholipidiques (ex plaquettes activées) en présence de calcium. Le système de la coagulation est inhibé par inactivation des Facteurs Va et VIIIa. La voie d'inhibition du système PC/PS a une activité diminuée si la forme libre de la PS est déficiente ou anormale. Des déficits congénitaux ou acquis de la Protéine S sont des facteurs de risque de thrombose veineuse.

PRINCIPE:

Le coffret HEMOCLOT Protein S est une méthode coagulante, utilisant le Temps de Céphaline Activée (TCA), déclenché par du Facteur IXa en présence de phospholipides, de calcium et d'une quantité constante en excès de Protéine C Activée (PCA).

Le plasma du patient à tester dilué est mélangé dans un premier temps au plasma déficient en PS (R1). Dans un deuxième temps, le réactif activateur (R2), à concentration constante et optimisée, est ajouté. La coagulation est déclenchée par ajout de calcium (Ca²⁺). Le temps de coagulation est mesuré. La Protéine S étant le facteur limitant, il en résulte une relation directe entre la concentration en Protéine S et le temps de coagulation correspondant.



ECHANTILLONS:

Plasma humain citraté.

REACTIFS:

Le coffret HEMOCLOT Protein S contient les réactifs nécessaires pour réaliser 3 séries de 20 tests en méthode manuelle ou automatique.

R1: Réactif 1: Plasma déficient en Protéine S.

Plasma déficient en Protéine S, immunodéplété, lyophilisé en présence d'un agent neutralisant l'héparine. 3 flacons (à reconstituer par 1 ml d'eau distillée)

R2: Réactif 2: Réactif Activateur

Lyophilisé contenant du Facteur IXa humain, de la PCA humaine, et des phospholipides, à concentration optimale. 3 flacons (à reconstituer par 1 ml d'eau distillée).

Nota:

- Le plasma humain utilisé pour la préparation des réactifs est certifié exempt pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.
- Toute précaution doit être prise pour éviter tout risque d'ingestion et d'introduction accidentelles des réactifs dans l'organisme. En cas de contact avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de contact avec une plaie, contacter un service médical compétent en précisant la nature et l'origine biologique du produit.
- Éviter tout contact avec la peau et les yeux. Ne pas vider dans les égouts. Porter des vêtements protecteurs appropriés.

REACTIFS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée, de préférence stérile.
- Chlorure de Calcium 0.025M (ex : réf AAR001A/AAR001K).
- Tampon Imidazole (ex : réf AAR021A/AR021K/AAR021L). Utiliser le même tampon pour tous les tests réalisés.
- Plasmas de calibration titrés en Protéine S (ex : BIOPHEN Plasma Calibrator réf A222101), matériel de référence international ou interne, ou pool de plasma humain normal de référence.
- Plasmas de contrôle de qualité normaux ou anormaux titrés en Protéine S (ex : BIOPHEN Normal Control Plasma réf A223201 et BIOPHEN Abnormal Control Plasma réf A223301).

Matériels:

- Bain marie électromagnétique ou automates pour dosages coagulants.
- Pipettes calibrées et Chronomètre pour méthode manuelle.

CONSERVATION:

Les réactifs doivent être conservés à 2-8 °C, dans leur coffret d'origine. Ils sont alors stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

Remarque: Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS:

Se reporter à l'adaptation spécifique pour chaque automate.

Préparation:

R1: Réactif 1: Plasma Déficient Protéine S

Reconstituer chaque flacon par exactement 1 ml d'eau distillée, bien homogénéiser pour une dissolution complète du contenu (vortex). Laisser stabiliser 15 min. à température ambiante (18-25°C), en agitant de temps en temps. Bien homogénéiser avant chaque utilisation.

R2: Réactif 2: Réactif Activateur

Reconstituer chaque flacon par exactement 1 ml d'eau distillée, bien homogénéiser jusqu'à dissolution complète du contenu (vortex). Laisser stabiliser 15 min. à température ambiante (18-25°C), en agitant de temps en temps. Bien homogénéiser avant chaque utilisation.

Stabilité:

La stabilité des réactifs R1 et R2 reconstitués, conservés dans leur flacon d'origine, et sous réserve de toute contamination ou évaporation :

- 24 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- 1 mois à -20°C ou moins (avant utilisation, placer à 37°C dans un bain marie jusqu'à décongélation complète, et homogénéiser).

Précautions:

- Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage avec leurs bouchons respectifs.
- Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination.
- Les flacons R1 et R2 sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.
- Pour toute méthode automatique utilisée, les rapports respectifs de chaque réactif, R1 et R2, préconisés dans la méthode manuelle (concentration finale dans le milieu réactionnel et volume total), doivent être respectés.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffrets. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage. Les réactifs R1 et R2 sont optimisés pour chaque lot de coffrets.

COLLECTE, PREPARATION ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS TESTES:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109M (1 vol.), par ponction veineuse franche, en évitant toute activation. Rejeter les premières gouttes de sang. Centrifuger le prélèvement, dans les 2 heures suivantes, pendant 20 minutes à 2500g. Le plasma citraté doit être décanté dans un tube plastique.

Conservation du plasma :

- 4 heures à température ambiante (18-25°C).
- 1 mois congelé à -20°C ou moins (avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 min. dans un bain marie à 37°C).

Note : se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS/CLSI pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons. Rejeter tout prélèvement suspect.

PROCEDURE

Le coffret HEMOCLOT Protein S est utilisé en méthode coagulante manuelle ou automatisée. Les adaptations sur automates sont disponibles sur demande. Le test est réalisé à 37°C, et le temps de coagulation, après addition du réactif déclenchant (calcium), est mesuré.

ETALONNAGE:

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'un pool de plasma citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connue), qui par définition titre 100% de PS. Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/10 en tampon imidazole, qui représente par définition le taux 100% de PS. La gamme d'étalonnage va de 0 à 100% de PS.

OU La gamme d'étalonnage peut également être réalisée à l'aide d'un plasma calibrateur du commerce, de concentration (C) en PS précisément définie (ex : BIOPHEN Plasma Calibrator - réf 222101). La dilution au 1/10 correspond alors à la concentration (C) en PS indiquée. Pour un calibrateur titrant C, le taux de 100% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant ce calibrateur par le facteur suivant : 10x(C)/100.

Préparer 3 ml de la dilution 1/10 du pool de plasmas normaux, ou une dilution (10x C / 100) du plasma calibrateur titré en PS, en tampon (ex : AR021) : cette solution titre 100% de PS. Préparer la gamme d'étalonnage suivante par dilutions successives dans le tampon imidazole, comme suit :

PS	0%	25%	50%	75%	100%
Dilution	1/1	1/40	1/20	3/40	1/10
Plasma Pool 1/10	0 mL	0,250 mL	0,500 mL	0,750mL	1 mL
Tampon Imidazole	1 mL	0,750 mL	0,500 mL	0,250mL	0 mL

Réaliser la gamme d'étalonnage extemporanément pour une performance optimale.

D.750.01/CK/041K



7768 Service Center Drive • West Chester OH 45069
Phone: 513.770.1991 Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241 Email: info@aniara.com

www.aniara.com

PLASMA A TESTER:

Le plasma (et contrôles) à tester est dilué au 1/10 en tampon imidazole. Pour des concentrations attendues >100%, les valeurs exactes peuvent être obtenues en testant les plasmas à la dilution 1/20, et en multipliant ensuite les résultats obtenus par 2.

Précaution: tous les tests devront être réalisés dans le même tampon. Dans la mesure du possible, pour obtenir les performances optimales du dosage, tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) seront réalisés extemporanément et simultanément.

MODE OPERATOIRE :

• Méthode manuelle :

Dans un tube plastique incubé à 37°C, introduire:

Réalisation du Test	Méthode Manuelle
Calibrateurs; ou contrôle ou plasma dilué 1/10	50µl
Réactif R1 préincubé à 37°C	50µl
Mélanger et incubé 1 minute à 37°C	
Réactif R2 préincubé à 37°C	50µl
Mélanger et incubé 3 minutes à 37°C	
CaCl2 0.025M (pré incubé à 37°C, et agité)	100µl
Noter le Temps de Coagulation, en secondes	TC

• Méthode automatisée :

Les adaptations sur divers automates présents sur le marché sont disponibles sur demande. Se reporter à l'adaptation spécifique et aux précautions indiquées pour chaque automate.

Note : Le tampon isotonique Imidazole (réf AR021) est recommandé pour diluer les calibrateurs, contrôles et plasmas testés, pour le dosage de la Protéine S avec le kit Hemoclot Protein S, afin d'obtenir une bonne reproductibilité. Cependant, le tampon type Owren Koller (ex. ref AR003) peut également être utilisé pour diluer les plasmas. Le même tampon doit être utilisé pour l'ensemble du test, pour diluer les calibrateurs, contrôles et plasmas testés.

CONTROLE DE QUALITE:

L'utilisation de plasmas de contrôle de qualité, titrés en Protéine S, permet de valider la courbe d'étalonnage et la réactivité homogène du dosage, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs. La courbe d'étalonnage est valide lorsque les concentrations obtenues pour les contrôles entrent dans la zone d'acceptation.

Différents plasmas de contrôle sont disponibles: **Biophen Normal Control Plasma (réf A223201)** et **Biophen Abnormal Control Plasma (réf A223301)**. La valeur cible et le domaine d'acceptation en Protéine S devront être vérifiés dans les conditions de travail exactes du laboratoire pour chaque lot.

Note :

- Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être effectuée à chaque changement de lot de réactif, après toute maintenance importante de l'analyseur, et lorsque les résultats des contrôles de qualité ne sont pas dans les valeurs annoncées pour la méthode.

- Chaque laboratoire peut établir son propre domaine d'acceptation, en fonction des protocoles et des instruments utilisés.

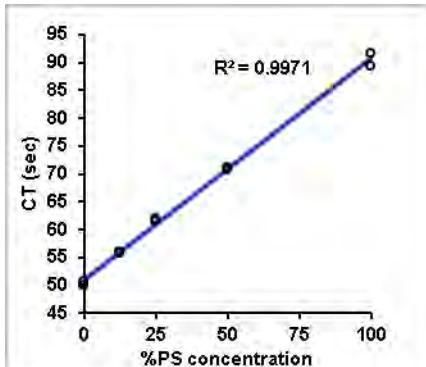
- Inclure au moins un contrôle de qualité (à différents niveaux) dans chaque série de dosages réalisée.

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, tracer sur papier millimétré la droite étalon en coordonnées linéaires en portant en ordonnées les temps de coagulation TC (en sec) et en abscisses le taux de Protéine S en %. En coordonnées linéaires, le test est linéaire de 10-100 % de Protéine S.
- La calibration est acceptable si $r \geq 0,98$, et que les valeurs mesurées pour les contrôles sont conformes.
- La concentration de Protéine S dans l'échantillon à doser (dilué au 1/10) est déduite directement de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en % ou en U/ml (un pool de plasma normal contient par définition 1U/ml d'activité Protéine S, ce qui correspond à une concentration de 100%).
- En technique automatique, les taux sont directement calculés par l'instrument en fonction des valeurs de l'étalonnage.
- Si la dilution utilisée est 1/10, le taux de Protéine S est obtenu directement sur la courbe. Si des pré-dilutions sont utilisées, multiplier ensuite par le facteur de pré-dilution éventuel pour avoir le taux dans l'échantillon testé (ex : x2 pour un échantillon testé au 1/20).

EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE :

La courbe d'étalonnage ci-dessous, obtenue sur KC10, n'est montrée qu'à titre d'exemple. Seule la courbe d'étalonnage effectivement réalisée doit être utilisée pour le calcul des taux des échantillons testés lors de la série de dosages.



PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES:

- Zone de mesure : 10-100% de Protéine S (ou selon automate utilisé).

- La limite de détection est déterminée en mesurant sur la courbe d'étalonnage le « taux apparent » de Protéine S, qui correspond au temps de coagulation moyen obtenu sur plasma déficient en Protéine S plus 3 écart-types. Cette limite de détection est d'environ 10%.
- **Spécificité :** plasma déficient en Protéine S mesuré <5%
- **Reproductibilité :** CV inter essais (sur CT) <5% (KC10, STAR).

Limites de la méthode :

- L'activation du sang, durant le prélèvement et la préparation du plasma, est susceptible de fausser les résultats.
- Le test peut être réalisé chez les patients traités par l'héparine (jusqu'à 1 UI/ml) ou sous AVK (le taux est alors diminué). Le diagnostic doit être vérifié par une autre méthode et/ou un autre prélèvement si les temps sont anormalement allongés.
- Une attention particulière doit être portée aux patients connus avec un taux de FVIII: C élevé ou un Lupus anticoagulant (LA) ou un FV muté (R506Q, FVLeiden), et le résultat confirmé par une autre méthode (ex : dosage de la PS libre par méthode immunologique) et considéré en fonction du contexte clinique.
- L'aprotinine inhibe la Protéine C activée. L'activité "apparente" de la Protéine S pourrait être diminuée chez les patients traités par l'aprotinine (7). Il est alors recommandé d'utiliser une méthode différente (ex : immunologique) pour mesurer la Protéine S.
- Pour une meilleure précision des résultats, pour un échantillon mesuré $\leq 10\%$, utiliser la dilution 1/5 et diviser le taux ainsi obtenu par 2 ; pour un échantillon mesuré >100% utiliser la dilution 1/20 et multiplier le taux ainsi obtenu par 2. Si une dilution différente du 1/10 est utilisée, la concentration doit être corrigée par le facteur de dilution (ex : x 2 pour 1/20, ou x 0,5 pour 1/5).
- Pour obtenir les performances optimales du dosage, réaliser tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) extemporanément et successivement sans interruption. Suivre scrupuleusement les instructions techniques.
- Pour un même lot de réactifs, et un même plasma, le temps de coagulation TC peut varier selon l'instrument utilisé (particulièrement en fonction de la détection du caillot en mode mécanique ou optique) et l'ajustement de la sensibilité de détection du caillot. Les performances, ainsi que la zone normale, et les valeurs cibles et les intervalles de confiance, pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé, doivent, par conséquent, être confirmées (et ajustées si nécessaire), dans les conditions de travail exactes du laboratoire.

VALEURS USUELLES :

Par définition, le taux de 100% (ou 1U/ml) correspond à la concentration de Protéine S dans un pool de plasmas humains normaux, hommes ou femmes, âgés de 18 à 55 ans, en dehors de toute médication ou pathologie connue. Le taux plasmatique de Protéine S chez l'adulte sain est généralement compris entre 60 et 140% (variable en fonction du sexe, chez la femme la concentration est habituellement > 60% et chez l'homme > 70%). Le taux de Protéine S est diminué à la naissance (Prématuré : 14-38% ; nouveau né 12-60% ; 1 mois 60% et > 90 jours 90%).

VARIATIONS PATHOLOGIQUES:

Un taux de Protéine S $\leq 60\%$ indique la présence d'un déficit qui doit être confirmé par un autre dosage et/ou un autre prélèvement.

Un déficit en activité Protéine S peut être congénital. Il peut aussi être transitoirement développé pendant la grossesse, au cours de certaines pathologies, en cas de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), ou chez les patients atteints de SIDA. Au début d'un processus inflammatoire, la Protéine S activée peut aussi être diminuée. Le taux de Protéine S est diminué dans les traitements au AVK.

BIOCHIMIE:

La Protéine S (PS) est une protéine de la coagulation vitamine K dépendante, synthétisée dans le foie, d'environ 69 kDa. La PS est généralement présente dans le plasma à une concentration d'environ 25 µg/ml. La protéine S plasmatique existe sous deux formes primaires. Approximativement 60% (environ 15µg/ml) est complexée à la C4b-BP β-chain, les 40% restant sont sous forme libre (environ 10µg/ml). Seule la forme libre de la Protéine S présente une activité anticoagulante en agissant comme cofacteur de la Protéine C activée. Le Facteur V muté (Facteur V Leiden, mutation (R506Q)) est résistant à l'inactivation de sa fonction coagulante par le complexe PS-PCA.

INFORMATIONS CLINIQUES:

Déficit congénital:

Il existe 3 sortes de déficits héréditaires congénitaux de la Protéine S :

- Type I – L'activité PS est diminuée : Diminution de la PS totale et de la PS libre (anomalie quantitative).
- Type II – L'activité PS est diminuée : PS totale et PS libre normales (anomalie qualitative).
- Type III – L'activité PS est diminuée : PS totale normale et PS libre diminuée (anomalie quantitative).

Déficit acquis:

Un déficit en Protéine S peut être acquis suite :

- à un traitement au AVK ou à un déficit en Vitamine K. Dans ce cas d'autres facteurs sont diminués (II, VII, IX et X), prédisposant plus à des problèmes hémorragiques que thrombotiques,
- durant une hormonothérapie, une grossesse, des atteintes hépatiques, certaines infections chroniques (comme HIV).

Un déficit en PS est la cause sous-jacente d'une petite proportion de cas de coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD), de thrombose veineuse profonde (TVP) et d'embolie pulmonaire (EP). De rares cas de déficit en PS dus à la présence d'auto-anticorps anti-PS acquis ou transitoires ont été reportés dans la littérature (par exemple chez des enfants atteints de varicelle).

REFERENCES:

1. Walker F.J.: Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. J.Biol.Chem. 1980, 255, 5521-24.
2. Comp P.C., Nixon R.R., Cooper M.R. Esmon C.T.: Familial Protein S Deficiency is Associated with recurrent Thrombosis. J.Clin.Invest. 1984, 74, 2082-88,
3. D'Angelo A., Viganà-D'Angelo S., Esmon C.T., Comp P.C.: Acquired Protein S Deficiencies. J.Clin.Invest., 1988, 81, 1445-54.
4. Castoldi E., Simioni P., Tormene D., Rosing J., Hackeng M.: Hereditary and Acquired Protein S deficiencies are associated with low TFPI levels in plasma. J.Thromb. Haemostas. 2009, 8, 294-300.

D.750.01/CK/041K