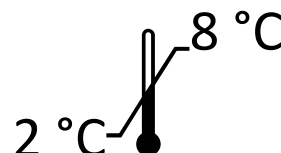


ACTICLOT[®] Protein S

REF 843L-HS



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

USAGE PRÉVU

ACTICLOT® Protein S est un test de coagulation fonctionnelle destiné à la détermination quantitative de l'activité de la Protéine S dans le plasma humain. Le test est destiné à un usage diagnostic *in vitro*.

EXPLICATION DU TEST

Richard DiScipio et ses collègues ont identifié pour la première fois la Protéine S humaine (S pour Seattle) en 1977.¹ La Protéine S humaine est une glycoprotéine à chaîne unique de 635 acides aminés (69.000 kD) qui circule dans le plasma à une concentration d'environ 320 nM. Le gène actif de la Protéine S possède 15 exons et s'étend sur plus de 80 kilobases sur le chromosome 3.² La Protéine S est une protéine dépendante de la vitamine K, synthétisée principalement dans le foie mais aussi dans l'endothélium et éventuellement dans les mégacaryocytes. Il est possible que les trois sources de Protéine S jouent un rôle important dans la régulation de l'hémostase.

La Protéine S ne semblait pas être le précurseur zymogène d'une protéase à sérine et aucune fonction n'était connue jusqu'en 1980, lorsque Walker a rapporté que la Protéine S bovine fonctionnait comme cofacteur de la Protéine C activée dans l'inactivation du facteur V activé.³ L'importance biologique de la régulation de la coagulation par la voie impliquant la Protéine C, la Protéine S et la Thrombomoduline a été étayée par des études cliniques. Une association entre la thrombose et des carences partielles en Protéine S a été documentée dans certaines familles.^{4,5,6} La Protéine S a également été détectée à la surface des cellules endothéliales et des plaquettes.⁷ Environ 60 % de la Protéine S dans le plasma humain est étroitement liée à la protéine de liaison C4b. Par conséquent, les niveaux plasmatiques de la Protéine S peuvent ne pas refléter complètement sa biodisponibilité.⁸ Ce complexe n'a pas d'activité de cofacteur anticoagulant. Il a été suggéré que la Protéine S pourrait jouer un rôle dans le système du complément en médiant l'association de la protéine de liaison C4b (C4bBP) avec les surfaces cellulaires qui ont été endommagées ou activées pour exposer des phospholipides chargés négativement.⁹ Cela pourrait représenter un autre mécanisme de régulation important pour la Protéine S.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

ACTICLOT Protein S est un test plasmatique basé sur la coagulation. Dans le test, les dilutions de plasma du patient sont mélangées avec du plasma appauvri en Protéine S. Un réactif activateur contenant le facteur Xa, la Protéine C activée et des phospholipides est ajouté au mélange. Après une période d'incubation de 5 minutes, du chlorure de calcium est ajouté pour amorcer la formation de caillots. Dans ces conditions, l'allongement du temps de coagulation est directement proportionnel à la concentration de la Protéine S dans le plasma du patient.

RÉACTIFS

Le kit contient des réactifs suffisants pour réaliser 80 tests à l'aide d'un analyseur de coagulation automatisé, 40 tests si une méthode en point final manuelle est utilisée.

- | | | |
|-----------|---|-----------------------------------|
| R1 | Réactif Activateur ACTICLOT: | 4 flacons, 1,0 ml (lyophilisé). |
| R2 | Plasma Déficient en Protéine S: | 6 flacons, 1,0 ml (lyophilisé). |
| R3 | Tampon Pour Dilution de l'Échantillon: | 2 flacons, 2,5 ml, 10X concentré. |

AVERTISSEMENT

Ce produit contient une matière d'origine humaine qui s'est avérée non réactive à l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), au virus de l'hépatite C (HVC) et au virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et de type 2 (HIV-1, HIV-2) selon des méthodes enregistrées. Comme aucune méthode de test connue ne peut fournir une assurance complète que les produits dérivés d'échantillons humains ne transmettront pas l'AgHBs, le HVC, le HIV-1, le HIV-2 ou d'autres agents pathogènes transmissibles par le sang, ce produit doit être manipulé conformément aux recommandations pour tout échantillon humain potentiellement infectieux.

Ce produit contient des matières d'origine animale. Comme aucune méthode de test connue ne peut fournir une assurance complète que les produits dérivés d'échantillons animaux ne transmettront pas d'agents pathogènes transmissibles par le sang, ce réactif doit être manipulé conformément aux recommandations pour tout échantillon potentiellement infectieux.

PRÉPARATION ET STOCKAGE DES RÉACTIFS

Les réactifs liquides lyophilisés et concentrés sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette des flacons lorsqu'ils sont conservés entre 2°C et 8°C.

A. Réactif Activateur ACTICLOT (R1)

Reconstituez avec 1 ml d'eau désionisée ou distillée de type I. Laissez reposer à température ambiante (entre 18°C et 25°C) pendant 20 minutes pour permettre une dissolution complète. Conservez ensuite à une température comprise entre 2°C et 8°C et utilisez dans les 4 heures. Le réactif activateur reconstitué est stable pour :

	30 jours
	-20°C

B. Plasma Déficient en Protéine S (R2)

Reconstituez avec 1 ml d'eau désionisée ou distillée de type I. Mélangez doucement et laissez reposer à température ambiante (entre 18°C et 25°C) pendant 20 minutes pour permettre une dissolution complète. Conservez ensuite à une température comprise entre 2°C et 8°C et utilisez dans les 4 heures. Le plasma déficient reconstitué est stable pour:

	30 jours
	-20°C

C. Tampon Pour Dilution de l'Échantillon (R3)

Diluez le contenu d'un flacon de 25 ml avec de l'eau désionisée ou distillée de type I et mélangez. La concentration de travail du tampon pour dilution est stable pour :

	30 jours
	2° – 8°C

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Voir « Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition » (Collecte, transport et traitement des échantillons de sang pour les tests de coagulation plasmatique et les tests d'hémostase moléculaire ; Directives approuvées — cinquième édition), Document CLSI H21-A5, Vol. 28, N°5, 2008.¹⁰ Le prélèvement de plasma doit être effectué comme suit :

1. Prélevez 9 volumes de sang dans 1 volume de 0,1 M de citrate trisodique.
2. Centrifugez l'échantillon de sang à 2.500 x g pendant 15 minutes.
3. Le plasma doit être stocké à une température comprise entre 2°C et 8°C et analysé dans les 2 heures. Le plasma peut également être conservé pendant :

	1 mois
	-20°C

4. Le plasma congelé peut être décongelé une fois à 37°C, 30 minutes avant son utilisation.

PROCÉDURE

Matériel Fourni — Voir Réactifs

Matériel Requis Mais Non Fourni

Eau désionisée de type 1 ou eau distillée.

Calibrateur de Coagulation Spécial, REF C.BMD.SCC030-01ML-A.

Contrôle de Coagulation Spécial Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A.

Contrôle de Coagulation Spécial Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A.

Solution de chlorure de calcium 0,025 M.

Analyseur de coagulation automatisé ou minuterie de coagulation mécanique.

Éprouvette graduée de 25 ml.

Pipette à volume variable (100–1.000 µl).

Incubateur ou bain-marie à 37°C.

Calibration du Test

Le Calibrateur Spécial Coagulation, REF C.BMD.SCC030-01ML-A, doit être utilisé pour la préparation des étalons de calibration de la Protéine S. Préparez les étalons de calibration de la Protéine S, les échantillons de contrôle et de plasma du patient comme suit. Utilisez les étalons et les échantillons immédiatement après leur préparation.

Étalon de la Protéine S*	Volume du Calibrateur Spécial Coagulation	Volume de Dilution Tampon
100 %	100 µl	900 µl
50 %	500 µl de l'étalon à 100 %	500 µl
12,5 %	250 µl de l'étalon à 50 %	250 µl
0 %	0 µl	1 000 µl
Échantillon de Patient/Contrôle	Échantillon de Patient/Contrôle	Volume de Dilution Tampon
100 %	50 µl	450 µl

* La valeur réelle des étalons de la Protéine S dépendra de la valeur spécifique du lot du Calibrateur Spécial Coagulation.

Procédure de Test

ACTICLOT Protein S peut être réalisé manuellement ou à l'aide d'analyseurs de coagulation semi-automatisés ou automatisés.

Méthode Des Analyseurs De Coagulation Automatisés

BioMedica Diagnostics propose des applications d'instruments pour réaliser ACTICLOT Protein S sur plusieurs analyseurs de coagulation. Ces applications d'instruments peuvent contenir des données de programmation et de performance spécifiques à la plate-forme qui diffèrent de celles fournies dans ce mode d'emploi. Dans ces cas, les informations contenues dans l'application d'instruments remplacent les informations de ce mode d'emploi. Veuillez consulter le manuel de l'instrument spécifique du fabricant pour obtenir des instructions d'utilisation complètes.

Méthode en point final manuelle

Transférez l'Activateur ACTICLOT et une solution de chlorure de calcium de 25 mM dans les puits de réactifs de 37°C. Incubez pendant au moins 2 minutes.

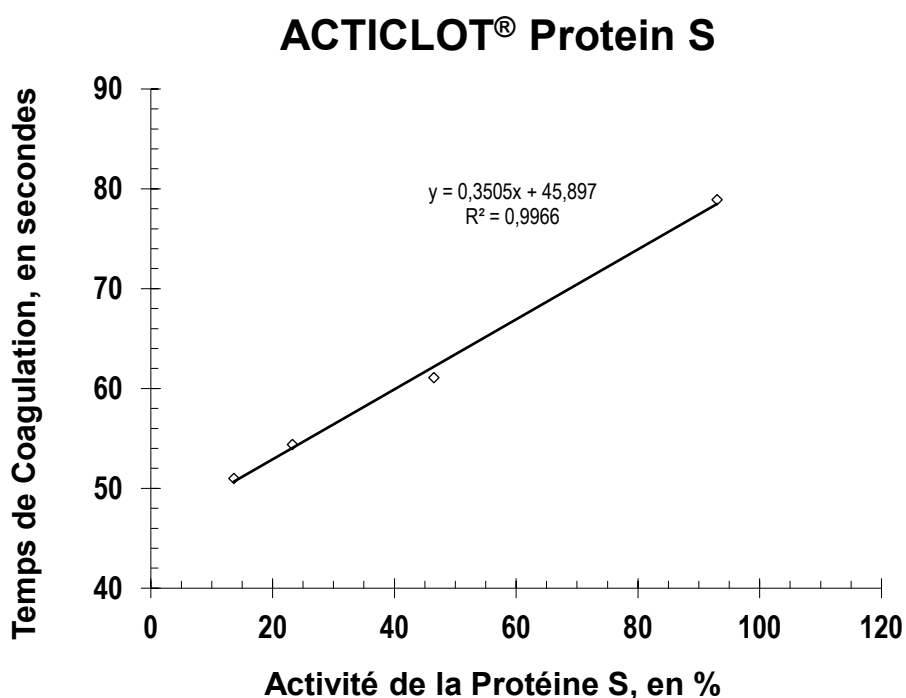
1. Ajoutez 0,1 ml de Plasma Déficient en Protéine S + 0,1 ml de dilution standard ou d'échantillon de patient dans une cuvette de coagulation.
2. Incubez à 37°C pendant 2 minutes.
3. Ajoutez 0,1 ml d'Activateur ACTICLOT.
4. Incubez à 37°C pendant 5 minutes.
5. Ajoutez 0,1 ml de solution de chlorure de calcium 0,025 M.
6. Démarrez la minuterie de coagulation et notez le temps de coagulation.
7. Obtenez des déterminations en double pour chaque dilution de plasma.

RÉSULTATS

Courbe Standard Représentative

Une courbe standard est créée en traçant le temps moyen de coagulation pour chaque étalon de Protéine S en fonction de son activité correspondante en pourcentage. Une courbe standard doit être générée à chaque fois que le test est effectué. Tracez la ligne de meilleur ajustement entre les points, généralement une équation linéaire, pour l'analyse des données.

La courbe standard suivante est uniquement à titre de démonstration.



CALCUL DES RÉSULTATS

Déterminez le % de Protéine S dans l'échantillon test par interpolation à partir de la courbe standard. Dans le cas de patients présentant un lupus anticoagulant ou une activité anormalement élevée de la Protéine S, lorsque plusieurs dilutions de patients ont été testées, il faut corriger le taux de Protéine S pour la dilution. Les taux de Protéine S corrigés à partir d'au moins deux dilutions doivent correspondre.

CONTRÔLE QUALITÉ

Les plasmas de contrôle doivent être inclus dans le test chaque fois que des réactifs fraîchement reconstitués sont utilisés. Le Contrôle de Coagulation Spécial Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A, et le Contrôle de Coagulation Spécial Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A, peuvent être utilisés. Les niveaux obtenus pour ces plasmas de contrôle devraient se situer dans les plages spécifiées. Si ces plasmas de contrôle ne parviennent pas à produire des taux de Protéine S dans la plage spécifiée, le test doit être répété. Contactez BioMedica Diagnostics si les tests répétés de ces plasmas de contrôle ne permettent pas d'obtenir des taux de Protéine S dans des limites acceptables.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

La présence d'héparine supérieure à 1,2 U/ml dans l'échantillon du patient, ou la présence d'anticoagulants du lupus dans l'échantillon, peut affecter les résultats du test en prolongeant le temps de coagulation, générant une valeur de Protéine S artificiellement élevée. Ces échantillons doivent être testés à de multiples dilutions pour corriger cet effet.¹¹

Les dosages fonctionnels de la Protéine S peuvent être influencés par la présence de la mutation du facteur V de Leiden chez le patient, car cette condition inhibe l'inactivation du facteur Va par la Protéine C activée, renforcée par la Protéine S.

Ce test ne doit pas être utilisé comme seul moyen de diagnostic. Il convient de suivre le régime standard de test de coagulation.

VALEURS ATTENDUES

La valeur de la Protéine S est généralement exprimée en pourcentage relatif par rapport à la valeur d'un plasma normal standard ou mélangé. La plage normale prévue pour la Protéine S est de 55 à 160 %.¹² Toutefois, chaque laboratoire doit déterminer sa propre plage normale.¹³ Les hommes ont 10 % à 15 % de Protéine S plasmatique en plus que les femmes, et la concentration augmente quelque peu avec l'âge chez les deux sexes.⁹ Une diminution de la Protéine S est associée à une augmentation de l'incidence de la thromboembolie.¹⁴ Une diminution de l'activité de la Protéine S n'indique pas

nécessairement une diminution de la concentration plasmatique de la Protéine S. Comme la Protéine S (totale) est présente dans le plasma sous forme de protéine libre et de protéine liée à la C4bBP, seule la Protéine S libre agit comme cofacteur de la Protéine C activée. Lorsque l'activité de la Protéine S est réduite, il est important d'établir les taux plasmatiques de la Protéine S libre et de la Protéine S liée à la C4bBP. Trois types de carences congénitales en Protéine S ont été décrits, comme le résume le Tableau 1.¹⁵

Tableau 1

TYPE DE CARENCE	PROTÉINE S TOTALE	PROTÉINE S LIBRE	ACTIVITÉ DE LA PROTÉINE S
I	▽ ^b	▽	▽
II	↔ ^a	↔	▽
III	↔	▽	▽

a : ↔ = est normal

b : ▽ = est à un taux réduit

Les taux de Protéine S peuvent également être réduits en cas de maladie du foie et pendant un traitement anticoagulant. En outre, l'activité de la Protéine S et l'antigène libre de la Protéine S peuvent être réduits en cas de maladie inflammatoire, au cours de laquelle les taux de C4bBP sont élevés.

SUBSTANCES POUVANT INDUIRE EN ERREUR

Les substances suivantes, aux taux indiqués, peuvent interférer avec ACTICLOT Protein S.

Substance	Concentration
Hémoglobine	> 500 mg/dl
Bilirubine	> 21 mg/dl
Triglycérides	> 900 mg/dl

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

L'utilisateur final doit établir les caractéristiques de performance du produit pour la méthode ou l'instrumentation spécifique utilisée. Des études utilisant un analyseur automatisé avec détection photo-optique ont généré les résultats indiqués ci-dessous.¹¹

Exactitude

Une étude réalisée à l'aide d'un autre kit Protéine S disponible dans le commerce a généré un coefficient de corrélation de 0,868 pour 78 échantillons testés, avec une équation de régression de $y = 0,913x + 17,2$.

Précision

Les coefficients de variation (CV) suivants ont été observés :

Taux de Protéine S	CV Intra-Test	CV Inter-Tests
Plasma Normal (87 %)	3,0 %	5,9 %
Plasma Anormal (42 %)	2,3 %	5,1 %

Sensibilité

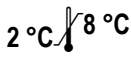
ACTICLOT Protein S est conçu pour générer une courbe standard linéaire pour les taux de Protéine S entre 0 et 100 % lorsqu'ils sont tracés comme indiqué.

RÉFÉRENCES

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

5. Broekmans, A. W., *et al.* Hereditary Protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. *Thrombosis and Haemostasis* 1985, **53**: 273-277.
6. Kamiya, T., *et al.* Inherited deficiency of Protein S in a Japanese family with recurrent venous thromboembolism. A study of three generations. *Blood* 1986, **67**: 406-410.
7. Sscharz, H. P., *et al.* Identification and quantification of Protein S in human platelets. *Blood* 1985, **66**: 1452-1455.
8. Dahlbäck, Björn. Interaction between vitamin K-dependant Protein S and the complement C4b-binding protein. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1984, **10**: 139-148.
9. Broze, G. J., *et al.* Biochemistry and Physiology of Protein C, Protein S, and Thrombomodulin. In: Colman, *et al.*, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Third Edition* 1994. Philadelphia, PA: J. B. Lippincott Company, 259-275.
10. *Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition*, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.
11. Données internes BioMedica Diagnostics Inc.
12. Boyer-Neumann, C., *et al.* Comparison of functional assays for Protein S. *Thrombosis and Haemostasis* 1993, **70**: 946-950.
13. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory – second edition. *NCCLS/CLSI Document C28-A2* June 2000; Vol. 20, No. 13.
14. Bertina, R. M. Hereditary Protein S deficiency. *Haemostasis* 1995, **15**: 241-246.
15. Hathaway, W. E. and Goodnight, Jr., S. H. *Disorders of Hemostasis and Thrombosis: A Clinical Guide*. McGraw-Hill 1993, p. 350.

DÉFINITIONS DES SYMBOLES

	Consulter le mode d'emploi		Avertissement
	Dispositif médical pour diagnostic in vitro		Limite de température À conserver à une température comprise entre 2 °C et 8 °C
	Numéro de lot		Référence catalogue
	Date de péremption		Fabricant
	Quantité suffisante pour <n> tests		Contient...
	Marquage CE		Représentant agréé au sein de l'Union Européenne