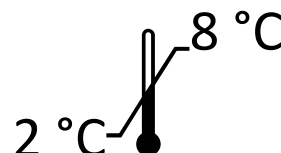


ACTICLOT[®] Protein S

REF 843L-HS



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

USO PREVISTO

ACTICLOT® Protein S è un test di coagulazione funzionale destinato alla determinazione quantitativa dell'attività della Proteina S nel plasma umano. Il test è per uso diagnostico *in vitro*.

SPIEGAZIONE DEL TEST

DiScipio e colleghi hanno identificato per la prima volta la Proteina S umana (S per Seattle) nel 1977.¹ La Proteina S umana è una glicoproteina a catena singola di 635 aminoacidi (69.000 kD) che circola nel plasma a una concentrazione di circa 320 nM. Il gene attivo della Proteina S ha 15 esoni e si estende per più di 80 kilobasi sul cromosoma 3.² La Proteina S è una proteina dipendente dalla vitamina K sintetizzata principalmente nel fegato ma anche nell'endotelio e forse nei megacariociti. È possibile che tutte e tre le fonti della Proteina S svolgano un ruolo significativo nella regolazione dell'emostasi.

La Proteina S non sembrava essere il precursore zimogeno di una serina proteinasi e non era nota alcuna funzione fino al 1980, quando Walker riferì che la Proteina S bovina funziona come un cofattore per la Proteina C attivata nell'inattivazione del fattore V attivato.³ L'importanza biologica della regolazione della coagulazione attraverso il percorso che coinvolge la Proteina C, la Proteina S e la trombomodulina è stata confermata da studi clinici. Un'associazione fra trombosi e carenze parziali della Proteina S è stata documentata in alcune famiglie.^{4,5,6} La Proteina S è stata trovata anche sulla superficie delle cellule endoteliali e delle piastrine.⁷ Circa il 60% della Proteina S nel plasma umano è strettamente legato alla proteina legante C4b, quindi i livelli plasmatici della Proteina S potrebbero non riflettere completamente la sua biodisponibilità.⁸ Questo complesso non ha attività di cofattore anticoagulante. È stato suggerito che la Proteina S può avere un ruolo nel sistema del complemento mediando l'associazione della proteina legante C4b (C4bBP) con le superfici cellulari che sono state danneggiate o attivate per esporre i fosfolipidi caricati negativamente.⁹ Questo può rappresentare un altro importante meccanismo di regolazione della Proteina S.

PRINCIPIO DEL METODO

Il test ACTICLOT Protein S è un test del plasma basato sulla coagulazione. Nel test, le diluizioni di plasma del paziente sono mescolate con plasma privato della Proteina S. Un reagente attivatore contenente il fattore Xa, la Proteina C attivata e i fosfolipidi viene aggiunto alla miscela. Dopo un periodo di incubazione di 5 minuti, viene aggiunto cloruro di calcio per iniziare la formazione di coaguli. In queste condizioni, il prolungamento del tempo di coagulazione è direttamente proporzionale alla concentrazione della Proteina S nel plasma del paziente.

REAGENTI

Il kit contiene reagenti sufficienti a eseguire 80 test con un analizzatore di coagulazione automatico, 40 test se è impiegato un metodo end-point manuale.

- | | | |
|-----------|--|----------------------------------|
| R1 | Reagente Attivatore ACTICLOT: | 4 fiale, 1,0 ml (liofilizzate) |
| R2 | Plasma Carente di Proteina S: | 6 fiale, 1,0 ml (liofilizzate) |
| R3 | Tampone di Diluizione del Campione: | 2 fiale, 2,5 ml, concentrato 10X |

AVVERTENZA

Questo prodotto contiene materiale di origine umana ed è risultato non reattivo per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), il virus dell'epatite C (HCV) e il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 e 2 (HIV-1, HIV-2) con metodi registrati. Poiché nessun metodo di analisi conosciuto può fornire una garanzia completa che i prodotti derivati da campioni umani non trasmettano HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 o altri agenti patogeni trasmessi per via ematica, questo prodotto deve essere maneggiato come raccomandato per qualsiasi campione umano potenzialmente infettivo.

Questo prodotto contiene materiale di origine animale. Poiché nessun metodo di analisi conosciuto può fornire una garanzia completa che i prodotti derivati da campioni animali non trasmettano agenti patogeni trasmessi per via ematica, questo reagente deve essere maneggiato come raccomandato per qualsiasi campione potenzialmente infettivo.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti liquidi liofilizzati e concentrati sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette delle fiale se conservati a 2°-8°C.

A. Reagente Attivatore ACTICLOT (R1)

Ricostituire con 1 ml di acqua deionizzata o distillata di tipo I. Lasciare riposare a temperatura ambiente (18°-25°C) per 20 minuti per consentire la completa dissoluzione. Quindi conservare a 2°-8°C e utilizzare entro 4 ore. Il reagente attivatore ricostituito è stabile per:

	30 giorni
	-20°C

B. Plasma Carente di Proteina S (R2)

Ricostituire con 1 ml di acqua deionizzata o distillata di tipo I. Mescolare delicatamente e lasciare riposare a temperatura ambiente (18°-25°C) per 20 minuti per consentire la completa dissoluzione. Quindi conservare a 2°-8°C e utilizzare entro 4 ore. Il plasma carente ricostituito è stabile per:

	30 giorni
	-20°C

C. Tampone di Diluizione del Campione (R3)

Diluire il contenuto di una fiala a 25 ml con acqua deionizzata o distillata di tipo I e mescolare. La forza lavoro del Tampone di Diluizione è stabile per:

	30 giorni
	2°-8°C

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Vedere “Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition”, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.¹⁰ La raccolta del plasma deve essere eseguita come segue:

1. Raccogliere 9 volumi di sangue in 1 volume di citrato trisodico 0,1 M.
2. Centrifugare il campione di sangue a 2.500 x g per 15 minuti.
3. Il plasma deve essere conservato a 2-8°C e testato entro 2 ore. In alternativa, il plasma può essere conservato per:

	1 mese
	-20°C

4. Il plasma congelato può essere scongelato una volta a 37°C, 30 minuti prima dell'uso.

PROCEDURA

Materiali Forniti - Vedere Reagenti

Materiale Richiesto Ma Non Fornito

Acqua deionizzata o distillata di Tipo 1

Calibratore di Coagulazione Speciale, REF C.BMD.SCC030-01ML-A

Controllo Speciale di Coagulazione Normale, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A

Controllo Speciale di Coagulazione Anormale, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A

Soluzione di cloruro di calcio da 0,025 M

Analizzatore di coagulazione automatizzato o timer meccanico per coaguli

Cilindro graduato da 25 ml

Pipetta per volumi variabili (100-1000 µl)

Incubatore o bagno d'acqua a 37°C

Calibrazione del Test

Il calibratore di coagulazione speciale, REF C.BMD.SCC030-01ML-A, deve essere utilizzato per la preparazione degli standard di calibrazione della Proteina S. Preparare gli standard di calibrazione della Proteina S, i campioni di controllo e di plasma del paziente come segue. Utilizzare gli standard e i campioni immediatamente dopo la preparazione.

Proteina S Standard*	Volume del Calibratore di Coagulazione Speciale	Volume di Diluizione Tampone
100%	100 µl	900 µl
50%	500 µl di standard al 100%	500 µl
12,5%	250 µl di standard al 50%	250 µl
0%	0 µl	1000 µl
Campione Paziente/Controllo	Campione Paziente/Controllo	Volume di Diluizione Tampone
100%	50 µl	450 µl

* Il valore effettivo degli standard della Proteina S dipenderà dal valore specifico del lotto del Calibratore di coagulazione speciale.

Procedura di Test

ACTICLOT Protein S può essere eseguito manualmente o utilizzando analizzatori di coagulazione semiautomatici o automatici.

Metodo Con Analizzatore di Ccoagulazione Automatico

BioMedica Diagnostics offre applicazioni dello strumento per eseguire ACTICLOT Protein S su diversi analizzatori di coagulazione. Queste applicazioni possono contenere dati di programmazione ed esecuzione specifici della piattaforma che differiscono da quelli forniti nelle presenti Istruzioni per l'uso. In questi casi, le informazioni contenute nell'applicazione dello strumento sostituiscono quelle contenute nelle presenti Istruzioni per l'uso. Per le istruzioni d'uso complete consultare il manuale dello strumento specifico del produttore.

Metodo End-Point Manuale

Trasferire l'Attivatore ACTICLOT e 25 mm di soluzione di cloruro di calcio nei pozzetti di reagente a 37°C. Incubare per almeno 2 minuti.

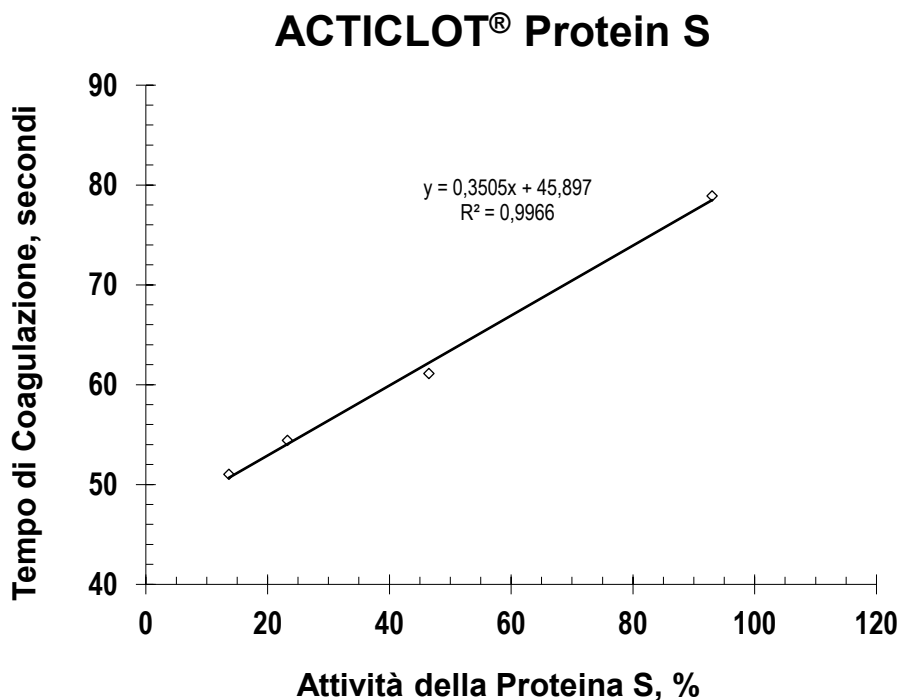
1. Aggiungere 0,1 ml di Plasma Carente di Proteina S + 0,1 ml di diluizione standard o campione del paziente in una cuvetta di coagulazione.
2. Incubare a 37°C per 2 minuti.
3. Aggiungere 0,1 ml di Attivatore ACTICLOT.
4. Incubare a 37°C per 5 minuti.
5. Aggiungere 0,1 ml di soluzione di cloruro di calcio da 0,025 M.
6. Avviare il timer di coagulazione e annotare il tempo di coagulazione.
7. Ottenere determinazioni doppie per ciascuna diluizione di plasma.

RISULTATI

Curva Standard Rappresentativa

Una curva standard è costruita tracciando il tempo medio di coagulazione per ciascuno standard di Proteina S rispetto alla sua corrispondente attività in percentuale. Ogni volta che si esegue il test è necessario generare una curva standard. Tracciare la linea del miglior adattamento tra i punti, tipicamente un'equazione lineare, per l'analisi dei dati.

La seguente curva standard è esclusivamente a scopo dimostrativo.



CALCOLO DEI RISULTATI

Determinare la % di Proteina S nel campione di test interpolando dalla curva standard. Nel caso di pazienti con lupus anticoagulante o attività della Proteina S elevata in modo anomalo, laddove siano state testate diluizioni multiple di pazienti, correggere il livello di Proteina S per la diluizione. Devono essere concordi i livelli corretti di Proteina S di almeno due diluizioni.

CONTROLLO DI QUALITÀ

I plasmi di controllo devono essere inclusi nell'esecuzione ogniqualvolta vengano utilizzati reagenti appena ricostituiti. Possono essere utilizzati il Controllo Speciale di Coagulazione Normale, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A, e il Ccontrollo Speciale di Coagulazione Anormale, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A. I livelli ottenuti per questi plasmi di controllo devono rientrare negli intervalli specificati. Se questi plasmi di controllo non riescono a produrre livelli di Proteina S che rientrano nell'intervallo specificato, l'esecuzione deve essere ripetuta. Contattare BioMedica Diagnostics se nemmeno il test ripetuto di questi plasmi di controllo produce livelli di Proteina S entro i limiti accettabili.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

La presenza di eparina superiore a 1,2 U/ml nel campione del paziente, oppure la presenza di anticoagulanti del lupus nel campione, può influenzare i risultati del test prolungando il tempo di coagulazione, dando un valore artificialmente alto della Proteina S. Questi campioni devono essere testati a diluizioni multiple per correggere questo effetto.¹¹

I test funzionali per la Proteina S possono essere influenzati dalla presenza della mutazione del fattore V Leiden nel paziente, poiché questa condizione inibisce l'inattivazione del fattore Va potenziata dalla Proteina S mediante Proteina C attivata.

Questo test non deve essere usato come unico mezzo di diagnosi. Deve essere seguito il regime standard di test della coagulazione.

VALORI ATTESI

Il valore della Proteina S è solitamente espresso come percentuale relativa rispetto al valore di uno standard o di un pool di plasma normale. L'intervallo normale atteso per la Proteina S è 55-160%.¹² Tuttavia, ogni laboratorio deve determinare il proprio intervallo normale.¹³ I maschi hanno il 10%-15% in più di Proteina S plasmatica rispetto alle femmine e la concentrazione aumenta leggermente con l'età in entrambi i sessi.⁹ Una diminuzione della Proteina S è associata a una maggiore incidenza di tromboembolia.¹⁴ Una diminuzione dell'attività della Proteina S non indica necessariamente una diminuzione della concentrazione plasmatica della Proteina S. Poiché la Proteina S (totale) è presente nel plasma come proteina libera e come proteina legata a C4bBP, solo la Proteina S libera agisce come cofattore per la Proteina C attivata. Quando l'attività della Proteina S è ridotta, è importante stabilire i livelli plasmatici sia della Proteina S libera sia della Proteina S legata a C4bBP. Sono stati descritti tre tipi di carenza congenita della Proteina S, come riassunto nella Tabella 1.¹⁵

Tabella 1

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

a: ↔ = è normale

b: ▽ = è a un livello ridotto

I livelli di Proteina S possono essere ridotti anche nelle malattie epatiche e durante la terapia anticoagulante. Inoltre, l'attività della Proteina S e l'antigene libero della Proteina S possono essere ridotti nelle malattie infiammatorie, in cui i livelli di C4bBP sono elevati.

SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti sostanze, ai livelli indicati, possono interferire con ACTICLOT Protein S.

Sostanza	Concentrazione
Emoglobina	> 500 mg/dl
Bilirubina	> 21 mg/dl
Trigliceridi	> 900 mg/dl

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utente finale deve stabilire le caratteristiche di prestazione del prodotto per il metodo specifico o la strumentazione utilizzata. Gli studi che utilizzano un analizzatore automatico con rilevamento foto-ottico hanno prodotto i risultati mostrati di seguito.¹¹

Accuratezza

Uno studio effettuato utilizzando un altro kit per la Proteina S disponibile in commercio ha dato un coefficiente di correlazione di 0,868 per 78 campioni testati, con un'equazione di regressione di $y = 0,913x + 17,2$.

Precisione

Sono stati osservati i seguenti coefficienti di variazione (CV):

Livello di Proteina S	CV intra-test	CV inter-test
Plasma Normale (87%)	3,0%	5,9%
Plasma Anormale (42%)	2,3%	5,1%

Sensibilità

ACTICLOT Protein S è progettato per fornire una curva standard lineare per i livelli di Proteina S tra 0 e 100% quando viene tracciato come indicato.

RIFERIMENTI

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. Dati archiviati presso 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.

DEFINIZIONI DEI SIMBOLI

	Consultare le istruzioni per l'uso		Avvertenza
	Dispositivo medicale diagnostico in vitro		Limite di temperatura Conservare da 2 a 8 °C
	Numero di lotto		Numero di catalogo
	Data di scadenza		Produttore
	Contenuto sufficiente per <n> test		Contiene...
	Marchio CE		Rappresentante autorizzato nell'Unione Europea