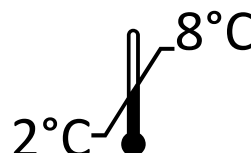
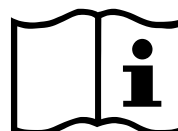


ACTICLOT[®] Protein S

REF 843L-HS



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

PRZEZNACZENIE

ACTICLOT® Protein S to test czynnościowy krzepnięcia przeznaczony do ilościowego oznaczania aktywności Białka S w ludzkim osoczu. Test jest przeznaczony do diagnostyki *in vitro*.

WYJAŚNIENIE TESTU

DiScipio i współpracownicy jako pierwsi zidentyfikowali ludzkie Białko S (od Seattle) w 1977 r¹. Ludzkie Białko S to glikoproteina jednołańcuchowa składająca się z 635 aminokwasów (69.000 kD), krążąca w osoczu w stężeniu około 320 nM. Aktywny gen Białka S ma 15 eksonów i obejmuje ponad 80 tysięcy par zasad w chromosomie 3². Białko S jest zależne od witaminy K i syntezowane jest głównie w wątrobie, ale także w nabłonku i możliwe, że w megakariocytach. Możliwe, że wszystkie trzy źródła Białka S odgrywają istotną rolę w regulacji hemostazy.

Białko S nie wydaje się być proenzymatycznym prekursorem proteinazy serynowej i nie znano żadnej jego funkcji do aż do 1980 r., kiedy to Walker ogłosił, że wołowe Białko S działa jako kofaktor dla aktywowanego Białka C w dezaktywacji aktywowanego czynnika V³. Znaczenie biologiczne regulacji krzepnięcia na ścieżce obejmującej Białko C, Białko S i trombomodulinę zostało potwierdzone w badaniach klinicznych. W niektórych rodzinach udokumentowano związek między zakrzepicą i częściowymi niedoborami Białka S^{4,5,6}. Białko S wykryto także na powierzchni komórek nabłonka i płytek krwi⁷. Około 60% Białka S w ludzkim osoczu jest ściśle związane z białkiem wiążącym C4b, a tym samym poziom Białka S w osoczu może nie do końca odzwierciedlać jego biodostępność⁸. Ten kompleks nie wykazuje aktywności kofaktora przeciwzakrzepowego. Sugerowano, że Białko S może odgrywać rolę w systemie dopełniacza przez mediację wiązania białka wiążącego C4B (C4bBP) z powierzchniami komórek, które zostały uszkodzone lub aktywowane, odsłaniając ujemnie naładowane fosfolipidy⁹. Może to stanowić kolejny ważny mechanizm regulacyjny Białka S.

ZASADA METODY

Test ACTICLOT Protein S jest testem osocza wykorzystującym krzepnięcie. W teście tym rozcieńczenia osocza pacjenta miesza się z osoczem zubożonym o Białko S. Do mieszaniny dodaje się odczynnik aktywujący zawierający czynnik Xa, aktywowane Białko C i fosfolipidy. Po 5-minutowej inkubacji dodaje się chlorek wapnia do zainicjowania powstawania skrzepu. W tych warunkach przedłużenie czasu krzepnięcia jest wprost proporcjonalne do stężenia Białka S w osoczu pacjenta.

ODCZYNNIKI

Zestaw zawiera odczynniki wystarczające do wykonania 80 testów za pomocą automatycznego analizatora koagulacji i 40 testów w przypadku zastosowania ręcznej metody punktu końcowego.

- R1 ACTICLOT Activator Reagent:** 4 fiołki, 1,0 ml (liofilizowane)
- R2 Protein S Deficient Plasma:** 6 fiolek, 1,0 ml (liofilizowane)
- R3 Sample Dilution Buffer:** 2 fiołki, 2,5 ml, koncentrat 10x

OSTRZEŻENIE

Ten produkt zawiera materiał pochodzenia ludzkiego, który został uznany za niereaktywny dla antygenu powierzchniowego zapalenia wątroby typu B (HBsAg), wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) i ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 oraz typu 2 (HIV-1, HIV-2) przy użyciu zatwierdzonych metod. Ponieważ żadna ze znanych metod badawczych nie daje całkowitej pewności, że produkty uzyskane z próbek ludzkich nie będą przenosić HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 lub innych patogenów krwiopochodnych, z produktem tym należy postępować zgodnie z zaleceniami dla wszelkich potencjalnie zakaźnych próbek ludzkich.

Ten produkt zawiera materiał pochodzenia zwierzęcego. Ponieważ żadna ze znanych metod badawczych nie może zapewnić całkowitej pewności, że produkty uzyskane z próbek zwierzęcych nie będą przenosić patogenów krwiopochodnych, z odczynnikami tym należy postępować zgodnie z zaleceniami dla wszelkich próbek potencjalnie zakaźnych.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE ODCZYNNIKA

Odczynniki liofilizowane i płynne stężone są stabilne do daty ważności podanej na etykiecie fiolek, gdy są przechowywane w temperaturze 2°–8°C.

A. ACTICLOT Activator Reagent (Odczynnik Aktywujący; R1)

Odtworzyć w 1 ml wody dejonizowanej typu I lub wody destylowanej. Pozostawić w temperaturze pokojowej (18°–25°C) na 20 minut, aby doprowadzić do pełnego rozpuszczenia. Następnie przechowywać w temperaturze 2°–8°C i zużyć w ciągu 4 godzin. Odtworzony odczynnik aktywatora jest stabilny przez:

	30 dni
	–20°C

B. Protein S Deficient Plasma (Osocze z Niedoborem Białka S; R2)

Odtworzyć w 1 ml wody dejonizowanej typu I lub wody destylowanej. Łagodnie wymieszać i pozostawić w temperaturze pokojowej (18°–25°C) na 20 minut, aby doprowadzić do pełnego rozpuszczenia. Następnie przechowywać w temperaturze 2°–8°C i zużyć w ciągu 4 godzin. Odtworzone Osocze z Niedoborem Białka S jest stabilne:

	30 dni
	–20°C

C. Sample Dilution Buffer (Bufor do Rozcieńczania Próbek; R3)

Zawartość jednej fiołki rozcieńczyć 25 ml wody dejonizowanej typu I lub wody destylowanej i wymieszać. Bufor Rozcieńczający w stężeniu roboczym jest stabilny:

	30 dni
	2°–8°C

POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

Patrz „Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition”, dokument CLSI H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008¹⁰. Osocze należy pobrać następująco:

1. Pobrać 9 objętości krwi w 1 objętości 0,1 M cytrynianu trisodu.
2. Odwirować próbkę krwi przy 2.500 x g przez 15 minut.
3. Osocze należy przechowywać w temperaturze od 2° do 8°C i oznaczyć w ciągu 2 godzin. Alternatywnie osocze można przechowywać przez:

	1 miesiąc
	-20°C

4. Zamrożone osocze może być rozmrożone raz w temperaturze 37°C, 30 minut przed użyciem.

PROCEDURA

Dostarczone Materiały — Patrz Odczynniki

Materiały SWwymagane, Ale Niedostarczane

Woda dejonizowana lub destylowana typu 1

Specjalny Kalibrator Koagulacji, REF C.BMD.SCC030-01ML-A

Specjalna Kontrola Koagulacji Prawidłowa, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A

Specjalna Kontrola Koagulacji Nieprawidłowa, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A

0,025 M roztwór chlorku wapnia

Automatyczny koagulometr lub mechaniczny zegar do rejestracji czasu krzepnięcia

Cylinder miarowy 25 ml z podziałką

Pipeta automatyczna o zmiennej objętości (100–1.000 µl)

Inkubator lub łaźnia wodna o temperaturze 37°C

Kalibracja Testu

Do przygotowania wzorców kalibracji Białka S należy użyć Specjalnego Kalibratora Koagulacji, REF C.BMD.SCC030-01ML-A. Przygotować wzorce kalibracji Białka S, kontroli osocza oraz próbki osocza pacjenta w następujący sposób. Wzorce i próbki należy wykorzystać natychmiast po przygotowaniu.

Wzorzec Białka S*	Objętość Specjalnego Kalibratora Koagulacji	Objętość Rozcieńczenia Bufor
100%	100 µl	900 µl
50%	500 µL 100% wzorca	500 µl
12,5%	250 µL 50% wzorca	250 µl
0%	0 µl	1000 µl
Próbka Pacjenta/Kontrola	Próbka Pacjenta/Kontrola	Objętość Rozcieńczenia Bufor
100%	50 µl	450 µl

* Faktyczna wartość wzorca Białka S będzie zależna od swoistej dla serii wartości specjalnego kalibratora koagulacji.

Procedura Testu

Test ACTICLOT Protein S można wykonywać ręcznie lub za pomocą półautomatycznych lub automatycznych analizatorów koagulacji (koagulometrów).

Metoda Z Użyciem Automatycznego Koagulometru

Firma BioMedica Diagnostics oferuje aplikacje urządzenia testu ACTICLOT Protein S dla kilku koagulometrów. Aplikacje urządzenia mogą obejmować instrukcje programowania specyficzne dla danej platformy oraz dane wydajności różne od zamieszczonych w instrukcji użycia. W takich przypadkach informacje zamieszczone w aplikacji urządzenia mają pierwszeństwo nad informacjami zamieszczonymi w instrukcji użycia. W celu uzyskania pełnych instrukcji postępowania należy zapoznać się z instrukcją obsługi producenta danego urządzenia.

Ręczna Metoda Punktu Końcowego

Przenieś odczynnik ACTICLOT Activator i 25 mM roztwór chlorku wapnia do dołków reakcyjnych o temperaturze 37°C. Inkubuj przez co najmniej 2 minuty.

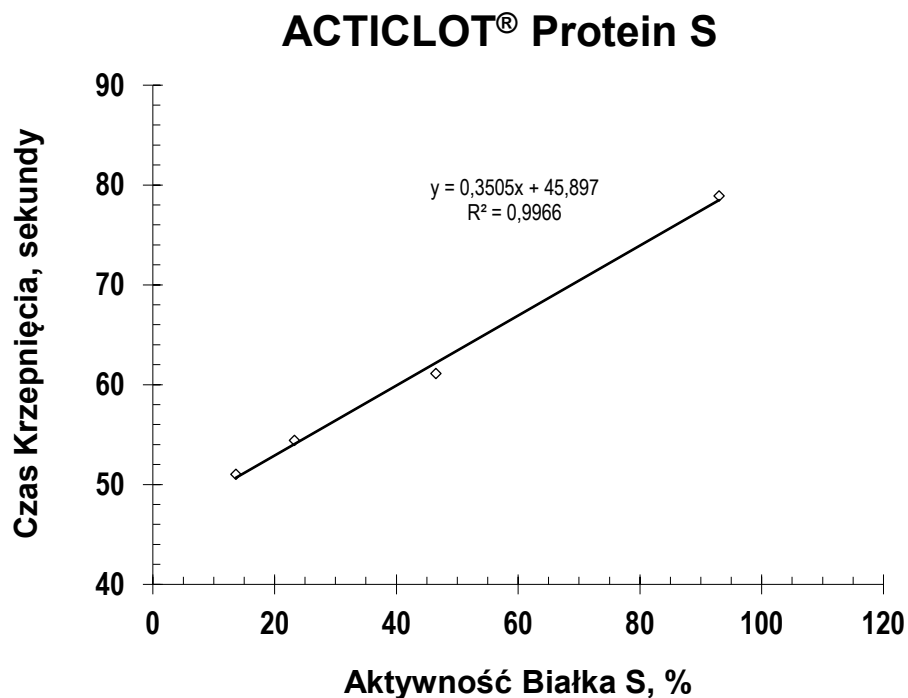
1. Do kuwety koagulacyjnej dodaj 0,1 ml Osocza Protein S Deficient oraz 0,1 ml standardowego rozcieńczenia lub próbki pobranej od pacjenta.
2. Inkubuj w temperaturze 37°C przez 2 minuty.
3. Dodaj 0,1 ml aktywatora ACTICLOT Activator.
4. Inkubuj w temperaturze 37°C przez 5 minut.
5. Dodaj 0,1 ml 0,025 M roztworu chlorku wapnia.
6. Uruchom zegar do rejestracji czasu krzepnięcia i zapisz czas krzepnięcia.
7. Wykonaj podwójne oznaczenia dla każdego rozcieńczenia osocza.

WYNIKI

Reprezentatywna Krzywa Sstandardowa

Krzywą standardową tworzy się przez wykreślenie średniego czasu krzepnięcia dla każdego wzorca Białka S względem odpowiadającej mu aktywności w procentach. Krzywą standardową należy przygotować każdorazowo podczas wykonywania testu. Wykreśl linię najlepszego dopasowania pomiędzy punktami, zwykle opisywaną równaniem liniowym, do analizy danych.

Poniższa krzywa standardowa służy wyłącznie do celów demonstracyjnych.



OBLICZANIE WYNIKÓW

Oznaczyć % Białka S w badanej próbce poprzez interpolację z krzywej wzorcowej. W przypadku pacjentów z antykoagulantami toczeniowymi lub z nieprawidłowo wysoką aktywnością Białka S, u których oznaczono wielokrotne rozcieńczenia, należy skorygować poziom Białka S odpowiednio do rozcieńczenia. Skorygowane poziomy Białka S z co najmniej dwóch rozcieńczeń muszą być zgodne.

KONTROLA JAKOŚCI

Osocza kontrolne powinny być włączone do badania zawsze wtedy, gdy używane są świeżo odtworzone odczynniki. Można użyć Specjalnej Kontroli Koagulacji prawidłowej, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A oraz Specjalnej Kontroli Koagulacji nieprawidłowej, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A. Poziomy uzyskane dla osoczy kontrolnych powinny mieścić się określonych zakresach. Jeśli wynik poziomu Białka S dla osoczy kontrolnych nie mieści się w określonym zakresie, badanie należy powtórzyć. Jeśli powtórne oznaczenie osoczy kontrolnych nie da wyniku poziomu Białka S w dopuszczalnych granicach, należy skontaktować się z firmą BioMedica Diagnostics.

OGRANICZENIA PROCEDURY

Obecność w próbce pacjenta heparyny w stężeniu powyżej 1,2 U/ml lub obecność w próbce antykoagulantów tocznia może wpłynąć na wyniki testu przez przedłużenie czasu krzepnięcia, prowadząc do sztucznie zawyżonej wartości dla Białka S. Próbki te należy badać w wielu rozcieńczeniach w celu skorygowania tego efektu¹¹.

Na działanie testów czynnościowych pod kątem Białka S może wpłynąć obecność u pacjenta mutacji Leiden genu czynnika V, jako że stan ten hamuje zwiększoną aktywację przez Białko S czynnika Va przez aktywne Białko C.

Tego testu nie należy używać jako jedynej metody rozpoznania. Należy przestrzegać standardowej procedury diagnostycznej.

WARTOŚCI OCZEKIWANE

Wartość dla Białka S jest zwykle wyrażana w postaci względnego procenta w porównaniu do wartości wzorcowej lub puli osocza prawidłowego. Oczekiwany zakres prawidłowy dla Białka S wynosi 55–160%¹². Jednak każde laboratorium powinno określić własny zakres prawidłowy¹³. U mężczyzn poziom Białka S jest o 10–15% wyższy niż u kobiet, a stężenie wzrasta nieco wraz z wiekiem u obu płci⁹. Zmniejszenie Białka S wiąże się ze zwiększeniem częstości występowania zakrzepu zatorami¹⁴. Zmniejszenie aktywności Białka S nie musi oznaczać niższego stężenia Białka S w osoczu. Białko S (całkowite) występuje w osoczu jako białko wolne oraz białko związane z C4bBP, przy czym tylko wolne Białko S działa jako kofaktor dla aktywowanego Białka C. Gdy spada aktywność Białka S, ważne jest określenie stężenia w osoczu zarówno wolnego Białka S, jak i Białka S związanego z C4bBP. Opisano trzy typy wrodzonego niedoboru Białka S, zestawione w tabeli 1¹⁵.

Tabela 1.

TYP NIEDOBORU	CAŁKOWITE BIAŁKO S	WOLNE BIAŁKO S	AKTYWNOŚĆ BIAŁKA S
I	▽ ^b	▽	▽
II	↔ ^a	↔	▽
III	↔	▽	▽

a: ↔ = prawidłowy

b: ▽ = na obniżonym poziomie

Poziom Białka S może być także obniżony w razie choroby wątroby oraz podczas leczenia przeciwzakrzepowego. Ponadto aktywność Białka S oraz antygeny wolnego Białka S może być zmniejszona w chorobie zapalnej, podczas której może dojść do podwyższenia poziomu C4bBP.

SUBSTANCJE ZAKŁÓCAJĄCE

Następujące substancje w podanych stężeniach mogą zakłócać działanie testu ACTICLOT Protein S.

Substancja	Stężenie
Hemoglobina	> 500 mg/dl
Bilirubina	> 21 mg/dl
Trójglicerydy	> 900 mg/dl

CHARAKTERYSTYKA SKUTECZNOŚCI

Użytkownik końcowy powinien określić charakterystykę skuteczności produktu dla konkretnej używanej metody lub urządzeń. Badania z użyciem automatycznego analizatora z detekcją fotooptyczną doprowadziły do uzyskania wyników przedstawionych poniżej¹¹.

Dokładność

Badanie przeprowadzone z użyciem innego dostępnego komercyjnie zestawu do oznaczania Białka S dało współczynnik korelacji wynoszący 0,868 dla 78 zbadanych próbek, z równaniem regresji postaci $y = 0,913x + 17,2$.

Precyzja

Uzyskano następujące współczynniki zmienności (CV):

Poziom Białka S	CV W Ramach Testu	CV Między Testami
Osocze prawidłowe (87%)	3,0%	5,9%
Osocze nieprawidłowe (42%)	2,3%	5,1%

Czułość

Test ACTICLOT Protein S zaprojektowano do generowania liniowej krzywej standardowej dla poziomu Białka S od 0 do 100% przy wykreślaniu zgodnie z instrukcją.

LITERATURA

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. W: 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. Dane własne, 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.

DEFINICJE SYMBOLI

	Sprawdź w instrukcji użycia		Ostrzeżenie
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Ograniczenia temperatury Przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C
	Numer serii		Numer katalogowy
	Data ważności		Producent
	Zawartość wystarczająca na <n> oznaczeń		Zawiera...
	Znak CE		Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej