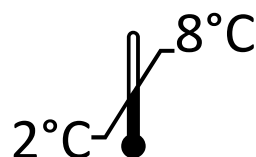
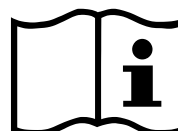


ACTICLOT[®] Protein S

REF 843L-HS



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

USO PRETENDIDO

ACTICLOT® Protein S é um ensaio de coagulação funcional destinado à determinação quantitativa da atividade da Proteína S no plasma humano. O ensaio destina-se ao uso diagnóstico *in vitro*.

EXPLICAÇÃO DO TESTE

DiScipio e colegas identificaram pela primeira vez a Proteína Humana S (S de Seattle) em 1977.¹ A Proteína Humana S é uma glicoproteína de cadeia única de 635 aminoácidos (69.000 kD) que circula no plasma a uma concentração de cerca de 320 nM. O gene ativo da Proteína S tem 15 exons e abrange mais de 80 kilobases no cromossomo 3.² A Proteína S é uma proteína dependente da vitamina K sintetizada principalmente no fígado, mas também no endotélio e possivelmente em megacariócitos. É possível que as três fontes de Proteína S desempenhem um papel significativo na regulação da hemostasia.

A Proteína S não parecia ser o zimógeno precursor de uma proteinase serina e nenhuma função era conhecida até 1980, quando Walker relatou que a Proteína S bovina funciona como um cofator da Proteína C na inativação do fator V ativado.³ A importância biológica da regulação da coagulação pelo caminho envolvendo a Proteína C, a Proteína S e a trombomodulina foi substanciada por estudos clínicos. Uma associação entre trombose e deficiências parciais de Proteína S foi documentada em certas famílias.^{4,5,6} A Proteína S também foi encontrada na superfície das células endoteliais e plaquetas⁷. Aproximadamente 60% da Proteína S no plasma humano está fortemente ligada à proteína de ligação C4b, portanto, os níveis plasmáticos de Proteína S podem não refletir completamente sua biodisponibilidade.⁸ Este complexo não tem atividade de cofator anticoagulante. Foi sugerido que a Proteína S pode ter um papel no sistema complemento, mediando a associação da proteína de ligação C4b (C4bBP) com superfícies celulares que foram danificadas ou ativadas para expor fosfolipídios carregados negativamente.⁹ Isso pode representar outro mecanismo regulador importante para a Proteína S.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O ensaio ACTICLOT Protein S é um ensaio de plasma baseado na coagulação. No ensaio, as diluições do plasma do paciente são misturadas com o plasma esgotado da Proteína S. Um reagente ativador contendo fator Xa, Proteína C ativada e fosfolipídios é adicionado à mistura. Após um período de incubação de 5 minutos, o cloreto de cálcio é adicionado para iniciar a formação do coágulo. Nestas condições, o prolongamento do tempo de coagulação é diretamente proporcional à concentração de Proteína S no plasma do paciente.

REAGENTES

O kit contém reagentes suficientes para realizar 80 testes usando um analisador de coagulação automático ou 40 testes se um método manual de ponto final for usado.

- R1 Reagente Ativador ACTICLOT:** 4 frascos, 1,0 ml (liofilizado)
- R2 Plasma Deficiente em Proteína S:** 6 frascos, 1,0 ml (liofilizado)
- R3 Tampão de Diluição de Amostra:** 2 frascos, 2,5 ml, concentração de 10 vezes

AVISO

Este produto contém material de origem humana que foi considerado não reativo para o Antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), Vírus da hepatite C (HVC) e Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e tipo 2 (HIV-1, HIV-2) usando métodos registrados. Uma vez que nenhum método de teste conhecido pode fornecer uma garantia total de que os produtos derivados de amostras humanas não transmitirão HBsAg, HVC, HIV-1, HIV-2 ou outros agentes patogênicos sanguíneos, esse produto deverá ser manuseado conforme recomendado para quaisquer amostras humanas potencialmente infecciosas.

Este produto contém material de origem animal. Uma vez que nenhum método de teste conhecido pode fornecer uma garantia total de que os produtos derivados de amostras animais não transmitirão agentes patogênicos sanguíneos, esse reagente deverá ser manuseado conforme recomendado para quaisquer amostras potencialmente infecciosas.

PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE REAGENTES

Reagentes líquidos liofilizados e concentrados estáveis até a data de validade indicada nas etiquetas dos seus frascos, quando armazenados a 2°-8°C.

A. Reagente Ativador ACTICLOT (R1)

Reconstituir com 1 ml de água deionizada ou destilada tipo 1. Deixar repousar à temperatura ambiente (18°-25°C) durante 20 minutos para permitir a dissolução completa. Depois manter a 2°-8°C e utilizar em 4 horas. O reagente ativador reconstituído é estável por:

	30 dias
	-20°C

B. Plasma Deficiente em Proteína S (R2)

Reconstituir com 1 ml de água deionizada ou destilada tipo 1. Misturar suavemente e deixar em repouso à temperatura ambiente (18°-25°C) durante 20 minutos para permitir a dissolução completa. Depois manter a 2°-8°C e utilizar em 4 horas. O plasma deficiente reconstituído é estável por:

	30 dias
	-20°C

C. Tampão de Diluição de Amostra (R3)

Diluir o conteúdo de um frasco a 25 ml com água deionizada ou destilada tipo 1 e misturar. O Tampão de Diluição de força de trabalho é estável por:

	30 dias
	2°-8°C

COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS

Consulte “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 A coleta de plasma deve ser feita da seguinte forma:

1. Coletar 9 volumes de sangue em 1 volume de citrato trissódico de 0,1 M.
2. Centrifugar a amostra de sangue a 2.500 x g durante 15 minutos.
3. O plasma deve ser armazenado entre 2° e 8°C e analisado em 2 horas. Alternativamente, o plasma pode ser armazenado por:

	1 mês
	-20°C

4. O plasma congelado pode ser descongelado uma vez a 37°C, 30 minutos antes da utilização.

PROCEDIMENTO

Materiais Fornecidos – Consultar Reagentes

Materiais Necessários, Mas Não Fornecidos

Água deionizada tipo 1 ou água destilada

Calibrador de Coagulação Especial, REF C.BMD.SCC030-01ML-A

Controle de Coagulação Especial Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A

Controle de Coagulação Especial Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A

Solução de cloreto de cálcio 0,025 M

Analizador de coagulação automatizado ou temporizador de coagulação mecânica

Cilindro graduado de 25 ml

pipetador de volume variável (100–1.000 µL)

Incubadora ou banho-maria a 37°C

Calibração de Ensaio

O Calibrador de Coagulação Especial, REF C.BMD.SCC030-01ML-A, deve ser utilizado para a preparação dos padrões de calibração da Proteína S. Prepare padrões de calibração de Proteína S, controle e amostras de plasma do paciente da seguinte forma. Use os padrões e as amostras imediatamente após a preparação.

Proteína S Padrão*	Volume do Calibrador de Coagulação Especial	Volume do Tampão de Diluição
100%	100 µL	900 µL
50%	500 µL do Padrão 100%	500 µL
12,5%	250 µL do Padrão 50%	250 µL
0%	0 µL	1000 µL
Amostra/Controle do Paciente	Amostra/Controle do Paciente	Volume do Tampão de diluição
100%	50 µL	450 µL

* O valor real dos padrões de Proteína S dependerá do valor específico do lote do calibrador de coagulação especial.

Procedimento de Ensaio

O ACTICLOT Protein S pode ser realizado manualmente ou por meio de analisadores de coagulação semiautomatizados ou automatizados.

Método do Analisador de Coagulação Automatizado

A BioMedica Diagnostics oferece aplicações do instrumento para executar o ACTICLOT Protein S em vários analisadores de coagulação. Essas aplicações do instrumento podem conter dados de programação e desempenho específicos da plataforma que diferem dos dados fornecidos nestas Instruções de uso. Nesses casos, as informações contidas na aplicação do instrumento substituem as informações desta Instrução de uso. Consulte o manual do instrumento do fabricante específico para obter as instruções de operação completas.

Método de Ponto Final Manual

Transfira o Ativador ACTICLOT e a solução de cloreto de cálcio 25 mM para os poços de reagente a 37°C. Incubar durante pelo menos 2 minutos.

1. Adicione 0,1 ml de Plasma deficiente em Proteína S + 0,1 ml de diluição padrão ou amostra do paciente a uma cubeta de coagulação.
2. Incube a 37°C por 2 minutos.
3. Adicione 0,1 ml de Ativador ACTICLOT.
4. Incube a 37°C por 5 minutos.
5. Adicione 0,1 ml de solução de cloreto de cálcio 0,025 M.
6. Inicie o temporizador de coagulação e observe o tempo de coagulação.
7. Obtenha determinações duplicadas para cada diluição de plasma.

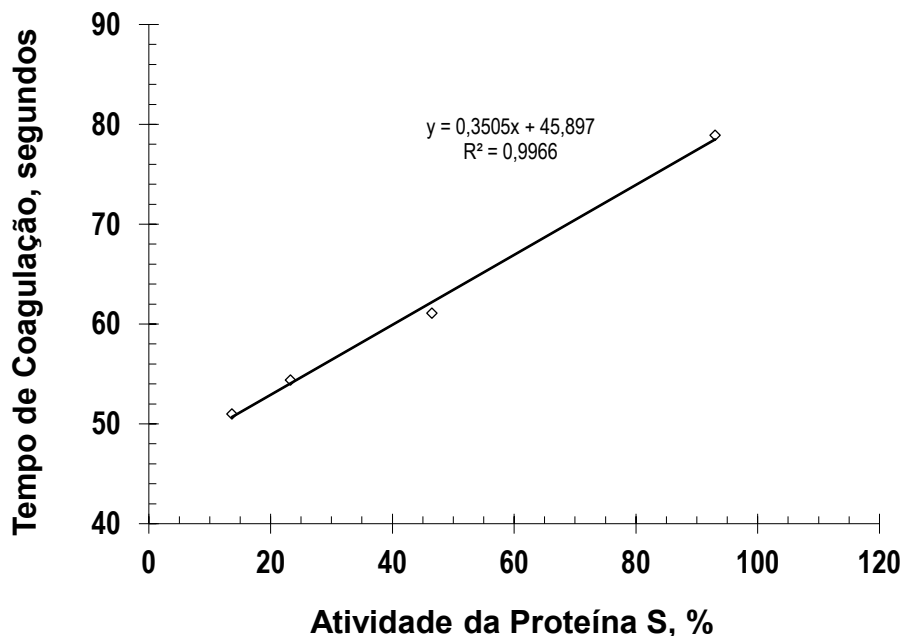
RESULTADOS

Curva Padrão Representativa

Uma curva padrão é construída ao traçar o tempo médio de coagulação de cada padrão de Proteína S em relação a sua atividade correspondente em porcentagem. Uma curva padrão deve ser gerada cada vez que o ensaio é realizado. Desenhe a linha de melhor ajuste entre os pontos, normalmente uma equação linear, para análise de dados.

A seguinte curva padrão destina-se apenas para fins demonstração.

ACTICLOT® Protein S



CÁLCULO DE RESULTADOS

Determinar a % de Proteína S na amostra de teste por meio da interpolação a partir da curva padrão. No caso de pacientes com anticoagulantes lúpicos ou atividade anormalmente alta de Proteína S, em que várias diluições de pacientes foram analisadas, corrija o nível de Proteína S da diluição. Os níveis corrigidos de Proteína S de pelo menos duas diluições devem estar de acordo.

CONTROLE DE QUALIDADE

Os plasmas de controle devem ser incluídos na análise sempre que são usados reagentes reconstituídos recentemente. O Controle de Coagulação Especial Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A, e o Controle de Coagulação Especial Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A, podem ser usados. Os níveis obtidos para estes plasmas de controle devem estar dentro dos limites especificados. Se os plasmas de controle não gerarem os níveis de Proteína S dentro do intervalo especificado, a análise deverá ser repetida. Entre em contato com a BioMedica Diagnostics se o ensaio repetido dos controles não gerar os níveis de Proteína S dentro dos limites aceitáveis.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A presença de heparina superior a 1,2 U/ml na amostra do paciente, ou a presença de anticoagulantes lupus na amostra, pode afetar os resultados do ensaio, prolongando o tempo de coagulação, dando um valor artificialmente elevado de Proteína S. Essas amostras devem ser testadas em várias diluições para corrigir esse efeito.¹¹

Os ensaios funcionais para a Proteína S podem ser influenciados pela presença da mutação de fator V Leiden no paciente, uma vez que esta condição inibe a inativação aumentada da Proteína S do fator Va pela Proteína C ativada.

Este teste não deve ser usado como o único meio de diagnóstico. O regime padrão de testes de coagulação deve ser seguido.

VALORES ESPERADOS

O valor da Proteína S é geralmente expresso como um percentual relativo em relação ao valor de um plasma normal padrão ou comum. O intervalo normal esperado para a Proteína S é de 55-160%.¹² No entanto, cada laboratório deve determinar o seu próprio intervalo normal.¹³ Os machos têm 10%-15% mais proteína S plasmática do que as fêmeas, e a concentração aumenta um pouco com a idade em ambos os sexos.⁹ Uma diminuição na Proteína S está associada a um aumento da incidência de tromboembolismo.¹⁴ Uma diminuição na atividade da Proteína S não indica necessariamente uma diminuição na concentração plasmática da Proteína S. Como a Proteína S (total) está presente no plasma como proteína livre e como proteína ligada à C4bBP, apenas a Proteína S livre atua como cofator da Proteína C ativada. Quando a atividade da Proteína S diminui, é importante estabelecer os níveis plasmáticos tanto da Proteína S livre quanto da Proteína S ligada à C4bBP. Três tipos de deficiência de Proteína S congênita foram descritos, conforme resumido na Tabela 1.¹⁵

Tabela 1

TIPO DE DEFICIÊNCIA	TOTAL PROTEÍNA S	LIVRE PROTEÍNA S	ATIVIDADE DA PROTEÍNA S
I	▽ ^b	▽	▽
II	↔ ^a	↔	▽
III	↔	▽	▽

a: ↔ = é normal

b: ▽ = está a um nível reduzido

Os níveis de Proteína S também podem ser diminuídos em doenças hepáticas e durante a terapia anticoagulante. Além disso, a atividade da Proteína S e o antígeno livre da Proteína S podem ser reduzidos em doenças inflamatórias, nas quais os níveis de C4bBP são elevados.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

As seguintes substâncias podem interferir com o ACTICLOT Protein S nos níveis indicados.

Substância	Concentração
Hemoglobina	>500 mg/dl
Bilirrubina	>21 mg/dl
Triglicerídeos	>900 mg/dl

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O usuário final deve estabelecer características de desempenho do produto para o método ou a instrumentação específica utilizada. Estudos utilizando um analisador automático com detecção foto-óptica produziram os resultados mostrados abaixo.¹¹

Precisão

Um estudo realizado utilizando outro kit de Proteína S disponível comercialmente deu um coeficiente de correlação de 0,868 para 78 amostras testadas, com uma equação de regressão de $y = 0,913x + 17,2$.

Precisão

Foram observados os seguintes coeficientes de variação (CV's):

Nível de Proteína S	CV Intraensaio	CV Interensaio
Plasma Normal (87%)	3,0%	5,9%
Plasma Anormal (42%)	2,3%	5,1%

Sensibilidade

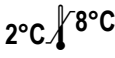
O ACTICLOT Protein S foi projetado para dar uma curva padrão linear para níveis de Proteína S entre 0 e 100% quando traçado como direcionado.

REFERÊNCIAS

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 Guidelines-Fifth Edition*, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.
11. Data on file at 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.

DEFINIÇÕES DOS SÍMBOLOS

	Consulte as Instruções de uso		Aviso
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Limitação de temperatura Armazenar entre 2°C e 8°C
	Número do lote		Número de catálogo
	Data de expiração		Fabricado por
	Contém o suficiente para <n> testes		Contém...
	Marca CE		Representante Autorizado da União Europeia