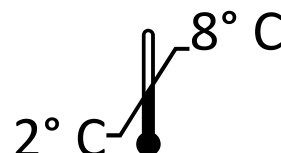


# ACTICLOT® Protein S

**REF 843L-HS**



Obelis s.a  
Bd. Général Wahis 53, 1030 Bruselas, BÉLGICA

## USO PREVISTO

ACTICLOT® Proteína S es un ensayo funcional de coagulación destinado a la determinación cuantitativa de la actividad de la proteína S en el plasma humano. La prueba es para uso diagnóstico *in vitro*.

## EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

DiScipio y sus colegas identificaron por primera vez la Proteína S humana (S de Seattle) en 1977.<sup>1</sup> La Proteína S humana es una glicoproteína de cadena simple de 635 aminoácidos (69.000 kD) que circula en el plasma a una concentración de aproximadamente 320 nM. El gen activo de la Proteína S tiene 15 exones y abarca más de 80 kilobases en el cromosoma 3.<sup>2</sup> La Proteína S es una proteína dependiente de la vitamina K que se sintetiza principalmente en el hígado, pero también en el endotelio y posiblemente en los megacariocitos. Es posible que las tres fuentes de Proteína S desempeñen un papel importante en la regulación de la hemostasia.

La Proteína S no parecía ser el precursor zimógeno de una serina proteinasa y no se conocía su función hasta 1980, cuando Walker informó que la Proteína S bovina funciona como cofactor de la Proteína C activada en la inactivación del factor V activado.<sup>3</sup> La importancia biológica de la regulación de la coagulación por la vía que implica a la Proteína C, la Proteína S y la Trombomodulina ha sido corroborada por estudios clínicos. Se ha documentado una asociación entre la trombosis y las deficiencias parciales de la Proteína S en ciertas familias.<sup>4,5,6</sup> La Proteína S también se ha encontrado en la superficie de las células endoteliales y las plaquetas.<sup>7</sup> Aproximadamente el 60% de la Proteína S en el plasma humano está fuertemente unida a la proteína de unión al C4b, por lo que los niveles plasmáticos de la Proteína S pueden no reflejar completamente su biodisponibilidad.<sup>8</sup> Este complejo no tiene actividad de cofactor anticoagulante. Se ha sugerido que la Proteína S puede tener un papel en el sistema del complemento al mediar la asociación de la proteína de unión al C4b (C4bBP) con las superficies celulares que han sido dañadas o activadas para exponer fosfolípidos cargados negativamente.<sup>9</sup> Esto puede representar otro importante mecanismo de regulación para la Proteína S.

## PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo ACTICLOT Proteína S es un ensayo de plasma basado en la coagulación. En el ensayo, se mezclan diluciones de plasma de pacientes con plasma empobrecido en Proteína S. Se añade a la mezcla un reactivo activador que contiene factor Xa, Proteína C activada y fosfolípidos. Tras un periodo de incubación de 5 minutos, se añade cloruro de calcio para iniciar la formación del coágulo. Bajo estas condiciones, la prolongación del tiempo de coagulación es directamente proporcional a la concentración de Proteína S en el plasma del paciente.

## REACTIVOS

El kit contiene reactivos suficientes para realizar 80 pruebas utilizando un analizador de coagulación automatizado, 40 pruebas si se utiliza un método de punto final manual.

**R1 Reactivo Activador ACTICLOT:** 4 viales, 1,0 ml (liofilizados)

**R2 Plasma Con Deficiencia de Proteína S:** 6 viales, 1,0 ml (liofilizados)

**R3 Tampón de Dilución de Muestras:** 2 viales, 2,5 ml, concentrado 10X

## ADVERTENCIA

Este producto contiene material de origen humano que se ha encontrado que no es reactivo para el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), del virus de la Hepatitis C (VHC) y del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1, VIH-2) utilizando métodos registrados. Como ningún método de prueba conocido puede proporcionar una garantía completa de que los productos derivados de muestras humanas no transmitirán HBsAg, VHC, VIH-1, VIH-2 u otros patógenos transmitidos por la sangre, este producto debe manipularse como se recomienda para cualquier muestra humana potencialmente infecciosa.

Este producto contiene material de origen animal. Como ningún método de prueba conocido puede proporcionar una garantía completa de que los productos derivados de muestras de animales no transmitirán patógenos transmitidos por la sangre, este reactivo debe manipularse como se recomienda para cualquier muestra potencialmente infecciosa.

## PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Los reactivos liofilizados y concentrados líquidos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan de 2°-8°C.

### A. Reactivo Activador ACTICLOT (R1)

Reconstituya con 1 ml de agua desionizada o destilada Tipo I. Dejar reposar a temperatura ambiente (18°-25°C) durante 20 minutos para permitir la disolución completa. Úselo de inmediato o almacénelo a 2°-8°C y úselo en un lapso de 4 horas. El reactivo activador reconstituido es estable durante:

|                                                                                   |         |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|
|  | 30 días |
|  | -20°C   |

### B. Plasma Con Deficiencia de Proteína S (R2)

Reconstituya con 1 ml de agua desionizada o destilada Tipo I. Mezcle suavemente y deje reposar a temperatura ambiente (18°-25°C) durante 20 minutos para permitir la disolución completa. Úselo de inmediato o almacénelo a 2°-8°C y úselo en un lapso de 4 horas. El plasma deficiente reconstituido es estable por:

|                                                                                     |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
|  | 30 días |
|  | -20°C   |

### C. Tampón de Dilución de Muestras (R3)

Diluya el contenido de un vial de 25 ml con agua desionizada o destilada Tipo I y mezcle. El Tampón de Dilución a la concentración de trabajo es estable durante:

|                                                                                     |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
|  | 30 días |
|  | 2°-8°C  |

## RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Consulte “Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition (Recolección, transporte y procesamiento de muestras de sangre para pruebas de coagulación basadas en plasma y pruebas de hemostasia molecular; Directrices aprobadas-Quinta edición)”, Documento CLSI H21-A5, Vol. 28, N. 5, 2008.<sup>10</sup> La recolección de plasma se debe realizar de la siguiente manera:

1. Recolecte 9 volúmenes de sangre en 1 volumen de citrato trisódico 0,1 M.
2. Centrifugue la muestra de sangre a 2.500 x g durante 15 minutos.
3. El plasma debe almacenarse a 2°-8°C y evaluarse en un lapso de 2 horas. Alternativamente, el plasma puede almacenarse por:

|                                                                                   |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|
|  | 1 mes |
|  | -20°C |

4. El plasma congelado puede descongelarse una vez a 37°C, 30 minutos antes de su uso.

## PROCEDIMIENTO

### Materiales Suministrados – Ver Reactivos

### Material Requerido, Pero No Suministrado

Agua desionizada Tipo 1, o agua destilada

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

Control Especial de la Coagulación Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A

Control Especial de la Coagulación Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A

0,025 M de solución de cloruro de calcio

Analizador de coagulación automatizado o temporizador de coágulos mecánico

Cilindro graduado de 25 ml

pipeteador de volumen variable (100-1000 µL)

Incubadora o baño de agua a 37°C

## Calibración de la Prueba

El calibrador especial de coagulación, REF C.BMD.SCC030-01ML-A, debe utilizarse para la preparación de los estándares de calibración de Proteína S. Prepare los estándares de calibración de la Proteína S, el control y las muestras de plasma del paciente de la siguiente manera. Utilice los estándares y las muestras inmediatamente después de la preparación.

| Estándar de Proteína S*      | Volumen del Calibrador de Coagulación Especial | Volumen de Dilución Tampón |
|------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|
| 100%                         | 100 µl                                         | 900 µl                     |
| 50%                          | 500 µl de estándar 100%                        | 500 µl                     |
| 12,5%                        | 250 µl de estándar 50%                         | 250 µl                     |
| 0%                           | 0 µl                                           | 1000 µl                    |
|                              |                                                |                            |
| Muestra del Paciente/Control | Muestra del Paciente/Control                   | Volumen de Dilución Tampón |
| 100%                         | 50 µl                                          | 450 µl                     |

\* El valor real de los Estándares de Proteína S dependerá del valor específico del lote del Calibrador de coagulación especial.

## Procedimiento de Prueba

ACTICLOT Proteína S puede realizarse manualmente, o utilizando analizadores de coagulación semiautomáticos o automatizados.

## Método del Analizador de Coagulación Automatizado

BioMedica Diagnostics ofrece aplicaciones instrumentales para realizar la prueba ACTICLOT Proteína S en varios analizadores de coagulación. Estas aplicaciones de los instrumentos pueden contener datos de programación y rendimiento específicos de la plataforma que difieren de los que se proporcionan en estas instrucciones de uso. En estos casos, la información contenida en la aplicación del instrumento sustituye a la información de la presente instrucción de uso. Por favor, consulte el manual del instrumento del fabricante específico para obtener las instrucciones de funcionamiento completas.

## **Método de Punto Final Manual**

Transfiera el Activador ACTICLOT y la solución de cloruro de calcio de 25 mM a los pozos de reactivos a 37°C. Incubar durante al menos 2 minutos.

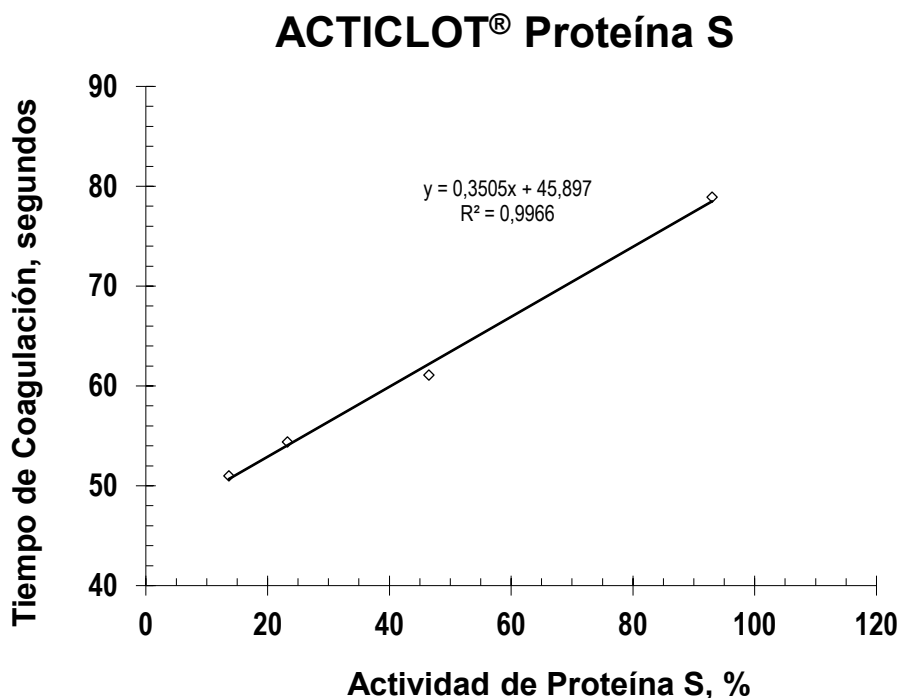
1. Añada 0,1 ml de Plasma Deficiente de Proteína S + 0,1 ml de dilución estándar o muestra del paciente a una cubeta de coagulación.
2. Incube a 37°C durante 2 minutos.
3. Añada 0,1 ml de Activador ACTICLOT.
4. Incube a 37°C durante 5 minutos.
5. Añada 0,1 ml de solución de cloruro de calcio 0,025 M.
6. Inicie el temporizador de coagulación y observe el tiempo de coagulación.
7. Obtenga determinaciones duplicadas para cada dilución de plasma.

## **RESULTADOS**

### **Curva Estándar Representativa**

Una curva estándar se construye graficando el tiempo medio de coagulación para cada estándar de Proteína S versus su actividad correspondiente en porcentaje. Se debe generar una curva estándar cada vez que se realiza la prueba. Dibuje la línea de mejor ajuste entre los puntos, típicamente una ecuación lineal, para el análisis de datos.

La siguiente curva estándar es solo para fines de demostración.



## CÁLCULO DE RESULTADOS

Determine el % de Proteína S en la muestra de ensayo interpolando a partir de la curva estándar. En el caso de pacientes con anticoagulantes tipo lupus o con actividad anormalmente alta de la Proteína S, donde se analizaron múltiples diluciones de pacientes, corrija el nivel de Proteína S para la dilución. Los niveles corregidos de Proteína S de al menos dos diluciones deben concordar.

## CONTROL DE CALIDAD

El plasma de control debe incluirse en el proceso siempre que se usen reactivos recién reconstituidos. Se puede utilizar el Control Especial de la Coagulación Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A, y el Control Especial de la Coagulación Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A. Los valores de los plasmas de control deben estar dentro de los rangos establecidos. Si el plasma de control falla en producir los niveles de Proteína S dentro del rango especificado, se debe repetir el proceso. Póngase en contacto con BioMedica Diagnostics si los ensayos repetidos del plasma de control no producen niveles de Proteína S dentro de límites aceptables.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La presencia de heparina superior a 1,2 U/ml en la muestra del paciente, o la presencia de anticoagulantes tipo lupus en la muestra, puede afectar los resultados del ensayo al prolongar el tiempo de coagulación, dando un valor de Proteína S artificialmente alto. Estas muestras se deben analizar con múltiples diluciones para corregir este efecto.<sup>11</sup>

Los ensayos funcionales de la Proteína S pueden verse influidos por la presencia de la mutación del Factor V Leiden en el paciente, ya que esta condición inhibe la inactivación potenciada del Factor Va por la Proteína C activada.

Esta prueba no debe utilizarse como único medio de diagnóstico. Se debe seguir el régimen de pruebas de coagulación estándar.

## VALORES ESPERADOS

El valor de la Proteína S suele expresarse como un porcentaje relativo en comparación con el valor de un plasma normal estándar o agrupado. El rango normal esperado para la Proteína S es de 55%-160%.<sup>12</sup> Sin embargo, cada laboratorio debe determinar su propio rango normal.<sup>13</sup> Los hombres tienen entre un 10% y un 15% más de Proteína S en plasma que las mujeres, y la concentración aumenta un poco con la edad en ambos sexos.<sup>9</sup> Una disminución de la Proteína S se asocia con una mayor incidencia de tromboembolismo.<sup>14</sup> Una disminución de la actividad de la Proteína S no indica necesariamente una disminución de la concentración plasmática de Proteína S. Como la Proteína S (total) está presente en el plasma como proteína libre y como proteína unida a la C4bBP, sólo la Proteína S libre actúa como cofactor de la Proteína C activada. Cuando la actividad de la Proteína S se reduce, es importante establecer los niveles plasmáticos tanto de la Proteína S libre como de la Proteína S unida a la C4bBP. Se han descrito tres tipos de deficiencia congénita de Proteína S, que se resumen en la Tabla 1.<sup>15</sup>

**Tabla 1**

| TIPO DE DEFICIENCIA | TOTAL PROTEÍNA S | PROTEÍNA S LIBRE | ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA S |
|---------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| I                   | ▽ <sup>b</sup>   | ▽                | ▽                          |
| II                  | ↔ <sup>a</sup>   | ↔                | ▽                          |
| III                 | ↔                | ▽                | ▽                          |

a: ↔ = es normal

b: ▽ = está en un nivel reducido

Los niveles de la Proteína S también pueden disminuir en las enfermedades hepáticas y durante el tratamiento con anticoagulantes. Además, la actividad de la Proteína S y el antígeno de la Proteína S libre pueden estar reducidos en la enfermedad inflamatoria, en la cual los niveles de C4bBP son elevados.

## SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias en los niveles indicados pueden interferir con ACTICLOT Proteína S.

| Sustancia     | Concentración |
|---------------|---------------|
| Hemoglobina   | > 500 mg/dL   |
| Bilirrubina   | > 21 mg/dL    |
| Triglicéridos | > 900 mg/dL   |

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El usuario final debe establecer las características de rendimiento del producto para el método o la instrumentación específicos utilizados. Los estudios realizados con un analizador automatizado con detección foto-óptica arrojaron los resultados que se muestran a continuación.<sup>11</sup>

## Exactitud

Un estudio realizado utilizando otro kit de Proteína S disponible comercialmente dio un coeficiente de correlación de 0,868 para 78 muestras analizadas, con una ecuación de regresión de  $y = 0,913x + 17,2$ .

## Precisión

Se observaron los siguientes coeficientes de variación (CV):

| Nivel de Proteína S  | CV de la Intraprueba | CV de la Interprueba |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Plasma Normal (87%)  | 3,0%                 | 5,9%                 |
| Plasma Anormal (42%) | 2,3%                 | 5,1%                 |

## Sensibilidad

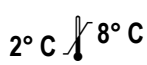
ACTICLOT Proteína S está diseñado para dar una curva estándar lineal para los niveles de proteína S entre 0 y 100% cuando se traza como se indica.

## REFERENCIAS

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. Sschwarz, 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. *En: 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. Datos en archivo en 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. Documento C28-A2 de NCCLS/CLSI Junio de 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.

## DEFINICIONES DE SÍMBOLOS

|                                                                                     |                                            |                                                                                     |                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|  | Consulte las instrucciones de uso          |  | Advertencia                                               |
|  | Dispositivo médico de diagnóstico in vitro |  | Limitación de temperatura<br>Almacenar entre 2° C y 8° C. |
|  | Número de lote                             |  | Número de catálogo                                        |
|  | Fecha de caducidad                         |  | Fabricante                                                |
|  | Contiene suficiente para <n> pruebas       |  | Contiene...                                               |
|  | marca de CE                                |  | Representante autorizado de la Unión Europea              |