

English Version

ThromboTek PSe is a complete kit for the quantitative determination of protein S activity in human plasma by clotting assay.

SUMMARY

Protein S is a vitamin K-dependent plasma protein which serves as a cofactor for the anticoagulant activity of activated Protein C in the degradation of factors Va and VIIIa (1). Deficiencies of protein S are associated with an increased risk of thrombosis (2).

PRINCIPLE

The ThromboTek PSe method is similar to a standard factor assay. Dilutions of normal plasma are mixed with protein S depleted plasma and activated Protein C. After a two minute incubation clotting of the plasma mixture is initiated by addition of an activator reagent that contains rabbit thromboplastin. Under these conditions, the prolongation of clotting time is directly proportional to the concentration of protein S in the patient plasma.

REAGENTS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

WARNING: POTENTIAL BIOHAZARD

The plasma used to prepare the Protein S Deficient Plasma and the human Activated Protein C has been tested and found negative for Hepatitis B antigen (HBsAg) and antibodies to HIV and HCV by FDA licensed tests. However, these reagents should be handled with the same precautions as those observed when handling potentially infectious patient plasmas.

(1) Protein S Deficient Plasma

Ingredients: Each vial contains 1 mL of lyophilized human plasma which has been depleted of protein S by immunoadsorption.

Preparation for use: Reconstitute the vial with 1 mL of supplied Hydration Solution. Mix gently; do not shake. Allow to stand room temperature for 20 minutes before use.

(2) Activator S Reagent

Ingredients: Each vial contains 2 mL of lyophilized reagent containing rabbit brain thromboplastin, calcium, buffer, and stabilizers.

Preparation for use: Reconstitute each vial with 2 mL of supplied Hydration Solution. Mix gently; do not shake. Allow to stand at room temperature for 20 minutes before use.

(3) Activated Protein C (aPC)

Ingredients: Each vial contains 1 mL of lyophilized, human activated Protein C with buffer and stabilizers.

Preparation for use: Reconstitute each vial with 1 mL of supplied Hydration Solution. Mix gently; do not shake. Allow to stand at room temperature for 20 minutes before use.

(4) Hydration Solution

Ingredients: Each bottle contains 30 mL of deionized water with an added preservative.

Preparation for use: None.

(5) Imidazole Buffered Saline (IBS)

Ingredients: Each bottle contains 30 mL of buffer containing 15 mM imidazole, 125 mM sodium chloride, and 0.02 % sodium azide as a preservative.

Preparation for use: None.

WARNING: Sodium azide can form highly explosive metal azides if exposed to lead or copper in plumbing. Any azide containing buffer should be discarded into a sink with large volumes of water to minimize such a risk.

STORAGE AND STABILITY

Store the kit components at 2-8°C. Expiry dating is printed on each vial label. After reconstitution the kit is stable (i.e., any shift in recovery is less than twice the total imprecision of the kit) when stored capped for 24 hours at 2-8°C or for 8 hours at room temperature (23°C-25°C).

TEST PROCEDURE

The ThromboTek PSe assay may be performed by acceptable manual methods or by using optical or electromechanical coagulation analyzers. Adaptation protocols for analyzers are available from r² Diagnostics on request.

Specimen Collection and Preparation

Plasma is obtained from whole blood anti-coagulated with 1 part 3.2% sodium citrate to 9 parts whole blood. Process the collected whole blood and handle the plasma according to the CLSI guideline H21-A5 (or superseding edition) (6).

Materials Provided in Kit

80 Determinations

- 4 vials of Protein S Deficient Plasma
- 4 vials of Activator S
- 4 vials of Activated Protein C
- 1 bottle of IBS
- 1 bottle of Hydration Solution

Reagents and equipment required but not provided

- Coagulation analyzer or 37°C water bath and timer.
- Variable volume pipettes (50 – 1000 µL)
- Graph paper or computer spreadsheet program

Step-by-Step Procedure

A. Disposables

All test tubes and pipette tips should be plastic

B. Assay Calibration

Pooled normal plasma (PNP) (at least 10 normal donors), which has been collected in the same manner as plasmas to be tested should be used for preparation of protein S calibration standards. This PNP will be assumed to have 100% protein S activity. Alternatively, a commercially available assayed reference plasma in which protein S activity has been determined may also be used. Assayed reference plasmas are also available from recognized international standards organizations.

Prepare plasma protein S calibration standards just before testing as follows:

Standard	Sample	IBS Buffer
100%	100% PNP or reference plasma	--
50%	500 µL 100% standard	500 µL IBS
25%	500 µL 50% standard	500 µL IBS
12.5%	500 µL 25% standard	500 µL IBS
6.25%	500 µL 12.5% standard	500 µL IBS

Use immediately after preparing.

C. Testing of samples

- Reconstitute reagents as described above.
- Prepare plasma and standard dilutions as described above.
- Transfer appropriate volumes of ThromboTek PSe Activator S reagent to a 37°C water bath or to a reagent reservoir in the instrument. Prime reagent delivery tubing if necessary.
- To an instrument cuvette or test tube:
 - Add 50 µL of a 1:10 dilution in IBS of patient sample or standard.
 - Add 50 µL of aPC.
 - Add 50 µL of Protein S depleted plasma.
 - Incubate for 2 minutes at 37°C.
 - Initiate the reaction by adding 100 µL of Activator S reagent, and note the time to clot formation.
 - Obtain duplicate determinations for each sample or reference plasma.
- Using linear graph paper, plot the % Protein S activity of the calibration standards on the x-axis versus the mean clotting fit of the standards on the y-axis. Draw the line of best fit between the resulting points. Commonly available spreadsheet software programs are often used as an alternative to graph paper and manual calculation. Determine the % Protein S of patient samples by interpolating from the standard curve.
- If the assigned Protein S level of the reference plasma used to construct the standard curve is not 100%, then the patient result must be corrected to account for the true reference value. Alternatively, the true assigned value can be used in the calibration curve.

QUALITY CONTROL

Quality control of coagulation tests involves multiple components, including reagents, pipettes, distilled water, buffers and instruments. Each laboratory should establish a

Quality Control program that includes both normal and abnormal control plasmas. All assays should include controls, and if any of the controls are outside the established reference ranges, then the assay should be considered invalid and no patient results should be reported. A normal reference control plasma and an abnormal reference control plasma can be used to verify instrument and reagent performance.

INTERPRETATION OF RESULTS

A decrease in protein S activity does not necessarily indicate a decrease in plasma concentration. Protein S (total) is present in plasma as free protein and as protein bound to C4b binding protein (C4bBP). Only the free protein S acts as a cofactor for activated protein C. When the protein S activity is decreased, it is important to establish the plasma levels of both free protein S and C4bBP bound protein S.

Congenital deficiency of protein S has been identified as a risk factor for thrombosis.(4) Various attempts to characterize the deficiency based on the relationships between total and free protein S activity and antigen values have been suggested but there is no agreement on how to express this (5).

Acquired protein S deficiency can also be seen in liver disease, DIC and with oral anticoagulant therapy. Congenital protein S deficiency has been reported to segregate with activated protein C resistance (APC-R) in about 25% of cases

LIMITATIONS OF PROCEDURE

The presence of heparin or lupus-type anticoagulants may interfere with the assay results, prolonging the clotting time and hence giving an artificially high protein S value. In patients with marked inflammatory responses an apparent protein S deficiency can occur because of high levels of the C4bP, which may be found in this condition. It is important to repeat testing at a different time or test a family member before classifying a patient as protein S deficient.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision: Precision estimates of three lots of ThromboTek PSe were determined in a two run per day, twenty day exercise on an AMAX 200 analyzer in mechanical mode using a normal plasma and an abnormal plasma as described in the CLSI guideline EP5-A2 (7). The average precision results as %CV were:

Plasma	Repeatability	Total
Normal	4.9%	5.7%
Abnormal	7.8%	9.2%

Linearity: Linearity studies of three lots of ThromboTek PSe were determined on Stago ST4 semi-automated coagulation analyzer. The ThromboTek PSe assay was linear from 10% Protein S to the maximum tested concentration of 156% Protein S.

Analytical Sensitivity: The lower limit of detection for three lots of ThromboTek PSe were determined by replicate measurement of IBS alone as the sample on an AMAX 200 analyzer in mechanical mode, and the % PS activity was calculated from the sum of the mean and 3 standard deviations. The lower limit of detection of the assay was 1% PS.

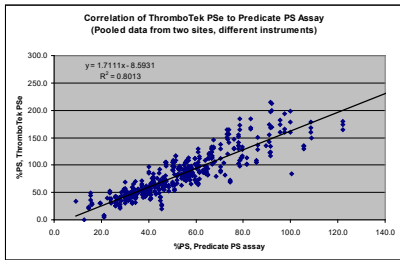
Interferences: Interference studies of three lots of ThromboTek PSe were determined on an AMAX 200 analyzer in mechanical mode. Interferant was spiked into pooled normal plasma and a dilution series prepared. The maximum concentration tolerated in the assay was defined as the highest concentration of interferant wherein any consistent shift relative to the recovered value of the base PNP was less than 10%. The maximum concentrations were:

Interferant class	Added interferant	Maximum concentration tested	Maximum tolerated concentration
Hemolysis	Hemoglobin	500 mg/dL	500 mg/dL
Icterus	Unconjugated bilirubin	20 mg/dL	20 mg/dL
Lipemia	IntraLipid®	2,000 mg triglyceride/dL	2,000 mg triglyceride/dL
Heparin	Heparin	2.0 Unit/mL	1.0 U/mL

Intralipid® is a registered trademark of Fresenius Kabi.

Method Comparison:

A total of one hundred seventy-four patient samples were assayed for Protein S activity with multiple lots of ThromboTek PSe and two lots of another commercially available Protein S activity assay. The data was collected in two sites, one using an AMAX 200 analyzer and the other a STart4 analyzer. As determined by Kruskal-Wallis analysis the data was pooled and then further analyzed by linear regression. The correlation coefficient was 0.895 (95% CI, 0.875-0.912) and the coefficient of determination was 0.801, with a slope and intercept of 1.71 and -8.59 respectively.



Normal Reference Range:

In a representative study one hundred twenty healthy donors were analyzed for Protein S activity with each of three lots of ThromboTek PSe on an AMAX 200 analyzer in mechanical mode. Assay calibration was performed using the SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3 available from NIBSC. The geometric means and standard deviations were calculated, and the ranges were calculated as the mean +/- 2 standard deviations. The results were:

Donors	Number	Mean % PS	Range %PS
All	120	120%	47% - 193%
Males only	35	135%	62% - 209%
Females only	85	114%	45% - 183%

These values should be considered illustrative only. Each laboratory should establish its own normal reference range.

The performance of any assay should be reviewed for the individual analyzer(s) in use in each laboratory according to the CLSI guideline EP15-A2 (8) or to a similar guideline.

References

- Walker FJ, "Protein S and the regulation of activated protein C", Semin Thromb.Hemostasis 10: 131-138, 1984
- Engesser L, Brookmans AW, Briet E, Brommer EJP,Bertina RM, "Hereditary protein S deficiency: Clinical manifestations", Ann.Intern. Med. 106: 241-245, 1985
- Boyer-Neumann C . "Comparison of functional assays for protein S", Thromb Hemostasis70: 946-950, 1993.
- Bertina RM, "Hereditary protein S deficiency", Haemostasis 15: 241-245,1985
- Comp PC, "Laboratory evaluation of protein S status", Semin Thromb Hemostasis. 16:177-181, 1990.
- H21-A5, "Collection, Transport, and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
- EP5-A2, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline-Second Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2004
- EP15-A2, "User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline-Second Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2005.

calcul manuel. Déterminer le pourcentage de protéine S des échantillons de patient en interpolant à partir de la courbe étalon.

- Si le niveau de protéine S attribué du plasma de référence utilisé pour construire la courbe étalon n'est pas de 100 %, le résultat du patient doit être corrigé pour représenter la véritable valeur de référence. La véritable valeur attribuée peut également être utilisée dans la courbe d'étalonnage.

CONTRÔLE QUALITÉ

Le contrôle qualité des tests de coagulation concerne de nombreux composants, notamment les réactifs, les pipettes, l'eau distillée, les tampons et les instruments. Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité incluant des plasmas de contrôle normaux et anormaux. Tous les dosages doivent inclure des contrôles et, si l'un des contrôles se situe en dehors des plages de référence établies, le dosage doit être considéré comme non valide et aucun résultat de patient ne doit être enregistré. Un plasma de contrôle normal et un plasma de contrôle anormal peuvent être utilisés pour vérifier les performances de l'instrument et du réactif.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une diminution de l'activité de la protéine S n'indique pas nécessairement une diminution de la concentration plasmatique. La protéine S totale est présente dans le plasma sous forme libre et sous forme de protéine liée à la protéine de liaison C4b (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 de doser les niveaux plasmatiques tant pour la protéine S libre que pour la protéine S liée à la C4bBP.

Une déficience congénitale en protéine S a été identifiée comme un facteur de risque de thrombose.(4) Diverses tentatives de caractérisation de la déficience basées sur la relation entre l'activité de la protéine S totale et de la protéine S libre et les valeurs des antigènes ont été suggérées mais il n'existe aucun consensus sur la manière de l'exprimer (5).

Une déficience en protéine S acquise peut également être observée dans des maladies hépatiques, une CIVD ou lors d'un traitement anticoagulant oral. La déficience congénitale en protéine S a été associée à une résistance à la protéine C activée dans environ 25 % des cas.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

La présence d'héparine ou d'anticoagulants circulants peut interférer avec les résultats du dosage, prolongeant le temps de coagulation et générant ainsi un taux de protéine S artificiellement élevé. Chez les patients présentant des réponses inflammatoires marquées, une déficience en protéine S apparente peut se produire en raison d'un taux élevé de C4bP, observé dans ces cas. Il est important de refaire l'analyse à différents moments ou de tester un autre membre de la famille avant de classer un patient comme déficient en protéine S.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision : Des évaluations de la précision sur trois lots de ThromboTek PSe ont été effectuées sur deux cycles par jour, pendant vingt jours sur un analyseur AMAX 200 en mode mécanique, en utilisant un échantillon de plasma normal et un échantillon de plasma anormal comme décrit dans les directives EP5-A2 du CLSI (7). La précision moyenne en % de la valeur de contrôle était la suivante :

Plasma	Reproductibilité	Total
Normal	4,9%	5,7%
Anormal	7,8%	9,2%

Linéarité : Des études de linéarité ont été réalisées sur trois lots de ThromboTek PSe sur l'analyseur de coagulation semi-automatisé ST4 de Stago. Le dosage ThromboTek PSe était linéaire de 10 % de protéine S à la concentration maximale testée de 156 % de protéine S.

Sensibilité analytique : Le seuil inférieur de détection pour trois lots de ThromboTek PSe a été déterminé par une double mesure d'IBS seul utilisé comme échantillon sur un analyseur AMAX 200 en mode mécanique, et le % d'activité de la PS a été calculé à partir de la somme de la moyenne et des 3 écarts-types. Le seuil inférieur de détection du dosage était de 1 % de la PS.

Inform of any suspected serious incident related to the device to Info@r2diagnostics.com, or the local r2 distributor, and the competent authority, ministry of health, or delegated agency in the country where the suspected serious incident occurred.

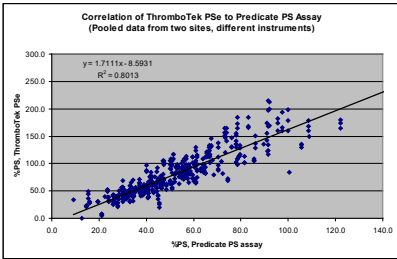
Interférences : Des études d'interférence portant sur trois lots de ThromboTek PSe ont été réalisées sur un analyseur AMAX 200 en mode mécanique. L'interférent a été injecté dans un pool de plasma normal, puis diverses dilutions ont été préparées. La concentration maximale tolérée dans ce dosage était définie comme la concentration la plus élevée d'interférent dans laquelle tout décalage systématique par rapport à la valeur récupérée du PNP de base était inférieur à 10 %. Les concentrations maximales étaient les suivantes :

Classe d'interférent	Interférent ajouté	Concentration maximale testée	Concentration maximale tolérée
Hémolyse	Hémoglobine	500 mg/dl	500 mg/dl
Ictère	Bilirubine non conjuguée	20 mg/dl	20 mg/dl
Lipémie	IntraLipid®	2000 mg de triglycéride/dl	2000 mg de triglycéride/dl
Héparine	Héparine	2,0 unités/ml	1,0 U/ml

Intralipid® est une marque déposée de Fresenius Kabi.

Comparaison des méthodes :

Au total, 174 échantillons de patients ont été dosés pour l'activité de la protéine S avec différents lots de ThromboTek PSe et deux lots d'un autre kit de dosage de l'activité de la protéine S disponible dans le commerce. Les données ont été recueillies sur deux sites, l'un utilisant un analyseur AMAX 200 et l'autre un analyseur STArt4. Comme déterminé par l'analyse de Kruskal-Wallis, les données ont été mises en pool puis analysées par régression linéaire. Le coefficient de corrélation était de 0,895 (IC à 95 %, 0,875-0,912) et le coefficient de détermination était de 0,801, avec une pente et un point d'intersection de 1,71 et -8,59 respectivement.



Plage de référence normale :

Dans une étude représentative, l'activité de la protéine S a été analysée chez 120 donneurs sains avec trois lots de ThromboTek PSe chacun sur un analyseur AMAX 200 en mode mécanique. L'étalonnage du dosage a été réalisé à l'aide du lot N° 3 d'étalon de coagulation secondaire SSC/ISTH disponible auprès du NIBSC. La moyenne géométrique et les écarts-types ont été calculés, et les plages ont été calculées comme la moyenne +/- 2 écarts-types. Les résultats étaient les suivants :

Donneurs	Nombre	Moyenne en % de la PS	Plage en % de la PS
Tous	120	120%	47% - 193%
Hommes seulement	35	135%	62% - 209%
Femmes seulement	85	114%	45% - 183%

Ces valeurs doivent être considérées comme indicatives uniquement. Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de référence normale.

Les performances de tout dosage doivent être vérifiées pour le(s) analyseur(s) utilisé(s) dans chaque laboratoire conformément aux directives EP15-A2 du CLSI (8) ou directives similaires.

Références

- Walker FJ, "Protein S and the regulation of activated protein C", Semin Thromb.Hemostasis 10: 131-138, 1984
- Engesser L, Broekmans AW, Briet E, Brommer EJP,Bertina RM., "Hereditary protein S deficiency: Clinical manifestations", Ann.Intern. Med. 106: 241-245, 1985

- Boyer-Neumann C. "Comparison of functional assays for protein S", Thromb Hemostasis70: 946-950, 1993.
- Bertina RM, "Hereditary protein S deficiency", Haemostasis 15: 241-245,1985
- Comp PC, "Laboratory evaluation of protein S status", Semin Thromb Hemostasis. 16:177-181, 1990.
- H21-A5, "Collection, Transport, and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays: Approved Guideline-Fifth Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
- EP5-A2, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline-Second Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2004
- EP15-A2, "User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline-Second Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2005.

ThromboTek PSe ist ein Komplettkit für die quantitative Bestimmung der Protein S-Aktivität in Humanplasma mithilfe eines Gerinnungsassays.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Protein S ist ein Vitamin K-abhängiges Plasmaprotein, das als Kofaktor bei der gerinnungshemmenden Wirkung des aktivierten Protein C bei der Spaltung der Faktoren Va und VIIIa (1) wirkt. Ein Protein S-Mangel wird mit einem erhöhten Risiko für Thrombose assoziiert (2).

PRINZIP

Die ThromboTek PSe -Methode ähnelt einem standardmäßigen Faktor-Assay. Normalplasma-Verdünnungen werden mit Protein S-Mangelplasma und aktiviertem Protein C gemischt. Nach 2-minütiger Inkubation wird ein Reagenz hinzugefügt, das als Aktivator Kaninchen thromboplastin enthält, und dadurch die Gerinnung der Plasmamischung eingeleitet. Unter diesen Bedingungen verhält sich die Verlängerung der Gerinnungszeit direkt proportional zur Protein-S-Konzentration im Patientenplasma.

REAGENZIEN

NUR FÜR DIE IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

WARNUNG: POTENZIELLE BIOGEFAHR

Das für die Herstellung des Protein S-Mangelplasmas und des humanen aktivierten Protein C verwendete Plasma wurde untersucht und erwies sich in von der FDA zugelassenen Tests als Hepatitis B-Antigen (HBsAg)-negativ und HIV- und HCV-Antikörper-negativ. Beim Umgang mit diesen Reagenzien sind jedoch die Vorsichtsmaßnahmen zu beachten, die auch üblicherweise beim Umgang mit potenziell infektiösem Patientenplasma gelten.

(1) Protein S-Mangelplasma

Zusammensetzung: Jedes Fläschchen enthält 1 mL lyophilisiertes Humanplasma, dem durch Immunadsorption Protein S entzogen wurde.

Vorbereitung zum Gebrauch: Fläschchen mit 1 mL der beiliegenden Rehydrierungslösung rekonstituieren. Vorsichtig mischen, nicht schütteln! Vor Gebrauch 20 Minuten bei Zimmertemperatur ruhen lassen.

(2) Aktivator S Reagenz

Zusammensetzung: Jedes Fläschchen enthält 2 mL lyophilisiertes Reagenz, das Kaninchenhirn-Thromboplastin, Kalzium, Puffer und Stabilisatoren enthält.

Vorbereitung zum Gebrauch: Jedes Fläschchen mit 2 mL der beiliegenden Rehydrierungslösung rekonstituieren. Vorsichtig mischen, nicht schütteln! Vor Gebrauch 20 Minuten bei Zimmertemperatur ruhen lassen.

(3) Aktiviertes Protein C (aPC)

Zusammensetzung: Jedes Fläschchen enthält 1 mL lyophilisiertes humanes aktiviertes Protein C mit Puffer und Stabilisatoren.

Vorbereitung zum Gebrauch: Jedes Fläschchen mit 1 mL der beiliegenden Rehydrierungslösung rekonstituieren. Vorsichtig mischen, nicht schütteln! Vor Gebrauch 20 Minuten bei Zimmertemperatur ruhen lassen.

(4) Rehydrierungslösung

Zusammensetzung: Jede Flasche enthält 30 mL entionisiertes mit Konservierungsmittel versetztes Wasser.

Vorbereitung zum Gebrauch: Nicht erforderlich.

(5) Imidazol-gepufferte Kochsalzlösung (IBS)

Zusammensetzung: Jede Flasche enthält 30 mL Pufferlösung, die 15 mM Imidazol, 125 mM Natriumchlorid und 0,02% Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

Vorbereitung zum Gebrauch: Nicht erforderlich.

WARNUNG: Natriumazid kann hoch explosive Metallazide bilden, wenn es in den Rohrleitungen mit Blei oder Kupfer in Berührung kommt. Daher sollte beim Entsorgen von azidhaltigen Puffern im Becken mit viel Wasser nachgespült werden, um dieses Risiko zu senken.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Kitbestandteile bei 2 - 8 °C lagern. Auf jedem Fläschchenetikett ist das Verfallsdatum angegeben. Nach der Rekonstituierung ist der Kit mit geschlossenem Deckel bei 2 - 8 °C für 24 Stunden und bei Zimmertemperatur (23 °C - 25 °C) für 8 Stunden stabil (d.h., die Veränderung bei der Wiederherstellung liegt unter der doppelten Gesamtungenauigkeit des Kits).

TESTVERFAHREN

Zur Durchführung des ThromboTek PSe-Assays können zulässige manuelle Verfahren bzw. optische oder elektromechanische Gerinnungsanalyatoren verwendet werden. Anpassungsprotokolle für Analysatoren werden auf Anfrage von r² Diagnostics zur Verfügung gestellt.

Probenentnahme und Vorbereitung

Das Plasma wird aus Vollblut gewonnen, das mit 1 Teil 3,2% Natriumzitrat zu 9 Teilen Vollblut antikoaguliert wurde. Die Behandlung des entnommenen Vollbluts und die Handhabung des Plasmas sollten entsprechend der CLSI-Richtlinie H21-A5 (oder der ersetzenden Folgerichtlinie) durchgeführt werden (6).

Im Kit enthaltene Materialien für 80 Bestimmungen

- 4 Fläschchen Protein S-Mangelplasma
- 4 Fläschchen Aktivator S
- 4 Fläschchen aktiviertes Protein C
- 1 Flasche IBS
- 1 Flasche Rehydrierungslösung

Benötigte Reagenzien und Geräte, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

- Gerinnungsanalysator oder 37 °C Wasserbad und Stoppuhr
- Pipetten verschiedener Volumina (50 – 1000 µL)
- Millimeterpapier oder Tabellenkalkulationsprogramm

Stufenweise Vorgehensweise

A. Einwegartikel

Sämtliche Teströhrchen und Pipettenspitzen sollten aus Plastik bestehen.

B. Assay-Kalibrierung

Zur Erstellung der Protein S-Kalibrierungsstandards sollte gepooltes Normalplasma (PNP) (von mindestens 10 normalen Spendern) verwendet werden, das in derselben Weise wie die zu testenden Plasmen entnommen wurde. Die Protein S-Aktivität dieses PNP wird als 100 % angesehen. Es kann wahlweise auch ein handelsübliches getestetes Referenzplasma verwendet werden, bei dem die Protein S-Aktivität bestimmt wurde. Getestetes Referenzplasma kann auch von anerkannten Unternehmen, die nach internationalen Standards arbeiten, bezogen werden.

Plasma-Protein S-Kalibrierungsstandards unmittelbar vor Testbeginn wie folgt vorbereiten:

Standard	Probe	IBS-Puffer
100%	100 % PNP oder Referenzplasma	--
50%	500 µL 100 % Standard	500 µL IBS
25%	500 µL 50 % Standard	500 µL IBS
12,5%	500 µL 25 % Standard	500 µL IBS
6,25%	500 µL 12,5 % Standard	500 µL IBS

Nach Vorbereitung sofort verbrauchen.

C. Testen von Proben

- Reagenz nach Vorschrift (s.o.) rekonstituieren.
- Plasma und Standardverdünnungen nach vorstehender Anleitung vorbereiten.
- Die entsprechenden Mengen ThromboTek PSe Aktivator S-Reagenz in ein 37 °C Wasserbad oder in einen Reagenzbehälter des Gerätes geben. Reagenz-Versorgungsschlauch gegebenenfalls vorfüllen.
- Nehmen Sie eine Küvette oder ein Teströhrchen und:
 - Fügen Sie 50 µL einer IBS-Verdünnung der Patientenprobe oder des Standards im Verhältnis 1:10 hinzu.
 - Fügen Sie 50 µL aPC hinzu.
 - Fügen Sie 50 µL Protein S-Mangelplasma hinzu.
 - 2 Minuten bei 37 °C inkubieren.
 - Leiten Sie die Reaktion ein, indem Sie 100 µL Aktivator S-Reagenz hinzufügen, und notieren Sie die Zeit bis zur Gerinnungsbildung.
 - Nehmen Sie für jede Probe oder Referenzplasma eine zweifache Bestimmung vor.
- Auf Millimeterpapier zeichnen Sie die prozentuale Protein S-Aktivität der Kalibrierungsstandards auf der x-Achse und die mittlere Gerinnungszeit der Standards auf

der y-Achse ein. Ziehen Sie zwischen den 5 entstehenden Punkten eine Linie, die alle Punkte möglichst nahe kommen. Häufig werden Tabellenkalkulationsprogramme anstatt Millimeterpapier und manueller Berechnung verwendet. Bestimmen Sie anhand der Standardkurve den Protein S-Anteil der Patientenproben.

- Wenn der zur Erstellung der Standardkurve verwendete zugewiesene Protein S-Spiegel des Referenzplasmas nicht 100 % beträgt, muss das Patientenergebnis entsprechend dem tatsächlichen Referenzwert korrigiert werden. Der tatsächliche zugewiesene Wert kann aber auch bei der Kalibrierungskurve verwendet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei der Qualitätskontrolle von Gerinnungstests sind mehrere Aspekte zu berücksichtigen. Dazu gehören Reagenzien, Pipetten, destilliertes Wasser, Puffer und verwendete Geräte. Jedes Labor sollte ein Verfahren zur Qualitätskontrolle entwickeln, das sowohl normale als auch pathologische Kontrollplasmen einschließt. Bei allen Assays sollten Kontrollen getestet werden. Wenn sich Kontrollen außerhalb des festgelegten Referenzbereiches befinden, sollten diese Assays als ungültig angesehen und die Patientenergebnisse nicht berichtet werden. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit von Gerät und Reagenz kann ein normales Referenz-Kontrollplasma oder ein pathologisches Referenz-Kontrollplasma verwendet werden.

INTERPRETIERUNG DER ERGEBNISSE

Eine sinkende Protein S-Aktivität ist nicht unbedingt ein Anzeichen für ein Sinken der Plasmakonzentration. Das Protein S (insgesamt) kommt im Plasma als freies Protein und gebunden an das C4b-bindende Protein (C4bBP) vor. Nur das freie Protein S wirkt als Kofaktor des aktivierten Protein C. Bei niedriger Protein S-Aktivität ist es wichtig, die Plasmaspiegel sowohl für das freie Protein S als auch für das C4bBP-gebundene Protein S zu bestimmen.

Ein hereditär Protein S-Mangel wurde als Risikofaktor für Thrombose festgestellt.(4) Es wurden mehrere Versuche unternommen, den Mangel aufgrund der Beziehung zwischen der gesamten und der freien Protein S-Aktivität und den Antigenwerten zu charakterisieren, aber es besteht keine Übereinstimmung darin, wie diese Beziehung ausgedrückt werden kann (5).

Ein erworbener Protein S-Mangel ist auch bei Lebererkrankungen, DIC und bei der oralen Antikoagulanzenztherapie zu beobachten. Es wurde berichtet, dass bei etwa 25 % der Patienten ein angeborener Protein S-Mangel mit der aktivierten Protein C-Resistenz (APC-R) koregriert.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Anwesenheit von Heparin oder lupusartigen Antikoagulanzen kann die Assayergebnisse beeinträchtigen und zu längeren Gerinnungszeiten führen, so dass es zur Ausgabe künstlich erhöhter Protein S-Werte kommt. Bei Patienten mit ausgeprägter Entzündungsreaktion kann es aufgrund der in diesem Zustand bestehenden hohen C4BP-Werte zu einem scheinbaren Protein S-Mangel kommen. In diesem Fall ist der Test zu einem späteren Zeitpunkt zu wiederholen oder es ist ein Familienmitglied zu testen, bevor ein Patient als Protein S-defizient eingestuft wird.

LEISTUNGSMERKMALE

Präzision: Es wurden an zwanzig Tagen bei zwei Durchläufen pro Tag Schätzwerte zur Präzision für drei Chargen von ThromboTek PSe ermittelt. Die Tests erfolgten auf einem Analysator AMAX 200 im mechanischen Modus unter Verwendung eines normalen Plasmas und eines pathologischen Plasmas gemäß der CLSI-Richtlinie EP5-A2 (7). Die ermittelten durchschnittlichen Präzisionswerte (als % VK) lauten:

Plasma	Wiederholbarkeit	insgesamt
normal	4,9%	5,7%
pathologisch	7,8%	9,2%

Lineartität: Für drei Chargen ThromboTek PSe wurden auf dem halbautomatischen Koagulometer Stago ST4 Lineartitätsstudien durchgeführt. Dabei war das ThromboTek

- Walker FJ, “Protein S and the regulation of activated protein C”, Semin Thromb.Hemostasis 10: 131-138, 1984
- Engesser L, Broekmans AW, Briet E, Brommer EJP,Bertina RM., “Hereditary protein S deficiency: Clinical manifestations”, Ann.Intern. Med. 106: 241-245, 1985
- Boyer-Neumann C. “Comparison of functional assays for protein S”, Thromb Hemostasis70: 946-950, 1993.
- Bertina RM, “Hereditary protein S deficiency”, Haemostasis 15: 241-245,1985
- Comp PC, “Laboratory evaluation of protein S status”, Semin Thromb Hemostasis. 16:177-181, 1990.
- H21-A5, “Collection, Transport, and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays: Approved Guideline-Fifth Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
- EP5-A2, “Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline-Second Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004
- EP15-A2, “User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline-Second Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2005.

ThromboTek PSe es un kit completo para la determinación cuantitativa de la actividad de la proteína S en plasma humano mediante ensayo de coagulación.

RESUMEN

La proteína S es una proteína plasmática dependiente de la vitamina K que sirve como cofactor de la actividad anticoagulante de la proteína C activada en la degradación de los factores Va y VIIIa (1). Las deficiencias de la proteína S están asociadas con el aumento del riesgo de trombosis (2).

PRINCIPIO

El método ThromboTek PSe se asemeja a los ensayos de factores estándar. Las diluciones de plasma normal se mezclan con plasma con menor concentración de proteína S y proteína C activada. Tras una incubación de dos minutos, se inicia la coagulación de la mezcla de plasma con la adición de un reactivo activador que contiene tromboplastina de conejo. Bajo estas condiciones, la prolongación del tiempo de coagulación es directamente proporcional a la concentración de la proteína S en plasma de paciente.

REACTIVOS

DISEÑO ÚNICAMENTE PARA DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.

ATENCIÓN: RIESGO BIOLÓGICO POTENCIAL

Se ha probado el plasma utilizado para preparar el plasma con déficit de proteína S y la proteína C humana activada y se ha descubierto que resulta negativo para el antígeno de la hepatitis B (HBsAg) y para los anticuerpos del VIH y el VHC en las pruebas autorizadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA). Sin embargo, estos reactivos se deben manipular con las mismas precauciones que se toman al manipular plasma de pacientes potencialmente infecciosos.

(1) Plasma con déficit de proteína S

Composición: Cada vial contiene 1 mL de plasma humano liofilizado en el que se ha reducido la concentración de proteína S mediante inmuoadsorción.

Preparación para el uso: Reconstituya el vial con 1 mL de la solución de hidratación suministrada. Mézclelo con suavidad, no lo agite. Deje reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de utilizarlo.

(2) Reactivo activador S

Composición: Cada vial contiene 2 mL de reactivo liofilizado con tromboplastina de cerebro de conejo, calcio, tampón y estabilizadores.

Preparación para el uso: Reconstituya cada vial con 2 mL de la solución de hidratación suministrada. Mézclelo con suavidad, no lo agite. Deje reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de utilizarlo.

(3) Proteína C activada (PCa)

Composición: Cada vial contiene 1 mL de proteína C activada humana liofilizada con tampón y estabilizadores.

Preparación para el uso: Reconstituya cada vial con 1 mL de la solución de hidratación suministrada. Mézclelo con suavidad, no lo agite. Deje reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de utilizarlo.

(4) Solución de hidratación

Composición: Cada frasco contiene 30 mL de agua desionizada con un conservante añadido.

Preparación para el uso: Ninguna.

(5) Solución salina tamponada con imidazol (IBS)

Composición: Cada frasco contiene 30 mL de tampón, que se compone imidazol de 15 mM, cloruro sódico de 125 mM y azida sódica al 0,02%, que actúa como conservante.

Preparación para el uso: Ninguna.

ATENCIÓN: La azida sódica puede formar azidas metálicas altamente explosivas si se expone al plomo o el cobre de las tuberías. Cualquier azida que contenga tampón sólo se debe desechar en un fregadero con agua en abundancia para minimizar dicho riesgo.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacene los componentes del kit a 2-8 °C. La fecha de caducidad aparece impresa en la etiqueta de cada vial. Tras la reconstitución, el kit permanece estable (es decir, cualquier cambio en la recuperación será inferior al doble de la

imprecisión total del kit) si se guarda tapado durante 24 horas a 2-8 °C o durante 8 horas a temperatura ambiente (23-25 °C).

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

El ensayo ThromboTek PSe se puede realizar siguiendo métodos manuales aceptados o mediante analizadores de coagulación ópticos o electromecánicos. Hay disponibles protocolos de adaptación para analizadores de r² Diagnostics bajo petición.

Recogida y preparación de la muestra

El plasma se obtiene a partir de sangre completa anticoagulada con 1 parte de citrato sódico al 3,2% por 9 partes de sangre completa. Procese la sangre completa recogida y manipule el plasma de acuerdo con la directriz H21-A5 del CLSI (o la edición posterior) (6).

Materiales incluidos en el kit

80 determinaciones

- 4 viales de plasma con déficit de proteína S
- 4 viales de activador S
- 4 viales de proteína C activada
- 1 frasco de IBS
- 1 frasco de solución de hidratación

Reactivos y equipo necesarios no incluidos

Analizador de coagulación o baño de agua a 37 °C y cronómetro.
Pipetas de volumen variable (50-1000 µL)
Papel cuadrículado o programa informático de hoja de cálculo

Procedimiento paso a paso

A. Desechables

Todos los tubos de ensayo y las puntas de pipeta deben ser de plástico.

B. Calibración de ensayo

Se debe utilizar plasma normal mezclado (PNP) (de al menos 10 donantes normales), recogido de la misma forma que el plasma que se va a probar, para la preparación de los estándares de calibración de la proteína S. Se presupone que este PNP tendrá un 100% de actividad de proteína S. Asimismo, también se puede usar un plasma de referencia ensayado comercial en el que se haya determinado la actividad de la proteína S. También hay disponible plasma de referencia ensayado de reconocidas organizaciones internacionales de estándares.

Prepare los estándares de calibración de proteína S del plasma justo antes de probar lo siguiente:

Estándar	Muestra	Tampón IBS
100%	100% del PNP o plasma de referencia	--
50%	500 µL de estándar 100%	500 µL de IBS
25%	500 µL de estándar 50%	500 µL de IBS
12,5%	500 µL de estándar 25%	500 µL de IBS
6,25%	500 µL de estándar 12,5%	500 µL de IBS

Úselo inmediatamente tras la preparación.

C. Pruebas de muestras

- Reconstituya los reactivos tal y como se describe anteriormente.
- Prepare el plasma y las diluciones del estándar tal y como se describe anteriormente.
- Trasvase las cantidades adecuadas del reactivo activador S ThromboTek PSe a un baño de agua a 37 °C o a un depósito de reactivos del instrumento. Cebe los conductos de salida de reactivo si es necesario.
- Para una cubeta de instrumentos o tubo de ensayo:
 - Añada 50 µL de una dilución de 1:10 en IBS de la muestra de paciente o el estándar.
 - Añada 50 µL de PCa.
 - Añada 50 µL de plasma con baja concentración de proteína S.
 - Incube durante 2 minutos a 37 °C.
 - Inicie la reacción añadiendo 100 µL de reactivo activador S y anote el tiempo que tarda la formación de coágulos.
 - Realice determinaciones por duplicado de cada muestra o plasma de referencia.
- Con ayuda de papel milimetrado, trace la actividad en % de la proteína S de los estándares de calibración en el eje

x en relación con el tiempo de coagulación medio de los estándares en el eje y. Dibuje la línea de ajuste óptimo entre los puntos resultantes. Con frecuencia se utilizan programas de software de hoja de cálculo más habituales como alternativa al papel cuadrículado y el cálculo manual. Determine el % de la proteína S de las muestras de paciente interpolando a partir de la curva estándar.

- Si el nivel asignado de la proteína S del plasma de referencia utilizado para crear la curva estándar no es del 100%, el resultado de paciente deberá corregirse para que represente el valor real de referencia. Asimismo, el valor real asignado se puede utilizar en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Para llevar a cabo el control de calidad de las pruebas de coagulación se necesitan varios elementos, incluidos reactivos, pipetas, agua destilada, tampones e instrumentos. Cada laboratorio debe fijar un programa de control de calidad que incluya plasma de control normal y anormal. Todos los ensayos deben incluir controles y, si alguno de los controles no está dentro de los intervalos de referencia fijados, el ensayo no se considerará válido y no se registrará ningún resultado de paciente. Es posible utilizar plasma de control de referencia normal, y plasma de control de referencia anormal, para verificar el rendimiento del reactivo y el instrumento.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Un descenso en la actividad de la proteína S no indica necesariamente una reducción de la concentración plasmática. La proteína S (total) está presente en el plasma como proteína libre y proteína unida a la proteína fijadora de C4b (C4bBP). Solamente la proteína S libre actúa como cofactor de la proteína C activada. Cuando la actividad de la proteína S descende, es importante fijar los niveles plasmáticos de la proteína S libre y la proteína S unida a C4bBP. La deficiencia congénita de proteína S se ha identificado como un factor de riesgo para la trombosis (4). Se han sugerido varios intentos para definir la deficiencia basada en las relaciones entre la actividad de la proteína S total y libre y los valores del antígeno, pero no hay un consenso sobre la forma de expresarla (5).

La deficiencia adquirida de proteína S también se puede presentar en las hepatopatías, el CID y la terapia con anticoagulantes orales. Se ha constatado que la deficiencia congénita de proteína S se aísla con resistencia a la proteína C activada (RPCa) en aproximadamente el 25% de los casos

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La presencia de heparina o anticoagulantes lúpicos puede interferir en los resultados del ensayo con la prolongación del tiempo de coagulación, por lo que se produce un valor de proteína S artificialmente alto. En pacientes con marcasas respuestas inflamatorias puede producirse un déficit de proteína S aparente debido a los altos niveles de C4bP, lo que se puede encontrar en esta situación. Es importante repetir las pruebas en un momento diferente o llevarlas a cabo en un familiar antes de atribuir déficit de proteína S a un paciente.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precisión: Las estimaciones de precisión de tres lotes de ThromboTek PSe se determinaron en un doble análisis diario durante veinte días en un analizador AMAX 200 en modo mecánico con plasma normal y anormal, tal y como se describe en la directriz EP5-A2 del CLSI (7). Los resultados de precisión promedios en porcentaje de CV fueron los siguientes:

Plasma	Repetibilidad	Total
Normal	4,9%	5,7%
Anormal	7,8%	9,2%

Linealidad: Los estudios de linealidad de tres lotes de ThromboTek PSe se determinaron en un analizador de coagulación semiautomático ST4 de Stago. El ensayo ThromboTek PSe fue lineal desde el 10% de proteína S hasta la concentración máxima probada de 156% de proteína S.

Sensibilidad analítica: El límite inferior de detección de tres lotes de ThromboTek PSe se determinó mediante una medición duplicada de IBS como única sustancia de la muestra en un analizador AMAX 200 en modo mecánico y el porcentaje de actividad de proteína S se calculó a partir de la

suma de la media y 3 desviaciones típicas. El límite inferior de detección del ensayo fue del 1% de PS.

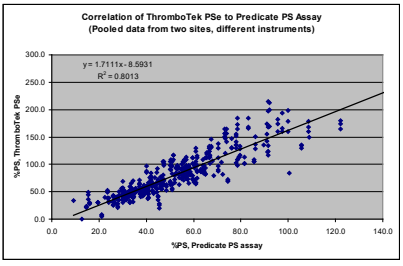
Interferencias: Los estudios de interferencia de tres lotes de ThromboTek PSe se determinaron en un analizador AMAX 200 en modo mecánico. El interferente se añadió a plasma normal mezclado y una serie de diluciones preparadas. La concentración máxima tolerada en el ensayo se definió como la concentración más alta de interferente, donde todo cambio constante en relación con el valor recuperado del PNP de base fue inferior al 10%. Las concentraciones máximas fueron las siguientes:

Tipo de interferente	Interferente añadido	Concentración máxima probada	Concentración máxima tolerada
Hemólisis	Hemoglobina	500 mg/dL	500 mg/dL
Ictericia	Bilirrubina no conjugada	20 mg/dL	20 mg/dL
Lipemia	Intralipid®	Triglicéridos de 2.000 mg/dL	Triglicéridos de 2.000 mg/dL
Heparina	Heparina	2,0 U/mL	1,0 U/mL

Intralipid® es una marca comercial registrada de Fresenius Kabi.

Método comparativo:

Se analizó un total de ciento setenta y cuatro muestras de paciente para observar la actividad de proteína S con varios lotes de ThromboTek PSe y dos lotes de otro ensayo de actividad de la proteína S comerciales. Los datos se recogieron en dos emplazamientos, que utilizaban un analizador AMAX 200 y un analizador STart4 respectivamente. Según ha determinado el análisis de Kruskal-Wallis, los datos se recogieron y se analizaron posteriormente mediante regresión lineal. El coeficiente de correlación fue de 0,895 (95% de IC, 0,875-0,912) y el coeficiente de determinación fue de 0,801, con una pendiente y un punto de intersección de 1,71 y -8,59 respectivamente.



Intervalo normal de referencia:

En un estudio representativo se analizaron ciento veinte donantes sanos para observar la actividad de la proteína S con tres lotes de ThromboTek PSe en un analizador AMAX 200 en modo mecánico. La calibración del ensayo se realizó utilizando el lote nº 3 de los estándares de coagulación secundarios de la SSC/ISTH del NIBSC. Se calcularon las medias geométricas y las desviaciones típicas, y los intervalos se obtuvieron como la media +/- 2 las desviaciones típicas. Los resultados fueron los siguientes:

Donantes	Número	% de PS media	Intervalo de % de PS
Todos	120	120%	47% - 193%
Sólo hombres	35	135%	62% - 209%
Sólo mujeres	85	114%	45% - 183%

Estos valores deben considerarse como meramente orientativos. Cada laboratorio debe fijar su propio intervalo de referencia.

Los resultados de cualquier ensayo deben revisarse para los analizadores individuales que se utilicen en cada laboratorio de acuerdo con la directriz EP15-A2 del CLSI (8) o directriz similar.

Referencias

- Walker FJ, “Protein S and the regulation of activated protein C”, Semin Thromb.Hemostasis 10: 131-138, 1984

Engesser L, Broekmans AW, Briet E, Brommer EJP,Bertina RM., “Hereditary protein S deficiency: Clinical manifestations”, Ann.Intern. Med. 106: 241-245, 1985

Boyer-Neumann C. “Comparison of functional assays for protein S”, Thromb Hemostasis70: 946-950, 1993.

Bertina RM, “Hereditary protein S deficiency”, Haemostasis 15: 241-245,1985

Comp PC, “Laboratory evaluation of protein S status”, Semin Thromb Hemostasis. 16:177-181, 1990.

H21-A5, “Collection, Transport, and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays: Approved Guideline-Fifth Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

EP5-A2, “Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline-Second Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004

EP15-A2, “User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline-Second Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2005.

Inform of any suspected serious incident related to the device to Info@r2diagnostics.com, or the local r2 distributor, and the competent authority, ministry of health, or delegated agency in the country where the suspected serious incident occurred.

LL-4519 REV. J
Last Revision Date: 04/14/2025



MT Promedt Consulting GmbH
Ernst-Heckel-Straße 7, 66386
St. Ingbert, Germany



R2 Diagnostics, Inc.
1801 Commerce Drive South Bend, Indiana USA 46628
(574) 288-4377 www.r2diagnostics.com