

**ZYMUTEST™ Free Protein S (II)**

REF | RK015B

96 tests

Méthode ELISA pour la détermination quantitative de  
Protéine S libre.

Français, dernière révision 11-2022

**UTILISATION :**

Le coffret ZYMUTEST™ Free Protein S (II) est une méthode ELISA pour le dosage quantitatif de la Protéine S Libre (cofacteur de la Protéine C activée), dans le plasma humain.

**RESUME ET EXPLICATION :**

- La concentration en Protéine S d'un plasma normal est d'environ 25 µg/mL<sup>1</sup>. Environ 40% (soit 10 µg/mL) se trouve sous forme libre et 60% (soit 15 µg/mL) circule dans le sang sous forme complexée avec la C4b-BP. Seule la forme libre a une activité anticoagulante en tant que cofacteur de la Protéine C activée.
- La Protéine S est synthétisée dans le foie. C'est une glycoprotéine vitamine K dépendante de poids moléculaire 80 000 Daltons. L'équilibre entre la forme libre et la forme liée joue un rôle important du fait que seule la Protéine S libre est active. Dans les étapes précoces des maladies inflammatoires, la concentration en Protéine S libre est diminuée du fait de l'augmentation de la C4b-BP. Le taux de Protéine S est diminué dans les traitements dicoumarol ou L-asparaginase et dans les maladies hépatiques.

**PRINCIPE :**

Le coffret ZYMUTEST™ Free Protein S (II) est spécifique pour la forme libre de la Protéine S, et il est dessiné avec deux anticorps monoclonaux qui ne réagissent pas avec la Protéine S complexée à la C4b-BP (C4B Binding Protein). Il mesure spécifiquement la forme libre de la Protéine S. Dans un premier temps, l'immunoconjugué, un anticorps monoclonal de souris spécifique de la Protéine S libre et couplé à la peroxydase (HRP), est introduit dans les puits de la plaque sensibilisée par un autre anticorps monoclonal de souris spécifique de la Protéine S libre. Immédiatement après, l'échantillon à tester dilué ou le fluide biologique est introduit et la réaction immunologique débute. La Protéine S présente dans l'échantillon se fixe sur la phase solide par un de ses épitopes, et réagit avec le second anticorps monoclonal couplé à la peroxydase par un deuxième épitope. Seule la Protéine S libre est dosée, car la protéine S complexée à la C4b-BP (C4b Binding Protein) n'est pas réactive dans le dosage. Après une étape de lavage, le substrat de la peroxydase, 3,3',5,5' – Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité de Protéine S libre présente dans l'échantillon testé.

**REACTIFS :**

1. **COAT** Microplaque ELISA : **12x8** contenant 12 barrettes de 8 puits, coâtées avec un anticorps monoclonal spécifique de la Protéine S libre humaine, stabilisées et emballées dans un sachet aluminium hermétiquement fermé en présence d'un déshydratant.
2. **SD ELISA** Diluant pour échantillon : 2 flacons de 50 mL, prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
3. **CAL PROTEIN S** Plasma étalon : 3 flacons de 2 mL, lyophilisés. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 mL de diluant pour échantillon pour obtenir un plasma déjà dilué au **1/50**. Cet étalon est lié au standard international NIBSC. Contient de la BSA.
4. **CI PROTEIN S** Contrôle I (haut) : 1 flacon de 0.5 mL, lyophilisé. Contient de la BSA.
5. **CII PROTEIN S** Contrôle II (bas) : 1 flacon de 0.5 mL, lyophilisé. Contient de la BSA.
6. **IC** Immunoconjugué Anti-(h)-Free PS (II)-HRP : 3 flacons de 4 mL, lyophilisés. Anticorps monoclonal couplé à la peroxydase (HRP). Contient de la BSA.
7. **CD ELISA** Diluant pour immunoconjugué : 1 flacon de 25 mL, prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
8. **WS ELISA** Solution de lavage : 1 flacon de 50 mL, **20x** 20 fois concentrée. Contient du Proclin.
9. **TMB** 3,3',5,5'-Tetraméthylbenzidine : 1 flacon de 25 mL de substrat peroxydase. Contient du peroxyde hydrogène. Prêt à l'emploi.
10. **SA** Acide sulfurique 0,45M : 1 flacon de 6 mL de solution d'arrêt, prêt à l'emploi. Contient du 0,45M d'acide sulfurique.

Les concentrations de l'étalon et des contrôles peuvent légèrement varier de lot à lot. Pour le dosage, se référer aux valeurs exactes fournies sur le papillon du coffret utilisé.

**MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :**

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- Le plasma humain utilisé pour la préparation a été testé par des méthodes approuvées et trouvé négatif les anticorps VIH 1/2, VHC et l'antigène HBs.
- Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- Si le substrat TMB devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.

- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air. L'évaporation réduit la stabilité du réactif à bord de l'automate.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Pour usage de diagnostic *in vitro*.

**CD ELISA** | **SD ELISA** | **WS ELISA** H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

**PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :**

Ramener le coffret à température ambiante, au moins 30 min avant le dosage. Conserver les réactifs non utilisés à 2-8°C. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des produits lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.

1. **COAT** Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Après ouverture, les barrettes doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à **4 semaines à 2-8°C** dans leur emballage d'origine, hermétiquement refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, dans le sachet en plastique pour microplaque fourni (minigrip).
2. **SD ELISA** Prêt à l'emploi.  
La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - **4 semaines** à 2-8°C.
3. **CAL PROTEIN S** Reconstituer chaque flacon avec exactement **2 mL de diluant pour échantillon**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. L'étalon plasma Protéine S contient une concentration « C » de Protéine S libre en %, déjà dilué au **1/50**.  
La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - **24 heures** à 2-8°C
  - **8 heures** à température ambiante (18-25°C).
4. **CI PROTEIN S** Reconstituer chaque flacon avec exactement **0,5 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.  
La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - **24 heures** à 2-8°C
  - **8 heures** à température ambiante (18-25°C).
  - **2 mois** congelé à -20°C ou moins\*.
5. **CII PROTEIN S** Reconstituer chaque flacon avec exactement **0,5 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.  
La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - **24 heures** à 2-8°C
  - **8 heures** à température ambiante (18-25°C).
  - **2 mois** congelé à -20°C ou moins\*.

\*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C en adaptant la durée d'incubation au volume de réactif. La stabilité du réactif décongelé doit être vérifiée dans les conditions de travail du laboratoire.

6. **IC** Reconstituer chaque flacon avec exactement **4 mL de diluant pour immunoconjugué**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser le culot se dissoudre complètement avant utilisation, et agiter le flacon afin d'homogénéiser le contenu.  
La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - **4 semaines** à 2-8°C
  - **24 heures** à température ambiante (18-25°C).
7. **CD ELISA** Prêt à l'emploi.  
La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - **4 semaines** à 2-8°C.
8. **WS ELISA** Incuber, si nécessaire, le flacon dans un bain-marie à **37°C** jusqu'à dissolution totale des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au **1/20** en eau distillée (les 50 mL de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution).  
La stabilité de la solution de lavage après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservée dans son flacon d'origine est de :
  - **4 semaines** à 2-8°C.
 La stabilité de la solution de lavage, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation d'origine est de :
  - **7 jours** à 2-8°C.
9. **TMB** Prêt à l'emploi. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - **4 semaines** à 2-8°C.
10. **SA** Prête à l'emploi. La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - **4 semaines** à 2-8°C.

## CONDITIONS DE STOCKAGE :

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

## REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :

### Réactifs:

- Eau distillée.

### Matériels:

- Pipettes à 8 canaux** permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 µL.
- Pipettes à volume variable** de 0 à 20 µL, de 20 à 200 µL et de 200 à 1000 µL.
- Matériel de lavage pour microplaques et agitateur** (facultatif).
- Lecteur de microplaques ELISA** réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.

## PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS :

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI GP44-A4<sup>1</sup> pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

### Echantillons :

Plasma humain pauvre en plaquettes obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique). L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes qu'avec le plasma citraté.

### Prélèvement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0.109M) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

### Centrifugation :

Dans les 2 heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

### Conservation du plasma :

- 8 heures à température ambiante (18-25°C)
- 1 mois à -20°C.
- 18 mois à -70°C.

Les échantillons de plasma congelés doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongélation et avant utilisation.

## PROCEDURE :

### Méthode de dosage :

1. Diluer les échantillons et les contrôles dans du **Diluant pour échantillon** comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Dilution
Plasma	1/50
Contrôles	1/50

En présence d'échantillons avec un taux élevé de Protéine S, diluer au **1/100** ou plus. Les résultats obtenus devront alors être multipliés par 2 ou plus (ex : D/50). Pour des faibles quantités de Protéine S (<10%) l'échantillon peut être testé à une dilution plus faible. Les résultats obtenus doivent être divisés par le facteur de dilution.

2. En utilisant l'**étalon (CAL PROTEIN S)** avec une concentration en Protéine S libre de « C » (la **concentration à 100% de Protéine S** libre correspond à une pool de plasma normal dilué au 1/50, qui est la dilution standard du test) contenu dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration de Protéine S libre (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. d'étalon Protéine S libre	1 mL	0.5 mL	0.25 mL	0.1 mL	0.05 mL	0 mL
Vol. de Diluant échantillon	0 mL	0.5 mL	0.75 mL	0.9 mL	0.95 mL	1 mL

Agiter pour homogénéiser.

Les dilutions de calibration sont stables **4 heures** à température ambiante (18-25°C).

3. Sortir les barrettes de leur emballage et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Conjugué anti (h)-Free PS (II)-HRP	100 µL	Introduire l' <b>immunoconjugué anti-(h)-Free Protein S (II)-HRP</b> dans les puits de la plaque.
Etalon Protéine S Ou Echantillon testé Ou Diluant échantillon (blanc)	100 µL	Introduire <b>immédiatement</b> : • Solutions standards ou • Echantillons testés dans les puits de la plaque. (a)
<b>Mélanger puis incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C) (d)</b>		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µL	Effectuer une série de 5 lavages. (b)
TMB / Substrat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µL	Immédiatement après lavage, introduire cette solution dans les puits. (b) <b>Nota</b> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément avec des intervalles identiques. (c, d)
<b>Incuber pendant exactement 5 minutes à température ambiante (18-25°C) (d)</b>		
Solution d'arrêt Acide sulfurique 0,45M	50 µL	Arrêter la réaction en introduisant l' <b>acide sulfurique 0,45M</b> . Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat. (c)
<b>Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs si nécessaire (e).</b>		

- (a) Distribuer les échantillons aussi vite que possible (**≤10 minutes**), pour obtenir une cinétique immunologique homogène pour la liaison des anticorps. Un trop long délai entre la distribution du premier et du dernier puits peut induire une influence de la cinétique immunologique et produire des résultats erronés. **Au cas où une plaque entière est utilisée, distribuer les dilutions de l'étalon au centre de la plaque pour réduire l'effet cinétique.**
- (b) Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage afin de préserver les protéines immobilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de

la plaque, qui pourrait endommager les protéines immobilisées et réduire la réactivité de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. Régler le laveur de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.

- (c) Lors de la distribution du substrat TMB, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Il doit être le même lors de l'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique.
- (d) Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. Une température d'incubation (18-25°C) doit être respectée. Les résultats sont affectés par une température trop élevée (>25°C) ou trop basse (<18°C), conduisant à une absorbance anormalement élevée ou faible à 450 nm. Il doit être pris en compte lors de l'analyse des résultats. Les absorptions à 450 nm sont significativement augmentées si un agitateur de plaques micro-ELISA est utilisé tout au long des étapes d'incubation.
- (e) Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620 nm ou à 690 nm.

## CONTROLE QUALITE :

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie pour chaque série d'essai.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

## RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle, tracer la droite de calibration en portant en ordonnées la **DO à 450 nm** et en abscisses la concentration de Protéine S libre en %, en choisissant le mode d'interpolation « best fit » (se reporter au papillon contenu dans le coffret).
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.
- La concentration de Protéine S dans l'échantillon à doser et dans les contrôles I et II, à la dilution standard (**D=50**) est déduite directement de la courbe de calibration et exprimé en % de Protéine S.
- Pour des dilutions plus ou moins importantes, la concentration mesurée doit être multipliée par le facteur de dilution complémentaire (par exemple, pour **D=100**, les résultats doivent être multipliés par 2).

## LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Si les étapes de lavage ne sont pas réalisées correctement, cela peut induire un "bruit de fond" élevé et une valeur trop forte du contrôle négatif. Afin d'éviter tout développement de coloration non spécifique, vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué.
- Pour l'influence possible d'interférences, aucun effet significatif n'est observé pour des taux d'héparines jusqu'à 2 UI/mL, de bilirubine jusqu'à 0,6 mg/mL, d'hémoglobine jusqu'à 10 mg/mL, d'intralipides jusqu'à 10 mg/mL et de DOACS jusqu'à 400 ng/mL, par tests de surcharge en plasma.

## VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

- La concentration en Protéine S libre est diminuée dans les déficits en Protéine S de type I et de type III.
- Le taux de Protéine S est diminué dans les traitements AVK, lors de déficits en vitamine K, dans les atteintes hépatiques sévères.
- De façon transitoire, des déficits en Protéine S peuvent être observés en phase initiale dans certains états inflammatoires, du fait de l'augmentation de la C4b-BP, qui forment un complexe avec la Protéine S.
- Déficience de type I: déficience partielle des antigènes de la Protéine S libre et totale.
- Déficience de type II: antigène Protéine S libre ou totale normal, réduit l'activité.
- Déficience de type III: antigène Protéine S totale normal, activité réduite et antigène libre<sup>6</sup>.

## PERFORMANCES :

- Le coffret ZYMUTEST™ Free Protein S est spécifique pour les deux formes de Protéine S libre. Les deux anticorps monoclonaux ne sont pas réactifs avec les complexes Protéine S-C4b-BP. Il mesure spécifiquement la forme fonctionnelle, native et active de la Protéine S.
- Zone de mesure : 5 à environ 130%.
- La limite de détection est ≤ 5%.
- CV intra essais : ≤ 6% (pour des échantillons de plasma normaux), ≤ 8% (pour des échantillons de plasma anormaux).
- CV inter essais : ≤ 10%.
- Matériel de référence : Standard International pour la Protéine S (03/228).

## REFERENCES :

- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
- Faioni E., Valsecchi C., Palla A., Taioli E., Razzari C., Mannucci P.: Free Protein S Deficiency is a Risk Factor for Venous Thrombosis: *Thromb. Haemost.*, 1997, 78, 1343-46
- Henkens C.A.A., Bom V.S., Van der Schaaf W., Pelsma P.M., Smit Sibinga C.T., Kam P.S., Van der Meer J.: Plasma Levels of Protein S, Protein C, and Factor X : Effects of sex, Hormonal State and Age : *Thromb. Haemost.*, 1995, 74, 1271-75
- Aiach M., Borgel D., Gaussem P., Emmerich J., Alhenc-gelas M., Gandrille S.: Protein C and Protein S deficiencies. *Sem. in Hemat.*, 1997, 34, 205-17.
- Schwartz H.P., Fischer M., Hopmeier P., Batard M.A., and Griffin J.H.: Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease: *Blood*, 1984, 64, 1297-1300.
- Marlar R. A., Gausman J. N. Protein S abnormalities a diagnostic nightmare. *Am. J. Hematol.* 2011, 86, 418-421.

## SYMBOLES :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.