


HEMOCLOT™ Protein S
REF CK041K R1 R2 3 x 1 mL

 Méthode coagulante pour le dosage fonctionnel
de la Protéine S plasmatique.

Français, dernière révision : 07-2024

UTILISATION:

 Le coffret HEMOCLOT™ Protein S est une méthode coagulante pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité de la Protéine S (PS) sur plasma humain citraté, par méthode manuelle ou automatisée.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION:
Technique :

 La Protéine S (PS) est une protéine vitamine K dépendante, principalement synthétisée dans le foie. La PS plasmatique existe sous deux formes : complexée à la C4b-BP, ou sous forme libre qui présente une activité anticoagulante en agissant comme cofacteur de la Protéine C activée (PCA). En présence de calcium et phospholipides, le complexe PCA-PS inhibe les Facteurs Va et VIIIa.¹
Contexte clinique du test :

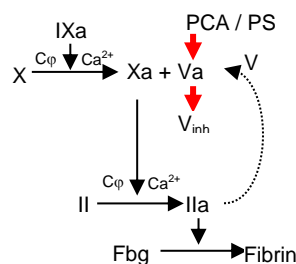
 La voie d'inhibition du système PC/PS a une activité diminuée si la forme libre de la PS est déficiente ou anormale. Les déficits congénitaux ou acquis en PS sont associés à une augmentation du risque de thrombose veineuse.^{1,2}

 L'activité de la PS dépend de l'âge et du sexe^{3,4}, et peut être diminuée dans différents contextes comme : déficit en Vitamine K ou traitement aux AVK (prédisposant plus à des problèmes hémorragiques que thrombotiques), thérapie L-asparaginase, troubles hépatiques, syndrome néphrotique, pendant la grossesse, en lien avec la prise de contraceptifs oraux ou d'œstrogènes, premiers stades des maladies inflammatoires, infections virales, coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD), thrombose veineuse profonde (TVP), embolie pulmonaire (EP), rarement dû à des auto-anticorps anti-PS acquis ou transitoires (ex : chez des enfants atteints de varicelle).^{1,2}

 Les déficits en Protéines S héréditaires sont classés en trois types: les déficits de type I et III représentent 95% des cas de déficit en PS.^{1,5}

 Le Facteur V muté (ex. FV Leiden mutation R506Q) est résistant à l'inactivation de sa fonction coagulante par le complexe PCA-PS.¹
PRINCIPE:

Le coffret HEMOCLOT™ Protein S est une méthode coagulante, utilisant le Temps de Céphaline Activée (TCA), déclenché par du Facteur IXa en présence de phospholipides, de calcium et d'une quantité constante et en excès de PCA.

 Le plasma dilué à tester est mélangé au plasma déficient en PS (R1). Le réactif activateur (R2), à concentration constante et optimisée, est ajouté. La coagulation est déclenchée par ajout de calcium (Ca²⁺). La PS étant le facteur limitant, il en résulte une relation directe entre la concentration en PS et le temps de coagulation mesuré correspondant.

REACTIFS:
R1 Plasma déficient en Protéine S, immunodéplété, lyophilisé en présence d'un agent neutralisant l'héparine.

R2 Réactif Activateur, lyophilisé. Contient du Facteur IXa humain, de la PCA humaine, et des phospholipides, à concentration optimale. Contient de la BSA.

REF CK041K → R1 R2 3 flacons de 1 mL
MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PRÉPARATION DES REACTIFS:

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R1 R2 Reconstituer chaque flacon avec exactement :

REF CK041K → 1 mL d'eau distillée

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 15 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

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.

R1 R2 La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 24 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:
Réactifs:

- Eau distillée
- Tampon Imidazole (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N)
- CaCl₂ à 0,025M (AR001B/AR001K/AR001L)
- Étalon et contrôles spécifiques :

| Nom du produit | Référence |
|----------------------------------|-----------|
| BIOPHEN™ Plasma Calibrator | 222101 |
| BIOPHEN™ Normal Control Plasma | 223201 |
| BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma | 223301 |

Utiliser le même tampon pour tous les tests réalisés.

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Bain-Marie, automate de coagulation semi-automatique ou optique automatique. Le test HEMOCLOT™ Protein S (CK041K) n'est pas utilisable sur instrument automatique STA-R® family
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou en verre silicé.

PRÉLEVEMENTS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

 La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les États-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁶ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

 Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{6,7}.

PROCÉDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode manuelle ou automatisée. Le test est réalisé à 37°C, et le temps de coagulation, déclenché par l'ajout de calcium, est mesuré.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer l'étalon et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. L'étalon doit être dilué dans du tampon Imidazole comme décrit ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en PS ou par définition 100% pour un pool de plasma normal):

 Lorsque la gamme de calibration est réalisée à l'aide d'un plasma étalon commercial (ex: BIOPHEN™ Plasma Calibrator), la dilution au 1/10 correspond à la concentration (C) en PS activité indiquée. Pour un étalon titrant C, le taux de 100% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : **10x(C)/100**.

La gamme de calibration peut également être réalisée à l'aide d'un pool de plasma citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connus), qui par définition titre 100% de PS. Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/10, qui représente par définition le taux 100% de PS. La gamme de calibration va de 0 à 100% de PS.

Préparer 3 mL de la dilution 1/10 du pool de plasmas normaux, ou une dilution (10x C/100) du plasma étalon titré en PS (soit C1). Cette solution titre 100% de la PS. Préparer la gamme d'étalonnage suivante par dilutions successives dans le tampon Imidazole comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration:

| Etalon | C5 | C4 | C3 | C2 | C1 |
|-------------------------|------|----------|----------|---------|------|
| Protéine S (%) | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
| Volume Etalon | 0 mL | 0,250 mL | 0,500 mL | 0,750mL | 1 mL |
| Volume Tampon Imidazole | 1 mL | 0,750 mL | 0,500 mL | 0,250mL | 0 mL |

2. Diluer les échantillons dans du tampon imidazole comme décrit dans le tableau ci-dessous :

| Echantillons | Référence | Dilution |
|--------------|---------------|----------|
| Contrôle | 223201/223301 | 1/10 |
| Echantillons | N.A. | 1/10 |

Pour une meilleure précision des résultats, pour des concentrations attendues >100%, les valeurs peuvent être obtenues en testant le plasma à la dilution 1/20 et en multipliant les résultats par 2; pour un échantillon mesuré ≤10%, utiliser la dilution 1/5 et diviser le résultat par 2.

Réaliser la gamme de calibration et la tester rapidement avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Dans la mesure du possible, pour obtenir une performance optimale, tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) seront réalisés extemporanément et simultanément. Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le kit.

3. Dans un tube plastique incubé à 37°C, introduire :

| | Volume |
|---|--------|
| Etalon, contrôle ou plasma (dilués) | 50 µL |
| R1 Plasma déficient en Protéine S, préincubé à 37°C | 50 µL |
| Mélanger et incubé 1 minute à 37°C, puis ajouter : | |
| R2 Réactif Activateur, préincubé à 37°C | 50 µL |
| Mélanger et incubé 3 minutes à 37°C, puis ajouter (en déclenchant le chronomètre) : | |
| CaCl ₂ 0.025M (préincubé à 37°C, et agité) | 100 µL |
| Noter le Temps de Coagulation, en secondes | TC |

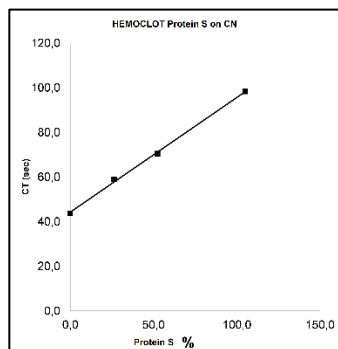
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION:

Le test HEMOCLOT™ Protein S peut être calibré pour le dosage fonctionnel de la Protéine S plasmatique. L'étalon couvrant la zone calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

La zone de calibration est d'environ 0 à 100% (sur CN series).

La courbe de calibration ci-dessous, est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



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, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

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

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration lin-lin, en portant en ordonnées le temps de coagulation (sec) et en abscisses la concentration de PS en %.
- La concentration de PS (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Le test peut être réalisé chez les patients traités par l'héparine (jusqu'à 1 UI/mL) ou sous AVK (l'activité PS est diminuée). Une attention particulière doit être portée aux patients connus avec taux de FVIII: C anormaux, élevés, un Lupus anticoagulant (LA), ou un FV muté (R506Q, FV Leiden). L'aprotinine tendant à inhiber la Protéine C activée, l'activité "apparente" de la PS pourrait être diminuée chez les patients traités par l'aprotinine⁸. Le résultat doit être confirmé par une autre méthode (ex : immunologique) et/ou un autre prélèvement si les temps sont anormalement raccourcis ou allongés, et considéré en fonction du contexte clinique.
- Pour un même lot de réactifs, et un même plasma, le temps de coagulation (TC) peut varier selon l'instrument utilisé (particulièrement en fonction de la détection du caillot en mode mécanique ou optique) et l'ajustement de la sensibilité de détection du caillot.

VALEURS ATTENDUES:

La valeur normale en Protéine S d'un plasma adulte est généralement comprise entre 60 et 140% (variable en fonction de l'âge et du sexe)^{3,4}. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES:

Les études de performances ont été menées conformément aux recommandations du CLSI.

Les données de performance suivantes représentent des résultats typiques et ne doivent pas être considérées comme des spécifications pour HEMOCLOT™ Protein S.

Les analyses mathématiques sont réalisées en utilisant un logiciel de statistique validé construit conformément aux recommandations CLSI.

Toutes les performances sont documentées dans les Guides d'Application des instruments respectifs.

Performances analytiques

Zone de mesure

La zone de mesure est définie par le système d'analyses utilisé et est documentée dans les Guides d'Application des instruments respectifs.

Exactitude

Les études d'exactitude ont été évaluées à l'aide de contrôles du laboratoire et de plasmas groupés.

Justesse : le biais pour tous les échantillons est inférieur à 13%.

Précision : le coefficient de variation (CV) pour tous les échantillons est inférieur à 7 % pour la répétabilité, à moins de 10 % pour la reproductibilité et à moins de 8 % pour l'inter-laboratoire. La précision est documentée dans les Guides d'Application des instruments respectifs.

Substances interférentes

Les interférences sont définies par le système d'analyses utilisé et sont documentées dans les Guides d'Application des instruments respectifs.

Performances cliniques

Agrement

| Analyte | n | ACL TOP® family | | |
|------------|-----|---------------------|-------|------------------------------------|
| | | Régression linéaire | r | Méthode de référence / comparaison |
| Protéine S | 129 | y = 0.92x+8.56 | 0.940 | HemosIL® Protein S |

Sensibilité/Spécificité

| Analyte | n | ACL TOP® family | | |
|----------------|----------|-----------------|-------------|---------------------------|
| | | Sensibilité | Spécificité | Aire sous la courbe (ROC) |
| Protéine S | 129 | 0.97 | 0.97 | 0.998 |
| Analyte | n | VPP | VPN | RV+ RV- |
| Protéine S | 129 | 97% | 98% | 31.99 0.02 |

VPP : Valeur prédictive d'un résultat positif RV+ : Rapport de vraisemblance +
VPN : Valeur prédictive d'un résultat négatif RV- : Rapport de vraisemblance -

REFERENCES:

1. Meireles Rezende S. *et al.* Coagulation, inflammation, and apoptosis : different roles for protein S and the protein S – C4b binding protein complex. Blood. 2004.
2. Wypasek E. and Undas Anetta. Protein C and Protein S Deficiency – Practical Diagnostic Issues. Adv Clin Exp Med. 2013.
3. Appel IM *et al.* Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty, J Thromb Haemost. 2012.
4. Lowe GDO *et al.* Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA survey I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. Br J Haematol. 1997.
5. Castoldi E. *et al.* Similar hypercoagulable state and thrombosis risk in type I and type III protein S-deficient individuals from families with mixed type I/III protein S deficiency. Haematologica. 2010.
6. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
7. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.
8. Tanaka K.A. *et al.* The effect of aprotinin on activated protein C-mediated downregulation of endogenous thrombin generation. Br J Haematol. 2006.

SYMBLES:

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

Changements par rapport à la précédente version.