



- STA-LOT® PROTEIN S

Determinación cuantitativa de la actividad de la proteína S

- Contenido del kit:
 - 2 viales de Reactivo 1 (Proteína S Deficiente Plasma)
 - 2 viales de Reactivo 2 (PCa)
 - 2 viales de Reactivo 3 (F.Va)

(REF 00746)

Marzo 2012 Español 6

1/ UTILIZACIÓN DEL KIT

El kit STA® - Staclot® Protein S previsto para uso con analizadores de la línea STA® que pueden utilizar estos reactivos, para la medición cuantitativa del nivel de proteína S funcional basada en el principio de inhibición del Factor Va (7).

2/ INFORMACIÓN SOBRE LA PROTEÍNA S

• Bioquímica de la proteína S

La proteína S es una proteína plasmática vitamino K-dependiente que no presenta función esterásica (1). Su peso molecular en el ser humano es de 70 000 (10) y se presenta como una única cadena polipeptídica. Contiene alrededor del 7 % de hidratos de carbono y se encuentra en el plasma en una concentración cercana a 25 mg/l (2). La proteína S se sintetiza en el hígado, bajo la forma de un precursor inactivo. Esta proteína se carboxila mediante la acción de una carboxilasa vitamino K - dependiente, tras lo cual los residuos γ -carboxiglutamínicos pueden fijar el calcio (1).

Fisiológicamente, la proteína S juega un papel anticoagulante esencial. Es el cofactor de la proteína C activada, con la cual forma un complejo estioquimétrico (1). En presencia de calcio, este complejo se fija fuertemente a las superficies fosfolipídicas. Regula entonces las vías pro-coaguladoras degradando por proteólisis los factores V y VIII activados por la trombina (3). La proteína S amplifica de forma considerable el papel anticoagulante de la proteína C, probablemente aumentando la afinidad de esta última por las membranas fosfolipídicas (8).

La región sensible a la trombina de la proteína S puede estar sometida a una proteólisis parcial por la trombina. La proteína S conserva entonces su afinidad por los fosfolípidos pero pierde su papel anticoagulante como cofactor de la proteína C activada (8).

La bioquímica de la proteína S es complicada por el hecho de que está en equilibrio dinámico con la proteína que fija el C_{4b} del complemento, la C_{4b} -binding protein (C_{4b} -BP), presente en el plasma en dos formas (8): una de bajo peso molecular (un 20 % del total) sin afinidad por la proteína S y una de alto peso molecular (un 80 % del total) que sí puede fijar la proteína S. La proteína S forma un complejo equimolecular con esta última forma. En estado fisiológico se alcanza un equilibrio. La proteína S se encuentra bajo dos formas:

- la forma libre que representa un 40 % del total de proteína S. Es esta forma libre la que ocupa la función de cofactor de la proteína C activada,
- la forma unida a la C_{4b} -BP de alto peso molecular. Representa un 60 % del total. Esta forma no presenta actividad como cofactor de la proteína C activada (8).

• Variaciones patológicas o iatrogénicas

- Las deficiencias congénitas de proteína S se clasifican en tres categorías (10):
 - las deficiencias de tipo I se caracterizan por una disminución del nivel antigénico de la proteína S (total y libre)
 - las deficiencias de tipo II se definen por una reducción de la actividad de la proteína S asociada a niveles antigénicos normales de proteína S total y libre
 - en las deficiencias de tipo III se observan niveles antigénico y funcional de la proteína S libre reducidos, mientras que el nivel de proteína S total es normal.
- Las deficiencias adquiridas de proteína S libre pueden estar asociadas a los siguientes estados clínicos: síndromes inflamatorios debidos al aumento de la C_{4b} -BP, trastornos hepáticos (6), síndrome nefrótico (6), tratamientos con medicamentos anti-vitamina K (4), anticonceptivos orales (11) y L-asparaginasa (6).

La deficiencia congénita o adquirida de proteína S aumenta el riesgo tromboembólico al disminuir el potencial anticoagulante de la sangre. Puede conducir a episodios trombóticos repetitivos (2).

3/ PRINCIPIO DEL TEST

El principio de la prueba se basa en la actividad de cofactor de la proteína S, que potencia la acción anticoagulante de la proteína C activada. Esta potenciación se refleja mediante la prolongación del tiempo de coagulación de un sistema enriquecido con el factor Va, el cual es un sustrato fisiológico para la proteína C activada.

4/ COMPOSICIÓN DEL KIT

Cada estuche de STA® - Staclot® Protein S contiene una hoja con código de barras. Este código de barras contiene las siguientes informaciones: número de lote referencia del kit, referencia de los reactivos, fecha de caducidad.

- **Reactivo 1:** plasma humano liofilizado, libre de proteína S.
- **Reactivo 2:** proteína C activada humana, liofilizada.
- **Reactivo 3:** preparación con contenido de factor Va bovino, liofilizada.

Los reactivos de este kit contienen productos de origen humano y/o animal. Cuando se ha utilizado plasma humano en la preparación de estos reactivos, se excluye previamente la presencia del antígeno HBs, de los anticuerpos anti-HCV, anti-HIV 1 y anti-HIV 2 con los correspondientes análisis. Sin embargo, ningún test puede garantizar de manera absoluta la ausencia de agentes infecciosos. Por eso, estos reactivos de origen biológico han de ser manipulados con las precauciones habituales, ya que se trata de productos potencialmente infecciosos.

5/ PRECAUCIONES

El estuche intacto se debe conservar a 2-8 °C. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*. Estos reactivos sólo deben ser utilizados por personal autorizado del laboratorio. Utilizar únicamente reactivos de un mismo kit o de un mismo lote. Los residuos se eliminarán con arreglo a la reglamentación local vigente. El estuche STA® - Staclot® Protein S está diseñado especialmente para los aparatos de la línea STA® que pueden utilizar estos reactivos. Antes de cualquier utilización, leer con atención el "Manual del Operador" del instrumento utilizado. Tener cuidado en el manejo de estos reactivos y las muestras.

6/ OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

La obtención de la muestra debe ajustarse a las recomendaciones para las pruebas de hemostasia.

- Obtención de sangre en solución de citrato trisódico 0,109 M: 1 vol. de citrato por 9 vol. de sangre.
- Centrifugación: 15 minutos a 2500 g.
- Conservación del plasma: 4 horas a 20 ± 5 °C
1 mes a -20 °C. Atemperar la muestra a 37 °C el tiempo necesario y suficiente para que la descongelación sea completa.

7/ PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

• Preparación

Reconstituir el contenido de cada vial de Reactivo 1, 2 o 3 con exactamente 1 ml de agua destilada. Dejar que la solución se estabilice durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C). Después homogeneizarlo antes de su uso.

• Conservación

Conservados a 2-8 °C en su embalaje original, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche. Estabilidad tras la reconstitución: 4 horas en STA-R® y STA Compact®. **No se debe congelar.**

8/ REACTIVOS Y MATERIALES AUXILIARES

- STA® - Owren-Koller (REF 00360).
- STA® - CaCl₂ 0,025 M (REF 00367).
- STA® - Unicalibrador (REF 00675).
- STA® - System Control [N] + [P] (REF 00678): controles normal y anormal.
- STA-R® o STA Compact®.
- Equipamiento habitual en los laboratorios de análisis clínicos.

9/ PROCEDIMIENTO

9.1. Calibración

La calibración se lleva a cabo con la ayuda de los estuches STA® - Unicalibrador. Preparar STA® - Unicalibrador y transferir al aparato las informaciones contenidas en el código de barras de la hoja. Los estándares son preparados automáticamente por el analizador, diluyendo con tampón Owren-Koller de acuerdo a los parámetros ingresados en el instrumento para la dosificación. La curva de calibración se puede ver en la pantalla del instrumento con la ayuda del menú "Calibración" (ver el "Manual del Operador").

9.2. Plasmas a analizar

Los plasmas a testar han de estar sin diluir. Introducirlos en el instrumento (ver el "Manual del Operador" del instrumento utilizado). El instrumento realizará automáticamente las diluciones en tampón Owren-Koller. Seleccionar el(los) test(s) a efectuar en los plasma de pacientes.

9.3. Controles

Los controles son necesarios para verificar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados. Utilizar el kit STA® - System Control [N] + [P]. Preparar estos reactivos de control y transferir la información contenida en el código de barras impreso en su respectivos inserts, al instrumento. Estos controles se utilizan han de estar sin diluir; el instrumento realizará automáticamente la dilución en diluyente (tampón Owren-Koller).

9.4. Dosificación

Para la realización de la dosificación, seguir los protocolos descritos en los "Standardized Operating Procedures" del instrumento.

La determinación de la proteína S en el plasma por valorar se procesa automáticamente por el analizador tan pronto se cargan las muestras. Es obligatorio que el ensayo de la muestra de pacientes se comience inmediatamente después de realizar la calibración. Si cualquiera de los resultados del paciente queda fuera del rango de trabajo de la dosificación, el instrumento revalorará automáticamente la muestra en según una dilución apropiada, siempre que esta opción haya sido introducida en la configuración de la prueba (ver el "Manual del Operador").

10/ RESULTADOS

El nivel de proteína S (%) de las muestras analizadas aparece en tiempo real en la pantalla del aparato (ver el "Manual del Operador"). El resultado debe interpretarse en función del estado clínico y biológico del paciente.

Si el aparato señala que los resultados obtenidos para los controles se sitúan fuera del intervalo de valores indicado en las hojas de estos controles, es preciso asegurarse del buen funcionamiento de todo el sistema: condiciones de ensayo, reactivos, calibración, plasmas en los que se efectúa el test, etc. Si es necesario, repetir las muestras.

11/ LIMITACIONES

- **Recolección de muestras**
Utilice siempre la relación correcta entre el volumen de sangre y el anticoagulante.
- **Interferencia de heparina (UFH y LMWH)**
Los niveles de heparina hasta 1 UI/ml no afectan los resultados de la prueba. Los niveles más altos de heparina pueden hacer que se sobrestime el nivel de proteína S.
- **Interferencia del Factor VIII**
Los niveles de factor VIII de hasta 250 % no afectan los resultados de la prueba (9).
- **Interferencia de C_{4b} -BP**
En las condiciones de ensayo descritas, no existe disociación *in vitro* del complejo de Proteína S y C_{4b} -BP (9).
- **Interferencia de LA y/o APA**
Se ha observado que los anticoagulantes lúpicos (AL) y/o anticuerpos anti-fosfolípidos (APA), si se encuentran en el plasma que se analiza, pueden interferir en la prueba. En caso de un nivel inexplicable de proteína S y según el estado clínico, puede ser útil llevar a cabo pruebas de LA y/o APA y determinar el nivel de proteína S libre antigénica.
- **Interferencia del inhibidor de trombina**
Los inhibidores de la trombina (ej., hirudina, argatroban) presentes en la muestra a analizar pueden llevar a una sobreestimación del nivel de proteína S para esta muestra.

12/ VALORES NORMALES

Los porcentajes de proteína S total y libre son menores en las mujeres que en los hombres (9). Además, en las mujeres se han observado variaciones en función del estado hormonal (11). Por lo tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores normales en función de su población y determine los valores a partir de los cuales es necesario realizar más investigaciones (estudio de antecedentes individuales y familiares, porcentajes de C_{4b} -BP...). Como ejemplo, se analizaron 156 plasmas humanos presuntamente normales (94 hombres y 62 mujeres cuyas 7 fueron usuarias de anticonceptivos orales). Los resultados fueron los siguientes:

- hombres: \bar{X} = 110 % con una desviación estándar de 16,5 %
- mujeres: \bar{X} = 89 % con una desviación estándar de 17 %.

Durante el embarazo se observa una disminución del porcentaje de proteína S libre (5). Al nacer, el porcentaje de proteína S funcional se aproxima al del adulto, mientras que los porcentajes de proteína S libre y total son menores (5).

13/ CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

• Intervalo de medición - Límite de detección

En STA-R® y STA Compact®, la linealidad de la dosificación se observa hasta una actividad entre 10 y 150 % de la proteína S; el valor del límite de detección es 10 %.

• Reproducibilidad

Se han realizado estudios de reproducibilidad, intra e inter-series a partir de muestras normales y anormales. Los resultados obtenidos en STA® están indicados en las tablas siguientes:

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-serie	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
\bar{x}	21	21	10	10
\bar{X} (%)	94	33	105	36
SD (%)	4,1	1,5	5,9	2,3
CV (%)	4,4	4,5	5,6	6,4

14/ VARIANTES

Los capítulos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 y 12 precedentes, son también válidos para la dosificación con el método semiautomático o al baño maría.

14.1. Preparación y conservación de los reactivos

La preparación de los Reactivos 1, 2 y 3 es idéntica a la indicada en el capítulo 7 del presente folleto.

Tras la reconstitución, los reactivos son estables 4 horas a 20 ± 5 °C y 4 horas a 2-8 °C. **No se debe congelar.**

14.2. Reactivos y material auxiliares

- STA® - Owren-Koller (REF 00360).
- STA® - CaCl₂ 0,025 M (REF 00367).
- Unicalibrador (REF 00625).
- System Control [N] + [P] (REF 00617): controles normal y anormal.
- Instrumento como el ST ar® baño maría.
- Equipamiento habitual en los laboratorios de análisis clínicos (cronómetro...).

14.3. Calibración

Construya una curva de calibración para cada ensayo de la prueba. Para la elaboración de los estándares, utilice el tampón Owren Koller para preparar en tubos de ensayo plásticos diluciones de 1/10, 3/40, 1/20 y 1/40 del Unicalibrador (UC). Por definición:

- la dilución 1/10 representa el valor de ensayo indicado en la caja UC,
- la dilución 3/40 representa las tres cuartas del valor de ensayo indicado en la caja UC
- la dilución 1/20 representa la mitad del valor de ensayo indicado en la caja UC

– la dilución 1/40 representa una cuarta parte del valor de ensayo indicado en la caja UC.

14.4. Plasmas a analizar y controles

En tubos de plástico, diluir los plasmas a probar y los controles al 1/10 en tampón Owren-Koller.

14.5. Dosificación

Se recomienda que todos los ensayos (estándares, muestras pacientes y controles) sean llevados a cabo en una sola y la misma corrida. Cuando esto no sea posible, el análisis de las muestras se debe realizar inmediatamente después de la calibración desarrollada en las mismas condiciones (la secuencia de pipeteo, tiempos de incubación, mezclado luego de la adición de reactivos, etc.).

En un tubo de plástico a 37 ± 0,5 °C:	
• Plasma (patrón, paciente o control)	0,1 ml
• Reactivo 1	0,1 ml
• Reactivo 2	0,1 ml
• Reactivo 3	0,1 ml
• Mezclar e incubar a 37 °C durante exactamente	120 s
• Poniendo en marcha un cronómetro, el tiempo el STA® - CaCl ₂ 0,025 M preincubado a 37 °C	0,1 ml

Mezclar. Anotar el tiempo de coagulación (segundos).

14.6. Resultados

En papel milimetrado, marcar en abscisas el porcentaje de proteína S de los diferentes puntos de la gama de calibración y en ordenadas el tiempo de coagulación correspondiente. Trazar la curva patrón y obtener el valor de la proteína S de las muestras analizadas.

Si el nivel de proteína S de un paciente es bajo (< 10%), se recomienda analizar el plasma en una dilución 1/5. En este caso el resultado de la prueba leído a partir de la línea de calibración será dividido por 2. Si por el contrario, el nivel de proteína S de un paciente es mayor a 150 %, se recomienda analizar el plasma en una dilución 1/20. En este último caso, el resultado de la prueba leído a partir de la línea de calibración será multiplicará por 2.

Comprobar que los resultados obtenidos para los System Control [N] + [P] se sitúan en el intervalo indicado en la hoja incluida en el kit. Si los resultados estuvieran fuera del intervalo de valores, es preciso asegurarse del buen funcionamiento de todo el sistema: condiciones de ensayo, reactivos, plasmas en los que se efectúa el test, calibración, etc. Si es necesario, repetir las muestras.

14.7. Limitaciones

Durante el ensayo, respete el tiempo de incubación de 2 minutos.

14.8. Características del método

- La linealidad del ensayo observada para el nivel de proteína S entre 10 y 150 %.
- Los resultados de los estudios de reproducibilidad intra e inter-series obtenidos en ST ar® están indicados en las tablas siguientes:

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-serie	
	Muestra a	Muestra b	Muestra c	Muestra d
\bar{x}	24	24	10	10
\bar{X} (%)	106	35	91	34
SD (%)	5,2	1,9	4,4	1,4
CV (%)	4,9	5,3	4,8	4,2

BIBLIOGRAFÍA

1. WALKER F.J.: "Protein S and the regulation of activated protein C". Semin. Thromb. Hemost., 10, 131-138, 1984.
2. BERTINA R.M.: "Hereditary protein S deficiency". Haemostasis, 15, 241-246, 1985.
3. GRIFFIN J.H., HEEB M.J., SCHWARZ H.P.: "Plasma protein S deficiency and thromboembolic disease". Prog Hematol., XV, 39-49, 1987.
4. WEISS P., SOFF G.A., HALKIN H., SELIGSON U.: "Decline of proteins C and S and factors II, VII, IX and X during the initiation of warfarin therapy". Thromb. Res., 45, 6, 783-790, 1987.
5. FERNANDEZ J.A., ESTELLES A., GILBERT J., ESPANA F., AZNAR J.L.: "Functional and immunologic protein S in normal pregnant women and in full-term newborns". Thromb. Haemostas, 61, 3, 474-478, 1989.
6. TAKAHASHI H., TATEWAKI W., WADA K., SHIBATA A.: "Plasma protein S in disseminated intravascular coagulation, liver disease, collagen disease, diabetes mellitus, and oral anticoagulant therapy". Clin. Chim. Acta, 182, 195-208, 1989.
7. WOLF M., BOYER-NEUMANN C., MARTINOLI J.L., LEROY-MATHERON C., AMIRAL J., MEYER D., LARRIEU M.J.: "A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as substrate". Thromb. Haemostas, 62, 1144-1145, 1989.
8. DAHLBACK B.: "Protein S and C_{4b} -binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system". Thromb. Haemostas, 66, 1, 49-61, 1991.
9. WOLF M., BOYER-NEUMANN C., LEROY-MATHERON C., MARTINOLI J.L., CONTANT G., AMIRAL J., MEYER D., LARRIEU M.J.: "Functional assay of protein S in 70 patients with congenital and acquired disorders". Blood Coag. Fibrinolysis, 2, 6, 705-712, 1991.
10. LANE D.A., MANNUCCI P.M., BAUER K.A., BERTINA R.M., BOCHKOV N.P., BOULJENKOV V., CHANDY M., DAHLBACK B., GINTER E.K., MILETICH J.P., ROSENDAAL F.R., SELIGSON U.: "Inherited thrombophilia: Part 1". Thromb. Haemostas, 76, 5, 651-662, 1996.
11. BEECK H., HELLSTERN P., HUBBUCH A.: "Effects of sex and oral contraceptives on the reference ranges of protein S and protein C". Haemostas, 30, suppl. 1, 127-200.

Los cambios significativos son indicados por las líneas punteadas en el margen.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
 8 rue des Frères Chausson
 92600 Asnières sur Seine (France)
 +33 (0)1 46 88 20 20
 webmaster@stago.com

Las informaciones y/o las imágenes contenidas en este documento están protegidas por copyright y otros derechos de propiedad intelectual. © 2012, Diagnostica Stago, todos derechos reservados. Los logos y/o los nombres de los productos de Diagnostica Stago son marcas registradas. España