



HEMOCLOT™ Protein S

REF CK041K R1 R2 3 x 1 mL

REF CK042K R1 R2 3 x 2 mL

Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung der Protein S-Aktivität



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

VERWENDUNGSZWECK:

HEMOCLOT™ Protein S ist ein Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung der Protein S (PS)-Aktivität in humanem Citratplasma und ist sowohl zur manuellen als auch zur automatisierten Durchführung geeignet.

KLINISCHE BEDEUTUNG:

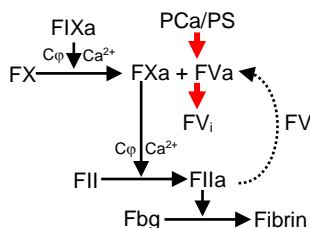
Unter physiologischen Bedingungen bindet Thrombin an Thrombomodulin, ein Transmembranprotein der Endothelzellen. Im Komplex mit Thrombomodulin verliert Thrombin seine gerinnungsfördernde Aktivität zu Gunsten einer gerinnungshemmenden Wirkung, welche die Aktivierung von Protein C (PC) zu aktiviertem PC (PCa) zur Folge hat. In Gegenwart von Calciumionen und im Komplex mit freiem PS als Cofaktor bindet PCa an die Phospholipidmembranen von aktivierten Thrombozyten. Dies führt zur Inaktivierung der aktivierten Faktoren V und VIII (FVa und FVIIIa) und folglich zu einer Gerinnungshemmung.

Die durch den PCa/PS-Komplex erzielte Gerinnungshemmung ist vermindert, wenn ein quantitativer oder qualitativer Mangel an freiem PS vorliegt. Ein angeborener oder erworbener PS-Mangel geht deshalb mit einem erhöhten Thromboserisiko einher.

TESTPRINZIP:

HEMOCLOT™ Protein S ist ein aPTT-ähnlicher Gerinnungstest, der aber im Unterschied zur aPTT durch die Zugabe von aktiviertem Faktor IX (FIXa) in Gegenwart von Phospholipiden, Calciumionen und einem konstanten Überschuss an PCa eingeleitet wird.

In einem ersten Schritt wird das verdünnte Probenplasma mit einem PS-Mangelplasma (R1) versetzt. Nach Zugabe des Aktivierungsreagenzes (R2) in einer konstanten, optimierten Konzentration wird die Gerinnung durch die Zugabe von Calciumionen ausgelöst. Da PS der limitierende Faktor im Testansatz ist, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der gemessenen Gerinnungszeit und der PS-Aktivität der Probe.



IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

HEMOCLOT™ Protein S enthält Reagenzien zur manuellen Durchführung von 3x20 Bestimmungen (Art.Nr. CK041K) bzw. 3x40 Bestimmungen (Art.Nr. CK042K). Die Anzahl der möglichen Bestimmungen bei einer automatisierten Durchführung kann hingegen in Abhängigkeit des verwendeten Gerinnungsautomaten variieren.

R1 3 Flaschen **PS-Mangelplasma**, immunadsorbiert, in Gegenwart eines Heparinneutralisators lyophilisiert.

R2 3 Flaschen **Aktivierungsreagenz**, lyophilisiert. Enthält humanen FIXa, humanes PCa und Phospholipide in einer konstanten, optimierten Konzentration. Enthält Rinderserumalbumin.

REF CK041K → R1 R2 Je 3 Flaschen mit je 1 mL

REF CK042K → R1 R2 Je 3 Flaschen mit je 2 mL

Warnhinweis: Das zur Herstellung der im Kit enthaltenen Reagenzien verwendete Humanplasma wurde mit anerkannten Methoden auf HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper untersucht und für negativ befunden. Kein Test kann jedoch die Abwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit garantieren. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen deshalb unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest., vorzugsweise steril.
- 25 mM CaCl₂ (z.B. Art.Nr. AR001A/K).
- Imidazolpuffer (z.B. Art.Nr. AR021A/K/L).
- Kalibrationsplasma (z.B. BIOPHEN™ Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101) oder sonstiges Referenzmaterial (internationaler oder interner Standard) mit bekannter PS-Aktivität.
- Normal- und Abnormal Kontrollplasmen (z.B. BIOPHEN™ Kontrollplasma „Normal“, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN™ Kontrollplasma „Abnormal“, Art.Nr. 223301) oder sonstiges Referenzmaterial (interne Kontrollen) mit bekannter PS-Aktivität.

Materialien:

- Manuelle Methode: Kalibrierte Pipetten, Wasserbad, Stoppuhr.
- Automatisierte Methode: Gerinnungsautomat.

LAGERUNG:

In der Originalverpackung bei 2-8°C gelagert sind die ungeöffneten Reagenzien bis zum auf dem Etikett gedruckten Verfallsdatum haltbar.

Anmerkung: Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Testpackungen ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Reagenzien bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

R1 **R2** Den Inhalt jeder Flasche rekonstituieren mit genau

REF CK041K → 1 mL Aqua dest.

REF CK042K → 2 mL Aqua dest.

und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig schütteln. Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Vor jedem Gebrauch durchmischen.

Nach Rekonstitution sind die Reagenzien, verschlossen in ihrer Originalflasche und geschützt vor jeglicher Kontamination und Verdunstung, über folgende Zeiträume stabil:

- 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)
- 24 Stunden bei 2-8°C
- On-Board-Stabilität: Siehe gerätespezifische Vorschrift des Analyseautomaten

Vorsichtsmaßnahmen:

- Die im Kit enthaltenen Flaschen werden unter Vakuum verschlossen. Um einen Verlust deren Inhalts beim Öffnen zu vermeiden, müssen die Verschlüsse vorsichtig entfernt werden.
- Eine sorgfältige Behandlung der Reagenzien verringert das Risiko von Kontamination und Verdunstung.
- Um die Stabilität der Reagenzien zu gewährleisten, müssen die Flaschen nach jedem Gebrauch mit ihren Originalschraubkappen verschlossen werden.

Anmerkungen:

- Bei einer automatisierten Testdurchführung kann es in Abhängigkeit des verwendeten Gerinnungsautomaten zu Abweichungen der Rekonstitutionsvolumina von den hier angegebenen Werten kommen. Die festgelegten Reaktionsverhältnisse (das Verhältnis der einzelnen Reagenzkonzentrationen im Testansatz) müssen aber auf jeden Fall eingehalten werden.
- Die Kombination der einzelnen Reagenzien ist chargenabhängig optimiert. Zur Testdurchführung dürfen folglich ausschließlich Komponenten aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden.

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumentteile) wird vorsichtig in 0,109 M oder 0,129 M Trisodium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumentteil) abgenommen und innerhalb von 2 Stunden für 20 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma muss innerhalb von **4 Stunden** getestet werden. Alternativ kann es für bis zu **1 Monat** bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Das geforene Citratplasma muss vor Gebrauch für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und innerhalb von **4 Stunden** getestet werden.

Anmerkung: Weitere Empfehlungen zur Probengewinnung, -handhabung und -lagerung können den GEHT- und NCCLS/CLSI-Dokumenten entnommen werden. Ikerische, hämolytische und lipämische Plasmen sind zu verwerfen.

TESTDURCHFÜHRUNG:

HEMOCLOT™ Protein S ist ein Gerinnungstest, der sowohl zur manuellen als auch zur automatisierten Durchführung geeignet ist. Der Test wird bei einer konstanten Temperatur von 37°C durchgeführt. Anwendungsvorschriften für die gängigsten Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Kalibration:

HEMOCLOT™ Protein S kann mithilfe eines **gepoolten humanen Normalplasmas** (zusammengeführt aus den Citratplasmen von mindestens 30 gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren, die nicht unter Medikation stehen) kalibriert werden. Da die Verdünnung der Proben im Testansatz 1:10 beträgt, entspricht eine **1:10-Verdünnung** eines solchen gepoolten humanen Normalplasmas einer **PS-Aktivität von 100%**.

Alternativ können kommerziell verfügbare Kalibrationsplasmen mit bekannter PS-Aktivität (z.B. BIOPHEN™ Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101) zur Kalibration des Testes herangezogen werden. Eine **1:10-Verdünnung** eines solchen Kalibrationsplasmas mit Imidazolpuffer (1 Teil Plasma + 9 Teile Puffer) entspricht einer **PS-Aktivität von C%**. Diese Aktivität ist chargenabhängig und wird auf dem Datenblatt, das jeder Packung beigelegt ist, exakt angeführt. Um eine Verdünnung mit einer PS-Aktivität von 100% zu erhalten, wird das Kalibrationsplasma mit dem Faktor **D = C:10** (z.B. 93:10 = 9,3 bei C = 93%) verdünnt.

HEMOCLOT™ Protein S misst in einem Bereich von 0 bis 100% PS-Aktivität. Zur Kalibration des Testes werden zunächst **3 mL** einer **1:10-Verdünnung** eines gepoolten humanen Normalplasmas bzw. **3 mL** einer **Verdünnung um den Faktor D** eines kommerziell verfügbaren Kalibrationsplasmas mit bekannter PS-Aktivität hergestellt. Die Verdünnung erfolgt in isotonem Imidazolpuffer (z.B. Art.Nr. AR021A/K/L) und enthält dann eine Ausgangsaktivität von 100%. Von dieser Stammlösung werden weitere Kalibratorlösungen durch Verdünnung mit demselben Puffer hergestellt. Beispiel:

Kalibrator	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5
PS-Aktivität	100%	75%	50%	25%	10%
Stammlösung mit 100% PS	1,00 mL	0,75 mL	0,50 mL	0,25 mL	0,10 mL
Imidazolpuffer	0,00 mL	0,25 mL	0,50 mL	0,75 mL	0,90 mL

Es empfiehlt sich die Durchführung einer Kalibration mit frisch hergestellten Kalibratorlösungen.

Proben und Kontrollen:

Proben und Kontrollen müssen zur Testung 1:10 mit Imidazolpuffer verdünnt werden. Bei erwarteten PS-Aktivitäten von > 100% können die Proben in einer Verdünnung von 1:20 getestet werden. Umgekehrt können Proben mit erwarteten PS-Aktivitäten von < 10% in einer Verdünnung von 1:5 getestet werden.

Anmerkung: Zur Verdünnung der Kalibrations-, Kontroll- und Probenplasmen wird isotoner Imidazolpuffer (z.B. Art.Nr. AR021A/K/L) empfohlen, es kann aber auch Owren-Koller-Puffer verwendet werden. Auf jeden Fall müssen innerhalb eines Testansatzes alle Kalibrations-, Kontroll- und Probenplasmen mit demselben Puffer verdünnt werden.

Testdurchführung:

Manuelle Methode:

Ein Reaktionsgefäß bei 37°C vorwärmen und nach folgendem Schema zugeben:

Reagenz	Volumen
Kalibratorlösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:10 verdünnt) oder Proben (1:10 verdünnt)	50 µL
R1 (vorgewärmt bei 37°C)	50 µL
Mischen und 1 Minute bei 37°C inkubieren	
R2 (vorgewärmt bei 37°C)	50 µL
Mischen und 3 Minuten bei 37°C inkubieren	
25 mM CaCl ₂ (unter Rühren bei 37°C vorgewärmt)	100 µL
Gerinnungszeit in Sekunden messen	

Automatisierte Methode:

Anwendungsvorschriften für die gängigsten Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Anmerkung: Um eine optimale Leistungsfähigkeit des Testes zu gewährleisten, müssen alle Schritte rasch und zügig durchgeführt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Der Einsatz interner oder kommerziell verfügbarer (z.B. BIOPHEN™ Kontrollplasma „Normal“, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN™ Kontrollplasma „Abnormal“, Art.Nr. 223301) Kontrollplasmen mit bekannter PS-Aktivität erlaubt die Validierung der ermittelten Kalibrationskurve sowie die Überprüfung der Testqualität von einer Analysenserie zur nächsten. Es empfiehlt sich eine Messung von Kontrollen auf verschiedenen Levels. Die Kalibrationskurve ist gültig, wenn die gemessenen Kontrollwerte innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen.

Anmerkung: Eine Neukalibration ist bei jedem Wechsel der Testkitcharge, nach sämtlichen größeren Wartungsarbeiten am verwendeten Gerinnungsautomaten oder wenn immer die Kontrollwerte außerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen erforderlich. Für jede neue Kontrollcharge sollte jedes Labor in Abhängigkeit des verwendeten Gerinnungsautomaten, der gewählten Messvorschriften sowie der vorherrschenden Arbeitsbedingungen laborspezifische Sollwerte und Vertrauensbereiche festlegen.

ERGEBNISDARSTELLUNG:

Manuelle Methode:

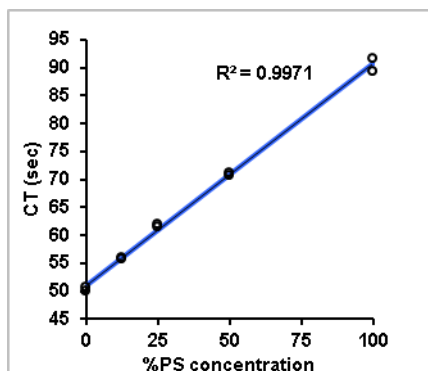
- Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden die berechneten **PS-Aktivitäten (%)** der einzelnen Kalibratorlösungen auf der x-Achse in **linearer Skalierung** gegen die jeweils gemessenen **Gerinnungszeiten (sec)** auf der y-Achse aufgetragen. Der Test ist im Bereich von **10 bis 100%** PS-Aktivität linear.
- Anschließend wird der Korrelationskoeffizient (r^2) der Kalibrationskurve berechnet. Die Kalibrationskurve ist gültig, wenn $r^2 \geq 0.98$ und die Kontrollwerte innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen.
- Von der ermittelten Kalibrationskurve kann anhand der für die **Proben und Kontrollen** gemessenen Gerinnungszeiten auf die jeweiligen PS-Aktivitäten geschlossen werden. Wurden die Proben **anders als 1:10** verdünnt, muss der errechnete Wert unter Berücksichtigung des abweichenden Verdünnungsfaktors **D mit D:10 multipliziert** werden (z.B. mit 20:10 = **2 bei einer Verdünnung von 1:20**), um die tatsächliche PS-Aktivität der Probe zu erhalten.
- Alternativ zur Angabe in Prozenten (%) können die gemessenen PS-Aktivitäten auch in Einheiten pro Milliliter ausgedrückt werden (**1 E/mL = 100%**).

Automatisierte Methode:

- Die PS-Aktivitäten der Proben und Kontrollen werden anhand der automatisch ermittelten Kalibrationskurve und unter Berücksichtigung eventuell abweichender Probenvorverdünnungen direkt vom Gerinnungsautomaten berechnet.

BEISPIEL EINER KALIBRATIONSKURVE:

Die hier gezeigte Kalibrationskurve wurde durch die Messung eines in mehreren Schritten verdünnten Kalibrationsplasmas mittels HEMOCLOT™ Protein S an einem KC-10-Kugelkoagulometer ermittelt und dient lediglich als Beispiel. Zur Kalibration des Testes darf nur die für die jeweilige Testkitcharge erstellte Kalibrationskurve verwendet werden.



TESTCHARAKTERISTIKA:

- Messbereich:** Von 10 bis etwa 100%.
- Nachweisgrenze:** $\leq 10\%$. Die Nachweisgrenze wird durch die „scheinbare“ PS-Aktivität definiert. Diese entspricht der mittleren Gerinnungszeit eines PS-Mangelplasmas plus 3 Standardabweichungen.
- Spezifität:** Bei der Testung von PS-Mangelplasmen können Werte von < 5% gemessen werden.
- Reproduzierbarkeit:** Sowohl am KC-10 als auch am STA-R wurde ein Inter-Assay-VK von < 5% festgestellt.

TESTEINSCHRÄNKUNGEN:

- Eine Gerinnungsaktivierung während der Probengewinnung kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Test kann bei Patienten unter Heparin- (bis zu 2 IE/mL) und Dicoumaroltherapie durchgeführt werden. Wird eine ungewöhnlich stark verlängerte Gerinnungszeit festgestellt, empfiehlt sich die Bestätigung der Diagnose durch die Wiederholung der Messung anhand einer weiteren Probe desselben Patienten bzw. durch Heranziehung einer weiteren Methode (z.B. der immunologischen Bestimmung von freiem PS).
- Besondere Sorgfalt ist bei der Interpretation der Ergebnisse von Patienten mit erhöhter FVIII-Aktivität, Antiphospholipidsyndrom oder Faktor V-Leiden (R506Q-Mutation) geboten. In solchen Fällen empfiehlt sich eine eingehende Evaluierung des Befundes unter Berücksichtigung des klinischen Kontextes und die Bestätigung der Diagnose durch Heranziehung einer weiteren Methode.
- Da PCa durch Aprotinin inhibiert wird, kann die „scheinbare“ PS-Aktivität bei Patienten unter Aprotinintherapie erniedrigt sein. Auch in diesem Falle empfiehlt sich die Bestätigung der Diagnose durch Heranziehung einer weiteren Methode.
- In Abhängigkeit des verwendeten Gerinnungsautomaten, des Messprinzips (mechanische oder optische Gerinnungsdetektion) sowie der Sensitivitätseinstellungen bei der Gerinnungsdetektion können für eine bestimmte Probe trotz Verwendung derselben Testkitcharge unterschiedliche Gerinnungszeiten gemessen werden.

ERWARTETE BEREICHE:

Bei gesunden Erwachsenen schwankt die PS-Aktivität zwischen **60 und 140%**. Sie ist bei Männern höher als bei Frauen und nimmt sowohl mit dem Alter als auch mit den Blutfettwerten zu. Bei Kleinkindern ist die PS-Aktivität hingegen niedriger und beträgt etwa: 14-38% bei Frühgeburten, 12-60% bei Neugeborenen, 36% bei einem Alter von 5 Tagen, 60% bei einem Alter von 30 Tagen und 90% bei einem Alter von 90 Tagen.

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN:

PS ist ein Vitamin K-abhängiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 69 kDa, das in der Leber synthetisiert wird. Die Gesamt-PS-Konzentration in humanem Normalplasma beträgt ca. 25 µg/mL. Etwa 40% davon zirkuliert frei, während etwa 60% in einem nicht-kovalenten Komplex mit dem C4b-Bindeprotein (C4b-BP) vorliegt. Nur in seiner freien Form kann PS als Cofaktor von PCa fungieren und somit seine gerinnungshemmende Aktivität entfalten.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

Eine PS-Aktivität von $\leq 60\%$ bei Erwachsenen weist auf einen PS-Mangel hin, der durch die Wiederholung der Messung mit einer weiteren Probe desselben Patienten bzw. durch Heranziehung einer weiteren Methode bestätigt werden sollte. Ein PS-Mangel kann angeboren oder erworben sein.

Angeborener PS-Mangel:

- Typ I: Teilweise erniedrigte Konzentration an freiem und Gesamt-PS.
- Typ II: Normale Konzentration an freiem und Gesamt-PS, aber erniedrigte Aktivität.
- Typ III: Normale Gesamt-PS-Konzentration mit erniedrigtem Anteil an freiem PS und somit erniedrigter Aktivität.

Erworbener PS-Mangel:

- Bei Vitamin K-Mangel oder unter Dicoumaroltherapie. In diesen Fällen sind Vitamin K-abhängige Faktoren (II, VII, IX und X) ebenfalls erniedrigt, so dass ein erhöhtes Blutungsrisiko besteht.
- Bei einer systemischen Therapie mit Geschlechtshormonen, Schwangerschaft, Lebererkrankungen und bestimmten chronischen Infektionen wie AIDS.
- In bestimmten Fällen kann ein erworbener PS-Mangel die Ursache von disseminierten intravasalen Koagulopathien (DIC), tiefen Venenthrombosen (TVT) und Lungenembolien sein.
- Eine vorübergehende Verringerung der PS-Aktivität kann in den Frühstadien von entzündlichen Prozessen beobachtet werden.
- Ein seltener PS-Mangel aufgrund eines chronischen oder vorübergehenden Auftretens von anti-PS-Autoantikörpern kann u.a. bei Kindern mit Windpocken vorkommen.

WEITERFÜHRENDE LITERATUR:

- Walker (1980). Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. *J. Biol. Chem.*, 255, 5521-24.
- Comp et al. (1984). Familial Protein S Deficiency is Associated with recurrent Thrombosis. *J. Clin. Invest.*, 74, 2082-88.
- D'Angelo et al. (1988). Acquired Protein S Deficiencies. *J. Clin. Invest.*, 81, 1445-54.
- Castoldi et al. (2009). Hereditary and Acquired Protein S deficiencies are associated with low TFPI levels in plasma. *J. Thromb. Haemostas.*, 8, 294-300.

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Symbolerklärungs-Blatt ist zu beachten.