



LIAPHEN™ Free Protein S

REF 120004

R1 4 x 3 mL, R2 4 x 4,4 mL

Méthode immuno-turbidimétrique pour la Protéine S:Ag libre,
avec réactifs liquides prêts à l'emploi.

Français, dernière révision : 01-2021

UTILISATION:

Le coffret LIAPHEN™ Free Protein S est une méthode immuno-turbidimétrique pour la détermination quantitative *in vitro* de l'antigène Protéine S libre (PS:Ag libre) sur plasma humain citraté en utilisant une méthode automatisée. L'ensemble des réactifs est sous forme liquide prête à l'emploi.

RESUME ET EXPLICATION:

Technique :

La Protéine S (PS) est une glycoprotéine vitamine K dépendante, principalement synthétisée dans le foie. La concentration en Protéine S d'un plasma humain normal est d'environ 25 µg/mL. Environ 40% (soit 10 µg/mL) se trouve sous forme libre et 60% (soit 15 µg/mL) circule dans le sang sous forme de complexe non-covalent avec la C4b-BP. L'équilibre entre les formes de Protéine S libre et liée à la C4b-BP joue un rôle important, seule la Protéine S libre étant active via son activité anticoagulante en tant que cofacteur de la Protéine C activée.

Clinique : 1,2,3

Les déficits congénitaux ou acquis en Protéine S sont associés à une augmentation du risque de thrombose veineuse.

Dans les premiers stades des maladies inflammatoires, la concentration en Protéine S libre est diminuée à cause d'une augmentation de C4b-BP. La Protéine S peut être diminuée dans différents contextes comme les thérapies au dicoumarol ou L-asparaginase, dans les troubles hépatiques, le syndrome néphrotique, pendant la grossesse, en lien avec la prise de contraceptifs oraux ou d'oestrogènes, les infections virales, CIVD. La Protéine S libre peut également être diminuée chez les nouveau-nés.

Les déficits en Protéines S héréditaires sont classés en trois types:

- Type I: niveaux de PS totale et libre diminués (défauts quantitatifs).
- Type II: activité PS diminuée mais niveaux antigéniques normaux (défauts qualitatifs rares).
- Type III: niveaux normaux de PS totale mais de PS libre diminuée (défaut quantitatif).

Les déficits de type I et III représentent 95% des cas de déficit en PS.

PRINCIPE:

Le coffret LIAPHEN™ Free Protein S est une méthode immuno-turbidimétrique, basée sur une réaction antigène-anticorps : l'antigène PS libre de l'échantillon réagit avec les particules de latex sensibilisées avec deux anticorps monoclonaux de souris anti-PS libre, conduisant à l'agglutination des particules de latex. Cette agglutination peut être directement détectée par un changement d'absorbance. Le changement d'absorbance est directement proportionnel à la quantité de PS:Ag libre dans l'échantillon.

REACTIFS:

R1 Tampon de réaction, sous forme liquide.

4 flacons de 3 mL.

R2 Latex, sous forme liquide.

4 flacons de 4,4 mL.

Les réactifs R1 et R2 contiennent de la BSA et de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- 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.

PREPARATION DES REACTIFS:

R1 R2 Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser par inversion douce en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

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 ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 4 mois à 2-8°C.
- 2 semaines 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.
- Imidazole Buffer (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N), comme diluant.
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration de PS:Ag libre connue, tels que :

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

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

Matériels:

- Spectrophotomètre, automates pour dosage immuno-turbidimétrique.
- Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou en verre siliciné.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

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 Etats-Unis, se référer aux recommandations de CLSI H21-A5⁴ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation). Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{4,5}.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée. Le test est réalisé à 37°C et la turbidimétrie est mesurée à 575nm (d'autres longueurs d'onde sont utilisables, de préférence entre 540 et 800nm).

Méthode de dosage:

1. Reconstituer la préparation de référence ou l'étalon plasmatique, et les contrôles plasmatiques, comme indiqué dans les notices spécifiques ou selon la pratique interne.

Programmer les points de calibration sur la zone 0 à 150% de PS:Ag libre (0-10-37,5-75-110-150% PS:Ag libre en tampon Imidazole), la dilution au 3/20 correspondant à la concentration « C » de PS:Ag libre indiquée pour l'étalon commercial.

2. Programmer la dilution des échantillons et contrôles dans du tampon Imidazole comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Dilution
Contrôles	223201/ 223301	3/20
Echantillons	NA	3/20

Réaliser la gamme d'étalonnage et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés extemporanément s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. A titre d'exemple, le tableau ci-dessous montre le schéma pour l'application sur CS-series. Introduire dans les cuvettes réactionnelles incubées à 37°C (directement géré par l'instrument):

	Volume
Etalons, échantillons ou contrôles dilués en tampon Imidazole	10 µL
Tampon Imidazole	10 µL
R1 Tampon réactionnel	60 µL
Incuber à 37°C pendant 130 sec.	
R2 Latex	100 µL
Mélanger et mesurer l'absorbance en continu (entre 40 et 80 sec) à 575 nm, à 37°C.	

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.

Pour des concentrations élevées (entre 150% et 300%), il est recommandé d'effectuer une pré-dilution en tampon Imidazole (la concentration mesurée doit ensuite être multipliée par le facteur de « pré-dilution »).

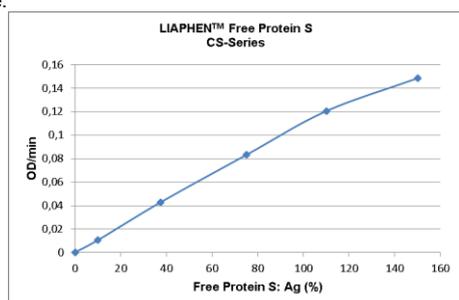
Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

CALIBRATION:

Le test LIAPHEN™ Free Protein S peut être calibré pour le dosage de la PS:Ag libre en plasma humain. 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 environ de 0 à 150%.

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.



CONTRÔLE 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:

- Sur instrument Sysmex CS-series, la courbe de calibration (en point par point), est obtenue en portant en ordonnées la ΔDO à 575 nm et en abscisses la concentration de PS:Ag libre en %.
- La concentration de PS:Ag libre (%) 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.

- Les anticorps hétérophiles sont susceptibles d'interférer dans le dosage en donnant une valeur anormalement élevée de PS:Ag.
- Pour l'influence possible d'effet crochet, se référer à l'application spécifique pour l'instrument utilisé (aucun effet significatif n'est observé sur Sysmex CS-series pour des concentrations de PS:Ag libre jusqu'à 600%).

VALEURS ATTENDUES:

Le domaine de référence (ou intervalle de référence) a été mesuré sur des sujets adultes sains (n=120) sur Sysmex CS-5100 (Central 90%, 95th percentile) entre 60 et 137%.

Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal. Des facteurs tels que l'âge, le sexe et le statut hormonal sont susceptibles d'influencer la concentration de PS:Ag libre dans le plasma.

PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé (<0,6% sur Sysmex CS-5100).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 6 à 300% de PS:Ag libre sur Sysmex CS-series, le test étant linéaire jusqu'à 150% sans redilution).
- Spécificité : Un plasma déficient en PS a été mesuré <6% sur Sysmex CS-series. L'addition de C4b-BP en plasma diminue la concentration de PS:Ag libre mesurée (augmentation de la quantité de PS liée à la C4b-BP).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 5 jours, 2 séries par jour et 3 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai			Inter-essais				
	N	Moy.	CV%	SD	n	Moy.	CV%	SD
Normal	40	97,7	2,5	2,4	30	95,3	1,2	1,1
Pathologique	40	29,0	1,8	0,5	30	29,9	1,9	0,6

- Corrélation avec une autre méthode (INNOVANCE® Free PS Ag (Siemens) vs LIAPHEN™ Free Protein S sur Sysmex CS-5100) :
n = 131 y = 1,141x-7,982 r = 0,990

Interférences:

Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes :

Hémoglobine	1000 mg/dL	Héparine (HNF/HBPM)	10/10 UI/mL
Bilirubine (Libre)	60 mg/dL	Rivaroxaban	400 ng/mL
Bilirubine (Conjuguée)	60 mg/dL	Apixaban	400 ng/mL
Intralipides	1000 mg/dL	Dabigatran	400 ng/mL
Fibrinogène	12 g/L	Edoxaban	400 ng/mL
Facteurs rhumatoïdes	3000 UI/mL	Plaquettes	490.10 ⁹ /L

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

REFERENCES:

- 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.
- Wypasek E. and Undas Anetta. Protein C and Protein S Deficiency – Practical Diagnostic Issues. *Adv Clin Exp Med*. 2013.
- Meireles Rezende S. *et al.* Coagulation, inflammation, and apoptosis : different roles for protein S and the protein S – C4b binding protein complex. *Blood*. 2004.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. *Ann Biol Clin*. 2014.

SYMBOLES:

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.*