

Protein S Antigen Rocket EID

Instructions For Use

REF 5359

EID en fusée, antigène de la protéine S
Fiche technique

Protein S-Antigen Rocket-EID
Anleitung

Rocket EID per l'antigene della proteina S
Istruzioni per l'uso

EID Rocket del antígeno de la proteína S
Instrucciones de uso

Contents

English	1
Français	8
Deutsch	16
Italiano	24
Español	32



INTENDED PURPOSE

The Protein S procedure is used to determine the concentration of Protein S in human plasma as a free protein and as a complex with complement component C-4 binding protein (C4bp) using Laurell rocket electrophoresis^{1,2}.

Protein S is a vitamin K dependent plasma protein that acts as a potent cofactor for activated Protein C. In the coagulation process, it inhibits thrombin formation forming Factors V and VIII:C. Abnormally low Protein S levels are found in congenital Protein S deficiency^{3,4}, liver disorders and oral anticoagulant patients. The complexity of Protein S is illustrated by the formation of a dynamic equilibrium with C4b - binding protein. C4b - BP can be found in plasma in two different forms^{4,5}. The first is a low molecular weight form which exhibits no affinity for Protein S. The second is a high molecular weight form which can bind Protein S in a 1:1 complex.

Free Protein S represents about 40% (10 mg/l) of total Protein S. It acts as the carrier for anticoagulant activity and as the cofactor for activated Protein C. The C4b - BP bound Protein S normally represents about 60% (15 mg/l) of total Protein S and does not have any anticoagulant activity.

The Helena Protein S Rocket EID Procedure is performed in a 1% agarose gel medium containing an antiserum specific for Protein S. After the plasma specimens are applied to the wells in the agarose, electrophoresis is used to migrate the proteins into the antibody field. A rocket-shaped precipitin pattern forms along the axis of migration. The length of this rocket pattern is proportional to the antigen concentration.

Studies done by Dahlback⁷ showed that the addition of PEG to the plasma would precipitate the C4b - BP complex but not the free Protein S. The Helena Free Protein S Reagent resolves the free from the bound Protein S and thus allows for correlation between functional Protein S activity and immunologic levels of free Protein S.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for *in-vitro* diagnostic use only - **DO NOT INGEST**. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheets for risk and safety phrases and disposal information. Plasma products have been screened and found negative (unless otherwise stated on the kit box or vial) for the presence of Hepatitis B Antigen (HbsAg) HIV 1 and 2 antibody and HCV antibody, however they should be handled with the same precautions as a human plasma sample.

COMPOSITION

1. Protein S Antigen Rocket Plates (Cat. No. 5359)

Contains sheep or goat antibody to human Protein S incorporated into agarose in Tris-tricine buffer and sodium azide as preservative. To prevent the formation of toxic vapors, sodium azide should not be mixed with acidic solutions.

Preparation: Remove the plate from the protective packaging and allow 5-10 minutes for the agarose to reach 15...30°C.

2. Tris-tricine Buffer (Cat. No. 5358 - not included)

When diluted, the buffer contains 0.081M Tris and 0.024M tricine.

Preparation: Dilute one package of buffer to 1000ml with deionized water. The buffer is ready for use when all material is completely dissolved.

3. Rocket Stain (Cat. No. 5362 - not included)

Rocket Stain is Coomassie Brilliant Blue stain.

Preparation: Dissolve the contents of the vial in 450 ml deionized water, 450 ml methanol and 100 ml acetic acid. Mix thoroughly and filter before use if necessary.

4. Free Protein S Reagent (Cat. No. 5363)

The reagent contains 25% Polyethylene glycol. The reagent is ready for use as packaged.

5. Other Kit Components

Each reagent contains Instructions for Use, a rocket ruler and report form.

STORAGE AND SHELF-LIFE

Unopened reagents are stable until the given expiry date when stored under conditions indicated on the vial or kit label.

1. Protein S Antigen Rocket Plates (Cat. No. 5359)

Rocket Plates MUST be stored at 2...6°C and maintained in moist condition within the bag. **DO NOT FREEZE.** The plates are stable until the expiry date indicated on the package.

Signs of Deterioration: Discard the plate if dry in appearance or if the wells are not round. A crystalline appearance indicates the agarose has been frozen.

2. Tris-tricine Buffer (Cat. No. 5358)

The buffer should be stored at 15...30°C. Diluted buffer is stable for 2 months when stored at 15...30°C.

Signs of Deterioration: Discard packaged buffer if the material shows signs of dampness or discoloration. Discard diluted buffer if it becomes turbid.

3. Rocket Stain (Cat. No. 5362)

The stain should be stored at 15...30°C.

Signs of Deterioration: If methanol evaporation occurs, a metallic sheen will be visible on the stain surface. Discard the stain if it does not adequately stain protein rockets as described in this procedure.

4. Free Protein S Reagent (Cat. No. 5363)

The reagent should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label.

Signs of Deterioration: Discard the reagent if it shows any signs of microbial contamination.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 5358 Tris - Tricine Buffer

Cat. No. 5362 Rocket Stain

Cat. No. 5363 Free Protein S Reagent

Cat. No. 5185 SARP reference plasma

Cat. No. 4063 Titan Gel Chamber

Cat. No. 5014 Development Weight

Cat. No. 1520 EWS Power Supply

Cat. No. 5037 Blotter Pads

Cat. No. 9025 IEP VuBox

Cat. No. 5116 I.O.D. - Incubator, Oven, Drier

Cat. No. 1558 TITAN GEL Multi-staining Set

Cat. 6210, 6211 Microdispenser and Tubes (10ml)

Lint free tissue

Destain solution: Mix 200ml deionized water, 200ml methanol and 50ml glacial acetic acid.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Plastic or siliconised glass should be used throughout. Blood (9 parts) should be collected into 3.2% or 3.8% sodium citrate anticoagulant (1 part). Separate plasma after centrifugation at 2000-3000xg for 15 minutes. Plasma should be kept at 2...6°C. Testing should be completed within 2 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for one month. Thaw quickly at 37°C prior to testing. DO NOT keep at 37°C for more than 5 minutes.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

- I. For step I follow the procedure according to Free Protein S Determination or Total Protein S Determination..

Free Protein S Determination

- i. All samples, including standard material and controls, must be pretreated by adding 15ml of Free Protein S Reagent to 85ml of plasma. These volumes may be altered, but the ratio should remain the same. DO NOT dilute the patient and control samples before pretreatment.
- ii. Vortex each specimen and place on ice for 30 minutes.
- iii. Centrifuge each specimen at a minimum of 1000 X G for 10 minutes. Reserve the supernatant for standard dilutions and patient dilutions.
- iv. To make the standard curve, dilute the standard material supernatant with 0.85% saline according to the following instructions.

Nominal Percent Activity	Dilution	Parts S.A.R.P.	Parts 0.85% Saline
100%	Use reconstituted S.A.R.P. undiluted		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3

- v. Go to Step 2

Total Protein S Determination

- i. Reconstitute one vial of S.A.R.P. with 1.0ml deionized water. Make dilutions for preparation of the Standard Curve as follows:

Nominal Percent Activity	Dilution	Parts S.A.R.P.	Parts 0.85% Saline
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12.5%	1:8	1	7

- ii. Dilute each patient sample with 0.85% saline. Prepare a 1:2 dilution (1 part patient sample and 1 part saline) and a 1:4 dilution (1 part patient plasma and 3 parts saline). Additional dilutions may be necessary depending on the patient history. Suspected abnormal samples may need to be tested undiluted.
- iii. Go to Step 2

NOTE: Remove the plate from the refrigerator, allow approximately 5-20 minutes for the plate to reach 15...30°C and for excess moisture to be absorbed before use.

2. Pour 65ml of Tris-tricine buffer into each inner section of the chamber.
3. Remove any excess buffer from the wells of the plate. Excess moisture on the plate can result in poor rockets.

4. Apply 10ml of each patient sample or dilution to the appropriate well. Standard curve samples must be run on each plate. **NOTE:** Duplicate applications of patient samples are advisable. When applying the samples to the plate wells, do not allow the pipette tip to touch the sides of the wells as this may cause damage.
5. Allow 5 minutes for specimens to diffuse into the agarose.
6. Place the gel into the inner section of the chamber, agarose side down, by gently squeezing the gel into place. Position the gel(s) so that the edges of the agar are in the buffer and the wells are toward the cathode (-) side of the chamber.
7. Electrophorese the plates at a constant current of 16 mA per plate for 3 hours.
8. Following electrophoresis, remove the plates from the chamber. Discard the chamber buffer after each run. **NOTE:** Use the TITAN GEL Multi-Staining Set (Cat. No. 1558) as a staining and rinsing chamber.
9. Rinse the plate with deionized water and wash it in 0.85% saline overnight.
10. After the overnight wash, rinse the plate with deionized water.
11. Place the plate on a flat surface, agarose side up. Cover the agarose with a single, lint-free tissue.
12. Place 2-3 Blotter Pads and a Development Weight on the plate for 15 minutes and remove.
13. Dry the plate in a drying oven at 60...70°C for 10-20 minutes. DO NOT over dry plates. The plate will be transparent when completely dry. **NOTE:** If a dryer/oven is not available, the plates may be covered with wet lint-free tissues and allowed to dry at 15...30°C overnight or under a fan for 3 hours at 15...30°C as climate requires.
14. Following drying, stain the plate by immersing it in Rocket Stain for 20 minutes.
15. Place the plate in destain solution for 1-3 minutes. **NOTE:** Destaining is complete as soon as the background sufficiently clears in order to easily distinguish rocket peaks. Excessive destaining may fade the rockets making correct measurements difficult. If over destaining does occur, repeat Step 14 and stain the rockets again.
16. Rinse the plate twice in deionized water for 5-10 minutes each rinse.
17. Dry the plates at 37°C for 5 minutes or at 15...30°C until dry.
18. Place the plate on the Helena I.E.P.VuBox using a piece of white paper in the bottom of the VuBox for easier viewing of the rockets. Mark the apex of each rocket peak with a marker.
19. Using the Helena Rocket Ruler, measure the length of each peak in millimeters. The peak is measured from the top of each well to the apex of the rocket.
20. Plot the values of the standard curve versus each rocket height on the Rocket Antigen Report Form or on 3 cycle semi-logarithmic paper. Draw the line of best fit for the standard points. See Figures 1 and 2 in INTERPRETATION OF RESULTS for an example of a completed Rocket Plate and a standard curve drawn on a Rocket Antigen Report Form.

INTERPRETATION OF RESULTS

Read the patient values from the standard curve and multiply each by the appropriate dilution factor. If S.A.R.P. is used to prepare the standard curve, the patient value read from that curve must be multiplied by the assigned Protein Antigen value of the appropriate lot number of S.A.R.P. as well as the dilution factor.

Patient value from curve = 30%

Dilution factor = 2

S.A.R.P. assigned value = 98%

Actual Patient Factor

Protein S Antigen = $30\% \times 2 \times 0.98 = 58.8\%$

Patient samples with Protein S Antigen levels greater than the range of the standard curve, must be reassayed using the appropriate dilutions

Figure 1: Rocket patterns on a Protein S Antigen Rocket Plate. The lengths of the rockets (in millimeters) of the standard dilutions are used to prepare the standard curve. Patient results are read from the curve.

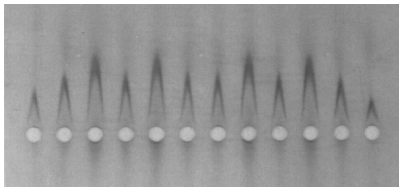
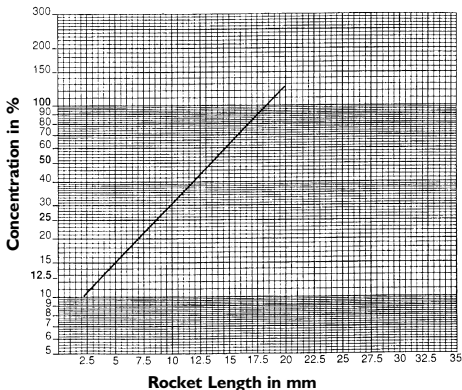


Figure 2: Representative standard curve prepared with S.A.R.P. on 3 cycle semi-logarithmic paper.



All decreases in Protein S, whether congenital or acquired, cause an increase in the risk of thromboembolism. Recurrent thrombotic episodes occur due to a decrease of anticoagulant potential³⁻⁶.

Protein S levels are decreased in:

- * Protein S congenital deficiency³⁻⁶.
 - type I, indicated by a decrease in the anticoagulant activity (free Protein S) and a normal to slightly decreased antigen level.
 - type II, indicated by a significant decrease in both the activity and antigen levels of Protein S.
- * Hepatic disorders.
- * Oral anticoagulant therapy.

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish a quality control program. Normal and abnormal control plasmas should be tested prior to each batch of patient samples, to ensure satisfactory instrument and operator performance. If controls do not perform as expected, patient results should be considered invalid.

Helena BioSciences supply the following controls available for use with this product:

Cat. No. 5301 SAC 1

Cat. No. 5302 SAC 2

REFERENCE VALUES

Reference values can vary between laboratories depending on the techniques and systems in use. For this reason each laboratory should establish its own normal range.

Protein S antigen values are usually expressed in relative percentages compared to a pooled normal plasma standard.

Total Proteins: The normal range study consisted of fifty (50) normal healthy adults, 25 males & 25 females. There has been no indication of any difference in Protein S antigen range levels between healthy males & females. The expected normal range for Protein S antigen run by rocket electrophoresis was 60-150%.

These specimens were from donors who are aged between 18 and 65 years old, in good health; no surgery within 6 months, have normal haemoglobin, haematocrit and temperature and are taking no medication, i.e., antibiotics.

Free Protein S: Normal free Protein S levels established by this method have been reported from 57% - 120%⁵. Helena tested 31 plasmas and determined an actual range of specimen concentration from 42% to 147%. Each laboratory should establish its own normal for this procedure but be aware that there is currently no accepted international standard for Protein S antigen.

LIMITATIONS

Heparin samples with levels up to 10 IU/ml do not affect the results of the Helena Protein S antigen assay. Patients on oral anticoagulant therapy do show marked decreases in the protein S antigen level. The free Protein S level does not affect the measurement of total Protein S. No other substances have been found to interfere with this procedure.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Helena BioSciences or their representatives have determined the following performance characteristics as a guideline. Each laboratory should establish its own performance data.

Precision

Studies were done with a control material used in replicate on one plate.

	Within Run:		Between Run:	
	Total S	Free S	Total S	Free S
\bar{x}	98.1	50.8	98.4	52.2
SD	2.8	2.7	2.8	3.5
CV%	2.3	5.2	5.6	6.7
n	8	5	18	15

Comparison

Correlation studies were done using the Helena Protein S system and a reference method. The specimens used met the same criteria as those for the normal range study. The following data was derived.

	Total S		Free S
n	= 49	31	Y = Helena Protein S
Y	= 0.917X + 6.975	0.981X + 0.498	X = Reference Method
r	= 0.849		0.906

Sensitivity

Sensitivity for this procedure is expressed in relative percentages compared to a pool of normal plasma, such as S.A.R.P. Patient values greater than the highest value on the normal standard curve must be diluted and retested. The sensitivity threshold for the Helena Protein S Kit is 6% of the normal human level.

Specificity

Specificity was done on known Protein S deficient plasmas and verified using a Double Diffusion (Ouchterlony) plate and various dilutions of antisera associated with coagulation proteins. The Helena Protein S Kit utilizes goat antihuman Protein S in optimum concentrations.

BIBLIOGRAPHY

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest, 29 Suppl 124:21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Schwarz H.P., et al, Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. Blood, 64:1297-1300, 1984.
4. Comp P.C., et al., Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. J Clin Invest, 74:2082-2088, 1984.
5. Comp P.C., et al., An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. Blood, 67:504-508, 1986.
6. Kamiya T., et al., Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. Blood, 67:406-410, 1986.
7. Dahlback, B., Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by thrombin. Biochem Jour, 209:827, 1983.

UTILISATION

La méthode Protéine S est utilisée pour déterminer la concentration en protéine S dans le plasma humain sous la forme de protéine libre et sous celle d'un complexe avec la protéine fixant le C4 (C-4 binding protein, C4bp) en utilisant l'électrophorèse en fusée par la méthode de Laurell^{1,2}.

La protéine S est une protéine plasmatique vitamine K dépendante qui agit en tant que puissant cofacteur pour la protéine C activée. Dans le mécanisme de coagulation, elle inhibe la formation de thrombine donnant lieu aux facteurs V et VIII:C. Des taux anormalement bas en protéine S sont trouvés chez les patients ayant un déficit congénital en protéine S^{3,6}, chez ceux souffrant de troubles hépatiques et chez ceux sous anticoagulants oraux. La complexité de la protéine S est illustrée par la formation d'un équilibre dynamique avec la protéine fixatrice du C4b, qui existe dans le plasma sous deux formes différentes^{4,5} : la première, une forme de bas poids moléculaire ayant peu d'affinité avec la protéine S et la seconde, une forme de haut poids moléculaire qui peut se lier à la protéine S en formant un complexe 1:1.

La protéine S libre représente environ 40% (10 mg/l) de la protéine S totale. Elle sert de vecteur pour l'activité anticoagulante et de cofacteur pour la protéine C activée. La protéine S formant un complexe avec la C4b-BP représente normalement environ 60% (15 mg/l) de la protéine S totale et elle n'a aucune activité anticoagulante.

La méthode d'EID en fusée de la protéine S Helena est réalisée sur un gel d'agarose à 1% contenant un antisérum spécifique de la protéine S. Une fois que les échantillons de plasma sont déposés dans les puits d'agarose, une électrophorèse est mise en œuvre pour faire migrer les protéines dans la zone des anticorps. Un arc de précipitine en forme de fusée se développe le long de l'axe de migration. La longueur de cette fusée est proportionnelle à la concentration en antigène.

Des études réalisées par Dahlback⁷ ont montré que l'ajout de PEG au plasma précipite le complexe avec la C4b-BP, mais pas la protéine S libre.

Le réactif Protéine S libre Helena sépare la forme libre de la forme liée, ce qui permet d'établir une corrélation entre le taux d'activité fonctionnelle et le taux immunologique de la protéine S libre.

PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostique *in vitro* uniquement. **NE PAS INGÉRER.** Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination. Un dépistage des produits à base de plasma a été réalisé et a donné un résultat négatif (sauf indication contraire sur la boîte du kit ou sur le flacon) pour les antigènes de l'hépatite B (AgHBs), les anticorps anti VIH 1 et 2 et les anticorps anti VHC ; il est malgré tout nécessaire de les manipuler avec les mêmes précautions que pour les échantillons de plasma humain.

COMPOSITION

1. Plaques d'EID en fusée, antigène de la protéine S (réf. 5359)

Contient des anticorps, d'origine ovine ou caprine, anti protéine S humaine incorporés à l'agarose dans un tampon tris-tricine et de l'azide de sodium comme conservateur. Afin d'éviter la formation de vapeurs toxiques, l'azide de sodium ne doit pas être mélangé avec des solutions acides.

Préparation : Enlever la plaque de l'emballage de protection et attendre 5-10 minutes que la température de l'agarose s'équilibre entre 15...30°C.

2. Tampon tris-tricine (réf. 5358, non inclus)

Une fois dilué, le tampon contient du tris à 0,081 M et de la tricine à 0,024 M.

Préparation : Diluer un sachet de tampon dans 1000ml d'eau désionisée. Le tampon est prêt à l'emploi lorsque la dissolution est complète.

3. Colorant d'EID en fusée (réf. 5362, non inclus)

Le colorant pour l'EID en fusée est du bleu de Coomassie brillant.

Préparation : Dissoudre le contenu d'un flacon avec 450ml d'eau désionisée, 450ml de méthanol et 100ml d'acide acétique. Bien mélanger et filtrer avant utilisation si nécessaire.

4. Réactif Protéine S libre (réf. 5363)

Le réactif contient du polyéthylène glycol à 25%. Le réactif est prêt à l'emploi.

5. Autres composants du kit

Chaque kit contient une fiche technique, une règle à fusée et une fiche de résultats.

STOCKAGE ET CONSERVATION

Les flacons de réactif non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée s'ils sont conservés dans les conditions indiquées sur l'étiquette du kit ou du flacon.

1. Plaques d'EID en fusée, antigène de la protéine S (réf. 5359)

Les plaques d'EID en fusée doivent être conservées entre 2...6°C dans l'emballage pour maintenir l'humidité. **NE PAS CONGELER**. Elles sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Signes de détérioration : Jeter la plaque si elle a séché ou si les puits ne sont pas ronds. Un aspect cristallin de l'agarose indique qu'elle a été congelée.

2. Tampon tris-tricine (réf. 5358)

Le tampon doit être conservé entre 15...30°C. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C.

Signes de détérioration : Jeter le tampon non reconstitué s'il présente des signes d'humidité ou de décoloration. Jeter le tampon reconstitué s'il devient trouble.

3. Colorant d'EID en fusée (réf. 5362)

Le colorant doit être conservé entre 15...30°C.

Signes de détérioration : En cas d'évaporation de méthanol, la surface du colorant émet un reflet brillant métallique. Jeter le colorant s'il ne colore pas correctement les fusées de protéines comme indiqué dans le protocole.

4. Réactif Protéine S libre (réf. 5363)

Le réactif doit être conservé entre 2...6°C ; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Signes de détérioration : Jeter le réactif s'il présente des signes de contamination microbienne.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 5358 Tampon tric-tricine

Réf. 5362 Colorant d'EID en fusée

Réf. 5363 Réactif Protéine S libre

Réf. 5185 Plasma de référence SARP

Réf. 4063 Chambre Titan Gel

Réf. 5014 Poids à développement

Réf. 1520 Générateur EWS

Réf. 5037 Blocs buvards

Réf. 9025 Dispositif de visualisation IEP VuBox

Réf. 5116 Appareil IOD (incubateur, étuve, sécheur)

Réf. 1558 Kit de multi-coloration TITAN GEL

Réf. 6210, 6211 Micropipette et capillaires (10ml)

Papier absorbant non pelucheux

Solution décolorante : Mélanger 200ml d'eau désionisée, 200ml de méthanol et 50ml d'acide acétique glacial.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre silicé. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 2000-3000 x g pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre 2...6°C. L'analyse doit être terminée dans les 2 heures suivant le prélèvement de l'échantillon ; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20°C ou un mois à -70°C. Décongeler rapidement à 37°C avant de réaliser l'analyse. Ne pas laisser à 37°C plus de 5 minutes.

MÉTHODOLOGIE

- i. Pour l'étape 1, observer le protocole approprié pour la détermination de la protéine S libre ou pour la détermination de la protéine S totale.

Détermination de la protéine S libre

- i. Tous les échantillons, y compris les étalons et les contrôles, doivent être prétraités en ajoutant 15 ml de réactif Protéine S libre à 85 ml de plasma. Il est possible de modifier les volumes, mais le rapport doit rester identique. NE PAS diluer les échantillons patients et de contrôle avant le prétraitement.
- ii. Vortexer chaque échantillon et placer sur de la glace durant 30 minutes.
- iii. Centrifuger chaque échantillon à au moins 1000 x g pendant 10 minutes. Réserver le surnageant pour les dilutions étalons et pour les dilutions patients.
- iv. Afin de préparer la courbe d'étalonnage, diluer le surnageant de l'étalon avec de la solution physiologique à 0,85% de la manière suivante.

Activité nominale en %	Dilution	Vol. de SARP	Vol. de s. physiologique à 0,85%
100%	Utiliser du SARP reconstitué non dilué		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3

- v. Passer à l'étape 2.

Détermination de la protéine S totale

- i. Reconstituer un flacon de SARP en ajoutant 1,0ml d'eau désionisée. Réaliser les dilutions suivantes afin de préparer la courbe d'étalonnage :

Activité nominale en %	Dilution	Vol. de SARP	Vol. de s. physiologique à 0,85%
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12,5%	1:8	1	7

- ii. Diluer chaque échantillon patient avec de la solution physiologique à 0,85%. Préparer une dilution au 1:2 (1 volume d'échantillon patient plus 1 volume de solution physiologique) et une dilution au 1:4 (1 volume de plasma du patient plus 3 volumes de solution physiologique). Il est possible que d'autres dilutions soient nécessaires suivant les cas. Il est possible qu'il soit nécessaire d'analyser les échantillons soupçonnés anormaux sans les diluer.
- iii. Passer à l'étape 2.

REMARQUE : Sortir la plaque du réfrigérateur et attendre environ 5–20 minutes pour que sa température s'équilibre entre 15...30°C et que l'excès d'humidité soit absorbé.

2. Verser 65ml de tampon tris-tricine dans chaque compartiment intérieur de la chambre.
3. Éliminer tout excès de tampon dans les puits de la plaque. Une humidité excessive sur la plaque risque de produire des fusées de mauvaise qualité.
4. Déposer 10ml de chaque dilution d'étalon ou d'échantillon patient dans le puits approprié. Il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage pour chaque plaque. **REMARQUE** : Il est conseillé de déposer en double les échantillons patients. Lors du dépôt des échantillons dans les puits de la plaque, veiller à ce que l'embout de la pipette ne touche pas les parois des puits car ils risqueraient d'être endommagés.
5. Attendre 5 minutes que les échantillons diffusent dans l'agarose.
6. Placer la plaque dans le compartiment intérieur de la chambre, agarose vers le bas, en appliquant une légère pression pour mettre le gel en place. Placer le ou les gels de sorte que les bords du gel soient dans le tampon et que les puits soient orientés vers la cathode (-) de la chambre.
7. Faire migrer les plaques à un courant constant de 16 mA par plaque pendant 3 heures.
8. Une fois l'électrophorèse terminée, enlever les plaques de la chambre. Jeter le tampon de la chambre après chaque analyse.

REMARQUE : Utiliser le kit de multi-coloration TITAN GEL (réf. 1558) comme chambre de coloration et de rinçage.

9. Rincer la plaque avec de l'eau désionisée et la laver dans de la solution physiologique à 0,85% toute la nuit.
10. Une fois ce lavage terminé, rincer la plaque avec de l'eau désionisée.
11. Placer la plaque, agarose vers le haut, sur une surface plane. Couvrir l'agarose avec un papier absorbant non pelucheux.
12. Placer 2 ou 3 blocs buvards et un poids à développement sur la plaque pendant 15 minutes puis les enlever.
13. Sécher la plaque dans une étuve de séchage entre 60...70°C pendant 10–20 minutes. Ne pas trop sécher la plaque. Elle doit être transparente une fois sèche.

REMARQUE : Si vous ne disposez pas d'étuve de séchage ou de dispositif similaire, il est possible de couvrir la plaque avec un papier absorbant non pelucheux humide et laisser sécher entre 15...30°C toute la nuit ou 3 heures sous un ventilateur.

14. Une fois le séchage terminé, colorer la plaque en la plongeant dans le colorant d'EID en fusée pendant 20 minutes.
15. Placer la plaque dans la solution décolorante pendant 1 à 3 minutes. **REMARQUE** : La décoloration est terminée dès que le fond de bande se distingue suffisamment des pics des fusées. Une décoloration excessive risquerait d'estomper les fusées, ce qui rendrait les mesures plus difficiles. S'il se produit une décoloration excessive, répéter l'étape 14 et colorer à nouveau les fusées.
16. Rincer la plaque dans deux bains d'eau désionisée de 5 à 10 minutes chacun.
17. Sécher la plaque à 37 °C pendant 5 minutes ou entre 15...30°C jusqu'à ce qu'elle soit sèche.
18. Placer la plaque dans le dispositif de visualisation Helena IEP VuBox en plaçant une feuille de papier blanc en bas de l'appareil pour mieux visualiser les fusées. Marquer le pic de chaque fusée avec un marqueur.
19. Mesurer à l'aide de la règle à fusée Helena la longueur de chaque pic en millimètres. La mesure doit s'effectuer entre la partie supérieure de chaque puits et le sommet de la fusée.

20. Tracer, point par point, une courbe d'étalonnage représentant la longueur de chaque fusée en fonction des valeurs des étalons sur la fiche de résultats des antigènes par EID en fusée ou sur du papier semi-logarithmique à 3 modules. Déterminer la droite de meilleur ajustement à partir des points d'étalonnage. Les figures 1 et 2 de la section INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS sont des exemples de plaque terminée et de courbe d'étalonnage tracée sur la fiche des résultats des antigènes par EID en fusée.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lire les résultats du patient à partir de la courbe d'étalonnage et les multiplier par le facteur de dilution correspondant. Si du plasma SARP est utilisé pour préparer la courbe d'étalonnage, les résultats du patient déterminés à partir de cette courbe doivent être multipliés par le taux assigné au plasma de référence ainsi que par le facteur de dilution.

Résultat du patient à partir de la courbe = 30%

Facteur de dilution = 2

Taux assigné au SARP = 98%

Facteur réel du patient

Antigène de la protéine S = $30\% \times 2 \times 0,98 = 58,8\%$

Les échantillons présentant des taux d'antigènes de protéine S dépassant l'intervalle de la courbe d'étalonnage doivent être analysés à nouveau en utilisant des dilutions appropriées.

Figure 1 : Fusées sur une plaque d'EID en fusée pour les antigènes de la protéine S. Les longueurs des fusées (en millimètres) des dilutions d'étalons sont utilisées pour préparer la courbe d'étalonnage. Les résultats du patient sont obtenus à partir de la courbe.

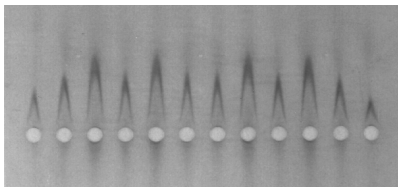
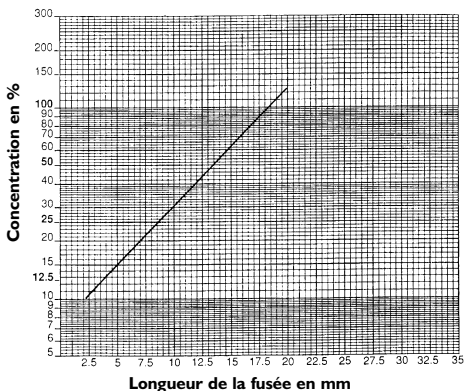


Figure 2 : Courbe d'étalonnage représentative préparée avec du plasma SARP sur du papier semi-logarithmique à 3 modules.



Toute diminution du taux de protéine S, quelle congénitale ou acquise, entraîne une augmentation du risque de thrombo-embolie. Des épisodes thrombotiques à répétition ont lieu en raison de la diminution du potentiel anticoagulant^{3,6}.

Les taux de protéine S sont diminués dans les cas suivants :

* Déficit congénital en protéine S^{3,6}.

- Type I : indiqué par une diminution de l'activité anticoagulante (protéine S libre) et par un taux normal ou légèrement diminué d'antigène.
- Type II : indiqué par une diminution significative de l'activité fonctionnelle et du taux d'antigène de la protéine S.

* Troubles hépatiques.

* Thérapie avec anticoagulants oraux.

CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité. Les plasmas de contrôle, normaux et anormaux, doivent être testés avant chaque lot d'échantillons patients afin de s'assurer que l'instrument et l'opérateur offrent des performances satisfaisantes. S'ils ne donnent pas les résultats prévus, les résultats du patient doivent être considérés comme non valables.

Helena BioSciences distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit :

Réf. 5301 SAC1

Réf. 5302 SAC2

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les valeurs de référence peuvent varier d'un laboratoire à l'autre suivant les techniques et les systèmes utilisés. C'est pour cette raison qu'il appartient à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs usuelles.

Le taux d'antigène de la protéine S est en général exprimé en un pourcentage relatif par rapport à un pool de plasma normal.

Protéines totales : L'étude pour déterminer les valeurs usuelles a été réalisée à partir de cinquante adultes sains, 25 hommes et 25 femmes. Pour le taux d'antigène de la protéine S, le résultat est identique quel que soit le sexe. L'intervalle des valeurs usuelles pour l'antigène de la protéine S par électro-immunodiffusion est de 60–150%.

Les échantillons proviennent de donateurs d'entre 18 et 65 ans, en bonne santé, n'ayant subis aucune intervention chirurgicale au cours des 6 derniers mois, ayant des températures, des hémoglobines, des hématocrites normaux et ne prenant aucun médicament (c.-à-d. antibiotiques).

Protéine S libre : Le taux normal de protéine S libre se situe avec cette méthode sur l'intervalle 57% – 120%. Helena a analysé 31 plasmas et a déterminé une concentration se situant entre 42% et 147%. Il appartient donc à chaque laboratoire déterminer ses propres valeurs usuelles avec le protocole, mais il faut savoir qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune valeur usuelle mondialement admises pour l'antigène de la protéine S.

LIMITES

Une concentration d'héparine dans l'échantillon allant jusqu'à 10 UI/ml n'affecte pas les résultats du dosage de l'antigène de la protéine S Helena. Les patients sous anticoagulants oraux présentent une diminution marquée du taux d'antigène de la protéine S. Le taux de protéine S libre n'altère pas la mesure de la protéine S totale. Il n'a pas été établi que d'autres substances interfèrent avec la méthode.

PERFORMANCES

Helena BioSciences ou ses représentants ont déterminé à titre indicatif les performances suivantes. Chaque laboratoire doit établir ses propres données de performance.

Précision

Des études de précision ont été réalisées avec un contrôle analysé plusieurs fois sur une plaque.

	Intra-analyse :		Inter-analyses :	
	Total S	Libre S	Total S	Libre S
moyen	98,1	50,8	98,4	52,2
Écart-type	2,8	2,7	2,8	3,5
CV%	2,3	5,2	5,6	6,7
n	8	5	18	15

Comparaison :

Des études de corrélation ont été réalisées en utilisant la méthode Helena Protéine S et une méthode de référence. Les échantillons utilisés répondent aux mêmes critères que ceux ayant servi à déterminer les valeurs usuelles. Voici les résultats correspondants :

	Total S		Libre S
n	= 49	31	Y = Helena Protéine S
Y	= 0,917X + 6,975	0,981X + 0,498	X = Méthode de référence
r	= 0,849		0,906

Sensibilité

La sensibilité de la méthode est exprimée par un pourcentage relatif par rapport à un plasma provenant d'un pool normal, comme le SARP. Les échantillons donnant des taux dépassant l'intervalle de la courbe d'étalonnage doivent être dilués puis analysés à nouveau. Le seuil de sensibilité du kit Helena Protéine S est de 6% chez un sujet normal.

Spécificité

La spécificité a été déterminée avec des plasmas déficients en protéine S et vérifiée en utilisant une plaque à double diffusion (méthode d'Ouchterlony) et plusieurs dilutions d'antisérums associés avec des protéines de coagulation. Le kit Helena Protéine S utilise une concentration optimale de sérum d'origine caprine anti protéine S humaine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Laurell, C. B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest 29 Suppl 124 : 21-37, 1972.
2. Laurell, C. B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15 : 45-52, 1966.
3. Schwarz H. P., et al, Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. Blood, 64 : 1297-1300, 1984.
4. Comp P. C., et al., Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. J Clin Invest, 74 : 2082-2088, 1984.
5. Comp P. C., et al., An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. Blood, 67 : 504-508, 1986.
6. Kamiya T., et al., Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. Blood, 67 : 406-410, 1986.
7. Dahlback, B., Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by thrombin. Biochem Jour, 209 : 827, 1983.

ANWENDUNGSBEREICH

Das Protein S-Verfahren wird zur Bestimmung der Konzentration von Protein S in humanem Plasma als freies Protein und als Komplex mit der Komplementkomponente C-4-bindendes Protein (C4bP) mit Hilfe der Laurell Rocket-Elektrophorese verwendet^{1,2}.

Protein S ist ein Vitamin K-abhängiges Plasmaprotein, das für aktiviertes Protein C als ein starker Ko-Faktor fungiert. Im Gerinnungsprozess hemmt es die Bildung von Thrombin, wobei es die Faktoren V und VIII:C bildet. Abnorm niedrige Protein S-Werte findet man bei angeborenem Protein S-Mangel^{3,4}, Leberkrankheiten und bei Patienten mit oraler Antikoagulanzen-Therapie. Die Komplexität des Protein S wird durch die Ausbildung eines dynamischen Gleichgewichts mit dem C4b - bindenden Protein dargestellt. C4b - BP kann in zwei verschiedenen Formen im Plasma vorkommen^{4,5}. Die erste davon ist eine Form mit niedrigem Molekulargewicht, die keine Affinität zum Protein S besitzt. Die zweite Form weist ein hohes Molekulargewicht auf, das Protein S 1:1 als Komplex binden kann.

Freies Protein S stellt ungefähr 40 % (10 mg/l) des Gesamt-Protein S dar. Es fungiert als Träger der Gerinnungsaktivität und als der Ko-Faktor für aktiviertes Protein C. Das C4b - BP gebundene Protein S macht normalerweise 60 % (15 mg/l) des Gesamt-Protein S aus und hat keine Gerinnungsaktivität. Das Helena Protein S-Rocket-IE Verfahren wird in einem 1 % Agarose-Gel-Medium, das ein spezifisches Protein S-Antiserum enthält, durchgeführt. Nach dem pipettieren der Plasmaproben in die Stanzlöcher der Agarose werden die Proteine mit Hilfe von Elektrophorese in den Antikörperbereich diffundiert. Entlang der Migrationsachse bildet sich ein raketenförmiges Präzipitationsmuster. Die Länge dieses „Rocket“-Musters entspricht dabei der Antigenkonzentration. Studien von Dahlback⁷ zeigten, dass der Zusatz von PEG zum Plasma wohl den C4b - BP Komplex, jedoch nicht freies Protein S präzipitiert.

Das freie Protein S-Reagenz von Helena trennt freies von gebundenem Protein S und gestattet so eine Korrelation zwischen funktionaler Protein S-Aktivität und immunologischen Konzentrationen an freiem Protein S.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Reagenzien dieses Kits sind nur zur *in-vitro* Diagnostik bestimmt. – **NICHT EINNEHMEN.** Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Siehe die Sicherheitsdatenblätter mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie Informationen zur Entsorgung. Die Plasmaprodukte sind mit negativem Befund auf Hepatitis B Antigen (HBsAg), HIV-1 und HIV-2 Antikörper und HCV-Antikörper getestet worden (wenn nicht auf Kit-Verpackung oder Fläschchen anders bezeichnet). Sie sollten trotzdem mit derselben Vorsicht wie humane Plasmaproben behandelt werden.

INHALT

1. Protein S-Antigen Rocket-Platten (Kat. Nr. 5359)

Enthält Antikörper gegen humanes Protein S von Schaf oder Ziege eingebettet in Agarose in einem Tris-Tricine-Puffer und Natriumazid als Konservierungsmittel. Zur Vermeidung toxischer Dämpfe sollte Natriumazid nicht mit säurehaltigen Lösungen vermischt werden.

Vorbereitung: Die Platte aus der Schutzverpackung nehmen und die Agarose 5-10 Minuten auf 15...30°C aufwärmen lassen.

2. Tris-Tricine-Puffer (Kat. Nr. 5358 – nicht mitgeliefert)

Verdünnt enthält der Puffer 0,081 mol Tris und 0,024 mol Tricine.

Vorbereitung: Eine Packung Puffer mit entionisiertem Wasser auf 1000ml verdünnen. Der Puffer ist gebrauchsfertig, wenn das ganze Material vollständig aufgelöst ist.

3. Rocket-Farbstoff (Kat. Nr. 5362 - nicht mitgeliefert)

Der Rocket-Farbstoff besteht aus Coomassie Brilliant Blue.

Vorbereitung: Den Inhalt eines Fläschchens in 450ml entionisiertes Wasser, 450ml Methanol und 100ml Essigsäure auflösen. Sehr gut mischen und falls nötig filtrieren.

4. Freies Protein S-Reagenz (Kat. Nr. 5363)

Das Reagenz enthält 25% Polyethylenglycol. Das Reagenz ist gebrauchsfertig verpackt.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Reagenz enthält eine Gebrauchsanweisung, einen Rocket-Lineal und ein Befundformblatt.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Ungeöffnete Reagenzien sind unter den auf Verpackung oder Fläschchen angegebenen Lagerbedingungen bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

1. Protein S-Antigen Rocket-Platten (Kat. Nr. 5359)

Die Rocket-Platten müssen feucht im Beutel bei 2...6°C gelagert werden. **NICHT EINFRIEREN.** Die Platten sind bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil.

Anzeichen für Verfall: Die Platten verwerfen, wenn sie angetrocknet oder die Vertiefungen nicht ganz rund sind. Kristallisierung weist darauf hin, dass die Agarose eingefroren wurde.

2. Tris-Tricine-Puffer (Kat. Nr. 5358)

Der Puffer sollte bei 15...30°C gelagert werden. Verdünnter Puffer ist bei 15...30°C 2 Monate stabil.

Anzeichen für Verfall: Verpackten Puffer verwerfen, wenn er Anzeichen von Feuchtigkeit oder Verfärbung zeigt. Verdünnten Puffer verwerfen, wenn er trübe aussieht.

3. Rocket-Farbstoff (Kat. Nr. 5362)

Der Farbstoff sollte bei 15...30°C gelagert werden.

Anzeichen für Verfall: Verdunstung von Methanol hinterlässt auf der Farbstoffoberfläche einen metallischen Schimmer. Farbstoff verwerfen, sollte er die Protein-Rockets nicht ausreichend, wie in diesem Verfahren beschrieben, anfärben.

4. Freies Protein S-Reagenz (Kat. Nr. 5363)

Das Reagenz sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

Anzeichen für Verfall: Reagenz verwerfen, wenn es Anzeichen für eine mikrobielle Kontamination gibt.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 5358 Tris-Tricine-Puffer

Kat. Nr. 5362 Rocket-Farbstoff

Kat. Nr. 5363 Freies Protein S-Reagenz

Kat. Nr. 5185 SARP Referenzplasma

Kat. Nr. 4063 Titan Gel Kammer

Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

Kat. Nr. 1520 EWS Netzteil

Kat. Nr. 5037 Blotter Pads

Kat. Nr. 9025 IEP VuBox

Kat. Nr. 5116 I.O.D. - Inkubator, Trockenschrank, Trockner

Kat. Nr. 1558 TITAN GEL Multifärbe-Set

Kat. 6210, 6211 Mikrodispenser und Röhrchen (10ml)

Fusselfreie Papiertücher

Entfärbelösung: 200ml entionisiertes Wasser, 200ml Methanol und 50ml Eisessig mischen.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Plastik oder Silikonglas verwenden. Blut (9 Teile) sollte in 3,2 % oder 3,8 % Natriumcitrat als Antikoagulanzen (1 Teil) entnommen werden. 15 Minuten bei 2000-3000 g zentrifugieren und Plasma abpipettieren. Plasma bei 2...6°C lagern. Plasma sollte innerhalb von 2 Stunden verarbeitet oder tief gefroren bei -20°C für 2 Wochen oder -70°C für einen Monat gelagert werden. Vor dem Testen schnell bei 37°C auftauen. Nicht länger als 5 Minuten bei 37°C belassen.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

- I. Für Schritt I der Anleitung zur Bestimmung des freien oder Gesamt-Protein S befolgen.

Bestimmung des freien Protein S

- Alle Proben einschließlich Standard und Kontrollen müssen durch Zugabe von 15µl freies Protein S-Reagenz zu 85µl Plasma vorbehandelt werden. Diese Volumina können abgeändert werden, das Verhältnis muss aber bestehen bleiben. Die Patienten- und Kontrollproben vor Vorbehandlung NICHT verdünnen.
- Jede Probe mit dem Vortex-Mischer mischen und 30 Minuten auf Eis stehen lassen.
- Jede Probe 10 Minuten bei mindestens 1000 x g zentrifugieren. Den Überstand für Standard- und Patientenverdünnungen aufheben.
- Zur Erstellung einer Standardkurve den Überstand des Standards gemäß folgender Anleitung mit 0,85% Kochsalz verdünnen.

Nominale prozentuale Aktivität	Verdünnung	Teile S.A.R.P.	Teile 0,85 % Kochsalz
100%	rekonstituiertes S.A.R.P. unverdünnt verwenden		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3

- v. Weiter mit Schritt 2.

Gesamt Protein S-Bestimmung

- Ein Fläschchen S.A.R.P. mit 1,0ml entionisiertem Wasser rekonstituieren. Zur Herstellung der Standardkurve Verdünnungen wie folgt herstellen:
- Patientenproben mit 0,85% Kochsalz verdünnen. Eine 1:2 Verdünnung (1 Teil Patientenprobe und 1 Teil Kochsalz) und eine 1:4 Verdünnung (1 Teil Patientenplasma und 3 Teile Kochsalz) vorbereiten. Je nach Patientenanamnese können weitere Verdünnungen erforderlich sein. Proben mit Verdacht auf abnormale Werte müssen möglicherweise unverdünnt getestet werden.

Nominale prozentuale Aktivität	Verdünnung	Teile S.A.R.P.	Teile 0,85 % Kochsalz
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12,5%	1:8	1	7

- iii. Weiter mit Schritt 2

BITTE BEACHTEN: Platte aus dem Kühlschrank nehmen, circa 5-20 Minuten auf 15...30°C aufwärmen lassen und überschüssige Feuchtigkeit vor Gebrauch aufsaugen.

- 65ml Tris-Tricine-Puffer in jede der inneren Kammerbereiche gießen.
- Überschüssigen Puffer aus den Stanzlöchern der Platte entfernen. Überschüssige Flüssigkeit auf der Platte kann zu schlechten Ergebnissen führen.

4. 10µl Patientenprobe oder Verdünnung in die entsprechenden Stanzlöcher geben. Auf jeder Platte müssen Proben für die Standardkurve mitlaufen. **BITTE BEACHTEN:** Ein Doppelansatz der Patientenproben wird empfohlen. Beim Pipettieren der Proben in die Stanzlöcher der Platte darauf achten, dass die Pipettenspitze nicht die Wände berührt, da das Gel dadurch beschädigt werden kann.
5. Die Proben 5 Minuten in die Agarose diffundieren lassen.
6. Das Gel mit der Agarose-Seite nach unten durch sanftes Hineindrücken in den inneren Kammerbereich legen. Das Gel / die Gele so positionieren, dass die Kanten des Agars im Puffer und die Stanzlöcher zur Kathodeseite (-) der Kammer zeigen.
7. Die Elektrophorese der Platten bei einem Konstantstrom von 16 mA pro Platte 3 Stunden laufen lassen.
8. Die Platten nach Elektrophorese aus der Kammer nehmen. Den Kammerpuffer nach jedem Lauf verwerfen.
BITTE BEACHTEN: Das TITAN GEL Multifarbe-Set (Kat. Nr. 1558) als Färbe- und Spülkammer verwenden.
9. Die Platte mit entionisiertem Wasser abspülen und in 0,85% Kochsalz über Nacht waschen.
10. Nach dem Waschvorgang über Nacht die Platte noch mal mit entionisiertem Wasser abspülen
11. Die Platte mit der Agarose-Seite nach oben auf eine gerade Oberfläche legen. Die Agarose mit einem einzigen, fusselfreien Papiertuch abdecken.
12. Für 15 Minuten 2-3 Blotter Pads mit einem Entwicklungsgewicht darauf auf die Platte legen und wieder entfernen.
13. Die Platte 10-20 Minuten in einem Trockenschrank bei 60...70°C trocknen. Die Platten nicht zu lange trocknen lassen. Vollständig getrocknet ist die Platte transparent.
BITTE BEACHTEN: Steht kein Trockenschrank zur Verfügung können die Platten, abgedeckt mit nassen, fusselfreien Papiertücher über Nacht bei 15...30°C trocknen oder 3 Stunden bei 15...30°C je nach Klimelage.
14. Nach dem Trocknen die Platte durch Eintauchen in den Rocket-Farbstoff 20 Minuten färben.
15. Die Platte 1-3 Minuten in Entfärbelösung geben. **BITTE BEACHTEN:** Sobald der Hintergrund für ein leichtes Differenzieren der Rockets klar genug ist, ist der Entfärbeprozess beendet. Übermäßiges Entfärben kann die Rockets verblassen lassen und damit eine korrekte Messung erschweren. Bei einem übermäßigen Entfärben den Schritt 14 wiederholen und die Rockets neu anfärben.
16. Die Platte zweimal für jeweils 5-10 Minuten in entionisiertem Wasser spülen.
17. Die Platten bei 37°C 5 Minuten trocknen lassen oder bei 15...30°C bis sie trocken sind.
18. Die Platte auf die Helena I.E.P. VuBox legen, der zuvor zum leichteren Ablesen der Rockets ein Bogen weißes Papier untergelegt wurde. Die Spitze der einzelnen Rockets mit einem Marker markieren.
19. Mit dem Helena Rocket-Lineal die Länge der einzelnen Peaks in Millimeter messen. Eine Peak wird von der oberen Kante des Stanzlochs bis zur Spitze des Rockets gemessen.
20. Die Werte der Standardkurve gegen die einzelnen Rocket-Längen auf dem Rocket Antigen-Befundblatt oder 3-zyklischen halblogarithmischem Papier auftragen. Durch diese vier Standardpunkte eine Ausgleichsgerade ziehen. Siehe Abbildungen 1 und 2 unter AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE für ein Beispiel einer fertigen Rocket-Platte und einer auf einem Rocket Antigen-Befundblatt erstellten Standardkurve.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Patientenwerte aus der Standardkurve ablesen und jeden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multiplizieren. Bei Verwendung von S.A.R.P. für die Standardkurve muss der aus dieser Kurve abgelesene Patientenwert mit dem zugeordneten Wert des Protein C-Antigens der entsprechenden Charge des S.A.R.P. sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Patientenwert aus der Kurve = 30 %

Verdünnungsfaktor = 2

S.A.R.P. zugeordneter Wert = 98 %

Tatsächlicher Patienten-Faktor

Protein S-Antigen = $30 \% \times 2 \times 0,98 = 58,8 \%$

Patientenproben mit Werten von Protein S-Antigen außerhalb des Bereichs der Standardkurve müssen in entsprechender Verdünnung wiederholt getestet werden.

Abbildung 1: Rocket-Muster einer Protein S-Antigen Rocket-Platte. Die Länge der Rockets (in Millimeter) der Standard-Verdünnungen werden zur Erstellung der Standardkurve verwendet. Die Patientenwerte liest man aus dieser Kurve ab.

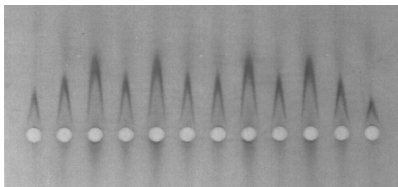
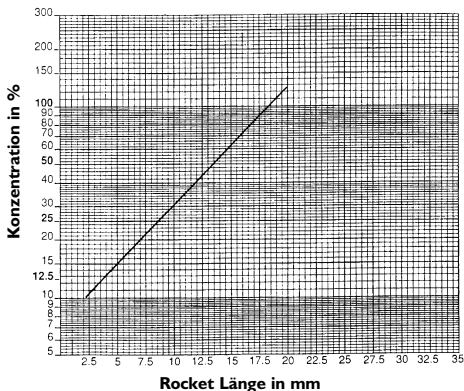


Abbildung 2: Eine repräsentative, mit S.A.R.P. hergestellte Standardkurve auf 3-zyklischem halblogarithmischem Papier.



Jede Verminderung des Protein S, ob angeboren oder erworben, verursacht ein erhöhtes Risiko auf Thromboembolien. Wiederkehrende thrombotische Episoden treten aufgrund einer Abnahme des Gerinnungspotenzials auf^{3,6}.

Protein S-Werte sind vermindert bei:

- * angeborener Protein S Mangel^{3,6}.
- Typ I, gekennzeichnet durch eine Verminderung in der Gerinnungsaktivität (freies Protein S) und einem normalen bis leicht verminderten Antigen Spiegel.
- Typ II, gekennzeichnet durch eine signifikante Verminderung sowohl der Aktivität als auch des Antigen spiegels des Protein S.
- * Lebererkrankungen.
- * Orale Antikoagulanzen-Therapie.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor muss für eine eigene Qualitätskontrolle sorgen. Vor jeder Testreihe mit Patientenproben müssen normale und abnormale Kontrollplasmen getestet werden, um eine zufrieden stellende Geräteleistung und Bedienung zu gewährleisten. Liegen die Kontrollen außerhalb des Normbereichs, sind die Patientenergebnisse nicht zu verwenden.

In Verbindung mit diesem Produkt bietet Helena BioSciences die folgenden Kontrollen an:

Kat. Nr. 5301 SAC 1

Kat. Nr. 5302 SAC 2

REFERENZWERTE

Referenzwerte können je nach Technik und verwendetem System von Labor zu Labor unterschiedlich sein. Aus diesem Grund sollte jedes Labor seinen eigenen Normalwertbereich erstellen.

Die Werte des Protein S-Antigens werden in der Regel als relative Prozentsätze im Vergleich mit einem gepoolten, normalen Plasma-Standard ausgedrückt.

Gesamtproteine: Die Normalbereichsstudie setzte sich aus fünfzig (50) normalen, gesunden Erwachsenen, 25 Männern und 25 Frauen zusammen. Es gab keinen Anhalt für einen Unterschied zwischen gesunden Männern und Frauen im Bereich der Protein S-Antigenwerte. Der erwartete Normalbereich für Protein S-Antigen mit der Rocket-Elektrophorese betrug 60-150%.

Diese Proben kamen von Spendern, die zwischen 18 und 65 Jahre alt und in gutem Gesundheitszustand waren, die während der vergangenen 6 Monate nicht operiert wurden, mit normalen Hämoglobin-, Hämatokrit- und Temperaturwerten, und die keine Medikamente wie z. B. Antibiotika einnahmen.

Freies Protein S: Normale, mit dieser Methode ermittelten, freien Protein S-Werte lagen zwischen 57% - 120%⁵. Helena testete 31 Plasmen und bestimmte eine tatsächliche Probenkonzentration von 42% bis 147%. Jedes Labor sollte für dieses Verfahren seinen eigenen Normalwertbereich erstellen, wohl wissend, dass es zurzeit noch keinen akzeptierten internationalen Standard für das Protein S-Antigen gibt.

EINSCHRÄNKUNGEN

Heparin-Proben mit Werten bis zu 10IU/ml beeinträchtigen die Ergebnisse des Helena Protein S-Antigentests nicht. Patienten mit oraler Antikoagulanzen-Therapie weisen einen merklich verringerten Protein S-Antigenwert auf. Die Werte des freien Protein S beeinträchtigen die Messung des Gesamt-Protein S nicht. Es sind keine Substanzen bekannt, die diese Methode stören.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die folgenden Leistungseigenschaften wurden von Helena BioSciences oder in ihrem Auftrag als Richtlinien ermittelt. Jedes Labor muss seine eigenen Werte ermitteln.

Präzision

Studien wurden wiederholt mit einem Kontrollmaterial auf einer Platte durchgeführt.

	Innerhalb eines Laufs:		Zwischen den Läufen:	
	Gesamt-S	Freies S	Gesamt-S	Freies S
\bar{X}	98,1	50,8	98,4	52,2
s	2,8	2,7	2,8	3,5
VK%	2,3	5,2	5,6	6,7
N	8	5	18	15

Vergleich

Mit dem Helena Protein S-System und einer Referenzmethode wurden Korrelationsstudien durchgeführt. Die Proben entsprachen den Kriterien der Normalbereichsstudie. Folgende Daten wurden erhalten.

	Gesamt-S		Freies S
N	= 49	31	Y = Helena Protein S
Y	= 0,917X + 6,975	0,981X + 0,498	X = Referenzmethode
R	= 0,849		0,906

Empfindlichkeit

Die Sensibilität dieser Methode wird in relativen prozentualen Anteilen mit einem Pool aus Normalplasmen wie S.A.R.P. verglichen. Patientenwerte über dem höchsten Wert der normalen Standardkurve müssen verdünnt und erneut getestet werden. Der Schwellenwert der Sensibilität für das Helena Protein S-Kit liegt bei 6% des normalen humanen Werts.

Spezifität

Die Spezifität wurde an bekannten Protein S-Mangelplasmen durchgeführt und mit einer doppelten Geldiffusion nach Ouchterlony und in mehreren Verdünnungen von mit Gerinnungsproteinen assoziierten Antiseren verifiziert. Das Helena Protein S-Kit verwendet in optimaler Konzentration Anti-Human Protein S von der Ziege.

LITERATUR

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest, 29 Suppl 124:21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Schwarz H.P., et al, Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. Blood, 64:1297-1300, 1984.
4. Comp P.C., et al., Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. J Clin Invest, 74:2082-2088, 1984.
5. Comp P.C., et al., An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. Blood, 67:504-508, 1986.
6. Kamiya T., et al., Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. Blood, 67:406-410, 1986.
7. Dahlback, B., Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by thrombin. Biochem Jour, 209:827, 1983.

PRINCIPIO

La procedura per la proteina S è utilizzata per determinare la concentrazione della proteina S nel plasma umano sia come proteina libera che come proteina legante il componente del complemento C-4 (C4bp) con l'impiego della rocket elettroforesi di Laurell^{1,2}.

La proteina S è una proteina plasmatica vitamina K-dipendente che funge da potente cofattore della proteina C attivata. Nel processo di coagulazione, essa inibisce la formazione di trombina e produce i fattori V e VIII:C. Livelli di proteina S bassi in modo anomalo sono riscontrati nella deficienza congenita di proteina S^{3,6}, nei disordini epatici e nei pazienti in terapia anticoagulante orale. La complessità della proteina S è illustrata dalla formazione di un equilibrio dinamico con la proteina legante la C4b. La C4b - BP è riscontrabile nel plasma in due forme diverse^{4,5}. La prima è una forma a basso peso molecolare che non presenta alcuna affinità per la proteina S. La seconda è una forma ad alto peso molecolare che può legare la proteina S in un complesso 1:1.

La proteina S libera rappresenta circa il 40% (10mg/l) della proteina S totale. Essa funge da carrier dell'attività anticoagulante e da cofattore per la proteina C attivata. La proteina S legata alla C4b - BP rappresenta normalmente il 60% (15mg/l) circa della proteina S totale e non ha alcuna attività anticoagulante.

La procedura Rocket EID per la proteina S Helena è eseguita in un terreno con gel di agarosio all'1% contenente un antisiero specifico per la proteina S. Dopo aver applicato i campioni di plasma ai pozzetti nell'agarosio, si utilizza l'elettroforesi per far migrare le proteine nel campo dell'anticorpo. Lungo l'asse di migrazione si costituisce un pattern della precipitina a forma di razzo (rocket). La lunghezza di tale pattern a forma di razzo è proporzionale alla concentrazione di antigene.

Gli studi condotti da Dahlback⁷ dimostrarono che l'aggiunta di PEG al plasma determinava la precipitazione del complesso C4b - BP, ma non della proteina S libera.

Il reagente per proteina S libera Helena separa la proteina S libera da quella legata e consente in questo modo di mettere in relazione l'attività funzionale della proteina S con i livelli immunologici della proteina S libera.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica *in vitro* - **NON INGERIRE**. Indossare i guanti durante la manipolazione di tutti i componenti del kit. Fare riferimento alle schede tecniche e ai dati di sicurezza per le avvertenze sulla sicurezza e sui rischi e per le informazioni sullo smaltimento. I prodotti plasmatici sono stati esaminati dando esito negativo (salvo diversamente indicato sulla confezione del kit o sul flacone) relativamente alla presenza dell'antigene dell'epatite B (HbsAg), dell'anticorpo anti-HIV 1 e 2 e dell'anticorpo anti-HCV; questi prodotti devono tuttavia essere manipolati con le stesse misure precauzionali adottate per un campione di plasma umano.

COMPOSIZIONE

I. Piastre rocket per l'antigene della proteina S (Cod. N. 5359)

Ogni piastra contiene anticorpo di ovino o caprino diretto verso la proteina S incorporata nell'agarosio in tampone Tris-tricina8 e sodio azide come conservante. Per prevenire la formazione di vapori tossici, la sodio azide non deve essere miscelata con soluzioni acide.

Preparazione: Togliere la piastra dalla confezione di protezione ed attendere 5-10 minuti per consentire all'agarosio di raggiungere 15...30°C.

ROCKET EID PER L'ANTIGENE DELLA PROTEINA S

2. **Tampone Tris-tricina (Cod. N. 5358 - non compreso)**

A diluizione avvenuta il tampone contiene 0,081M di Tris e 0,024M di tricina.

Preparazione: Diluire una confezione di tampone a 1000ml con acqua deionizzata. Il tampone è pronto per l'uso non appena tutto il materiale appare completamente disciolto.

3. **Colorazione rocket (Cod. N. 5362 - non compreso)**

La colorazione Rocket è Coomassie Brilliant Blue.

Preparazione: Dissolvere il contenuto di un flacone in 450ml di acqua deionizzata, 450ml di metanolo e 100ml di acido acetico. Miscelare bene e filtrare prima dell'uso se necessario.

4. **Reagente per proteina S libera (Cod. N. 5363)**

Il reagente contiene 25% di polietilenglicole. Il reagente è in confezione pronta all'uso.

5. **Altri componenti del kit**

Ogni reagente contiene le istruzioni per l'uso, una riga per rocket e un modulo di resoconto.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I reagenti non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati nelle condizioni riportate sul flacone o sull'etichetta del kit.

1. **Piastre rocket per l'antigene della proteina S (Cod. N. 5359)**

Le piastre rocket devono essere conservate a 2...6°C e mantenute in condizioni di umidità all'interno della busta. **NON CONGELARE.** Le piastre sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Segni di deterioramento: Gettare la piastra se è secca e se i pozzetti non sono rotondi. Un aspetto cristallino è indicativo di un congelamento dell'agarosio.

2. **Tampone Tris-tricina (Cod. N. 5358)**

Il tampone deve essere conservato a 15...30°C. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi se conservato a 15...30°C.

Segni di deterioramento: Gettare il tampone confezionato se il materiale mostra segni di umidità o scolorimento. Gettare il tampone diluito se diventa torbido.

3. **Colorazione rocket (Cod. N. 5362)**

Il colorante deve essere conservato al buio a 15...30°C.

Segni di deterioramento: Se il metanolo evapora, sarà visibile una lucentezza metallica sulla superficie del colorante. Gettare il colorante se non colora adeguatamente i rocket di proteine come descritto in questa procedura.

4. **Reagente per proteina S libera (Cod. N. 5363)**

Il reagente deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Segni di deterioramento: Gettare il reagente se presenta segni di contaminazione microbica.

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

Cod. N. 5358 Tampone Tris - Tricina

Cod. N. 5362 Colorazione Rocket

Cod. N. 5363 Reagente per proteina S libera

Cod. N. 5185 Plasma di riferimento SARP

Cod. N. 4063 Camera Titan Gel

Cod. N. 5014 Peso di sviluppo

Cod. N. 1520 Alimentatore EWS

Cod. N. 5037 Compresse per Blotter

Cod. N. 9025 IEP VuBox

Cod. N. 5116 I.F.E. - Incubatore, forno, essiccatore

Cod. N. 1558 Set a più coloranti TITAN GEL

Cod. 6210, 6211 Microdispenser e provette (10ml)

Salvietta non filacciosa

Soluzione decolorante: Miscelare 200ml di acqua deionizzata, 200ml di metanolo e 50ml di acido acetico glaciale.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro siliconizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodio citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 2000-3000 x g per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a 2...6°C. I test devono essere completati entro 2 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per un mese. Decongelare rapidamente a 37°C prima di eseguire i test. Non conservare a 37°C per oltre 5 minuti.

PROCEDURA

I. Per il punto 1 seguire la procedura indicata per la determinazione della proteina S libera o per la determinazione della proteina S totale.

Determinazione della proteina S libera

- i. Tutti i campioni, compresi il materiale standard ed i controlli, devono essere pretrattati con l'aggiunta di 15ml di reagente per proteina S libera a 85ml di plasma. Questi volumi possono essere cambiati ma il rapporto deve rimanere invariato. NON diluire i campioni dei pazienti e i controlli prima del pretrattamento.
- ii. Miscelare ogni campione con il Vortex e collocare su ghiaccio per 30 minuti.
- iii. Centrifugare ogni campione alla velocità minima di 1000xg per 10 minuti. Riservare il surnatante per le diluizioni standard e le diluizioni dei pazienti.
- iv. Per creare la curva standard, diluire il surnatante del materiale standard con 0,85% di salina in base alle istruzioni riportate di seguito.

Attività percentuale nominale	Diluizione	Parti S.A.R.P.	Parti di salina allo 0,85%
100%		Usare S.A.R.P. ricostituita non diluita.	
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3

v. Passare al punto 2.

Determinazione della proteina S totale

i. Ricostituire un flacone di S.A.R.P. con 1,0 ml di acqua deionizzata. Eseguire le diluizioni per la preparazione della curva standard nel seguente modo:

Attività percentuale nominale	Diluizione	Parti S.A.R.P.	Parti di salina allo 0,85%
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12,5%	1:8	1	7

ROCKET EID PER L'ANTIGENE DELLA PROTEINA S

- ii. Diluire ogni campione del paziente con 0,85% di salina. Preparare una diluizione 1:2 (1 parte di campione paziente e 1 parte di salina) ed una diluizione 1:4 (1 parte di plasma paziente e 3 parti di salina). In base all'anamnesi del paziente possono rendersi necessarie ulteriori diluizioni. I campioni anomali sospetti possono richiedere l'esecuzione del test senza diluizione.
- iii. Passare al punto 2.

NOTA: Togliere la piastra dal frigorifero, lasciare trascorrere circa 5-20 minuti affinché la piastra raggiunga 15...30°C e l'umidità in eccesso venga assorbita prima dell'uso.

2. Versare 65 ml di tampone Tris-tricina in ogni sezione interna della camera.
3. Eliminare ogni eccesso di tampone dai pozzetti della piastra. La presenza di umidità in eccesso sulla piastra può determinare rocket scadenti.
4. Applicare 10ml di ogni campione paziente o di diluizione al rispettivo pozzetto. su ogni piastra devono essere testati campioni con curva standard. **NOTA:** Sono consigliabili applicazioni in doppio di campioni dei pazienti. Quando i campioni vengono applicati ai pozzetti della piastra, non toccare con la punta della pipetta i lati dei pozzetti poiché potrebbero essere danneggiati.
5. Attendere 5 minuti affinché i campioni si diffondano nell'agarosio.
6. Inserire il gel nella sezione interna della camera, con il lato agarosio rivolto verso il basso, schiacciando delicatamente il gel nella posizione corretta. Posizionare il/i gel in modo che i margini dell'agar siano all'interno del tampone ed i pozzetti siano rivolti verso il lato catodico (-) della camera.
7. Sottoporre ad elettroforesi le piastre con una corrente costante di 16mA per piastra per 3 ore.
8. Terminata l'elettroforesi, togliere le piastre dalla camera. gettare il tampone della camera dopo ogni ciclo.

NOTA: Utilizzo del set a più coloranti TITAN GEL (Cod. N. 1558) come camera per la colorazione e il lavaggio.

9. Sciacquare la piastra con acqua deionizzata e lavarla overnight con 0,85% di salina.
10. Terminato il lavaggio overnight, sciacquare la piastra con acqua deionizzata.
11. Sistemare la piastra su una superficie piana, con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto. Coprire l'agarosio con una salvietta singola non filacciosa.
12. Collocare 2-3 compresse per Blotter ed un peso di sviluppo sulla piastra per 15 minuti e quindi rimuovere.
13. Asciugare la piastra nel forno a 60...70°C per 10-20 minuti. Non asciugare eccessivamente le piastre. La piastra sarà trasparente quando completamente asciutta.

NOTA: Se non è disponibile un forno/essiccatrice, è possibile coprire le piastre con una salvietta inumidita non filacciosa e lasciarle asciugare a 15...30°C overnight o sotto un ventilatore per 3 ore a 15...30°C come da necessità del clima presente.

14. Terminata l'essiccazione, colorare la piastra immergendola in colorante rocket per 20 minuti.
15. Sciacquare la piastra nella soluzione decolorante per 1-3 minuti. **NOTA:** La decolorazione è completa non appena il background è sufficientemente trasparente da lasciare facilmente distinguere i picchi a forma di razzo. Una decolorazione eccessiva può schiarire i rocket rendendo così difficile eseguire determinazioni corrette. In caso di scolorimento eccessivo, ripetere il punto 14 e colorare di nuovo i rocket.
16. Lavare la piastra per due volte con acqua deionizzata per 5-10 minuti per ogni lavaggio.
17. Essiccare il gel a 37°C per 5 minuti o a 15...30°C finché non risulterà essiccato.
18. Collocare la piastra sull'I.E.P.VuBox Helena mettendo un pezzo di carta bianca sul fondo del VuBox per facilitare la visualizzazione dei rocket. Contrassegnare l'apice di ogni picco dei rocket con un marker.

19. Con l'impiego della riga per i rocket Helena, misurare la lunghezza di ogni picco in millimetri. Il picco viene misurato dalla sommità di ogni pozzetto fino all'apice del rocket.
20. Tracciare i valori della curva standard rispetto all'altezza di ciascun rocket sul modulo di resoconto rocket dell'antigene o su carta semi-logaritmica a 3 cicli. Tracciare la "linea di migliore adattamento" dei punti standard. Fare riferimento alle figure 1 e 2 nella INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI per un esempio di una piastra rocket completa ed una curva standard tracciata su un modulo di resoconto rocket antigene.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sulla curva standard leggere i valori del paziente e moltiplicarli per il fattore di diluizione corretto. Se la preparazione della curva avviene con S.A.R.P., il valore del paziente ottenuto da tale curva deve essere moltiplicato per il valore assegnato dell'antigene della proteina appartenente al relativo numero di lotto di S.A.R.P. ed anche per il fattore di diluizione.

Valore del paziente ottenuto dalla curva = 30%
Fattore di diluizione = 2
Valore S.A.R.P. assegnato = 98%
Fattore effettivo del paziente
Antigene proteina S = $30\% \times 2 \times 0,98 = 58,8\%$

I campioni dei pazienti con valori dell'antigene della proteina S superiori a range della curva standard, devono essere ridosati con l'impiego delle diluizioni corrette

Figura 1. Pattern dei rocket su una piastra rocket per l'antigene della proteina S. Per preparare la curva standard si utilizzano le lunghezze dei rocket (in millimetri) delle diluizioni standard. I risultati del paziente sono leggibili sulla curva.

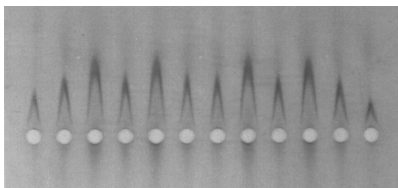
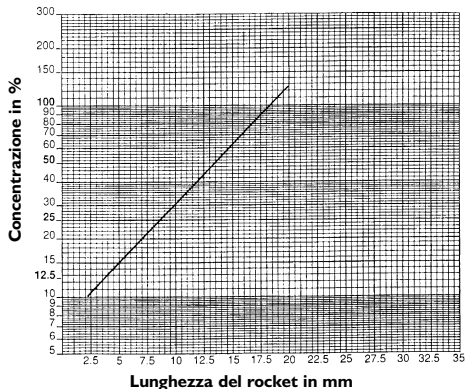


Figura 2. Curva standard rappresentativa preparata con S.A.R.P. su carta semilogaritmica a 3 cicli.

Tutti i cali di proteina S, siano essi congeniti o acquisiti, causano un aumento del rischio di tromboemboli. Episodi trombotici ricorrenti avvengono a causa di un calo del potenziale anticoagulante^{3,6}.

I livelli di proteina S sono bassi nei casi di:

- * deficienza di proteina S congenita^{3,6}.
- tipo I, indicato da un calo nell'attività anticoagulante (proteina S libera) e da un livello dell'antigene da normale a leggermente ridotto.
- tipo II, indicato da un significativo calo sia dell'attività che dei livelli di antigene della proteina S.
- * Disordini epatici.
- * Terapia anticoagulante orale.

CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmi di controllo normali e anomali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che per l'operatore. Qualora i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi.

Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

Cod. N. 5301 SAC 1

Cod. N. 5302 SAC 2

VALORI DI RIFERIMENTO

I valori di riferimento possono variare tra i singoli laboratori in funzione delle tecniche e dei sistemi utilizzati. Per tale motivo ciascun laboratorio dovrà elaborare un proprio range normale.

I valori dell'antigene della proteina S vengono solitamente espressi in percentuali relative rispetto ad uno standard di plasma normale in pool.

Proteine totali: Lo studio del range normale comprendeva cinquanta (50) adulti normali sani, 25 di sesso maschile e 25 di sesso femminile. Non sono emerse indicazioni riguardanti eventuali differenze nei livelli del range dell'antigene della proteina S tra gli uomini e le donne in buona salute. Il range normale previsto per l'antigene della proteina S ottenuto mediante rocket elettroforesi variava dal 60 al 150%.

Questi campioni provenivano da donatori di età compresa tra i 18 e i 65 anni, in buona salute; nessun intervento nei 6 mesi precedenti, con valori di emoglobina, ematocrito e temperatura nella norma e nessuna assunzione di farmaci, ossia, di antibiotici.

Proteina S libera: I livelli normali di proteina S libera determinati con questo metodo variavano da un 57% a un 120%. Helena ha testato 31 plasmi ed ha determinato un range effettivo di concentrazioni di campioni che variano dal 42% al 147%. Per questa ragione ogni laboratorio deve stabilire un proprio range normale con la consapevolezza che attualmente non esiste uno standard internazionale accettato per l'antigene proteina S.

LIMITI

Campioni di eparina con livelli fino a 10 UI/ml non influenzano i risultati del dosaggio dell'antigene della proteina S Helena. I pazienti in terapia anticoagulante orale presentano cali marcati nel livello dell'antigene della proteina S. Il livello della proteina S libera non influenza la misurazione della proteina S totale. Nessun'altra sostanza è risultata interferire con questa procedura.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena BioSciences o dai propri rappresentanti a titolo di linee guida. Ciascun laboratorio dovrà pertanto elaborare i propri dati prestazionali.

Precisione

Su una piastra sono stati condotti studi con un materiale di controllo utilizzato in replica.

	Entro la serie:		ra le serie:	
	totale S	libera S	totale S	libera S
\bar{X}	98,1	50,8	98,4	52,2
SD	2,8	2,7	2,8	3,5
CV%	2,3	5,2	5,6	6,7
N	8	5	18	15

Confronto

Sono stati condotti studi di correlazione con l'impiego del sistema per proteina S Helena ed un metodo di riferimento. I campioni utilizzati soddisfacevano gli stessi criteri di quelli dello studio per il range normale. Sono stato ricavati i seguenti dati.

	totale S		libera S
N	= 49	31	Y = Proteina S Helena
Y	= $0,917X + 6,975$	$0,981X + 0,498$	X = Metodo di riferimento
R	= 0,849		0,906

Sensibilità.

La sensibilità di questa procedura è espressa in percentuali relative rispetto ad un pool di plasma normale, come la S.A.R.P. I valori dei pazienti superiori al valore più alto sulla curva standard normale devono essere diluiti e ritestati. La soglia di sensibilità del kit per proteina S Helena è pari al 6% del livello umano normale.

Specificità

La specificità è stata determinata su plasmi con carenza di proteina S nota e verificata con l'impiego di una piastra a doppia diffusione (Ouchterlony) e diverse diluizioni di antisieri associati alle proteine della coagulazione. Il kit della proteina S Helena utilizza proteina S antiumana di capra in concentrazione ottimali.

BIBLIOGRAFIA

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest, 29 Suppl 124:21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Schwarz H.P., et al, Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. Blood, 64:1297-1300, 1984.
4. Comp P.C., et al., Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. J Clin Invest, 74:2082-2088, 1984.
5. Comp P.C., et al., An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. Blood, 67:504-508, 1986.
6. Kamiya T., et al., Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. Blood, 67:406-410, 1986.
7. Dahlback, B., Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by thrombin. Biochem Jour, 209:827, 1983.

USO PREVISTO

El procedimiento de la proteína S se usa para determinar la concentración de proteína S en plasma humano como proteína libre y como complejo con la proteína de unión a C-4 componente del complemento (C4bp) usando electroforesis en cohete de Laurell^{1,2}.

La proteína S es una proteína plasmática dependiente de la vitamina K que actúa como cofactor potente para la proteína C activada. En el proceso de coagulación, inhibe la formación de trombina formando Factores V y VIII:C. Se encuentran niveles anormalmente bajos de proteína S en la deficiencia congénita de la proteína S^{3,6}, en trastornos hepáticos y pacientes con anticoagulantes orales. La complejidad de la proteína S se ilustra por la formación de un equilibrio dinámico con proteínas de unión a C4b. Puede encontrarse la C4b - BP en plasma de dos formas diferentes^{4,5}. La primera es una forma de bajo peso molecular que no muestra afinidad por la proteína S. La segunda es una forma de alto peso molecular que puede unirse a la proteína S en un complejo 1:1.

La proteína S libre representa alrededor del 40% (10 mg/l) de la proteína S total. Actúa como transportador para la actividad anticoagulante y como cofactor para la proteína C activada. La proteína S unida a C4b - BP normalmente representa alrededor del 60% (15 mg/l) de proteína S total y no tiene actividad anticoagulante.

El procedimiento de EID Rocket de proteína S de Helena se realiza en un medio de gel de agarosa al 1% que contiene un anticuerpo específico para la proteína S. Después de aplicar las muestras de plasma a los pozos en la agarosa, se usa la electroforesis para hacer migrar las proteínas hacia el campo del anticuerpo. Se forma un patrón de precipitación en forma de cohete a lo largo del eje de migración. La longitud de este patrón de cohete es proporcional a la concentración del antígeno.

Los estudios realizados por Dahlback⁷ demostraron que la adición de PEG al plasma precipitaría el complejo C4b - BP pero no la proteína S libre.

El reactivo de Proteína S de Helena resuelve la proteína S libre de la unida y permite así realizar la correlación entre la actividad de la proteína S funcional y los niveles inmunológicos de proteína S libre.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos contenidos en este kit son sólo para uso diagnóstico. **NO SE DEBEN INGERIR.** Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos, avisos de seguridad y consejos para su eliminación. Se han estudiado los productos plasmáticos y han resultado negativos (a menos que se indique otra cosa en la caja del kit o en el vial) para la presencia de antígeno de la hepatitis B (HbsAg), anticuerpos frente a VIH 1 y VIH 2 y anticuerpo del VHC, aunque deben manejarse con las mismas precauciones que una muestra de plasma humano.

COMPOSICIÓN

1. Placas Rocket de antígeno de la proteína S (N° Cat. 5359)

Contiene anticuerpo de oveja o carnero a proteína S humana incorporados en agarosa en tampón Tris-tricina y azida sódica como conservante. Para evitar la formación de vapores tóxicos, no debe mezclarse azida de sodio con soluciones ácidas.

Preparación: Sacar la placa del envase protector y dejar transcurrir 5-10 minutos para que la agarosa alcance los 15...30°C.

2. Tampón de Tris-tricina (N° Cat. 5358, no incluido)

Cuando está diluido, el tampón contiene 0,081 M Tris y 0,024 M tricina.

Preparación: Diluir un paquete de tampón en 1000 ml de agua desionizada. El tampón está listo para usar cuando todo el material está completamente disuelto.

3. **Colorante Rocket (N° Cat. 5362 – no incluido)**

El colorante Rocket es colorante azul brillante Coomassie.

Preparación: Disolver el contenido de un vial en 450 ml de agua desionizada, 450ml de metanol y 100ml de ácido acético. Mezclar bien y filtrar antes de usar, si fuera necesario.

4. **Reactivo de proteína S libre (N° Cat. 5363)**

El reactivo contiene un 25% de polietilenglicol. El reactivo viene envasado listo para usar.

5. **Otros componentes del kit**

Cada reactivo contiene instrucciones de uso, una regla de cohete y un formulario de informe.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

Los reactivos no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se conservan en las condiciones indicadas en el vial o en la etiqueta del kit.

1. **Placas Rocket de antígeno de la proteína S (N° Cat. 5359)**

Las placas Rocket deben conservarse a 2...6°C y mantenerse en condición húmeda dentro de la bolsa. **NO CONGELAR.** Las placas permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el paquete.

Signos de deterioro: Desechar la placa si parece que está seca o si los pozos no son redondos. Una apariencia cristalina indica que la agarosa se ha congelado.

2. **Tampón de Tris-tricina (N° Cat. 5358)**

Debe guardarse el tampón a 15...30°C. El tampón diluido permanece estable durante 2 meses guardado a 15...30°C.

Signos de deterioro: Desechar el tampón envasado si el material muestra signos de humedad o decoloración. Desechar el tampón diluido si se hace turbio.

3. **Colorante Rocket (N° Cat. 5362)**

Debe guardarse el colorante a 15...30°C.

Signos de deterioro: Si se evapora el metanol, se podrá apreciar un brillo metálico en la superficie del colorante. Desechar el colorante si no tiene adecuadamente los cohetes de proteínas como se describe en este procedimiento.

4. **Reactivo de proteína S libre (N° Cat. 5363)**

El reactivo ha de almacenarse a 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Signos de deterioro: Desechar el reactivo si muestra algún signo de contaminación microbiana.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

N° Cat. 5358 Tampón de Tris - Tricina

N° Cat. 5362 Colorante Rocket

N° Cat. 5363 Reactivo de proteína S libre

N° Cat. 5185 Plasma de referencia SARP

N° Cat. 4063 Cámara Titan Gel

N° Cat. 5014 Peso de desarrollo

N° Cat. 1520 Fuente de alimentación EWS

N° Cat. 5037 Láminas secantes

N° Cat. 9025 VuBox IEP

N° Cat. 5116 I.O.D.: Incubador, Horno, Secador

N° Cat. 1558 Equipo de Multicolorante TITAN GEL

N° Cat. 6210, 6211 Microdispensador y tubos (10 ml)

Tejido carente de pelusa

Solución decolorante: Mezclar 200 ml de agua desionizada, 200 ml de metanol y 50 ml de ácido acético glacial.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Debe usarse siempre plástico o vidrio silicizado. Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% o al 3,8% (1 parte). Separar el plasma después de la centrifugación a 2000-3000xg durante 15 minutos. El plasma debe conservarse a 2...6°C. Las pruebas deberían terminarse en 2 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20°C durante 2 semanas o -70°C durante un mes. Descongelar rápidamente a 37°C antes de realizar la prueba. No conservar a 37 °C durante más de 5 minutos.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

- i. Para el paso 1, seguir el procedimiento de acuerdo con la Determinación de Proteína S libre o Determinación de Proteína S total.

Determinación del reactivo de proteína S libre

- i. Todas las muestras, incluidos los controles y material estándar, deben recibir un tratamiento previo añadiendo 15ml de reactivo de proteína S libre a 85ml de plasma. Pueden alterarse estos volúmenes pero la relación debe ser la misma. NO diluir las muestras de control y de paciente antes del tratamiento previo.
- ii. Mezclar con agitadora vorticial las muestras y colocar en hielo durante 30 minutos.
- iii. Centrifugar las muestras a un mínimo de 1000 X G durante 10 minutos. Reservar el sobrenadante para las diluciones estándar y las diluciones de paciente.
- iv. Para realizar la curva estándar, diluir el material estándar sobrenadante con solución salina al 0,85% según las siguientes instrucciones.

Actividad de porcentaje nominal	Dilución	Partes S.A.R.P.	Partes solución salina al 0,85%
100%	Usar S.A.R.P. reconstituido, no diluido.		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3

- v. Ir al paso 2

Determinación de proteína S total

- i. Reconstituir un vial de S.A.R.P con 1,0ml de agua desionizada. Realizar diluciones para preparar la Curva estándar como sigue:

Actividad de porcentaje nominal	Dilución	Partes S.A.R.P.	Partes solución salina al 0,85%
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12,5%	1:8	1	7

- ii. Diluir cada muestra del paciente con solución salina al 0,85%. Preparar una dilución 1:2 (1 parte muestra del paciente y 1 parte solución salina) y una dilución 1:4 (1 parte plasma del paciente y 3 partes solución salina). Es posible que sea necesario realizar diluciones adicionales dependiendo de los antecedentes del paciente. Las muestras con sospecha de ser anormales podrían tener que ser estudiadas sin diluir.
- iii. Ir al paso 2.

NOTA: Sacar la placa del refrigerador, dejar transcurrir aproximadamente 5-20 minutos para que la placa alcance los 15...30°C y para que se absorba cualquier exceso de humedad antes de utilizarla.

- Verter 65ml de tampón de Tris-tricina en cada una de las secciones internas de la cámara.
- Retirar cualquier exceso de tampón de los pozos de la placa. El exceso de humedad en la placa puede producir malos cohetes.
- Aplicar 10µl de cada dilución o muestra del paciente en los pozos apropiados. Deben realizarse curvas estándar en cada placa. **NOTA:** Se recomienda realizar aplicaciones duplicadas de las muestras del paciente. Al aplicar las muestras a los pozos de la placa, no dejar que la punta de la pipeta toque los laterales de los pozos ya que se podrían producir daños.
- Dejar transcurrir 5 minutos para que las muestras se difundan en la agarosa.
- Colocar el gel en la sección interna de la cámara, con la agarosa hacia abajo, apretando con suavidad el gel para colocarlo. Situar el(los) gel(es) de forma que los bordes de la agarosa estén en el tampón y los pozos estén situados hacia el lado del cátodo (-) de la cámara.
- Realizar la electroforesis de las placas a una corriente constante de 16 mA por placa durante 3 horas.

- Después de la electroforesis, sacar las placas de la cámara. Desechar el tampón de la cámara después de cada desarrollo.

NOTA: Usar el Equipo de multicoloración TITAN GEL (Nº Cat. 1558) como cámara de coloración y aclarado.

- Aclarar la placa con agua desionizada y dejar lavando toda la noche en solución salina al 0,85%.
- Después de haberlo lavado por la noche, aclarar la placa con agua desionizada.
- Colocar la placa sobre una superficie plana, con la agarosa hacia arriba. Cubrir la agarosa con un paño sin pelusa.
- Colocar 2-3 láminas secantes y un peso de desarrollo sobre la placa durante 15 minutos y retirar.
- Secar la placa en un horno de secado a 60...70°C durante 10-20 minutos. No secar en exceso las placas. Cuando la placa esté transparente, estará completamente seca.

NOTA: Si el secador/horno no está disponible, pueden cubrirse las placas con paños sin pelusa húmedos y dejarlas secar a 15...30°C toda la noche o colocarlas bajo un ventilador durante 3 horas a 15...30°C, según requiera el clima.

- Después del secado, teñir la placa sumergiéndola en el Colorante Rocket durante 20 minutos.
- Colocar la placa en la solución decolorante durante 1-3 minutos. **NOTA:** La decoloración finaliza en cuanto el fondo se aclare lo suficiente para poder distinguir fácilmente los picos del cohete. Si se decolora en exceso, puede perderse el color de los cohetes con lo que resultaría difícil realizar una medición correcta. En caso de que se decolore demasiado, volver a repetir el paso 14 y colorear los cohetes de nuevo.
- Aclarar la placa dos veces en agua desionizada durante 5-10 minutos cada vez.
- Secar las placas a 37°C durante 5 minutos o a 15...30°C hasta que se sequen.
- Colocar la placa en el VuBox I.E.P. de Helena usando un fragmento de papel blanco en la parte inferior del VuBox para ver más fácilmente los cohetes. Marcar el vértice de cada pico de cohete con un rotulador.
- Usando, la regla de cohete Helena, medir la longitud de cada pico en milímetros. El pico se mide desde la parte superior de cada pozo al vértice del cohete.

20. Representar los valores de la curva estándar frente a la altura de cada cohete en el impreso de informe del antígeno del cohete o en papel semilogarítmico de 3 ciclos. Dibujar la línea de mejor ajuste para los puntos estándar. Ver las Figuras 1 y 2 en INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS para ver un ejemplo de Placa Rocket terminada y una curva estándar dibujada en un Impreso de Informe de Antígeno Rocket.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Leer los valores del paciente desde la curva estándar y multiplicar cada uno de ellos por el factor de dilución apropiado. Si se usa el S.A.R.P. de coagulación para preparar la curva estándar, el valor del paciente leído de la curva debe multiplicarse por el valor del antígeno de proteína del número de lote adecuado de S.A.R.P. así como el factor de dilución.

Valor del paciente de la curva = 30%

Factor de dilución = 2

Valor asignado S.A.R.P. = 98%

Factor real del paciente

Antígeno de proteína S = $30\% \times 2 \times 0,98 = 58,8\%$

Las muestras de paciente con niveles de antígeno de proteína S superiores al intervalo de la curva estándar deben volver a estudiarse utilizando las diluciones apropiadas

Figura 1: Patrones de Rocket en una placa de Rocket de antígeno de proteína S. Se usan las longitudes de los cohetes (en milímetros) de las diluciones estándar para elaborar la curva estándar. Los resultados del paciente se leen a partir de la curva.

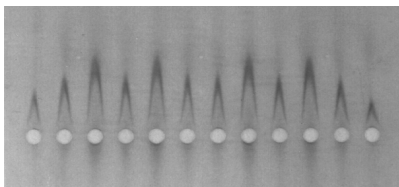
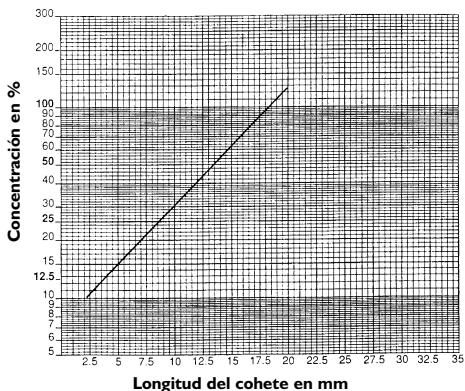


Figura 2: Una curva estándar representativa elaborada con S.A.R.P. en papel semilogarítmico de 3 ciclos.



Todas las disminuciones de la proteína S congénitas o adquiridas, producen un aumento del riesgo de tromboembolismo. Se producen episodios trombóticos recurrentes debido a una disminución de la capacidad anticoagulante ^{3,6}.

Los niveles de proteína S se reducen en:

- * Deficiencia congénita de proteína S ^{3,6}.
- tipo I, indicado por una disminución de la actividad anticoagulante (proteína S libre) y una reducción normal o ligera en el nivel de antígenos.
- tipo II, indicado por una disminución significativa tanto de los niveles de actividad como de los niveles de antígeno de la proteína S.
- * Trastornos hepáticos.
- * Tratamiento con anticoagulante oral.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad. Los controles normales y anormales deben estudiarse antes de cada lote de muestras del paciente, para asegurar un funcionamiento adecuado del instrumento y el operador. Si los controles no se realizan como se esperaba, los resultados del paciente deben considerarse inválidos.

Helena BioSciences suministra los siguientes controles disponibles para usar con este producto:

Nº Cat. 5301 SAC1

Nº Cat. 5302 SAC2

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal.

Los valores del antígeno de la proteína S suelen expresarse en porcentajes relativos en comparación con un estándar de plasma normal acumulado.

Proteínas totales: El estudio de intervalo normal consistió en cincuenta (50) adultos sanos normales: 25 hombres y 25 mujeres. No existe ninguna indicación de diferencia en cuanto a niveles de intervalo de antígeno de proteína S entre hombres y mujeres sanos. El intervalo normal esperado para el antígeno de la proteína S estudiado por electroforesis de cohete fue de 60-150%.

Estas muestras provenían de donantes con edades comprendidas entre los 18 y los 65 años, con buena salud, que no habían sido sometidos a ningún procedimiento quirúrgico en los últimos 6 meses, con niveles normales de hemoglobina, hematocritos y temperatura, y que no estaban tomando ningún medicamento (es decir, antibiótico).

Proteína S libre: Se han comunicado niveles de proteína S libre normales establecidos por este método del 57% - 120%. Helena estudió 31 plasmas y determinó un intervalo real de concentración de las muestras del 42% al 147%. Cada laboratorio debería establecer su propio intervalo normal para este procedimiento pero hay que tener en cuenta que actualmente no hay ningún estándar internacional aceptado para el antígeno de Proteína S.

LIMITACIONES

Las muestras de heparina con niveles de hasta 10 UI/ml no afectan a los resultados del ensayo de antígeno de la proteína S de Helena. Los pacientes con tratamiento de anticoagulantes orales muestran un descenso marcado del nivel de antígeno de proteína S. El nivel de proteína S libre no afecta a la medición de proteína S total. No se han encontrado otras sustancias que interfieran con este procedimiento.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Helena BioSciences o sus representantes han determinado las siguientes características de rendimiento como directriz. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de rendimiento.

Precisión

Los estudios se realizaron con un material de control empleado por duplicado en una placa.

	Dentro de cada prueba:		Entre pruebas:	
	S total	S Libre	S total	S Libre
\bar{X}	98,1	50,8	98,4	52,2
DE	2,8	2,7	2,8	3,5
%CV	2,3	5,2	5,6	6,7
N	8	5	18	15

Comparación

Se realizaron estudios de correlación utilizando el sistema de Proteína S de Helena y un método de referencia. Las muestras utilizadas cumplían los mismos criterios que las muestras para el estudio de intervalo normal. Se obtuvieron los siguientes datos.

	S total		S libre
N	= 49	31	Y = Proteína S de Helena
Y	= 0,917X + 6,975	0,981X + 0,498	X = Método de referencia
R	= 0,849		0,906

Sensibilidad

La sensibilidad para este procedimiento se expresa en porcentajes relativos comparados con una reserva de plasma normal como, por ejemplo, S.A.R.P. Los valores del paciente superiores a los valores más altos de la curva estándar normal deben diluirse y volverse a estudiar. El umbral de sensibilidad para el kit de proteína S de Helena es un 6% del nivel normal humano.

Especificidad

La especificidad se realizó en plasmas con deficiencia conocida de proteína S y se verificaron usando una placa de Difusión Doble (Ouchterlony) y diversas diluciones de los antisueros asociados a las proteínas de coagulación. El Kit de proteína S de Helena utiliza Anti-proteína S humano de carnero en concentraciones óptimas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest, 29 Suppl 124:21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Schwarz H.P., et al, Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. Blood, 64:1297-1300, 1984.
4. Comp P.C., et al., Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. J Clin Invest, 74:2082-2088, 1984.
5. Comp P.C., et al., An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. Blood, 67:504-508, 1986.
6. Kamiya T., et al., Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. Blood, 67:406-410, 1986.
7. Dahlback, B., Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by thrombin. Biochem Jour, 209:827, 1983.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-1428P 2007/05 (3)