

**ZYMUTEST Anti-Protein Z****Isotype – IgM****REF** RK025BRecherche et dosage des autoanticorps anti-Protéine Z, d'isotype
IgM**POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.****NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.**

Français, dernière révision :

10-2022

UTILISATION:

Le kit ZYMUTEST Anti-Protein Z, IgM, est un dosage immuno-enzymatique ELISA conçu pour la mesure des autoanticorps anti-Protéine Z de l'isotype IgM, dans le plasma humain ou dans tout fluide biologique où les auto-anticorps anti-Protéine Z doivent être dosés.

Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

RESUME ET EXPLICATION:

Le ZYMUTEST Anti-Protein Z, IgM mesure spécifiquement les autoanticorps anti-Protéine Z, d'isotype IgM, réactifs avec la Protéine Z insolubilisée. Il ne mesure pas les isotypes IgG ou IgA.

PRINCIPE:

La recherche des anticorps anti-Protéine Z, avec le coffret ZYMUTEST anti-Protein Z, est réalisée à l'aide d'une plaque ELISA, sensibilisée par la Protéine Z humaine, hautement purifiée, puis stabilisée.

Le plasma ou le sérum à tester sont introduits dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Les autoanticorps anti-Protéine Z, d'isotype IgM, quand ils sont présents, se fixent sur la Protéine Z immobilisée. Après lavage, les anticorps ainsi fixés sont révélés par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal de chèvre, spécifique des fragments Fc μ de l'IgM humaine, et couplé à la peroxydase (HRP). Cet immunoconjugué réagit spécifiquement avec l'autoanticorps anti-Protéine Z d'isotype IgM. Après lavage, le substrat, 3,3',5,5' – Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité d'autoanticorps anti-Protéine Z d'isotype IgM présente dans l'échantillon testé.

Echantillons :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na₂ EDTA ou sérum.
- Tout autre liquide biologique où la recherche d'autoanticorps anti-Protéine Z, d'isotype IgM, doit être effectuée.

REACTIFS:

- COAT** : Plaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée avec de la Protéine Z humaine, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
- SD** : Deux flacons de 50 ml de diluant échantillon pour tests auto-immuns (Autoimmunity-Sample Diluent), prêt à l'emploi. Contient de l'azide de sodium.
- CAL** : Trois flacons de calibrateur lyophilisé (Anti-Protein Z IgM calibrator). A reconstituer par 1 ml de diluant échantillon, afin d'obtenir le calibrateur, prêt à l'emploi (déjà dilué au 1/100).
Ce calibrateur a une concentration définie en anti-Protein Z, exprimée en Unités Arbitraires (UA) et indiquée sur le papillon fourni dans le coffret.
- C-** : Trois flacons de contrôle négatif lyophilisé, (Negative Control) lyophilisés, contenant du plasma humain normal dilué. Après reconstitution avec 1 ml de diluant échantillon, le contrôle négatif est prêt à l'emploi (déjà dilué au 1/100).
- IC** : Trois flacons d'Immunoconjugué (Anti-IgM (Fc μ)-HRP immunoconjugate), anticorps polyclonal de chèvre, spécifique des fragments Fc μ de l'IgM humaine, couplé à la peroxydase et lyophilisé.
- CD** : Un flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué (Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
- WS** : Un flacon de 50 ml de solution de lavage (Wash Solution, WS), 20 fois concentrée.
- TMB** : Un flacon de 25 ml de substrat : 3,3',5,5' – Tetraméthylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
- SA** : Un flacon de 6 ml d'acide sulfurique 0,45 M (Stop Solution), prêt à l'emploi.

Nota: Utiliser uniquement les réactifs provenant d'un coffret d'un même lot. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kit pour effectuer un dosage.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

- Micro ELISA plate** : Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Les

barrettes sorties du sachet aluminium doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à 4 semaines dans leur emballage d'origine, hermétiquement refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à 2 - 8°C, dans le sachet plastique minigrip fourni.

- Autoimmunity-Sample-Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
- Calibrator** : Chaque flacon doit être reconstitué avec 1 ml de "Autoimmunity-Sample-Diluent". Le calibrateur ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma contenant des autoanticorps anti-Protéine Z d'isotype IgM, déjà dilué au 1/100. Après reconstitution, ce flacon peut être conservé à 2-8°C, pendant 5 jours, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
- Negative control** : Chaque flacon doit être reconstitué avec 1 ml de "Autoimmunity-Sample-Diluent". Le contrôle négatif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma négatif déjà dilué au 1/100. Après reconstitution, ce flacon peut être conservé à 2-8°C, pendant 2 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.

Précautions : La Protéine Z humaine utilisée pour la sensibilisation des plaques est extraite de plasma humain. Le contrôle négatif est également préparé avec des plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

- Anti-IgM (Fc μ)-HRP immunoconjugate** : Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par 7.5 ml de "conjugate diluent" au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. L'immunoconjugué reconstitué est stable au moins 24 heures à la température du laboratoire et 4 semaines à 2-8°C.
- Conjugate Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
- Wash Solution** : Incuber, si nécessaire, le flacon de solution de lavage dans un bain-marie à 37°C jusqu'à totale dissolution des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée. Les 50 ml de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution. Après ouverture, le flacon est stable 4 semaines à 2-8°C, à l'abri de toute contamination. La solution de lavage diluée peut être utilisée jusqu'à 7 jours après préparation, lorsqu'elle est protégée de toute contamination. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
- TMB substrate** : Substrat TMB prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
- Stop Solution** : Solution contenant 0.45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi.

Nota : Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min. avant de réaliser le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:**Matériels:**

- Pipettes à 8 canaux permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 μ l
- Pipettes à volume variable de 0 à 20 μ l, de 20 μ l à 200 et de 200 μ l à 1000 μ l
- Matériel de lavage pour microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0.109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI GP44-A4⁵ (et CLSI H21-A5⁷)) pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation.

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références.

PROCEDURE:

Méthode de dosage:

Le plasma ou le sérum à tester sont analysés dilués au **1/100** dans le diluant échantillon (Autoimmunity-Sample Diluent). En présence d'échantillons avec un taux très élevé d'anticorps anti-Protéine Z, diluer au **1/200** ou **1/400**. Les résultats obtenus devront alors être multipliés par **2** ou **4**.

Le calibrateur et le contrôle négatif sont prêts à l'emploi et correspondent à des plasmas déjà dilués au **1/100**.

Courbe de calibration : Une courbe de calibration peut être obtenue à partir du calibrateur (**CAL**) inclus dans le coffret. La concentration (**C**) est donnée en Unités Arbitraires, (**UA**) et indiquée sur le papillon fourni dans le kit. Préparer les solutions standards en effectuant une série de dilutions de rythme 2 du calibrateur (gamme allant de **C/1** à **C/32**) en diluant échantillon (Autoimmunity-Sample Diluent).

Sortir la quantité nécessaire de barrettes de 8 puits du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Dilutions du calibrateur anti-Protéine Z IgM	200 µl	Introduire les dilutions : Calibrateur ou Contrôle négatif ou Echantillons dilués ou Diluant échantillon dans les puits de la plaque.
ou Contrôle Négatif	200 µl	
ou Echantillon à doser dilué au 1/100	200 µl	
ou diluant échantillon (blanc)	200 µl	
Incuber 30 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (a) (b).		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Immunoconjugué Anti-IgM (µ spécifique) HRP conjugué (reconstitué par 7,5 ml de diluant pour immunoconjugué)	200 µl	Immédiatement après lavage, introduire l' immunoconjugué dans les puits.
Incuber 30 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (a).		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Substrat TMB/H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits. Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément (c.)
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (b).		
Acide sulfurique 0,45 M	50 µl	Arrêter la réaction en introduisant 0.45M d'acide sulfurique. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat (c).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs (d).		

- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour microplaque ELISA est possible.
- Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage afin de préserver les protéines immobilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque, qui pourrait endommager les protéines immobilisées et réduire la réactivité de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. Régler le laveur de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.
- Lors de la distribution du substrat, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620 nm ou à 690 nm.

CONTRÔLE QUALITE:

- Le calibrateur et le contrôle négatif fournis dans le coffret, permettent de valider la bonne réalisation du dosage.
- Les DO attendues pour le calibrateur et négatif peuvent varier de lot à lot mais sont toujours de :

$$P = DO_{450} \text{ Calibrateur } 1/1 : \geq 1.5$$

$$N = DO_{450} \text{ Contrôle Négatif } : \leq 0.25$$

Les valeurs obtenues pour P et N, à 18-25°C, sont indiquées pour chaque lot de réactif dans le papillon inclus dans le coffret.

De plus, les concentrations obtenues pour le contrôle négatif doivent se situer dans la plage d'acceptation indiquée sur le dépliant fourni dans le kit. Si le contrôle négatif est en dehors de cette plage, vérifiez attentivement les conditions du test et réexécutez le test, si nécessaire.

RESULTATS:

- Les résultats sont exprimés à l'aide des DO 450 obtenues pour la gamme d'étalonnage. Les contrôles et les taux sont déterminés à l'aide de la courbe de calibration.
- Sur papier millimétré, porter les concentrations d'anti-Protéine Z exprimées en **UA** sur l'axe des abscisses et les DO correspondantes en ordonnées (voir modèle sur le papillon). La concentration d'anti-Protéine Z, de type IgM, pour l'échantillon testé, à la dilution standard **1:100**, et exprimée en **UA**, est directement déduite de la courbe d'étalonnage.
- Pour des dilutions plus importantes, (ex : **D**), la concentration mesurée doit être multipliée par le facteur de dilution complémentaire (soit **D:100** ; par exemple **x2 for 1:200** ou **x4 pour 1:400**).
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

Les résultats doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

INTERPRETATION DES RESULTATS :

Une courbe de calibration est utilisée pour calibrer le test, en utilisant une gamme de dilution de rythme 2. Ceci permet d'obtenir une meilleure reproductibilité et fiabilité du test, et une meilleure précision des mesures de lot à lot, ainsi qu'une meilleure définition de la valeur seuil.

Zone négative : Les unités arbitraires (**UA**) du calibrateur, sont définies par rapport à la limite supérieure de la zone normale, qui correspond à la valeur moyenne obtenue sur les plasmas normaux majorée de 2 écart types (SD). Par définition, cette valeur correspond à **10 UA**. Ainsi, les valeurs normales sont :
Zone négative : < 10 UA/ml

Zone douteuse : $\geq 10 \text{ UA/ml}$ et $< 20 \text{ UA/ml}$

Zone positive : La zone positive est définie pour les concentrations suivantes d'autoanticorps anti-Protéine Z :
Zone positive : $\geq 20 \text{ UA/ml}$

La positivité peut être classée de la façon suivante :

Faible positivité : ≥ 20 à $< 50 \text{ UA/ml}$
Positivité modérée : ≥ 50 à $< 100 \text{ UA/ml}$
Fort positivité : $\geq 100 \text{ UA/ml}$

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Si les étapes de lavage ne sont pas réalisées correctement, cela peut induire un "bruit de fond" élevé et une valeur trop forte du contrôle négatif. Afin d'éviter tout développement de coloration non spécifique, vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué.

REFERENCES:

- Broze GJ, Miletich JP & JR. Human Protein Z. J Clin Invest 1984; 73: 933-38.
- Hogg PJ, Stenflo J. Interaction of vitamin K-dependent protein Z with thrombin. J Biol Chem 1991; 17 (266): 10953-58.
- Muleski al, Wood GM. Cleavage of vitamin K-dependent Protein Z by thrombin. Effect of calcium, other divalent metal ions, and phospholipids. Thromb Haemostasis 1993; 69: 618.
- Tabatabai A, Fiehler R, Broze Jr GJ. Protein Z circulates in plasma in a complex with Protein Z-dependent protease inhibitor. Thromb Haemostasis 2001; 85: 655-60.
- Broze Jr GJ. Protein Z-dependent regulation of coagulation. Thromb Haemostasis 2001; 86: 8-13
- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.