

# ZYMUTEST Protein Z

# RK031A

(Méthode ELISA en un temps pour le dosage de la Protéine Z)  
POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision: 18/11/2022

## MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST Protein Z est une méthode ELISA en une étape, destinée à la mesure de la protéine Z (PZ) dans le plasma humain, ou tout autre milieu biologique où la protéine Z est présente. Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

## PRINCIPE :

Dans un premier temps, l'immunoconjugué, un anticorps polyclonal de lapin spécifique de la PZ et couplé à la peroxydase (HRP), est introduit dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée par un anticorps polyclonal également spécifique de la PZ. Immédiatement après, l'échantillon à tester dilué est introduit et la réaction immunologique débute. La PZ présente dans l'échantillon se fixe sur la phase solide par un de ses épitopes, et réagit avec le second anticorps polyclonal couplé à la peroxydase par les épitopes libres. Après une étape de lavage, le substrat de la peroxydase, 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 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 de PZ présente dans l'échantillon testé.

## ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.
- Tout autre liquide biologique où la PZ doit être mesurée.

## REACTIFS :

1. **COAT** : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps polyclonal spécifique de la PZ humaine, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons contenant 50 ml de **tampon de dilution pour échantillons** (Sample Diluent), prêt à l'emploi.
3. **Cal** : 3 flacons de **calibrateur PZ (Protein Z calibrator)**, lyophilisé. Reconstitué avec 2 ml de Sample Diluent, afin d'obtenir un calibrateur contenant une concentration « C », exprimée en **ng/ml** de PZ humaine.
4. **CI** : 1 flacon lyophilisé contenant 0.5 ml de **Plasma PZ Control I (Plasma contrôle haut)**.
5. **CII** : 1 flacon lyophilisé contenant 0.5 ml de **Plasma PZ Control II (Plasma contrôle bas)**.

**Nota** : La concentration en PZ et l'intervalle de confiance du calibrateur et des contrôles sont indiqués sur le papillon fourni dans la trousse.

6. **IC** : 3 flacons d'**immunoconjugué** (Anti-(h)-PZ-HRP immunoconjugué), anticorps polyclonal de lapin couplé à la peroxydase (HRP), lyophilisé.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de **tampon de dilution pour l'immunoconjugué** (Conjugate Diluent) prêt à l'emploi.
8. **WS** : Un flacon de 50 ml de **solution de lavage** (Wash Solution), 20 fois concentrée.
9. **TMB** : Un flacon de substrat : 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
10. **SA** : Un flacon de 6ml d'**acide sulfurique 0.45 M** (Stop Solution) prêt à l'emploi.

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

## MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

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

## PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Dans leur emballage d'origine, avant toute utilisation et conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

1. **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.

2. **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.
3. **Protein Z Calibrator** : reconstitué par **2 ml** de Sample Diluent afin d'obtenir un calibrateur contenant un taux « C », exprimé en **ng/ml de PZ**. Cette solution est stable au moins **8 heures** à température du laboratoire ou **72 heures à 2-8°C**.
4. **Plasma PZ Control I** (plasma humain, haut) : à reconstituer par **0.5 ml** d'eau distillée.
5. **Plasma PZ Control II** (plasma humain, bas) : à reconstituer par **0.5 ml** d'eau distillée.

**Nota** : Une fois reconstitués, les contrôles I et II sont stables **24 heures** à température du laboratoire, **72 heures à 2-8°C** ou **2 mois** congelés à **-20°C** ou plus.

**Précautions** : Le calibrateur (3) et les plasmas contrôles I et II (4 & 5) sont préparés à partir de plasma humain. Ce dernier a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt 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.

6. **Anti-(h)-PZ-HRP immunoconjugué** : chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par **2 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**.
7. **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. Il contient 0,05% de Kathon CG.
8. **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 et conservée à **2-8°C**. Ce réactif contient 0,05% de Kathon CG.
9. **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.
10. **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.

Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

## MODE OPERATOIRE :

### Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109 M (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les **8 heures** ou conservé congelé, à **-20°C** ou moins, jusqu'à 6 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins **4 heures** à température du laboratoire. Le plasma humain prélevé sur EDTA peut être aussi utilisé. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

### Echantillons et contrôles :

Les échantillons doivent être testés dilués 50 fois (**1:50**) en Sample Diluent. Pour des concentrations de PZ > 5 µg/ml, le plasma ou les échantillons peuvent être testés à des dilutions plus élevées, **1:100, ou 1:200, ou plus**.

Les contrôles I et II doivent être testés dilués 50 fois (**1:50**), en Sample Diluent.

**Calibration :**

Utiliser le calibrateur PZ avec une concentration de « C » (comprise entre 80 et 120 ng/ml selon les lots) fourni dans le coffret. Préparer les solutions standards suivantes.

Concentration de PZ (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de PZ Calibrateur	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. de Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Mélanger délicatement pour obtenir une solution homogène.

Les dilutions de calibration sont stables **8 heures** à température du laboratoire.

**Mode Opérateur :**

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
Conjugué anti (h)-PZ-HRP. (reconstitué avec 2 ml de Conjugate Diluent)	50 µl	Introduire l'immunoconjugué Anti-(h)-PZ- HRP dans les puits de la microplaque ELISA
Calibrateur PZ ou échantillon à tester ou Sample Diluent (blanc)	200 µl	Introduire <b>immédiatement</b> les solutions standards ou les échantillons à doser dans les puits correspondants sur la micro plaque ELISA
<b>Mélanger délicatement soit manuellement, soit sur un agitateur de microplaques. Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C).</b>		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Substrat TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (a). <b>Nota :</b> la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (b, c)
Laisser la coloration se développer pendant <b>5 minutes</b> à température du laboratoire. (c)		
0,45 M Sulfuric Acid (5)	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. (b).
<b>Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs (d).</b>		

**Nota:**

Effectuer les dépôts de l'étalonnage, des contrôles et des tests, le plus rapidement possible, pour une cinétique homogène des divers dosages. Un délai trop important (> 15 min) entre les premiers et derniers dépôts peut influencer la cinétique immunologique et fausser les résultats.

- 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 insolubilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement 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 TMB, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Il doit être le même lors de l'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique.
- 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 micro-plaques ELISA est possible.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

**VARIANTE : METHODE 2 TEMPS :**

- Le dosage de la PZ peut également être réalisé en méthode "deux temps". la courbe d'étalonnage est considérée de **0 à C ng/ml** (comme pour la méthode 1 temps). Le "PZ Calibrator" (**Cal**) doit être repris par **2 ml** de Sample Diluent (**SD**).
- L'immunoconjugué (**IC**) doit être reconstitué par **7,5 ml** de "Conjugate Diluent" (**CD**).
- Le plasma à tester est analysé dilué **50 fois** en "Sample Diluent" (**SD**), ou davantage si des taux supérieurs à 5µg/ml sont attendus.
- Dans chaque puits de la plaque ELISA, introduire **200µL** de la gamme d'étalonnage (réalisée comme pour la méthode 1 temps) ou **200 µL** de plasma à tester dilué **1/50** (ou plus si nécessaire). Après **1 heure** d'incubation à température du laboratoire (18-25°C), laver la plaque et ajouter **200 µl** d'immunoconjugué (**IC**) par puits. Incuber **1 heure** à température du laboratoire, laver la plaque, et ajouter le substrat TMB (**200 µl** par puits). Arrêter la coloration après **5 min.** à l'aide de **50µl** d'acide sulfurique 0,45 M (**SA**) par puits, et mesurer la DO à 450 nm. Pour les lavages, les précautions

opératoires, et l'interprétation des résultats, procéder comme indiqué pour la méthode 1 temps.

**EXPRESSION DES RESULTATS :**

- Sur papier millimétré, porter les concentrations de **PZ en ng/ml** sur l'axe des abscisses et les **DO450** correspondantes en ordonnées.

- Pour la mesure des taux de PZ, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée. Sur la courbe obtenue, déduire directement le taux de PZ de l'échantillon testé. Pour obtenir le taux de PZ dans l'échantillon, la valeur lue sur la courbe de calibration doit être **multipliée par le facteur de dilution utilisé (ex : 50,100, 200.....)** (voir modèle présenté sur le papillon).

- Pour les contrôles I et II, la concentration mesurée doit être multipliée par **50**.

- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

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

**BIOCHIMIE :**

La PZ est une glycoprotéine vitamine K dépendante de 62KDa. En présence de calcium et de phospholipides, le complexe PZ-inhibiteur dépendant de la PZ (ZPI) inhibe le facteur Xa. La concentration moyenne en PZ dans les plasmas normaux est d'environ 2,8µg/ml avec le coffret Zymutest PZ, et est largement variable selon les individus (environ 1 à 4µg/ml).

**CARACTERISTIQUES :**

- Limite de détection ≤ 0.25µg/ml.
- Intra-essai : 3-8%.
- Inter-essais : 5-10%.
- Aucune interférence significative de l'héparine n'est observée jusqu'à 2UI/ml.

Changement par rapport à la précédente version.