

ZYMUTEST Protein Z

ARK031A

(Complete ELISA kit for Protein Z)



Manufactured By: HYPHEN BioMed

In vitro research use only

Last revision: 17/03/2008

INTENDED USE:

The ZYMUTEST Protein Z kit is a one step immuno-assay for measuring human Protein Z (PZ) in plasma, or in any fluid where PZ can be present.

ASSAY PRINCIPLE:

First, the immunoconjugate, which is a polyclonal antibody specific for PZ coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced into the microwells coated with a polyclonal antibody specific for PZ. Then, the diluted tested sample is immediately introduced, and the immunological reaction starts. When present, PZ binds onto the polyclonal antibody coated solid phase through one epitope, and fixes the polyclonal antibody coupled to HRP through free epitopes. Following a washing step, the peroxidase substrate, 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine (TMB), in presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. When the reaction is stopped with Sulfuric Acid, a yellow colour is obtained. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human PZ in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate or Na₂ EDTA anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where PZ must be measured.

REAGENTS:

1. **COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with a rabbit polyclonal antibody specific for human PZ, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
2. **SD:** 2 vials containing 50ml of **Sample Diluent**, ready to use.
3. **Cal:** 3 vials of **Protein Z Calibrator**, lyophilised. When restored with 2 ml of Sample Diluent, a plasma containing a concentration "C" (expressed in **ng/ml**) of human PZ is obtained.
4. **CI:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised **Plasma PZ Control I High** (human plasma).
5. **CI:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised **Plasma PZ Control II Low** (human plasma).

Nota: The PZ concentrations and acceptancy ranges for calibrator and controls can vary from lot to lot, and are indicated on the flyer provided in the kit.

6. **IC:** 3 vials of **Anti-(h)-PZ-HRP immunoconjugate**, a polyclonal antibody coupled to HRP, lyophilised.
7. **CD:** 1 vial of 25 ml of **Conjugate Diluent**, ready to use.
8. **WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated **Wash Solution**.
9. **TMB:** 1 vial of 25 ml peroxidase substrate: 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine containing hydrogen peroxide. Ready to use.
10. **SA:** 1 vial of 6 ml of 0.45M **Sulfuric acid** (Stop solution). Ready to use.

Nota: Use only components from a same kit lot. Do not mix components from different lots, when running the assay.

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- 8-channel or repeating **pipette** allowing dispensing 50-300 µl.
- 1-channel **pipettes** at variable volumes from 0 to 20 µl, 20 to 200 µl and 200 to 1000 µl.
- Micro ELISA plate washing equipment and shaker.
- Micro ELISA plate **reader** with a wavelength set up at 450 nm.
- Distilled water.

REAGENTS PREPARATION, STORAGE AND STABILITY:

In their original packaging box, before use, when stored at 2-8°C, the unopened reagents are stable until the expiration date printed on the box.

1. **Micro ELISA plate:** open the plastic pouch and take off the required amounts of 8 well strips for the test series. When out of the pouch, the strips must be used within 30 minutes. Unused strips can be stored at 2-8°C for 4 weeks in their original aluminium pouch, in presence of the desiccant, hermetically closed and protected from any moisture, and stored in the provided microplate storage bag (minigrip).
2. **Sample Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
3. **Protein Z Calibrator:** restore each vial with 2 ml of Sample Diluent in order to obtain a plasma containing a PZ concentration "C". This solution is stable for at least 8 hours at room temperature or 72 hours at 2-8°C.
4. **Plasma PZ Control I** (human plasma, high): restore with 0.5 ml distilled water.
5. **Plasma PZ Control II** (human plasma, low): restore with 0.5 ml distilled water.

Nota: when restored, Protein Z controls are stable for 24 hours at room temperature, 72 hours at 2-8°C or 2 months frozen at -20°C or below.

Warning: Plasma controls I and II (4&5) and calibrator (3) are prepared with normal human plasma. This latter was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

6. **Anti-(h)-PZ-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with 2 ml of **Conjugate Diluent**. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial gently in order to homogenize the content. The restored conjugate is stable for at least 24 hours at room temperature or for at least 4 weeks at 2-8°C.
7. **Conjugate Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
8. **Wash Solution:** Incubate the vial for 15-30 minutes in a water bath at 37°C until complete dissolution of solids, when present. Shake the vial and dilute the amount required 1:20 in distilled water (the 50 ml contained in the vial allow preparing 1 liter of Wash Solution). The Wash Solution must be stored at 2-8°C in its original vial and used within 4 weeks following opening. The diluted Wash Solution must be used within 7 days, when protected from any contamination and stored at 2-8°C. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
9. **TMB substrate:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8°C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use.
10. **Stop solution:** It is ready to use.

Cautions: Sulfuric acid, although diluted to 0.45M is caustic. As for any similar chemical, handle Sulfuric acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

Nota: Bring the kit at room temperature, at least 30 min. before use. Store the unused reagents at 2-8°C. The stability studies at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature without damage.

PROCEDURE:

Specimen collection:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma should be tested within 8 hours or stored frozen at -20°C or colder for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within 4 hours.

EDTA collected human plasma may also be used. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

Tested plasma or sample or controls:

The sample must be tested diluted fifty fold (1:50) in the Sample Diluent. For expected PZ concentrations > 5µg/ml, plasma or samples can be tested at a higher dilution, 1:100, or 1:200, or more.

Plasma Controls I and II must be tested diluted fifty fold (1:50), with Sample Diluent.

D.750.02/ZY/031A



8580 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Calibration:

Using the Plasma PZ Calibrator, with a PZ concentration "C" (in the range 80-120% according to the lot used) provided in the kit, prepare the following standard solutions.

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

Mix gently for a complete homogenisation.

The standard dilutions are stable for at least 8 hours at room temperature.

Assay procedure:

Remove the required number of strips from the aluminium pouch, for the series of measures to be performed. Then put the strips in the frame provided. In the different wells of the micro ELISA plate introduce the reagents and perform the various assay steps as indicated on the following table:

Reagent	Volume	Procedure
Conjugate anti (h)-PZ-HRP. (Restored with 2 ml of conjugate Diluent)	50 µl	Introduce the Anti-(h)-PZ- HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells
PZ calibrator or tested sample or sample diluent (blank)	200 µl	Introduce immediately the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well
Mix gently on a plate shaker or manually and incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument. (a)
TMB/H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. <i>Nota</i> : The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (b, c).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (c)		
0.45 M Sulfuric Acid (5)	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45M sulfuric acid (b).
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450). Subtract the blank value (d).		

Nota:

Distribute calibrators, controls and tested specimen as rapidly as possible, in order to obtain an homogeneous immunological kinetics for PZ binding. A too long delay (>15 min) between the distribution of the first and the last wells may induce an influence of immunological kinetics and produce wrong results.

- Never let the plates empty between the addition of the reagents or following the washing step. The next reagent must be added within 3 minutes, in order to prevent the plate from drying, which could damage the immobilised components. If necessary, keep the plate filled with Wash Solution and empty it just before the introduction of the next reagent. The washing instrument must be adjusted in order to wash the plates gently, and to avoid a too drastic emptying, which could lower plate reactivity.
- For addition of the TMB substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

TWO STEP METHOD:

- The assay can also be performed with a two step method. The calibration curve is from 0 to C ng/ml (as for the one step method), the PZ calibrator being reconstituted with 2 ml of Sample Diluent (SD).
- The immunoconjugate (IC) must be reconstituted with 7.5 ml of Conjugate Diluent (CD).
- Tested plasma must be assayed at a fifty fold (1:50) dilution or at higher dilutions in Sample Diluent (SD), if required.
- In each microwell, 200µL of the calibration solution (prepared as for the one step method) or 200µL of the diluted tested plasma are introduced. Following a 1 hour incubation at room temperature (18-25°C) and a washing step, 200µl/well of

immunoconjugate (IC) are introduced. Following a new 1 hour incubation at room temperature and a washing step, the colour development with TMB (200µl/well) is allowed to develop for 5 min, and is then stopped with 50 µl of 0.45M sulfuric acid (SA). A450 is then measured. Washing and operating cautions, as well as results interpretation, are the same as recommended for the one step method.

EXPRESSION OF RESULTS:

- On a linear graph paper plot the PZ concentrations (ng/ml) on abscissa and the corresponding absorbances (A450) on ordinates.
- Users must construct their own calibration curve, obtained using their standard dilutions. From the curve obtained, deduce the PZ concentration for the tested sample. For obtaining the PZ concentration in this sample, the value read on the calibration curve must be multiplied by the dilution factor (i.e. 50,100, 200.....) (See model on the flyer).
- For controls I and II, the concentrations measured must be multiplied by 50.
- Alternatively, an ELISA software (i.e. Dynex, Biolise, etc...) can be used for the calculation of concentrations.

EXPECTED RANGE:

The mean PZ concentration in normal population is of about 2.8µg/ml when measured with the Zymutest PZ assay, and can largely vary between individuals (from about 1 to 4µg/ml).

BIOCHEMISTRY:

PZ is a vitamin K dependent glycoprotein, with a molecular weight of 62,000 daltons. The PZ-PZ dependent inhibitor (ZPI) complex is a factor Xa inhibitor, in the presence of calcium and phospholipids.

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

Clinical associations of Protein Z are still discussed and there is no obvious consensus until now. Among the reported studies, we can indicate:

- The PZ-ZPI complex is supposed to be involved in an increased thrombotic risk, for patients with antiphospholipid (aPL) syndrome.
- Protein Z deficiencies have been described in patients with ischemic stroke, and may induce in women an enhanced risk of early foetal loss, which could be related to enhanced immune complex formation with PZ, favoring an hypercoagulability state in placenta.
- The total PZ antigen level is extremely low in patients on stable warfarin therapy. Low PZ plasma levels are also associated with acute coronary syndromes (ACS).

APPLICATIONS:

- Assay of PZ in plasma samples.

ASSAY CHARACTERISTICS:

- Detection threshold ≤ 0.25 µg/ml.
- Intra-assay: 3-8%.
- Inter-assay: 5-10%.
- No significant heparin interference up to 2 IU/ml.

REFERENCES:

- Sofi F, Cesari F, Vigiani S, Fatini C, Marcucci R, Giglioli C, Valente S, Abbate R, Gensini GF, Fedi S, « Protein Z plasma levels in different phases of activity of coronary atherosclerosis », Thromb Haemost, 0:1-5, 2005.
- Vasse M, Denoyelle C, Guegan-Massardier E, Legrand E, Borg JY, Lenormand B, Soria C, Vannier JP, "Protein Z: a new regulator of coagulation in arterial vessels?", Review, Ann Pharm Fr., 62(5) : 316-22, 2004.
- Gris JC, Amadio C, Mercier E, Lavigne-Lissalde G, Déchaud H, Hoffet M, Quéré I, Amiral J, Dauzat M, Marès P, "Anti-PZ antibodies in women with pathologic pregnancies", Blood, 101(12) : 4850-4852, 2003.
- Forastiero RR, Martinuzzo ME, Lu L, Broze GJ, "Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by Protein Z/Protein Z dependent protease inhibitor", J Thromb Haemost, 1(8) : 1764-1770, 2003.
- Gris JC, Quéré I, Dechaud H, Mercier E, Pinçon C, Hoffet M, Vasse M, Marès P, "High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained early foetal loss", Blood, 99(7):2606-2608, 2002.
- Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C, "Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke", Lancet, 357(9260):933-4, 2001.
- Broze & Miletich, "Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and effect of warfarin therapy", Blood, 69(6) : 1580-1586, 1987.

ZYMUTEST Protein Z

ARK031A

(Méthode ELISA en un temps pour le dosage de la Protéine Z)

A usage de recherche *in vitro* exclusivement

Dernière révision: 17/03/2008

ANIARA

Fabricant: HYPHEN BioMed

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.

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 (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 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), lyophilisés. 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. **CI** : 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.

Précautions : Même dilué à 0,45M, l'acide sulfurique est caustique. Comme pour tout produit chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précautions en utilisant des gants et en portant des lunettes de protection. Éviter tout contact avec la peau et les yeux.

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.

D.750.01/ZY/031A

ANIARA

6560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

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 immédiatement les solutions standards ou les échantillons à doser dans les puits correspondants sur la micro plaque ELISA
Mélanger délicatement soit manuellement, soit sur un agitateur de microplaques. Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C).		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Substrat TMB/H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (a). <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (b, c)
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes 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).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs (d).		

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.
- Éviter 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.

VALEURS ATTENDUES :

La concentration moyenne en PZ dans les plasmas normaux est d'environ 2,8µg/ml avec le coffret Zymustest PZ, et est largement variable selon les individus (environ 1 à 4µg/ml).

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.

VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

Les associations cliniques de la Protéine Z sont sujettes à discussion et ne font pas l'objet d'un consensus évident à ce jour. Parmi les variations décrites dans la littérature on peut citer :

- Le complexe PZ-ZPI pourrait être impliqué dans l'augmentation du risque thrombotique chez les patients présentant un syndrome antiphospholipides.
- Des déficiences en PZ ont été décrites chez des patients présentant un accident ischémique, et pourraient par ailleurs induire un risque accru de perte fœtale, qui pourrait être lié à la formation d'immuns-complexes avec la PZ, favorisant ainsi un état d'hypercoagulabilité placentaire.
- Le taux de PZ antigène est extrêmement bas chez les patients sous thérapie stable à la warfarine. De faibles taux de PZ sont également associés avec le syndrome ACS (Acute Coronary Syndrome).

APPLICATIONS :

Dosage de la PZ dans le plasma humain.

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.

REFERENCES :

- Sofi F, Cesari F, Vigiani S, Fatini C, Marcucci R, Giglioli C, Valente S, Abbate R, Gensini GF, Fedeli S, « Protein Z plasma levels in different phases of activity of coronary atherosclerosis », Thromb Haemost, 0:1-5, 2005.
- Vasse M, Denoyelle C, Guegan-Massardier E, Legrand E, Borg JY, Lenormand B, Soria C, Vannier JP, "Protein Z: a new regulator of coagulation in arterial vessels?", Review, Ann Pharm Fr., 62(5) : 316-22, 2004.
- Gris JC, Amadio C, Mercier E, Lavigne-Lissalde G, Déchaud H, Hoffet M, Quéré I, Amiral J, Dautat M, Marès P, "Anti-PZ antibodies in women with pathologic pregnancies", Blood, 101(12) : 4850-4852, 2003.
- Forastiero RR, Martinuzzo ME, Lu L, Broze GJ, "Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by Protein Z/Protein Z dependent protease inhibitory", J Thromb Haemost, 1(8) : 1764-1770, 2003.
- Gris JC, Quéré I, Déchaud H, Mercier E, Pinçon C, Hoffet M, Vasse M, Marès P, "High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained early foetal loss", Blood, 99(7):2606-2608, 2002.
- Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C, "Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke", Lancet, 357(9260):933-4, 2001.
- Broze & Miletich, "Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and effect of warfarin therapy", Blood, 69(6) : 1580-1586, 1987.