

ZYMUTEST™ Protein Z

Art.Nr. RK031A

ELISA-Kit zur Bestimmung der Protein-Z-Konzentration

Nur für Forschungszwecke

Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren

VERWENDUNGSZWECK:

Der ZYMUTEST™ Protein Z ist ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Konzentration an humanem Protein Z (PZ) im Blutplasma oder anderen biologischen Flüssigkeiten. Dieser Testkit ist nur für Forschungszwecke und sollte nicht für diagnostische Verfahren eingesetzt werden.

TESTPRINZIP:

Auf die mit einem polyklonalen Anti-PZ-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte wird zunächst ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter polyklonaler Anti-PZ-Antikörper (Immunkonjugat) pipettiert. Anschließend wird die verdünnte Probe dazugegeben und darin vorhandenes PZ bindet einerseits an den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten Antikörper, andererseits an das in Lösung befindliche Immunkonjugat. Nach einem Waschschritt wird das Peroxidasesubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid hinzugefügt. So erfolgt die HRP-vermittelte Oxidation von TMB zu einem blauen Farbstoff, der beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach gelb umschlägt. Die Farbintensität ist direkt proportional zur PZ-Konzentration in der Probe.

PROBENMATERIAL:

- Humanes Citrat- oder EDTA-Plasma.
- Andere biologische Flüssigkeiten.

IM TESTKIT ENTHALTENE KOMPONENTEN:

- **COAT:** Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Streifen mit 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem polyklonalen, für humanes PZ spezifischen Kaninchen-Antikörper. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- **SD:** 2 Flaschen mit je 50 mL **Probendiluent**, gebrauchsfertig. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **Cal:** 3 Flaschen **PZ-Kalibrationsplasma**, lyophilisiert.
- **CI und CII:** Je 1 Flasche **PZ-Kontrollplasma I (hoch)** und **PZ-Kontrollplasma II (niedrig)**, lyophilisiert.
- **CD:** 1 Flasche mit 25 mL **Konjugatdiluent**, gebrauchsfertig. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **IC:** 3 Flaschen **Anti-PZ-HRP-Immunkonjugat**, ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter, polyklonaler, für humanes PZ spezifischer Antikörper, lyophilisiert.
- **WS:** 1 Flasche mit 50 mL 20-fach konzentrierter **Waschlösung**. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **TMB:** 1 Flasche mit 25 mL **Peroxidasesubstrat** (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), versetzt mit Wasserstoffperoxid, gebrauchsfertig.
- **SA:** 1 Flasche mit 6 mL **Stopplösung** (0,45 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig.

Anmerkung: Zur Testdurchführung dürfen ausschließlich Komponenten aus Testkits derselben Charge verwendet werden. Davon ausgenommen sind Probendiluent (SD), Konjugatdiluent (CD), Waschlösung (WS), Peroxidasesubstrat (TMB) und Stopplösung (SA).

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENTHALTEN SIND:

- Aqua dest.
- Einkanalpipetten.
- 8-Kanal- oder Repetierpipette.
- Mikrotiterplattenwascher (optional).
- Mikrotiterplattenleser mit einer Messwellenlänge von 450 nm.

VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER KOMPONENTEN:

In der Originalverpackung bei 2-8°C gelagert sind die ungeöffneten Komponenten bis zum auf dem jeweiligen Etikett gedruckten Ablaufdatum haltbar.

- **COAT:** Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und innerhalb von 30 Minuten verwenden. Nicht benötigte Streifen werden in Gegenwart des Trockenmittels im Aluminiumbeutel wieder verschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Auf solche Weise bei 2-8°C gelagert, sind sie bis zum Ablaufdatum haltbar.
- **SD:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Probendiluent, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.

- **Cal:** Mit 2 mL **Probendiluent (SD)** rekonstituieren. Das rekonstituierte Kalibrationsplasma ist 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 72 Stunden bei 2-8°C stabil.
- **CI und CII:** 30 Minuten vor Gebrauch mit 0,5 mL **Aqua dest.** rekonstituieren. Die rekonstituierten Kontrollplasmen sind 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C), 72 Stunden bei 2-8°C und 2 Monate bei ≤ -20°C stabil.

Anmerkung: Der Sollwert des Kalibrationsplasmas (Cal) sowie der Sollbereich der Kontrollplasmen (CI und CII) sind chargenabhängig und werden für jede Charge genau bestimmt. Sie werden auf dem beiliegenden Datenblatt angeführt.

Warnhinweis: Sowohl das Kalibrationsplasma (Cal) als auch die Kontrollplasmen (CI und CII) wurden aus humanem Plasma gewonnen, das mit validierten Methoden auf HBsAg, HCV-Antikörper sowie HIV-Antikörper untersucht und für negativ befunden wurde. Kein Test kann jedoch die Abwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit garantieren. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen deshalb unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

- **CD:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Konjugatdiluent, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.
- **IC:** Mit 2 mL bzw. 7,5 mL (siehe Abschnitt „Testdurchführung“) **Konjugatdiluent (CD)** rekonstituieren. Das rekonstituierte Immunkonjugat ist 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 4 Wochen bei 2-8°C stabil.
- **WS:** Für 15 bis 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Kristalle inkubieren. Schütteln und das für die Testreihe erforderliche Volumen 1:20 mit **Aqua dest.** verdünnen. Aus 50 mL Konzentrat lässt sich folglich 1 L verdünnte Waschlösung herstellen. Nach dem Öffnen ist das Konzentrat 4 Wochen bei 2-8°C haltbar. Nach Verdünnung kann die Waschlösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 1 Woche bei 2-8°C gelagert werden.
- **TMB:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Peroxidasesubstrat, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.
- **SA:** Gebrauchsfertig.

Warnhinweis: Die in der Stopplösung (SA) enthaltene Schwefelsäure ist trotz Verdünnung auf 0,45 M ätzend und wie ähnliche Chemikalien mit großer Vorsicht zu handhaben. Jeglicher Haut- und Augenkontakt ist unter Verwendung von Handschuhen und Schutzbrille zu vermeiden.

Anmerkung: Die erforderlichen Komponenten müssen 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Nicht benötigte Komponenten sind bei 2-8°C zu lagern. Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Testkits ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Komponenten bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Probengewinnung:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in Trinatrium-Citrat (0,109 M) oder Dinatrium-EDTA (1 Volumenteil) abgenommen und für 20 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma muss innerhalb von 8 Stunden getestet oder kann für bis zu 6 Monate bei ≤ -20°C gelagert werden. Gefrorenes Citratplasma wird im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und muss innerhalb von 8 Stunden getestet werden.

Proben und Kontrollen:

Proben- und Kontrollplasmen (CI und CII) werden 1:50 mit **Probendiluent (SD)** verdünnt getestet. Bei einer erwarteten PZ-Konzentration von > 5 µg/mL können Proben in höherer Verdünnung (z.B. 1:100) getestet werden.

Kalibration:

Unter Verwendung des Kalibrationsplasmas (Cal) mit einer PZ-Konzentration von C ng/mL, die auf dem beiliegenden Datenblatt angeführt ist, werden folgende Kalibrationslösungen hergestellt, die für 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil sind:

PZ-Konzentration (ng/mL)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volumen Kalibrationsplasma (Cal)	1.000 µL	500 µL	250 µL	100 µL	50 µL	0 µL
Volumen Probendiluent (SD)	0 µL	500 µL	750 µL	900 µL	950 µL	1.000 µL

Testdurchführung:

Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Dann nach folgendem Schema verfahren:

Ein-Stufen-Test

Reagenz	Volumen	Vorgehen
Immunkonjugat (IC), mit 2 mL Konjugatdiluent rekonstituiert	50 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ¹
Leerwert (Probendiluent), Kalibrationslösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:50 verdünnt) oder Proben (1:50 verdünnt)	200 µL	
Schütteln und für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ²		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschrötte (optional mit einem Waschrät). ³
Peroxidasesubstrat (TMB)	200 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ⁴
Für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ^{2,5}		
Stopplösung (SA)	50 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ⁴
Für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ² die Absorption bei 450 nm (A ₄₅₀) messen ⁶ und den Leerwert abziehen.		

Zwei-Stufen-Test

Reagenz	Volumen	Vorgehen
Leerwert (Probendiluent), Kalibrationslösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:50 verdünnt) oder Proben (1:50 verdünnt)	200 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ¹
Schütteln und für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ²		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschrötte (optional mit einem Waschrät). ³
Immunkonjugat (IC), mit 7,5 mL Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert	200 µL	In die Vertiefungen pipettieren.
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ²		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschrötte (optional mit einem Waschrät). ³
Peroxidasesubstrat (TMB)	200 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ⁴
Für 5 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ^{2,5}		
Stopplösung (SA)	50 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ⁴
Für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ² die Absorption bei 450 nm (A ₄₅₀) messen ⁶ und den Leerwert abziehen.		

Anmerkungen:

- Um eine homogene Antigenbindung zu gewährleisten müssen die Kalibrationslösungen, Kontrollen und Proben so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 10 Minuten pipettiert werden.
- Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden.
- Die Vertiefungen müssen schonend gewaschen werden und dürfen nach Entfernung der Waschlösung nach jedem Waschrötte nicht austrocknen, da dies die darin immobilisierten Komponenten beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 3 Minuten nach Entfernung der Waschlösung pipettiert werden.
- Die Zugabe des Peroxidasesubstrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen. Diese Zeitabstände müssen bei der anschließenden Zugabe der Stopplösung eingehalten werden.
- Abhängig von der im Labor vorherrschenden Raumtemperatur kann die Farbentwicklung verkürzt werden, um eine optimale Reaktion (A₄₅₀-Wert der Kalibrationslösung C ≈ 2) zu erzielen.
- Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von 620 oder 690 nm verwendet werden.

ERGEBNISBERECHNUNG:

Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden die A₄₅₀-Werte der einzelnen Kalibrationslösungen gegen die jeweiligen errechneten PZ-Konzentrationen aufgetragen. Die Interpolation erfolgt z.B. durch quadratische Regression (Polynom zweiter Ordnung).

Anhand dieser Kalibrationskurve werden ausgehend von den A₄₅₀-Werten der Proben und Kontrollen die jeweiligen PZ-Konzentrationen ermittelt und mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert.

BIOCHEMIE:

PZ ist ein Vitamin-K-abhängiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa, das in der Leber synthetisiert wird. In humanem Normalplasma kommt es in einer Konzentration von 1 bis 4 µg/mL vor.

PZ dient als Kofaktor für den PZ-abhängigen Protease-Inhibitor (ZPI), der in Anwesenheit von Calcium und Phospholipiden aktivierten Faktor X (FXa) inaktiviert. Darüber hinaus wird berichtet, dass PZ für die Bindung von Thrombin an Zellmembranen (besonders von Thrombozyten) essentiell ist, wodurch eine rasche Inaktivierung von Thrombin verhindert wird.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

Ein PZ-Mangel kann angeboren oder erworben sein. Letzterer kommt bei Behandlung mit Vitamin-K-Antagonisten, bei Lebererkrankungen (z.B. Leberzirrhose) oder bei Auftreten von Autoantikörpern vor.

Nach dem aktuellen Stand des Wissens geht ein PZ-Mangel mit einem etwa dreifach erhöhten Risiko für venöse und arterielle Thrombosen einher. Dies gilt besonders bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren (z.B. Faktor-V-Leiden). In dieser Hinsicht wird ein PZ-Mangel mit wiederholten Komplikationen in der Schwangerschaft assoziiert. Insbesondere wurde von einem fast elffach erhöhten Risiko für Fehlgeburten in der Frühschwangerschaft berichtet.

Darüber hinaus wird ein PZ-Mangel als Risikofaktor für peri- und postoperative Blutungskomplikationen beschrieben.

TESTEIGENSCHAFTEN:

- Referenzbereich: 1-4 µg/mL.
- Dynamischer Messbereich: 0-5 µg/mL.
- Nachweisgrenze: ≤ 0,25 µg/mL.
- Intra-Assay-VK: 3-8%.
- Inter-Assay-VK: 5-10%.
- Kein signifikanter Einfluss durch Heparine bis mindestens 2 IE/mL.

REFERENZEN:

- Broze G. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 8-13.
- Gris JC, Amadio C, Mercier E et al. Anti-protein Z antibodies in women with pathologic pregnancies. *Blood* 2003; 101: 4850-3.
- Gris JC, Quere I, Dechaud H et al. High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained early fetal loss. *Blood* 2002; 99: 2606-8.
- Hinterleitner C, Keisselmeier KP, Pecher AC et al. Low plasma protein Z levels are associated with an increased risk for perioperative bleedings. *Eur J Haematol* 2018; 100: 403-11.
- Hogg PJ, Stenflo J. Interaction of vitamin K-dependent protein Z with thrombin. *J Biol Chem* 1991; 266: 10953-8.
- Kemkes-Matthes B, Nees M, Kuhnel G et al. Protein Z influences the prothrombotic phenotype in factor V Leiden patients. *Thromb Res* 2002; 106: 183-5.
- Miletich J & Broze G. Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and effect of warfarin therapy. *Blood*, 1987; 69: 1580-6.
- Pardos-Gea J, Ordi-Ros J, Serrano S et al. Protein Z levels and anti-protein Z antibodies in patients with arterial and venous thrombosis. *Thromb Res* 2008; 121: 727-34.
- Sofi F, Cesari F, Abbate R et al. A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb Haemost* 2010; 103: 749-56.
- Sofi F, Cesari F, Vigiani S et al. Protein Z plasma levels in different phases of activity of coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2005; 3: 2254-8.
- Vasse M. The protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor complex. *Hamostaseologie* 2011; 31: 155-64.
- Vasse M, Denoyelle C, Guegan-Massardier E et al. Protein Z: a new regulator of coagulation in arterial vessels? *Ann Pharm Fr* 2004; 62: 316-22.
- Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY et al. Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet* 2001; 357:933-4.