

ZYMUPHEN MP-TF

Ref 521196
(96 tests)



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Dosage fonctionnel pour la mesure de l'activité procoagulante des microparticules exprimant le Facteur Tissulaire.

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.

Français, dernière révision : 08-2017

UTILISATION :

Le coffret ZYMUPHEN MP-TF est une méthode immuno-enzymatique, destinée à la détermination *in vitro* de l'activité procoagulante des microparticules exposant le Facteur Tissulaire (MP-TF), sur plasma humain et milieu purifié.

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 :

Les microparticules cellulaires sont des fragments de membrane plasmique libérées par pratiquement toutes les cellules lorsqu'elles sont soumises à diverses conditions de stress, incluant l'activation cellulaire et l'apoptose.

Le Facteur Tissulaire (FT, aussi appelé Facteur de coagulation III, ou thromboplastine), est l'initiateur physiologique de la coagulation. Le FT forme un complexe FVIIa-FT qui clive les Facteurs IX et X, initiant ainsi la cascade de la coagulation¹. Cette protéine transmembranaire de 47KDa (SDS-PAGE) est exprimée constitutivement par les cellules sous-endothéliales comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses. Le FT comprend trois domaines : un domaine extracellulaire (aa 1-219), un domaine transmembranaire (aa 220-242) et une queue cytoplasmique (aa 243-263). Il existe aussi sous forme soluble alternativement épissée (1-206).

PRINCIPE :

Dans un premier temps, la solution **AE-MP-TF** et l'échantillon à tester sont introduits dans les puits de la plaque sensibilisée par un anticorps monoclonal de souris spécifique du Facteur Tissulaire (FT, domaine extracellulaire), et qui n'interfère pas avec l'activité du FT. Les MP-TF présentes dans l'échantillon se fixent alors sur la phase solide par un épitope présent dans le domaine extracellulaire du FT. Après une nuit d'incubation et une étape de lavage automatisée, la solution de lavage est introduite dans les puits. Ce mélange de Facteur VIIa (R1) et de Facteur X (R2) sont ensuite introduits dans les puits de la microplaque. La formation du complexe FT-VIIa, sur la surface phospholipidique anionique des microparticules, en présence de calcium, permet l'activation du Facteur X en Facteur X activé (FXa). La concentration en MP-TF est alors le facteur limitant. Dans une troisième étape, un substrat spécifique du Facteur Xa (CS11-65) (R3) est introduit et réagit avec le Facteur Xa pour donner une coloration jaune. L'absorbance, mesurée à 405 nm avec un spectrophotomètre, est directement proportionnelle à la quantité de MP-TF présente dans l'échantillon à doser.

REACTIFS :

- **COAT : Microplaque ELISA :** contenant **12 barrettes de 8 puits**, sensibilisée par un anticorps monoclonal spécifique du FT humain, puis stabilisée. La microplaque est emballée dans un sachet aluminium hermétiquement fermée en présence d'un déshydratant.
- **SD-MP-TF : MP-TF Sample Diluent :** 1 flacon contenant **50 mL** de diluant échantillon, coloré en bleu, prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- **AE-MP-TF : MP-TF Assay-Enhancer :** 1 flacon contenant **25 mL** de MP-TF Assay-Enhancer, incolore, prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- **CAL : Etalon MP-TF :** 2 flacons de **2 mL** d'étalon, contenant « C » pg/mL de MP-TF (environ 25 pg/mL d'équivalent TF, voir le papillon), lyophilisé. Contient de la BSA.
- **CI/CII : Contrôle haut (CI) et bas (CII) :** 1 flacon de chaque contrôle, contenant **2 mL** de contrôle haut et bas, lyophilisé. Contient de la BSA.
- **R1 : Facteur VIIa :** 2 flacons de Facteur VIIa humain recombinant, lyophilisé. Contient de la BSA.
- **R2 : Facteur X :** 2 flacons de Facteur X humain purifié, lyophilisé. Contient de la BSA.
- **R3 : Substrat spécifique du Facteur Xa (CS-11(65)) :** 2 flacons de substrat spécifique, lyophilisé.
- **WS-MP-TF : Solution de lavage :** 1 flacon de **50 mL** de diluant (Wash Solution MP-TF), 20 fois concentrée.
- **CA : Acide citrique 2% :** 1 flacon de **6 mL** de diluant (Stop Solution), prêt à l'emploi.

La concentration exacte en MP-TF pour chaque niveau de contrôles (CI/CII) et l'étalon (CAL) est indiquée sur le papillon fourni dans le coffret. Les concentrations en microparticules des contrôles et de l'étalon peuvent varier de lot à lot. Pour le dosage, se référer aux valeurs fournies sur le papillon du coffret utilisé.

Les réactifs SD-MP-TF, AE-MP-TF et WS-MP-TF contiennent de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L), voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Éviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante pendant une période courte, sans aucun dommage.

- Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- Pour usage *in vitro*.

SD-MP-TF, AE-MP-TF : H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Ramener le coffret à température ambiante, au moins 30 min avant le dosage. Conserver les réactifs non utilisés à 2-8°C. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des produits lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.

- **COAT :** 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 à 2-8°C** dans leur emballage d'origine, hermétiquement refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, dans le sachet en plastique pour microplaque fourni (minigrip).

- **SD-MP-TF, AE-MP-TF :** Prêt à l'emploi. Ces réactifs contiennent 0,05 % de Kathon CG et 0,9 g/L d'azide de sodium.

La stabilité des réactifs après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservés dans son flacon d'origine est de :

- **4 semaines à 2-8°C.**

- **CAL :** Reconstituer chaque flacon avec exactement **2 mL de SD-MP-TF** afin d'obtenir une solution titrant « C » pg/mL (environ 25 pg/mL de FT humain, se référer au papillon contenu dans le coffret pour la concentration exacte).

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **24 heures à 2-8°C.**

- **8 heures à température ambiante (18-25°C).**

- **2 mois congelé à -20°C ou moins***

- **CI/CII :** Reconstituer chaque flacon avec exactement **2 mL de SD-MP-TF** afin d'obtenir une solution titrant environ 16 pg/mL de FT humain pour le contrôle haut et environ 5 pg/mL pour contrôle bas (se référer au papillon contenu dans le coffret pour la concentration exacte).

La stabilité de chaque réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **24 heures à 2-8°C.**

- **8 heures à température ambiante (18-25°C).**

- **2 mois congelé à -20°C ou moins***

- **R1, R2 :** Reconstituer chaque flacon avec exactement **1,5 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

Laisser stabiliser les réactifs pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser les réactifs avant chaque utilisation.

La stabilité de chaque réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **24 heures à 2-8°C.**

- **8 heures à température ambiante (18-25°C).**

- **2 mois congelé à -20°C ou moins***

- **R3 :** Reconstituer chaque flacon avec exactement **3 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

Laisser stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **24 heures à 2-8°C.**

- **8 heures à température ambiante (18-25°C).**

- **2 mois congelé à -20°C ou moins***

- **WS-MP-TF :** Incuber le flacon 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 1000 mL de solution de lavage après dilution).

La stabilité de la solution de lavage, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservée dans son flacon d'origine est de :

- **4 semaines à 2-8°C**

La stabilité de la solution de lavage diluée, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservée dans son flacon d'origine est de :

- Une fois ouvert, **7 jours à 2-8°C**

Ce réactif contient 0,9 g/L d'azide de sodium.

- **CA :** Prêt à l'emploi.

*Décongelé une seule fois le plus rapidement possible à 37°C en adaptant la durée d'incubation au volume de réactif. La stabilité du réactif décongelé doit être vérifiée dans les conditions de travail du laboratoire.

CONDITIONS DE STOCKAGE :

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 :

Réactifs:

- Eau distillée.

Matériels:

- Matériel de lavage pour microplaque ELISA (et agitateur) permettant la distribution de 100 µL de solution de lavage en fin de lavage (étape critique).**
- Spectrophotomètre, photomètre ou automates pour dosage chromogène réglé à une longueur d'onde de 405nm (plage de lecture allant jusqu'à 4u de DO).
- Bain-Marie, Incubateur à 37°C.
- Chronomètre, Pipettes calibrées.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS :

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur.

- Echantillons :**
Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique).
- Prélèvement :**

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

- Centrifugation (ne jamais conserver ou centrifuger les échantillons à 4°C) :**
Dans les deux heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma déplaqué, par exemple un minimum de 15 minutes à 1500g à température ambiante (18-25°C), puis récupérer le surnageant et centrifuger 2 minutes à 13000g à température ambiante (18-25°C). Le plasma est obtenu par récupération du surnageant, en prenant soin de ne pas toucher au culot plaquettaire.
- Conservation du plasma :**
 - 4 heures à température ambiante (18-25°C).
 - 1 mois à -20°C.
 - 6 mois à -70°C.

Les échantillons de plasma congelé doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongélation et avant utilisation.

PROCEDURE :

Méthode de dosage :

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans du tampon SD-MP-TF comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration ("C" = définie la concentration en MP-TF) :

Etalons	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volume Etalon	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,1 mL	0,05 mL	0 mL
Volume de SD-MP-TF	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 doivent être préparées extemporanément pour obtenir des performances optimales.

2. Les **échantillons de plasma et les contrôles** doivent être testés **purs**. Pour des échantillons autres que le plasma humain, la dilution doit être ajustée pour avoir au final une concentration comprise entre 0 et « C » pg/mL (environ 25 pg/mL) de Facteur Tissulaire). La dilution doit être réalisée en **SD-MP-TF**. Réaliser la gamme d'étalonnage et la tester avec les contrôles de qualité. Les concentrations exactes des calibrateurs et des contrôles sont indiquées pour chaque lot dans le papillon fourni avec le kit.

3. Sortir la quantité nécessaire de barrettes du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Incuber les réactifs R1, R2 et R3 au moins 15 minutes à 37°C avant utilisation. Introduire les réactifs dans des puits des microbarrettes et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

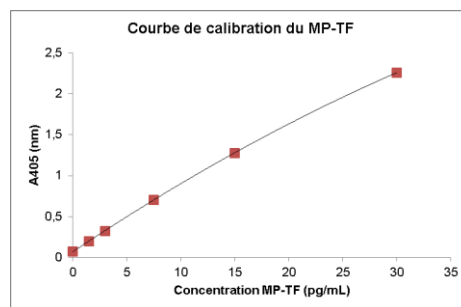
Réactif	Volume	Procédure
MP-TF-Assay Enhancer (AE-MP-TF)	200 µL	Introduire l'Assay Enhancer
Calibrateur MP-TF, ou échantillon pur, ou SD-MP-TF (blanc)	20 µL	Introduire les solutions standards, contrôles ou échantillons
Incuber 1 nuit à température ambiante (18-25°C) sous film autocollant (a)		
Solution de lavage (WS MP-TF) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µL par puit	Effectuer une série de 5 lavages sur automate , et faire distribuer par l'automate immédiatement, dans tous les puits, 100µL de solution de lavage (étape critique !!) (b)
	100 µL	
R1 (préalablement repris dans 1,5 mL d'eau distillée et pré-incubé à 37°C)	25 µL	Ne pas retirer la solution de lavage , introduire le Facteur VIIa (c)
R2 (préalablement repris dans 1,5 mL d'eau distillée et pré-incubé à 37°C)	25 µL	Introduire le Facteur X (c)
Incuber précisément 2 heures à 37°C		
R3 (préalablement repris dans 3 mL d'eau distillée et pré-incubé à 37°C)	50 µL	Introduire le substrat, en conservant le même intervalle de temps entre chaque barrette (d).
Laisser la coloration se développer pendant 2 heures exactement à 37°C .		
Acide citrique 2% (CA)	50 µL	Arrêter la réaction en introduisant l'acide citrique 2%. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat (d).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 405 nm. Soustraire les blancs (e, f).		

Nota:

- Le film plastique permet d'éviter l'évaporation de l'échantillon durant l'incubation sur la nuit.
- Le lavage automatisé est nécessaire. Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides après l'étape de lavage afin de préserver les MP-TF de l'oxydation**, qui entraînerait une perte importante et hétérogène de réactivité, ou des réactions aspécifiques. **Le laveur doit être programmé pour distribuer dans chaque puit 100µL de solution de lavage, immédiatement après le lavage.** 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.
- Pour faciliter le pipetage, il est possible de pooler les flacons de R1 et de R2 juste avant (dans les 5 minutes) introduction dans la microplaque et distribuer 50 µL du mélange au lieu de 25 µL de chaque réactif.
- Lors de la distribution du substrat, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Le même intervalle de temps doit être respecté pour l'arrêt de la réaction par l'acide citrique.
- Le test peut être utilisé en méthode cinétique (par exemple ΔDO405nm mesuré entre 20 secondes et 2 heures) sur un lecteur de plaque permettant l'incubation à 37°C.**
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

CALIBRATION :

La courbe de calibration ci-dessous est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTROLE QUALITE :

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs. Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie pour chaque série d'essai et quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode. Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle tracer sur papier millimétré la droite de calibration avec en abscisses la concentration de MP-TF (**pg/mL**) et en ordonnées la DO à **405 nm**.
 - La concentration de MP-TF dans le plasma testé pur est déduite directement de la courbe de calibration. Pour un échantillon dilué, multiplier le taux obtenu par le facteur de dilution. (ex: x4 pour un échantillon testé à la dilution 1/4).
 - Le mode d'interprétation utilisé est indiqué sur le CoA du coffret.
 - Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.
 - Les résultats sont exprimés en **pg/mL**.
- 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.**

LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.
- 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.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination 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 couleur non spécifique, vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué.

PERFORMANCES :

La limite basse de détection est ≤ 1 pg/mL.

Spécificité : L'ajout d'anticorps polyclonaux spécifiques du FT dans l'échantillon inhibe la réaction. Le kit ne réagit pas avec le FT tronqué (1-219) ni liposomes synthétiques.

Interférences : Le kit a été optimisé pour éviter les interférences dû aux microparticules qui ne présentent pas le Facteur Tissulaire à leur surface.

REFERENCES :

- Wang *et al.*, "Levels of microparticles tissue factor activity correlate with coagulation activation in endotoxemic mice", J Thromb Haemost. 2009.

SYMBOLIS :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.