



ZYMUTEST™ FPA

REF RK016B

Dosage CELIA du FPA (Fibrino-Peptide A)
POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.

UTILISATION:

Le coffret ZYMUTEST™ FPA est une méthode immuno-enzymatique de type compétitif (CELIA) pour le dosage quantitatif *in vitro* du FPA humain, utilisable sur plasma humain traité à la bentonite ou tout autre milieu biologique où le FPA doit être mesuré. Si l'échantillon à doser contient du fibrinogène, celui-ci doit être enlevé (ex : adsorption du plasma humain sur bentonite), afin d'éviter toute réaction croisée.

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:

Technique :

Le FPA est un peptide de 16 acides aminés, dont le poids moléculaire est d'environ 1536 Da, libéré de l'extrémité amino terminale des chaînes Aα du fibrinogène sous l'action de la thrombine. Deux molécules de FPA sont produites à partir de chaque molécule de fibrinogène.

La quantité totale de FPA pouvant être libérée du fibrinogène représente ainsi 0.9% de la concentration du fibrinogène. Le FPA a une durée de vie très courte dans la circulation sanguine (< 3 min.). Le taux de FPA dans le plasma humain normal est habituellement inférieur à 3 ng/mL.

PRINCIPE:

Le FPA est mesuré sur le plasma humain après adsorption du fibrinogène par la bentonite. Le FPA standard ou l'échantillon à doser sont pré-incubés avec l'anticorps de lapin anti-FPA humain, en quantité constante et limitée. Les anticorps anti-FPA n'ayant pas réagi avec le FPA sont alors mesurés sur une micro plaque ELISA, sensibilisée par du FPA synthétique et stabilisée. Ces anticorps se fixent sur le FPA immobilisé sur la plaque. Après lavage, les anticorps anti-FPA, fixés sur la plaque, sont révélés par l'immunoconjugué, anticorps de chèvre anti-IgG de lapin et couplé à la peroxydase (HRP). Après lavage, le substrat, 3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits de la plaque et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la coloration par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est inversement proportionnelle au taux de FPA présent dans le plasma adsorbé par la bentonite ou dans l'échantillon testé.

REACTIFS:

- [BS]** Suspension de bentonite : 1 flacon de 50 mL, prête à l'emploi. Contient de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).
- [T20]** Tween 20, 2% : 1 flacon de 5 mL, prêt à l'emploi. Contient de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).
- [COAT]** Microplaque ELISA : [12x8] contenant 12 barrettes de 8 puits, coatées avec du FPA synthétique humain, stabilisées et emballées dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant. Contient de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).
- [SD ELISA]** Diluant échantillon : 1 flacon de 50 mL, prêt à l'emploi. Contient de la BSA et du Proclin.
- [CAL]** Etalon FPA : 3 flacons de 2 mL, lyophilisé. Contient de la BSA. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 mL de [SD ELISA] afin d'obtenir un étalon à une concentration « C » (à environ 50 ng/mL de FPA). Contient de la BSA.
- [CI]** Contrôle I FPA (haut) : 3 flacons de 1 mL, lyophilisé, à taux élevé de FPA. Contient de la BSA.
- [CII]** Contrôle II FPA (bas) : 3 flacons de 1 mL, lyophilisé, à taux bas de FPA. Contient de la BSA.
- [ABS]** Anticorps de lapin purifiés par immunoaffinité spécifiques du FPA : 3 flacons de 2 mL. Contient de la BSA.
- [IC]** Immunoconjugué : 3 flacons de 7,5 mL, anticorps polyclonal de chèvre, spécifique des IgG de lapin et couplé à la peroxydase (HRP), lyophilisé. Contient de la BSA.
- [CD ELISA]** Diluant pour immunoconjugué : 1 flacon de 25 mL, prêt à l'emploi. Contient du Proclin et de la BSA.
- [WS ELISA]** Solution de lavage : 1 flacon de 50 mL, [20x] 20 fois concentrée. Contient du Proclin.
- [TMB]** 3,3', 5,5'-Tétraméthylbenzidine : 1 flacon de 25 mL, prêt à l'emploi. Contient de l'eau oxygénée.
- [ACS]** Solution anti-coagulante spéciale pour dosage du FPA : 1 flacon de 20 mL, prêt à l'emploi. Contient de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).
- [Stop]** Acide Sulfurique 0,45M : 1 flacon contenant 6 mL, prêt à l'emploi.

Les concentrations des étalons et contrôles peuvent légèrement varier de lot à lot. Pour le dosage, se référer aux valeurs fournies sur le papillon du coffret utilisé.

Le coffret ZYMUTEST™ FPA est validé avec l'étalon et les contrôles inclus. Ne pas dissocier. Si d'autres contrôles doivent être utilisés, chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-VHC, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique

HYPHEN BioMed

155 rue d'Eragny, 95000 Neuville-sur-Oise, France

doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.

- 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:

Laisser stabiliser les barrettes et réactifs pour le dosage au moins 30 min à température ambiante avant utilisation. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

[COAT] Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage. Les barrettes doivent être utilisées dans les 30 minutes.

Reconstituer chaque flacon avec exactement :

[CI] → 1 mL de [SD ELISA]. Laisser stabiliser 15 minutes à température ambiante. Agiter délicatement jusqu'à dissolution complète.

[CII] → 1 mL de [SD ELISA]. Laisser stabiliser 15 minutes à température ambiante. Agiter délicatement jusqu'à dissolution complète.

[CAL] → 2 mL de [SD ELISA] afin d'obtenir une solution étalon prête à l'emploi, titrant « C » (ng/mL) de FPA. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

[IC] → 7,5 mL de [CD ELISA] au moins 15 minutes avant utilisation. Agiter délicatement jusqu'à dissolution complète.

[ABS] → 2 mL de [SD ELISA]. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

[SD ELISA] [TMB] [Stop] [CD ELISA] [BS] [T20] [ACS]

Réactif prêt à l'emploi.

[WS ELISA] 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).

Incuber, si nécessaire, le flacon dans un bain-marie à 37°C jusqu'à dissolution totale des cristaux.

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.

[COAT] Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à 4 semaines à 2-8°C dans leur emballage d'origine en aluminium (hermétiquement fermé, en présence du déshydratant), placé dans le sachet en plastique pour microplaque fourni (minigrip) à l'abri de l'humidité.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

[CAL] → 8 heures à température ambiante (18-25°C).

[CI] [CII] → 48 heures à 2-8°C.

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

2 mois congelé à -20°C ou moins*

[IC] → 4 semaines à 2-8°C.

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

[ABS] → 1 semaine à 2-8°C.

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

[SD ELISA] [CD ELISA] [TMB] [BS] [T20] [ACS]

→ 4 semaines à 2-8°C.

[WS ELISA] → 4 semaines à 2-8°C.

7 jours à 2-8°C pour la solution diluée.

[Stop] → 8 semaines à 2-8°C.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée.

Matériels:

- 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.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 vol) doit être collecté par ponction veineuse franche sur l'anticoagulant [ACS] (1 vol) (trisodion citrate et inhibiteurs). Eliminer le premier tube.

Mélanger rapidement avec **ACS** et centrifuger (ex : 20 minutes à 2500 g) pour collecter le surnageant plasmatique prêt pour l'adsorption à la bentonite. Le traitement à la bentonite doit être réalisé rapidement, si ce n'est pas possible, le plasma doit être congelé rapidement à -20°C ou moins. Juste avant utilisation, décongeler le plasma à 37°C et réaliser le traitement à la bentonite. Les échantillons doivent être rapidement préparés et conservés selon les recommandations locales en vigueur (voir références¹⁻⁵ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

PROCEDURE:

Méthode de dosage:

1. Traitement à la bentonite :

Avant dosage, le fibrinogène doit être enlevé du plasma par absorption à la bentonite. Pour cela, mettre en suspension la **BS** par retournement du flacon en évitant de faire de la mousse. A 1 mL de plasma anticoagulé, ajouter 0,5 mL de **BS**. Mélanger délicatement et agiter doucement pendant 10 min. à température ambiante. Centrifuger 20 min. à 2500g. Prélever 1 mL de surnageant. Renouveler le traitement 1 fois en ajoutant 0,5 mL de **BS** à 1 mL de surnageant et procéder de la même manière que précédemment.

Le plasma ainsi traité est exempt de fibrinogène. Il doit être utilisé^{3,4}:

- Dès que possible, dans les 8 heures à température ambiante ou 24 heures à 2-8°C.
- Immédiatement, si congelé au préalable

Juste avant utilisation, ajouter 50 µL de **T20** à 1 mL de plasma traité par la bentonite. Le plasma ainsi traité est dilué 2 fois et le taux de FPA mesuré doit être multiplié par 2 afin d'obtenir la concentration finale du FPA dans le plasma à doser.

2. Plasma ou échantillon à tester :

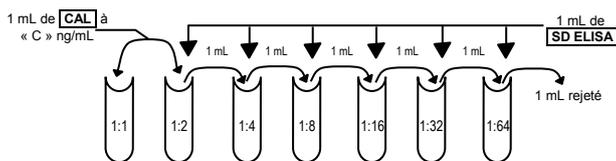
À 1 mL de plasma traité par la bentonite, et contenant du Tween 20, ajouter très exactement 0,1 mL d'anti-FPA ou pour 0,5 mL de plasma traité par la bentonite, et contenant du Tween 20, ajouter très exactement 0,05 mL d'anti-FPA. Incuber 1 heure en tube fermé à 37°C dans une enceinte thermostatée.

3. Contrôles de qualité :

Ne pas appliquer de traitement à la bentonite à ces contrôles. A 1 mL de chaque contrôle, ajouter très exactement 0,1 mL d'anti-FPA. Incuber 1 heure à 37°C.

4. Gamme d'étalonnage :

Préparer 1 mL de la gamme d'étalonnage avec le **CAL**, en réalisant une série de dilutions de rythme 2 dans le **SD ELISA**, de 1/1 à 1/64 comme indiqué ci-dessous :



Une gamme d'étalonnage allant de C à C/64 (ng/mL) de FPA est obtenue.

A 1 mL de chaque dilution, ajouter très exactement 0,1 mL d'anti-FPA (reconstitué par 2 mL de **SD ELISA**) ou à 0,5 mL de chaque dilution, ajouter très exactement 0,05 mL d'anti-FPA (reconstitué par 2 mL de **SD ELISA**). Incuber 1 heure en tube fermé à 37°C dans une enceinte thermostatée.

La première condition permet des tests en duplicate. La seconde condition permet des tests en simplicate.

La gamme et les contrôles doivent être traités dans les mêmes conditions que les échantillons.

5. 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
Mélange incubé de : CAL ou CI ou CII ou Echantillons à doser dilués ou SD ELISA (blanc)	200µL	Introduire la gamme d'étalonnage ou contrôles ou le plasma dilué dans les puits sur la micro plaque ELISA
Incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C) (a)		
WS ELISA	300µL	Effectuer une série de 5 lavages (b).
IC	200µL	Introduire IC dans les puits de la microplaque ELISA (b)
Incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C) (a)		
WS ELISA	300µL	Effectuer une série de 5 lavages (b).
TMB	200µL	Immédiatement après le lavage, introduire le substrat dans les puits (b, c). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire précisément et à un intervalle de temps précis.
Incuber pendant 5 minutes exactement à température ambiante (18-25°C) (a)		
Stop	50µL	En respectant le même intervalle de temps, barrette par barrette, que celui utilisé pour l'ajout du substrat, arrêter la réaction en introduisant l'acide sulfurique 0.45M (c).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis mesurer l'absorbance à 450 nm.		

Soustraire les valeurs de 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:

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.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Tracer la droite de calibration log-lin (concentration-DO) en portant en ordonnées la DO à 450 nm et en abscisses la concentration de FPA en ng/mL, en choisissant le mode d'interpolation « best fit » (se reporter au papillon contenu dans le coffret).
 - La concentration de FPA (ng/mL) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, en multipliant par 2 le résultat obtenu (pour prendre en compte la dilution au 1/2 dû au traitement par la bentonite).
 - Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
 - Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.
 - Pour les **CI** et **CII**, la concentration mesurée est obtenue en lecture directe.
- Les résultats 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.
- 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:

1. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
2. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular Hemostasis assays: approved guideline". 2008.
3. Amiral J. *et al.* Development and Performance Characteristics of a Competitive Enzyme Immunoassay for Fibrinopeptide A. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 1984.
4. Kockum C. and Frebelius S. Rapid Radioimmunoassay of Human Fibrinopeptide A - Removal of Cross-reacting Fibrinogen with Bentonite. Thrombosis Research. 1980.
5. Soria J. *et al.* A Solid Phase Immuno Enzymological Assay for the Measurement of Human Fibrinopeptide A. Thrombosis Research. 1980.

SYMBOLES:

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

SD ELISA **CD ELISA** **WS ELISA** H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

Changements par rapport à la précédente version.