



ZYMUTEST (TOTAL) TAFI :Ag

Référence RK008A

(Inhibiteur de la Fibrinolyse Activable par la Thrombine)

(Dosage ELISA du Total TAFI :Ag)**POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.****NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC**

Dernière révision : 17/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST (TOTAL) TAFI :Ag est un dosage ELISA sandwich du TAFI Total (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor), mesuré en tant que protéine antigène, utilisable sur plasma humain, ou tout autre milieu où le TAFI Total doit être mesuré. Toutes les formes de TAFI activables ou inactives sont mesurées. **Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.**

PRINCIPE :

Le dosage du Total TAFI antigène, avec le coffret ZYMUTEST (TOTAL) TAFI :Ag, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée par un anticorps monoclonal, spécifique du Total TAFI Ag, et stabilisée.

Le plasma ou l'échantillon à tester sont introduits dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Le TAFI se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, le TAFI fixé sur la plaque est révélé par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal de chèvre couplé à la peroxidase (HRP), qui réagit avec les épitopes libres du TAFI. Après lavage, le substrat, Tetraméthylbenzidine (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 proportionnelle au taux de TAFI Total présent dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na₂ EDTA.
- Tout autre échantillon biologique où le TAFI Total Ag doit être mesuré.

REACTIFS :

1. **COAT** : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps monoclonal de souris, spécifique du TAFI Total humain, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons de 50 ml de diluant échantillon (F-Sample Diluent), prêt à l'emploi.
3. **Cal** : 3 flacons de plasma d'étalonnage (plasma normal calibré par rapport à un pool de plasmas de référence), titré en TAFI antigène (**Plasma TAFI calibrator**), lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué par 0,5 ml d'eau distillée et dilué au 1/50 en diluant échantillon (F-SD) afin d'obtenir un plasma titré en TAFI. Le titre du plasma étalon est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.
4. **CI** : 1 flacon de 0,5 ml de TAFI Control I, lyophilisé (plasma humain, contrôle I, haut).
5. **CII** : 1 flacon de 0,5 ml de TAFI Control II, lyophilisé (plasma humain, contrôle II, bas).

La concentration de Total TAFI et les intervalles de confiance sont indiqués sur le papillon fourni dans le coffret.
6. **IC** : 3 flacons d'immunoconjugué [Anti-(h-Total)-TAFI Ag-HRP immunoconjugate], anticorps polyclonal de chèvre, spécifique du TAFI Total et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué (**Conjugate Diluent**), prêt à l'emploi.
8. **WS** : 1 flacon de 50 ml de solution de lavage (**Wash Solution**), 20 fois concentrée.
9. **TMB** : 1 flacon de 25 ml de substrat de la peroxydase : 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
10. **SA** : 1 flacon contenant 6 ml d'Acide Sulfurique 0,45M (**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 réglée 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 minigrp fourni.
2. **F-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. **Plasma TAFI calibrator** : Chaque flacon doit être reconstitué avec 0,5 ml d'eau. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins 8 heures à température du laboratoire et 24 H à 2-8°C.
4. **TAFI Control I, lyophilisé** (plasma humain) : reconstituer avec 0,5 ml d'eau distillée.
5. **TAFI control II, lyophilisé** (plasma humain) : reconstituer avec 0,5 ml d'eau distillée.

Nota : Après reconstitution, les plasmas contrôlés I et II sont stables au moins 8 heures à température du laboratoire, 24 heures à 2-8°C, ou 2 mois congelés à -20°C ou en dessous.

Précautions : Le Plasma TAFI calibrator et les contrôles sont préparés à partir de plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts 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-Total)-TAFI Ag-HRP immunoconjugate** : Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par 7.5 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. Ce réactif 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** : Prêt à l'emploi. A utiliser dans un délai de 4 semaines après ouverture, conservé à 2-8°C, sous réserve de contamination bactériologique lors de l'utilisation.
10. **Stop Solution** : Acide sulfurique 0,45M, prêt à l'emploi

Nota : Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min avant le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

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.

L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na₂ EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

Plasma ou échantillon à tester et contrôles :

Le plasma ou l'échantillon à tester sont analysés dilués au 1/50 dans le diluant échantillon (F-Sample-Diluent). Pour des taux de TAFI > 100%, diluer au 1/100 ou au 1/200, ou davantage selon le cas (soit D cette dilution). Les taux obtenus devront être corrigés en multipliant par le facteur de dilution complémentaire D:50 (soit x2 pour 1/100, x4 pour 1/200, etc...).

Les contrôles I et II doivent être testés dilués au 1/50.

Gamme d'étalonnage :

Les taux de TAFI Total Ag sont exprimés en % d'un pool de plasmas normaux (titrant par définition 100%). La dilution standard pour le dosage plasmatique du TAFI Total antigène étant 1/50, le 100% correspond à un pool de plasmas normaux dilué au 1:50.

Diluer le **Plasma TAFI calibrator** (reconstitué par 0.5 ml d'eau distillée) au **1/50 en F-SD**. En utilisant ce plasma TAFI calibrator dilué au 1/50 et ayant un taux "C" de TAFI Total Ag indiqué pour chaque lot de réactifs, sur le papillon inclus dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration de Total TAFI : Ag en %	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de Plasma TAFI calibrator dilué au 1/50.	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. de F-Sample-Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions d'étalonnages sont stables au moins **4 heures** à température du laboratoire.

Réalisation du dosage :

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 microbarrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Plasma TAFI calibrator, échantillon à doser ou contrôles	200 µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits
Incuber 2 heures à 37°C (a, b)		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
Immunoconjugué Anti-(h-Total)-TAFI Ag-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits
Incuber 1 heure à 37°C (a, b)		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
Substrat TMB / H₂O₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (c, d). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer pendant 5 min. à température du laboratoire		
Acide sulfurique 0.45 M	50 µl	Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat.
Attendre 10 min. pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm (e)		

Remarque :

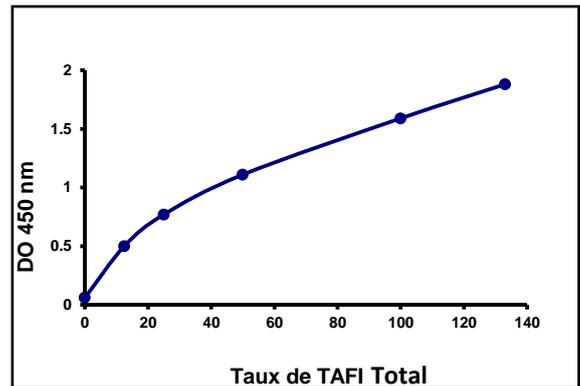
- Afin de favoriser la réaction immunologique, l'incubation doit être réalisée à 37°C.
- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour micro-plaques ELISA est possible.
- Ne jamais 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.
- Pour une lecture bichromatique, le filtre 620 nm ou 690 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

EXPRESSION DES RESULTATS :

- Sur du papier millimétré, porter en abscisses le taux de **TAFI Total Ag, en %**, et en ordonnées les **DO 450** correspondantes.
- Sur la courbe obtenue, en déduire directement le taux de TAFI Total Ag dans le plasma testé à la dilution standard au **1/50**. Lorsque d'autres dilutions sont utilisées (soit D), multiplier la valeur obtenue par le facteur de dilution complémentaire (soit D:50) afin d'obtenir le taux de TAFI Total dans l'échantillon testé (**ex : x2 pour 1/100**).
- Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc..) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de TAFI Total à partir de la courbe d'étalonnage.

EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE :

La courbe d'étalonnage ci-dessous n'est qu'un exemple. Pour la mesure des taux de TAFI Total Ag, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée.



Valeurs normales :

Biochimie :

- Le taux de TAFI Total Ag est d'environ 2.5 µg/ml dans le plasma normal, quand il est mesuré avec la trousse ZYMUTEST (TOTAL) TAFI :Ag.
- Le TAFI, synthétisé par le foie, est activé par la thrombine, en présence de thrombomoduline, en une carboxypeptidase qui coupe les sites lysines de l'extrémité carboxyterminale de la fibrine, sur les quels se fixent le tPA et le plasminogène, d'où son effet inhibiteur de la fibrinolyse. Le poids moléculaire de TAFI est de 60000 daltons.

Changement par rapport à la précédente version.