

ZYMUTEST DDimère

Référence RK023A

(Dosage ELISA du DDimère humain)

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 17/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST DDimère est un dosage ELISA sandwich des produits de dégradation de la fibrine (DDimère), sur plasma ou tout autre milieu biologique où le DDimère doit être mesuré. Le taux de fibrinogène plasmatique n'interfère pas dans ce dosage, l'anticorps monoclonal de capture utilisé dans le coffret étant hautement spécifique du DDimère.

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 DDimère, avec le coffret ZYMUTEST DDimère, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée avec un anticorps monoclonal de souris purifié, hautement spécifique du DDimère, et stabilisée.

Le plasma, ou l'échantillon dilué à tester, est introduit dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Si le DDimère est présent, il se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, le DDimère fixé sur la plaque est révélé par l'immunoconjugué, anticorps monoclonal couplé à la peroxydase (HRP), qui se lie à un second épitope libre du DDimère. Après lavage, le substrat de la peroxydase, 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 DDimère humain présent dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na₂ EDTA.
- Tout milieu biologique où le DDimère doit être mesuré.

REACTIFS :

1. **COAT : Microplaque ELISA** (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée avec un anticorps monoclonal de souris hautement purifié et spécifique du DDimère, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons de 50 ml de **diluant échantillon** (Sample Diluent), prêt à l'emploi.
3. **CAL** : 3 flacons de **Calibrateur DDimère**, lyophilisé (DDimer Calibrator). Après reconstitution par 2 ml de diluant échantillon (SD), une solution titrée à environ 200 ng/ml de DDimère en plasma humain dilué (1/50) est obtenue. Le titre du calibrateur est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret
4. **CI** : 1 flacon de 0.5 ml de **plasma DDimère Control I (High)** lyophilisé (contrôle haut, plasma humain).
5. **CII** : 1 flacon de 0.5 ml de **plasma DDimère Control II (Low)** lyophilisé (contrôle bas, plasma humain).

Nota : Pour les contrôles et le calibrateur, les concentrations en DDimère et les intervalles de confiance peuvent varier de lot à lot. Les valeurs obtenues sont indiquées sur le papillon fourni dans le coffret.

6. **IC** : 3 flacons d'**immunoconjugué** (Anti-(H)-DDimer-HRP immunoconjugué), anticorps monoclonal spécifique du DDimère 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 **6ml 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 coffrets ZYMUTEST DDimère 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.
- Laveur 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. **DDimer Calibrator** : Chaque flacon doit être reconstitué avec **2 ml** de "Sample Diluent" afin d'obtenir un standard titré en DDimère. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins **8 heures** à température du laboratoire.
4. **Plasma DDimère Control I High** (plasma humain, contrôle haut) : reconstituer avec **0.5 ml** d'eau distillée. Agiter à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes ou jusqu'à dissolution totale du lyophilisat. Homogénéiser avant utilisation. Laisser stabiliser 15 min avant utilisation.
5. **Plasma DDimère Control II Low** (plasma humain, contrôle bas) : reconstituer avec **0.5 ml** d'eau distillée. Agiter à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes ou jusqu'à dissolution totale du lyophilisat. Homogénéiser avant utilisation. Laisser stabiliser 15 min avant utilisation.

Nota :

Après reconstitution, les plasmas contrôles 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 calibrateur DDimère (3) et les contrôles (4&5) 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-DDimer-HRP immunoconjugué** : 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 **8 heures** à la température du laboratoire ou **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**. La solution concentrée contient 0.05% de Kathon CG.
9. **Substrat TMB** : Prêt à l'emploi. Après ouverture, et conservé à **2-8°C**, sous réserve de contamination bactériologique lors de l'utilisation, le TMB est stable **4 semaines**.
10. **Solution d'arrêt** : 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.

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 prélevé (ponction veineuse franche, évitant l'activation de la coagulation) sur du citrate trisodique 0.109 M. Centrifuger 20 min. à 2500 g et prélever le surnageant plasmatique ; le plasma doit être testé dans les **4 heures**, ou peut être 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 recueilli sur Na₂ EDTA peut également être utilisé. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

Nota : L'activation du sang lors du prélèvement ou de la préparation du plasma doit être évitée afin d'empêcher une génération de DDimère ex-vivo.

Plasma ou échantillon à tester :

L'échantillon à tester doit être dilué au **1/50** dans le diluant échantillon (Sample Diluent). Pour des taux attendus de DDimère **>10µg/ml** dans l'échantillon testé, diluer au **1/100 (D=100), 1/200 ou davantage**. Si la concentration de DDimère attendue est faible, et pour une bonne sensibilité, l'échantillon peut être testé moins dilué, au **1/20, 1/10 ou 1/5**. Les contrôles **CI et CII**, repris par 0.5 ml d'eau distillée, sont testés dilués au **1/50** dans le diluant échantillon (Sample Diluent).

Gamme d'étalonnage :

En utilisant le calibrateur DDimère fourni dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration de DDimère	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de Plasma DDimère	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

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions d'étalonnages sont stables au moins **6 heures** à température du laboratoire.

REALISATION 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
Calibrateur DDimer, ou contrôles ou échantillon à doser dilués au 1/50, ou blanc	200 µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou les contrôles ou le plasma dilué dans les puits
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl	Vider les puits et effectuer une série de 5 lavages. (b)
Immunoconjugué Anti-DDimer-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Immédiatement après le lavage, introduire l'immunoconjugué dans les puits (b)
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl	Vider les puits et effectuer une série de 5 lavages. (b)
Substrat TMB / H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement après le lavage, introduire cette solution dans les puits (b,c). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Acide sulfurique 0,45 M	50 µl	Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat (c)
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm . (d). Soustraire la valeur du blanc.		

Remarques :

- 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. **Effectuer rapidement les dépôts de calibrateurs, contrôles et tests sur la microplaque (≤ 10 min.) afin d'obtenir une cinétique immunologique homogène pour l'immunocapture.**
- 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 la concentration de **DDimère, en ng/ml**, et en ordonnées les **DO 450** correspondantes (voir modèle sur le papillon).

Pour la mesure des taux de DDimère, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée. Sur la courbe obtenue, déduire la concentration de DDimère dans la dilution testée. **Multiplier** la valeur obtenue par le **facteur de dilution** utilisé (**50** pour la méthode classique, ou dilution effectivement réalisée 1/5, 1/10, 1/20, 1/100, 1/200, ...) afin d'obtenir la concentration de DDimère en ng/ml dans l'échantillon testé.

Pour les **contrôles I et II**, la concentration mesurée doit être **multipliée par 50**.

Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc...) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de DDimère à partir de la courbe d'étalonnage.

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.

BIOCHIMIE :

- En cas d'activation sanguine, la génération de thrombine et de plasmine sont stimulées conjointement, ce qui génère des produits dérivés de la fibrine et des produits de dégradation de la fibrine, à différents stades. In vivo, la lyse du caillot de fibrine génère des produits de dégradation très hétérogènes, habituellement de haut poids moléculaire, incluant des X-oligomères, et des complexes D-X-D, Y-D et DDimère-E. Tous ces produits sont dénommés sous la terminologie de DDimère. Toutefois, le DDimère lui-même est rarement présent dans le sang. Les épitopes spécifiques du DDimère sont exposés durant la dégradation de la fibrine, et mesurés comme DDimère. La concentration de DDimère dans le plasma humain normal est habituellement <400ng/ml.

REACTIVITE DU DOSAGE :

La trousse ZYMUTEST DDimer mesure de façon homogène les différents produits de dégradation de la fibrine générés in vivo, lorsqu'un caillot de fibrine est formé et dégradé par le processus de fibrinolyse, quel que soit son stade de dégradation. Le test est insensible au fibrinogène et à ses produits de dégradation. Ce spectre de réactivité rend le dosage ZYMUTEST DDimer hautement spécifique et sensible pour le diagnostic des contextes cliniques impliquant une activation sanguine.

LIMITES :

Toute activation sanguine doit être évitée ex vivo, afin de conserver la spécificité du test pour la génération et la dégradation de la fibrine in vivo, et d'éviter toute surestimation de la concentration de DDimère mesurée.

Changement par rapport à la précédente version.