



ZYMUTEST Fibrinogen

Référence RK024A

(Dosage ELISA du Fibrinogène)

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 17/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST Fibrinogen est un dosage ELISA sandwich du fibrinogène humain, utilisable sur plasma pauvre en plaquettes ou tout autre milieu biologique où le fibrinogène doit être mesuré. Ce coffret, développé avec des anticorps polyclonaux de forte affinité, permet également la mesure du fibrinogène chez d'autres espèces animales, en particulier chez la souris.

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 fibrinogène, avec le coffret ZYMUTEST Fibrinogen, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée avec des anticorps polyclonaux de lapin, spécifiques du fibrinogène, et stabilisée.

Le plasma, ou l'échantillon dilué à tester, est introduit dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Si le fibrinogène est présent, il se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, le fibrinogène fixé sur la plaque est révélé par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal de lapin couplé à la peroxydase (HRP), qui se lie aux épitopes libres du fibrinogène. 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 fibrinogène 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 fibrinogène doit être mesuré.
- Plasma de souris prélevé sur citrate ou Na₂ EDTA.

REACTIFS :

1. **COAT : Microplaque ELISA** (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée avec les anticorps polyclonaux de lapin et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons de 60 ml de **diluant échantillon** (B2F-Sample Diluent), prêt à l'emploi contenant un inhibiteur du facteur Rhumatoïde*.
3. **Std** : 3 flacons de **fibrinogène humain standard**, lyophilisé ((h) Fibrinogen Standard). Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de diluant échantillon (SD), afin d'obtenir une solution titrée en fibrinogène humain. Le titre du standard est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.
4. **CI** : 1 flacon de 1 ml de **Fibrinogen Control I (High)** lyophilisé (contrôle haut).
5. **CII** : 1 flacon de 1 ml de **Fibrinogen Control II (Low)** lyophilisé (contrôle bas)

Nota : Les concentrations en fibrinogène 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-Fibrinogen-HRP immunoconjugate), anticorps polyclonal de lapin, spécifique du fibrinogène et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de **diluant pour immunoconjugué** (B2F-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 Fibrinogen pour effectuer un dosage.

NOTA : *L'utilisation de l'inhibiteur du Facteur Rhumatoïde pour la préparation du diluant échantillon permet d'éviter l'interférence du facteur rhumatoïde, lorsqu'il est présent

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 minigrup fourni.
2. **B2F-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 KathonCG.
3. **(h) Fibrinogen Standard** : Chaque flacon doit être reconstitué avec **2 ml** de "B2F-Sample Diluent" afin d'obtenir un standard titré en fibrinogène humain. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins **4 heures** à température du laboratoire ou **24 heures à 2-8°C**.
4. **Fibrinogen Control I (contrôle haut)** : reconstituer avec **1 ml** de "B2F-Sample Diluent".
5. **Fibrinogen Control II (contrôle bas)** : reconstituer avec **1 ml** de "B2F-Sample Diluent".

Nota :

Après reconstitution, les plasmas contrôlés I et II sont stables au moins **4 heures** à température du laboratoire, **24 heures à 2-8°C**, ou **2 mois** congelés à **-20°C** ou en dessous.

Précautions : Le fibrinogène standard (3) et les contrôles (4&5) sont préparés à partir de fibrinogène extrait 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-Fibrinogen-HRP immunoconjugate** : Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par **7.5 ml de "B2F-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 ou **4 semaines à 2-8°C**.
7. **B2F-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 KathonCG.
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 KathonCG.
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 sur du citrate trisodique 0.109 M. Centrifuger 20 min. à 2500 g et prélever le surnageant plasmatique ; le plasma conservé à 2-8°C doit être utilisé dans les **24 heures**, et dans les **8 heures** lorsqu'il est conservé à température ambiante. Il 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 **8 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, peut entraîner la formation de caillots. La concentration de fibrinogène mesurée est alors sous-estimée.

Plasma ou échantillon à tester :

Cette méthode est proposée pour doser le fibrinogène dans des milieux où il se trouve en faible concentration, ou dans les surnageants de culture cellulaire. L'échantillon à tester doit être dilué de façon à ce que le taux attendu de fibrinogène dans la dilution testée soit < « C » ou environ **50 ng/ml**. A titre d'exemple, un plasma humain doit être analysé dilué au 1/100000, ou au 1/200000 (ou davantage en cas d'hyperfibrinogénémie), dans le diluant échantillon (B2F-Sample Diluent). Les plasmas contrôles CI et CII, repris par 1ml de «B2F-Sample Diluent », sont testés « purs ».

Gamme d'étalonnage :

En utilisant le fibrinogène standard fourni dans le coffret (2 ml à « C » ng/ml, 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 fibrinogène (ng/ml) | C | C/2 | C/4 | C/10 | C/20 | 0 |
|--------------------------------------|------|--------|---------|--------|---------|------|
| Vol. de fibrinogène Std à C ng/ml | 1 ml | 0.5 ml | 0.25 ml | 0.1 ml | 0.05 ml | 0 ml |
| Vol. de B2F-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 **8 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 |
|---|--------|---|
| Fibrinogène standard ou contrôles, ou échantillon à doser dilué | 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-fibrinogène-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué | 200 µl | Immédiatement après le lavage, introduire l'immunoconjugué 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) |
| 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) | | |
| Acide sulfurique 0,45 M | 50 µl | Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat. |
| Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm . (d) | | |

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'immuno-capture.
- 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 **fibrinogène, en ng/ml**, et en ordonnées les **DO 450** correspondantes.

Pour la mesure des taux de fibrinogène, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée. Sur la courbe obtenue (voir modèle sur le papillon), déduire la concentration de fibrinogène dans la dilution testée. **Multiplier** la valeur obtenue par le **facteur de dilution** afin d'obtenir la concentration de fibrinogène en ng/ml dans l'échantillon testé.

Pour les contrôles I et II, la concentration mesurée est lue directement sur la courbe.

Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc.) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de fibrinogène 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.

VALEURS NORMALES :

La concentration de fibrinogène dans le plasma humain normal est habituellement comprise entre 1,5 et 5 mg/ml.

BIOCHIMIE DU FIBRINOGENE :

Le fibrinogène est une glycoprotéine de poids moléculaire 340 Kd, composée de 6 chaînes symétriques 2 à 2, et reliées par des ponts disulfures (A α , B β et γ). Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène est coagulé en fibrine. La plasmine le dégrade en fragments X et Y d'abord, puis en fragments D et E.

STANDARDISATION :

Le standard fibrinogène de la trousse de dosage ZYMUTEST Fibrinogen est calibré à l'aide d'une préparation purifiée de fibrinogène (coagulabilité > 99 %) dont le taux est précisément mesuré par son taux protéique.

REACTIVITE DU DOSAGE :

La trousse ZYMUTEST Fibrinogen mesure le fibrinogène, ainsi que ses produits de dégradation, ou les produits de dégradation de la fibrine.

La trousse ZYMUTEST Fibrinogen présente des réactivités croisées avec le fibrinogène de nombreux vertébrés (autres que le lapin), et en particulier avec le fibrinogène de souris. Si la trousse ZYMUTEST Fibrinogen est utilisée pour mesurer du Fibrinogène d'une autre espèce animale, le calibrateur utilisé doit être ajusté en fonction de la réactivité du Fibrinogène testé dans le coffret. Pour cela, utiliser un échantillon contenant un taux connu de Fibrinogène de l'espèce à doser, et le tester avec le coffret ZYMUTEST Fibrinogen. Etablir un rapport entre le taux mesuré et le taux réel du calibrateur. Ce rapport devra être utilisé ensuite pour obtenir le taux effectif de Fibrinogène pour l'espèce testée.

RECOMMANDATIONS :

En cas de dosage sur plasma, les dilutions requises sont très importantes (1/100000 ou davantage). Pour une meilleure précision, procéder par dilutions successives de 1/10 en 1/10 (5 fois de suite) ou de 1/100 en 1/100 (puis 1/10), pour la dilution 1/100000.

Changement par rapport à la précédente version.