

ZYMUTEST™ Tissue Factor (full length)

REF RK035A

96 tests

Méthode ELISA ultrasensible pour la détermination quantitative du Facteur Tissulaire entier.

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.



HYPHEN
BioMed

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

Tél : +33 (0)1 34 40 65 10

Fax : +33 (0)1 34 48 72 36

www.hyphen-biomed.com

info@hyphen-biomed.com

Français, dernière révision : 06-2023

UTILISATION:

Le coffret ZYMUTEST™ Tissue Factor (full length) est une méthode ELISA ultrasensible pour la détermination quantitative du Facteur Tissulaire entier (FL-FT) (1-263), sur plasma et milieu purifié, ou tout autre fluide biologique où le FL-FT est présent.

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 Facteur Tissulaire (FT) (aussi appelé Facteur III, ou thromboplastine), est l'initiateur physiologique de la coagulation. Le FT se lie au Facteur VIIa pour former un complexe FVIIa-FT qui clive les Facteurs IX et X, initiant la cascade de la coagulation. FT est une protéine transmembranaire de 47kDa (SDS-PAGE) exprimée constitutivement par les cellules sous-endothéliales comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses. Le FT a trois domaines : un domaine extracellulaire (aa 1-219), un domaine transmembranaire (aa 220-242) et une queue cytoplasmique (aa 243-263).

PRINCIPE:

Dans un premier temps, la solution TF Assay-Enhancer et l'échantillon sont introduits dans les puits de la plaque sensibilisée par un anticorps monoclonal de souris spécifique du FL-FT humain. Le FL-FT présent dans l'échantillon se fixe sur la phase solide par un de ses épitopes. Dans un second temps, après une étape de lavage, un anticorps monoclonal couplé à la biotine (BIOT Ab) spécifique d'un autre épitope, est introduit dans les puits de la plaque ELISA et se fixe sur le FL-FT immobilisé sur la plaque. Dans un troisième temps, après une autre étape de lavage, un conjugué Horseradish Peroxydase-Streptavidine (HRP-S) est introduit. De part sa forte affinité pour la biotine, la Streptavidine se fixe sur l'anticorps biotinylé. Après une dernière étape de lavage, le substrat de la peroxydase hautement sensible (TMB-HS), en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. Lorsque la réaction est arrêtée avec l'acide sulfurique, une couleur jaune est obtenue. Cette coloration est directement proportionnelle à la concentration de FL-FT humain dans l'échantillon à doser.

REACTIFS:

- COAT** Microplaque ELISA : **12x8** contenant 12 barrettes de 8 puits, coâtées avec un anticorps monoclonal spécifique du FL-FT humain, puis stabilisées. La microplaque est emballée dans un sachet aluminium hermétiquement fermée en présence d'un déshydratant.
- SD TISSUE FACTOR** Diluant échantillon FT : 2 flacons de 40 mL de diluant, coloré en vert, prêt à l'emploi. Contient du Proclin et de la BSA.
- AE-TF** Solution TF Assay-Enhancer: 1 flacon de 15 mL de solution, colorée en vert, prêt à l'emploi. Contient du Proclin et de la BSA.
- CAL TISSUE FACTOR** Etalon FT : 3 flacons de 2 mL d'étalon, lyophilisé. Contient de la BSA.
- CI TISSUE FACTOR** FT contrôle haut : 1 flacon de 1 mL de Tissue Factor Control I, lyophilisé. Contient de la BSA.
- CII TISSUE FACTOR** FT contrôle bas : 1 flacon de 1 mL de Tissue Factor Control II, lyophilisé. Contient de la BSA.
- BIOT Ab** Anticorps monoclonaux de souris spécifique du FL-FT humain, couplée à la biotine, 4 fois concentré : 1 flacon de 6 mL, lyophilisé. Contient de la BSA.
- HRP-S** Conjugué HRP-Streptavidine: 3 flacons de 7,5 mL, lyophilisé. Contient de la BSA.
- CD TISSUE FACTOR** Diluant pour immunoconjugué HRP-Streptavidine : 1 flacon de 25 mL de diluant, prêt à l'emploi. Contient du Proclin.
- WS ELISA** Solution de lavage : 1 flacon de 50 mL de diluant, **20x** 20 fois concentrée. Contient du Proclin.
- TMB-HS** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine: 1 flacon de 25 mL de substrat, prêt à l'emploi. Contient de l'eau oxygénée.
- Stop** Acide sulfurique 0,45M: 1 flacon de 6 mL, prêt à l'emploi.

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

HYPHEN BioMed

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

- 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. Ouvrir les opercules des barrettes nécessaires au dosage. Les barrettes doivent être utilisées dans les 30 minutes.

Reconstituer chaque flacon avec exactement :

CI TISSUE FACTOR → 1 mL d'eau distillée afin d'obtenir une solution contenant environ 350 pg/mL de FT humain (se référer au papillon contenu dans le coffret). Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

CII TISSUE FACTOR → 1 mL d'eau distillée afin d'obtenir une solution contenant environ 75 pg/mL de FT humain (se référer au papillon contenu dans le coffret). Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

CAL TISSUE FACTOR → 2 mL de **SD TISSUE FACTOR** afin d'obtenir une solution titrant « C » pg/mL de FT humain (environ 600 pg/mL, se référer au papillon contenu dans le coffret). Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

BIOT Ab → 6 mL de **SD TISSUE FACTOR** au moins 15 minutes avant utilisation. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, puis prélever la quantité d'anticorps nécessaire pour le test et la diluer au 1/4 en **SD TISSUE FACTOR**. Par exemple, pour 4 barrettes, prélever 1,8 mL d'anticorps biotinylé et ajouter 5,4 mL de **SD TISSUE FACTOR**.

HRP-S → 7,5 mL de **CD TISSUE FACTOR** au moins 15 minutes avant utilisation. Agiter délicatement jusqu'à dissolution complète.

SD TISSUE FACTOR **AE-TF** **TMB-HS** **Stop** **CD TISSUE FACTOR**

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 refermé, en présence du déshydratant) placé dans le sachet en plastique pour microplaque fourni (minigrp) 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 TISSUE FACTOR **CI TISSUE FACTOR** **CII TISSUE FACTOR**

- 72 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois congelé à -20°C ou moins*

BIOT Ab → 4 semaines à 2-8°C.
24 heures à température ambiante (18-25°C).
6 mois congelé à -20°C ou moins*

HRP-S → 4 semaines à 2-8°C.
24 heures à température ambiante (18-25°C).
2 mois congelé à -20°C ou moins*

*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 :

D750-01/ZY/035A/v3

SD TISSUE FACTOR | **AE-TF** | **CD TISSUE FACTOR** | **TMB-HS**

→ 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 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0.109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI GP44-A4⁴ (et CLSI H21-A5⁵) pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation). Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{4,5}.

PROCEDURE:**Méthode de dosage:**

1. Les échantillons et les contrôles doivent être testés non dilués. Pour des échantillons autres que le plasma humain, la dilution doit être ajustée pour avoir au final une concentration comprise entre 25 et 500 ou « C » pg/mL de FL-FT. La dilution doit être réalisée en **SD TISSUE FACTOR**.

2. En utilisant l'étalon **CAL TISSUE FACTOR** avec une concentration en pg/mL de « C », préparer la gamme d'étalonnage selon le tableau ci-dessous :

Concentration de FT (pg/mL)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. d'étalon FT	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 pour homogénéiser.

Les dilutions sont stables **8 heures** à température ambiante (18-25°C).

3. 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
AE-TF	100 µL	Introduire le AE-TF dans les puits de la microplaque ELISA
Echantillons ou CAL TISSUE FACTOR ou CI TISSUE FACTOR ou CII TISSUE FACTOR ou SD TISSUE FACTOR (blanc)	100 µL	Introduire les solutions standards ou les échantillons à doser dans les puits correspondants sur la micro plaque ELISA
Incuber 2 heures à 37°C (a)		
WS ELISA	300 µL	Effectuer une série de 5 lavages (b).
BIOT Ab	200 µL	Introduire l' anticorps biotinylé dilué au 1/4 en SD TISSUE FACTOR dans les puits de la microplaque ELISA
Incuber 2 heures à 37°C (a)		
WS ELISA	300 µL	Effectuer une série de 5 lavages (b).
HRP-S	200 µL	Introduire le HRP-S dans les puits de la microplaque ELISA
Incuber pendant 30 minutes exactement à température ambiante (18-25°C) (a)		
WS ELISA	300 µL	Effectuer une série de 5 lavages (b).
TMB-HS	200 µL	Immédiatement après le lavage, introduire le substrat dans les puits (b). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire précisément et à un intervalle de temps précis. (c)
Incuber pendant 10 minutes exactement à température ambiante (18-25°C) (a)		
Stop	50 µL	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).		

Déposer les dilutions de l'étalon, les contrôles et les échantillons, le plus rapidement possible, pour obtenir une cinétique homogène du dosage. Un délai trop important (> 10 min) entre les premiers et derniers dépôts peut influencer la cinétique immunologique et fausser les résultats (sous-estimation des valeurs pour les derniers puits).

- 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.

Au cas où une plaque entière est utilisée, distribuer les dilutions de l'étalon au centre de la plaque pour réduire l'effet cinétique.

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.

TRACABILITE :

La concentration en FL-FT des étalons et contrôles est établie précisément pour chaque lot par rapport à un standard interne de référence dont le taux en FL-FT est précisément déterminé. Les étalons et contrôles sont préparés avec un FL-FT recombinant (1-263).

RESULTATS:

- Les DO450 obtenues peuvent varier en fonction de la température réelle à laquelle est effectuée le dosage.
- Tracer la droite de calibration en portant en ordonnées la DO à 450 nm et en abscisses la concentration de FL-FT en pg/mL, en choisissant le mode d'interpolation « best fit » (se reporter au papillon contenu dans le coffret).
- Les résultats sont exprimés à l'aide des DO450 obtenues pour les échantillons et les contrôles en utilisant la courbe de calibration.
- La concentration de FL-FT (pg/mL) dans l'échantillon à doser (non dilué) est déduite directement de la courbe de calibration.
- Si l'échantillon est dilué, prendre en compte le facteur de dilution complémentaire appliqué.
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

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 d'absorbance élevée du contrôle négatif. Afin d'éviter tout développement de coloration non spécifique, vérifier que l'étape de lavage a été réalisée correctement.
- La présence de facteur rhumatoïde dans le plasma surestime le dosage du FL-FT.

PERFORMANCES:

- Zone de mesure : environ 3 pg/mL à 700 pg/mL.
- La limite de détection est environ 3 pg/mL.
- CV intra essais : (N= 12) : CV = 6% pour **CI TISSUE FACTOR**
CV = 8% pour **CII TISSUE FACTOR**
- CV inter essais : (N= 10) : CV = 5% pour **CI TISSUE FACTOR**
CV = 5% pour **CII TISSUE FACTOR**
- Recouvrement en plasma** : environ 65% pour un plasma non dilué.
- Cross-réactivité** : aucune cross-réactivité significative n'a été observée avec: le Facteur II, le Facteur V, le Facteur VII, le Facteur IX, le Facteur X, le Facteur Xa, le TFPI tronqué et le TFPI.

REFERENCES:

- Parhami-seren B. *et al.* Immunologic quantitation of tissue factors. J. Thromb. Haemost. 2006.
- Mackman N. The many faces of Tissue Factor. J. Thromb. Haemost. 2009.
- Edgington TS. *et al.* The structural biology of expression and function of tissue factor. Thromb Haemost. 1991.
- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

SYMBOLES:

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

CD TISSUE FACTOR | **SD TISSUE FACTOR** | **WS ELISA** | **AE-TF**

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

Changement par rapport à la précédente version.