



ZYMUTEST (ACTIVATABLE) TAFI

Référence RK037A

(Forme zymogène de l'Inhibiteur de la Fibrinolyse Activable par la Thrombine)

Dosage ELISA des formes activables du TAFI dans le plasma humain

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 18/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST (Activatable)TAFI est une méthode ELISA, type sandwich, destinée à la mesure de la forme zymogène et activable du TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor ou CPU), dans le plasma humain, ou tout autre milieu où le TAFI doit être mesuré. Les formes inactives du TAFI ne sont pas dosées.

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 de la forme zymogène du TAFI, avec le coffret ZYMUTEST (Activatable) TAFI, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée par un anticorps monoclonal spécifique du TAFI Activable, et stabilisée.

Le plasma ou l'échantillon à tester est introduit 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 monoclonal couplé à la peroxidase (HRP), qui réagit avec un autre épitope libre du TAFI Activable. Après lavage, le substrat, Tetramethylbenzidine (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 Activable 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 Activable 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 humain Activable, stabilisée, et 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 (Plasma TAFI calibrator), lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué par 0,5 ml d'eau distillée et dilué au 1/100 en diluant échantillon (F-SD) afin d'obtenir un plasma titré en TAFI.
4. **Cl** : 1 flacon de 0,5 ml de TAFI Control I, lyophilisé (plasma humain, contrôle I, haut).
5. **Cl** : 1 flacon de 0,5 ml de TAFI Control II, lyophilisé (plasma humain, contrôle II, bas).

Nota : La concentration en TAFI et l'intervalle de confiance des contrôles et du calibrateur sont indiqués sur le papillon fourni dans le coffret.

6. **IC** : 3 flacons d'Immunoconjugué [Anti (h-Act.)-TAFI -HRP immunoconjugate], anticorps monoclonal spécifique du TAFI 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' - Tetramethylbenzidine, 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 réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.

CONSERVATION :

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.

Nota : Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

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 minigrif 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 distillée. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins 8 h à température du laboratoire (18-25°C) 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 : Une fois reconstitués, les contrôles I et II sont stables 24 heures à température du laboratoire (18-25°C), 72 heures à 2-8°C ou 2 mois congelés à -20°C ou plus.

Précautions : Le calibrateur (3) et les plasmas contrôles I et II (4 & 5) sont préparés à partir de plasma humain. Ce dernier a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine. 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-Act.)-TAFI-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 de réaliser le dosage afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

COLLECTE, PREPARATION ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS TESTES :

Type d'échantillon : Plasma humain citraté ou autres fluides biologiques contenant du TAFI activable.

Collecte/préparation : Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109M (ou 0.129M) (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g.

Stabilité/Conservation : 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.

Nota : se référer aux recommandations du GEHT ou du CLSI pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons. Rejeter tout prélèvement suspect.

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.

MODE OPERATOIRE :

Echantillons et contrôles :

Le plasma ou l'échantillon à tester sont analysés dilués au 1/100 dans le diluant échantillon (F-Sample-Diluent) (par exemple 10µl de plasma dans 0.99ml de F-SD). Pour des taux de TAFI Activable > 100%, diluer au 1/200 ou au 1/400, ou davantage selon le cas (soit D cette dilution). Les taux obtenus devront être corrigés en multipliant par le facteur de dilution complémentaire D:100 (soit x2 pour 1/200, x4 pour 1/400, etc...).

Les contrôles I et II doivent être testés dilués au 1/100.

Calibration :

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

Diluer le Plasma TAFI calibrator inclus dans kit (reconstitué par 0.5 ml d'eau distillée) au 1/100 en F-SD. En utilisant ce plasma TAFI calibrator dilué au 1/100 et ayant un taux "C" de TAFI, 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 TAFI	C	C/2	C/4	C/10	0
Vol. de Plasma TAFI calibrator dilué au 1/100.	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0 ml
Vol. de F-Sample-Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	1 ml

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions d'étalonnage 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 température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (b).
Immunoconjugué Anti-(h-Act.)-TAFI-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (b).
Substrat TMB / H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (b). <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (a, c)
Laisser la coloration se développer pendant 5 min. à température du laboratoire (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. Soustraire les blancs (d).		

Nota : Effectuer les dépôts de l'étalonnage, des contrôles et des tests, le plus rapidement possible, pour une cinétique homogène des divers dosages. Un délai trop important (> 10 min) entre les premiers et derniers dépôts peut influencer la cinétique immunologique et fausser les résultats.

- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. Bien respecter la température d'incubation (18-25°C). Si la température est trop forte (>25°C) ou trop faible (<18°C), les résultats sont susceptibles d'être affectés et les DO mesurées à 450 nm trop fortes ou trop faibles. En tenir compte pour l'analyse des résultats. Ne pas agiter la plaque, l'utilisation d'un agitateur étant susceptible d'augmenter sensiblement les DO 450 obtenues dans le test.
- 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, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

EXPRESSION DES RESULTATS :

Sur papier millimétré, porter les concentrations de TAFI Activable en % sur l'axe des abscisses et les DO450 correspondantes en ordonnée. Tracer la courbe d'étalonnage passant au mieux par les divers points. Une courbe de type régression polynomiale de degré 2 convient.

- Pour la mesure des taux de TAFI Activable, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée (voir modèle présenté sur le papillon). Sur la courbe obtenue, déduire la concentration de TAFI Activable dans l'échantillon testé dilué à la dilution standard du test. Pour obtenir la concentration en TAFI Activable d'un échantillon testé plus ou moins dilué (soit D), multiplier le taux obtenu par D/100 (ex : x2 pour un échantillon testé à la dilution 1/200 où D=200 ou x0.5 pour un échantillon testé à la dilution 1/50 où D=50).

- Pour les contrôles I et II, testés au 1/100, la concentration mesurée est obtenue en lecture directe à partir de la gamme de calibration. L'étalonnage est valide lorsque les valeurs mesurées pour les contrôles de qualité sont conformes, dans l'intervalle de confiance défini indiqué sur le papillon du coffret.

- Alternativement, un logiciel spécifique (ex : Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations. Choisir une courbe « Best Fit », ou une régression polynomiale de degré 2.

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 :

- Le taux pondéral de TAFI Activable est variable selon les référentiels et les kits utilisés, il se situe entre 2,0 et 15µg/ml dans le plasma normal.
- 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 lesquels se fixent le tPA et le plasminogène, d'où son effet inhibiteur de la fibrinolyse. Le poids moléculaire du TAFI est de 60000 daltons.

APPLICATIONS :

- Le couple d'anticorps utilisé dans le kit Zymustest (Activatable) TAFI est spécifique de la forme Zymogène (ou activable) du TAFI (2). Le kit ne réagit pas avec les formes inactives ou les peptides d'activation. Il permet de détecter la quantité totale de TAFI activable par la thrombine en présence de thrombomoduline.

REFERENCES :

- Boffa MB, Wang W, Bajzae L, Nesheim ME. Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability and enzymatic properties. J Biol Chem 1998; 273: 2127-2135.
- Ceresa E, Brouwers E, Peeters M, Jern C, Declerck P J, Gils A. Development of ELISAs measuring the extent of TAFI activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 423-428.
- Willemsse J L, Hendriks D F. Measurement of procarboxypeptidase U (TAFI) in human plasma: a laboratory challenge. Clin chem 2006; 52(1):30-36.
- Bouma BN, Meijers JCM. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). J Thromb Haemost 2003; 1:1566-74.

Changement par rapport à la précédente version.