

**ZYMUTEST TAFI Ag**  
# ARK008A  
Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor  
(Complete ELISA kit for the assay of TAFI)



Manufactured By: HYPHEN BioMed

For *in vitro* use only

For research use only

Last revision: 18/01/2007

**INTENDED USE:**

The ZYMUTEST TAFI Ag kit is a two-site immuno-assay for measuring human TAFI Ag (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) in plasma, or in any fluid where TAFI can be present.

**ASSAY PRINCIPLE:**

ZYMUTEST TAFI Ag is a sandwich ELISA specific for human TAFI.

The diluted tested plasma or biological fluid is introduced into a microwell coated with a monoclonal antibody specific for human TAFI. When present, this protein is captured onto the solid phase. Following a washing step, the immunoconjugate, which is a goat polyclonal antibody coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced, and binds to the free epitopes of immobilized TAFI. Following a new washing step, the peroxidase substrate, Tetramethylbenzidine (TMB) in presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), is introduced and a blue colour develops. The colour turns yellow when the reaction is stopped with Sulfuric Acid. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human TAFI in the tested sample.

**TEST SAMPLE:**

- Trisodium Citrate or Na<sub>2</sub> EDTA anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where TAFI Ag must be measured.

**REAGENTS:**

1. **COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with a mouse monoclonal antibody specific for human TAFI, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
2. **SD:** Two vials containing 50ml of F-Sample Diluent, ready to use.
3. **Cal:** Three vials of Plasma TAFI calibrator, (normal plasma calibrated with a reference plasma pool), lyophilised.  
  
Each vial, when restored with 0.5 ml distilled water and diluted fifty fold with F-Sample diluent (SD), allows obtaining the calibrator plasma. The exact TAFI Ag concentration is indicated on the flyer provided in the kit.
4. **CI:** One vial containing 0.5 ml of lyophilised TAFI Control I (human plasma, high).
5. **CII:** One vial containing 0.5 ml of lyophilised TAFI Control II (human plasma, low). The TAFI concentrations and acceptancy ranges for controls are indicated on the flyer provided in the kit.
6. **IC:** Three vials of Anti-(H)-TAFI-HRP immunoconjugate, a goat polyclonal antibody coupled to HRP, lyophilised.
7. **CD:** One vial of 25 ml of Conjugate Diluent, ready to use.
8. **WS:** One vial of 50 ml of 20 fold concentrated Wash Solution.
9. **TMB:** One vial of 25 ml peroxidase substrate: 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine containing hydrogen peroxide. Ready to use.
10. **SA:** One vial of 6 ml of 0.45M Sulfuric acid. Ready to use.

**Nota:** Use only components from kits with the same lot number. Do not mix components from different lots of kits when running the assay.

**REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED:**

- 8-channel or repeating pipette allowing dispensing 50-300 µl.
- 1-channel pipettes at variable volumes from 0 to 20 µl, 20 to 200 µl and 200 to 1000 µl.
- Micro ELISA plate washing equipment and shaker.
- Micro ELISA plate reader with a wavelength set up at 450 nm.
- Distilled water.

**REAGENTS PREPARATION, STORAGE AND STABILITY:**

In their original packaging box, before use, when stored at 2-8°C, the unopened reagents are stable until the expiration date printed on the box.

1. **Micro ELISA plate:** open the plastic pouch and take off the required amounts of 8 well strips for the test series. When out of the pouch, the strips must be used within 30 minutes. Unused strips can be stored at 2-8°C for 4 weeks in their original aluminium pouch, in presence of the desiccant, hermetically closed and protected from any moisture, and stored in the provided microplate storage bag (minigrip).
2. **F-Sample Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
3. **Plasma TAFI calibrator:** restore each vial with 0.5 ml of distilled water . This undiluted plasma is stable for at least 8 hours at room temperature and 24H at 2-8°C.
4. **TAFI Control I (human plasma, high):** restore with 0.5 ml distilled water.
5. **TAFI Control II (human plasma, low):** restore with 0.5 ml distilled water.

**Nota:** when restored, TAFI controls are stable for 8 hours at room temperature, 24 hours at 2-8°C or 2 months frozen at -20°C or below.

**Warning:** Plasma TAFI calibrator (3) and controls (4&5) are prepared with normal human plasma. This latter was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

6. **Anti-(H)-TAFI-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial gently in order to homogenize the content. The restored conjugate is stable for at least 24 hours at room temperature or for at least 4 weeks at 2-8°C.
7. **Conjugate Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
8. **Wash Solution:** Incubate the vial for 15-30 minutes in a water bath, at 37°C, until complete dissolution of solids, when present. Shake the vial and dilute the amount required 1:20 in distilled water (the 50 ml contained in the vial allow preparing 1 liter of Wash Solution). The Wash Solution must be stored at 2-8°C in its original vial and used within 4 weeks following opening. The diluted Wash Solution must be used within 7 days, when protected from any contamination and stored at 2-8°C. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
9. **TMB substrate:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8°C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use.
10. **Stop solution:** It is ready to use.

**Cautions:** Sulfuric acid, although diluted to 0.45M is caustic. As for any similar chemical, handle Sulfuric acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

**Nota:** Bring the kit at room temperature, at least 30 min. before use. Store the unused reagents at 2-8°C.

**PROCEDURE:**

**Specimen collection:**

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma should be tested within 8 hours or stored frozen at -20°C or below for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within 4 hours. EDTA collected human plasma may also be used. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

**Tested plasma or sample or controls:**

The sample must be tested diluted fifty fold (1:50) in the F-Sample Diluent. For expected TAFI concentrations > 100 %, plasma or samples can be tested at a higher dilution, 1:100, or 1:200, or more. If the dilution factor is D, concentrations obtained must then be multiplied by the complementary dilution factor which is D:50 (i.e. x2 for 1/100, x4 for 1/200 etc...). Controls I and II must be tested diluted fifty fold (1:50) as for plasmas.



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

D.750.02/ZY/008A

### Calibration:

TAFI Ag concentrations are expressed as % of a normal pooled plasma (which concentration is assigned to 100%). For the TAFI Ag assay, the 100% concentration corresponds to a normal human plasma pool diluted 1:50, which is the standard assay dilution.

Dilute the plasma calibrator 1:50 with F-SD. Using this 1:50 diluted plasma TAFI Calibrator with a TAFI Ag concentration "C" indicated, for each lot of reagents, on the flyer provided in the kit), prepare the following standard solutions:

TAFI Ag concentration (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of 1:50 diluted Plasma TAFI calibrator	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. of F-Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Mix gently for a complete homogenisation.

The standard dilutions are stable for at least 4 hours at room temperature.

### Assay procedure:

Remove the required number of strips from the aluminium pouch, for the series of measures to be performed. Then put the strips in the frame provided. In the different wells of the micro ELISA plate introduce the reagents and perform the various assay steps as indicated on the following table:

Reagent	Volume	Procedure
Plasma TAFI calibrator or tested sample or controls	200 µl	Introduce the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well.
<b>Incubate for 2 hours at 37°C (a, b)</b>		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument.
Conjugate (anti TAFI polyclonal antibody coupled with peroxidase. Restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent)	200 µl	Introduce the Anti-(H)-TAFI- HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells (c).
<b>Incubate for 1 hour at 37°C (a, b)</b>		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument.
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells.  <b>Nota:</b> The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (c, d).
<b>Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (a)</b>		
0.45M Sulphuric Acid	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45M sulphuric acid.
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450) (e).		

### Nota:

- In order to allow the complete antigen/antibody reaction, incubating the plates at 37°C is necessary for the TAFI ELISA.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used.
- Never let the plates empty between the addition of the reagents or following the washing step. The next reagent must be added within 3 minutes, in order to prevent the plate from drying, which could damage the immobilized components. If necessary, keep the plate filled with Wash Solution and empty it just before the introduction of the next reagent. The washing instrument must be adjusted in order to wash the plate gently, and to avoid a too drastic emptying, which could lower plate reactivity.
- For addition of the TMB substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

### RESULTS:

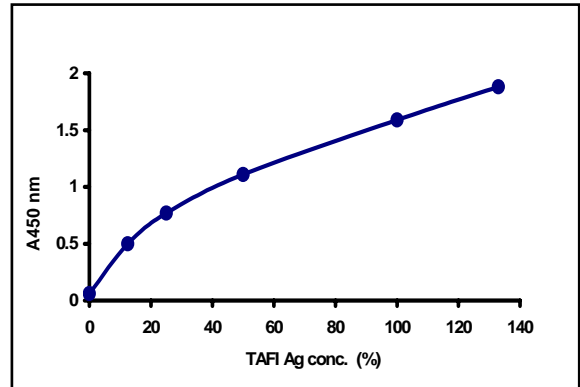
On a linear graph paper plot the TAFI Ag concentrations (in %) on abscissae and the corresponding absorbances on ordinates.

From the curve obtained, deduce directly the TAFI Ag concentration in samples tested at the standard 1:50 dilution. When higher dilutions are used (i.e. D), the TAFI Ag concentration must be multiplied by the complementary dilution factor (i.e. D:50).

Alternatively, an ELISA software (i.e. Dynex, Biolise, etc...) can be used for the calculation of concentrations.

### EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curve below is an example only. Users must construct their own calibration curve obtained using their standard dilutions.



### EXPECTED RANGE:

- The TAFI antigen concentration in normal human plasma is usually between 40 and 250% (1). There are no variations with gender, or pregnancy. Plasma TAFI Ag concentrations are stable upon time and do not present nyctemeral variations.

### BIOCHEMISTRY

- TAFI Ag concentration in normal human plasma is of about 2.5 µg/ml.
- TAFI is synthesized in liver. It is a carboxypeptidase which can be activated by thrombin-thrombomodulin complex in an active enzyme, which cleaves the carboxy terminal ends of fibrin (2, 4, 5). This induces hypofibrinolysis by decreasing the fibrin capacity to bind tPA and plasminogen (3). TAFI has a molecular weight of 60,000 daltons.

### APPLICATIONS:

- High TAFI Ag concentrations involve a hypofibrinolytic status, which can induce an elevated risk of thrombosis (3).
- Measurement of TAFI Ag on plasma in order to diagnose a risk of a hypofibrinolysis resulting from an excess of TAFI.

### REFERENCES:

- Chetaille P, Alessi MC, Kouassi D, Morange PE, Juhan-Vague I. Plasma TAFI antigen variations in healthy subjects. *Thromb Haemost* 2000; 83: 902-905.
- Boffa MB, Wang W, Bajzar 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.
- Mosnier LO, von dem Borne PAKr, Meijers JCM, Bouma BN. Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. *Thromb Haemost* 1998; 80: 829-835.
- Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 386-391.
- Hosaka Y, Takahashi Y, Ishii H. Thrombomodulin in human plasma contributes to inhibit fibrinolysis through acceleration of thrombin-dependent activation of plasma procarboxypeptidase B. *Thromb Haemost* 1998; 79: 371-377.

# ZYMUTEST TAFI Ag

Référence ARK008A

(Inhibiteur de la Fibrinolyse Activable par la Thrombine)

(Dosage ELISA du TAFI Ag)



Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation *in vitro* exclusivement

Uniquement à usage de recherche

Dernière révision : 18/01/2007

## MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST TAFI Ag est un dosage ELISA sandwich du TAFI Ag (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor), utilisable sur plasma humain, ou tout autre milieu où le TAFI Ag doit être mesuré.

## PRINCIPE :

Le dosage du TAFI antigène, avec le coffret ZYMUTEST TAFI Ag, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée par un anticorps monoclonal, spécifique du TAFI, 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, Tetramethylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 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 Ag présent dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

## ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na<sub>2</sub> EDTA.
- Tout autre échantillon biologique où le TAFI 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 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. **CI** : 1 flacon de 0,5 ml de TAFI Control II, lyophilisé (plasma humain, contrôle II, bas).  
La concentration de TAFI Ag et les intervalles de confiance sont indiqués sur le papillon fourni dans le coffret.
6. **IC** : 3 flacons d'immunoconjugué (Anti-(H)-TAFI Ag-HRP immunoconjugué), anticorps polyclonal de chèvre, spécifique du TAFI Ag 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 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 minigrip 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 Ag 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 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 Plasma TAFI Ag 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)-TAFI Ag-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 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. **Substrat TMB** : 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. **Solution d'arrêt** : Acide sulfurique 0,45M, prêt à l'emploi

**Précaution** : Même dilué à 0,45M l'acide sulfurique est caustique. Comme pour tout réactif chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précaution en particulier en utilisant des gants et en portant des lunettes de protection. Eviter tout contact avec la peau et les yeux.

**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 Na<sub>2</sub> 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.

D.750.01/ZY/008A



8580 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

### Gamme d'étalonnage :

Les taux de TAFI Ag sont exprimés en % d'un pool de plasmas normaux (titrant par définition 100%). La dilution standard pour le dosage plasmatique du TAFI 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 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 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
<b>Plasma TAFI calibrator, échantillon à doser ou contrôles</b>	<b>200 µl</b>	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits
<b>Incuber 2 heures à 37°C (a, b)</b>		
<b>Solution de lavage</b> (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	<b>300 µl</b> par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
<b>Immunoconjugué Anti-(H)-TAFI-HRP</b> reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	<b>200 µl</b>	Introduire l'immunoconjugué dans les puits
<b>Incuber 1 heure à 37°C (a, b)</b>		
<b>Solution de lavage</b> (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	<b>300 µl</b> par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
<b>Substrat TMB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>200 µl</b>	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (c, d). <b>Nota</b> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer <b>pendant 5 min.</b> à température du laboratoire		
<b>Acide sulfurique 0.45 M</b>	<b>50 µl</b>	Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat.
Attendre <b>10 min.</b> pour laisser stabiliser la coloration puis lire la <b>DO</b> obtenue à <b>450 nm (e)</b>		

### Remarques :

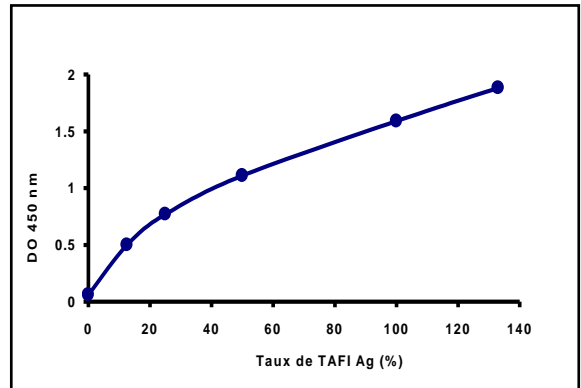
- Afin de favoriser la réaction immunologique, l'incubation doit être réalisée à 37°C.
- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour micro-plaques ELISA est possible.
- Ne jamais 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 Ag, en %**, et en ordonnées les **DO 450** correspondantes.
- Sur la courbe obtenue, en déduire directement le taux de TAFI 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 Ag 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 Ag 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 Ag, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée.



### Valeurs normales :

Le taux antigénique du TAFI dans le plasma humain normal présente de grandes variations selon les individus et est habituellement compris entre 40 et 250% (1). Ces concentrations semblent indépendantes du sexe, et de la grossesse. Elles sont stables dans le temps et ne présentent pas de variation avec le cycle nyctéméral.

### Biochimie :

- Le taux de TAFI Ag est d'environ 2.5 µg/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 (2, 3, 4, 5). Le poids moléculaire de TAFI est de 60000 daltons.

### Applications :

- Des taux élevés de TAFI induisent un état hypofibrinolytique ayant pour conséquence un risque élevé de thrombose (3).
- Dosage du TAFI Ag sur plasma pour la mise en évidence d'une hypofibrinolyse résultant d'un excès de TAFI.

### REFERENCES :

- Chetaille P, Alessi MC, Kouassi D, Morange PE, Juhan-Vague I. Plasma TAFI antigen variations in healthy subjects. *Thromb Haemost* 2000; 83: 902-905.
- Boffa MB, Wang W, Bajzar 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.
- Mosnier LO, von dem Borne PAKr, Meijers JCM, Bouma BN. Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. *Thromb Haemost* 1998; 80: 829-835.
- Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 386-391.
- Hosaka Y, Takahashi Y, Ishii H. Thrombomodulin in human plasma contributes to inhibit fibrinolysis through acceleration of thrombin-dependent activation of plasma procarboxypeptidase B. *Thromb Haemost* 1998; 79: 371-377.