

ZYMUTEST FPA

ARK016A

Assay of human Fibrino Peptide A

(Complete competitive ELISA for the measurement of FPA)



Manufactured By: HYPHEN BioMed

For in vitro use only

For research use only

Last revision: 22/06/2007

INTENDED USE:

The ZYMUTEST FPA kit is a Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (CELIA) for measuring human FPA on bentonite adsorbed human plasma, or in any fluid where FPA can be present. Fibrinogen, when present, must be removed (i.e. bentonite adsorption of human plasma), as it cross-reacts with antibodies to FPA.

ASSAY PRINCIPLE:

FPA is measured on bentonite adsorbed human plasma, which is then fibrinogen free. In a first step, FPA calibrator or tested sample is preincubated with a constant and limited amount of affinity purified rabbit antibodies specific for human FPA. In a second step, the unreacted anti-FPA antibodies are then measured using a micro ELISA plate coated with synthetic FPA and stabilised. Free antibodies bind to immobilised FPA. Following a washing step, the immunoconjugate, which is a goat polyclonal antibody specific for rabbit IgGs and coupled to Horse-Radish-Peroxidase (HRP), is introduced into microwells and binds to immobilised anti-FPA. Following a new washing step, the peroxidase substrate, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), in presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. The colour turns yellow when the reaction is stopped with Sulfuric Acid. There is an indirect relationship between the colour developed and the concentration of FPA in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Human plasma, anticoagulated with the special anticoagulant mixture for FPA testing, and made fibrinogen free by a bentonite adsorption.
- Any biological fluid, fibrinogen free, where FPA must be measured.

REAGENTS:

1. **BS:** One vial of 50 ml of bentonite suspension, ready to use.
2. **T20:** One vial of 5 ml of 2% Tween 20, ready to use.
3. **COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with synthetic human FPA, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
4. **SD:** One vial containing 50 ml of Sample Diluent, ready to use.
5. **CAL:** Three vials of FPA calibrator, lyophilised.

Each vial, when restored with 2 ml of Sample diluent (SD), allows obtaining the FPA calibrator at a "C" (ng/ml) concentration (at about 50 ng/ml).

Nota: The FPA concentration of the calibrator can vary according to the lot used and is precisely indicated for each lot on the flyer provided with the kit.

6. **ABS:** Three vials of affinity purified rabbit antibodies specific for human FPA.
7. **IC:** Three vials of Anti-rabbit IgG-HRP immunoconjugate, a goat polyclonal antibody coupled to HRP, lyophilised.
8. **CD:** One vial of 25 ml of Conjugate Diluent, ready to use.
9. **WS:** One vial of 50 ml of 20 fold concentrated Wash Solution.
10. **TMB:** One vial of 25 ml of peroxidase substrate: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, containing hydrogen peroxide, ready to use.
11. **ACS:** One vial of 20 ml of special anticoagulant solution for the assay of FPA.
12. **SA:** One vial of 6 ml of 0.45M Sulfuric acid (Stop Solution), ready to use.

Nota: Use only components from a same kit lot number. Do not mix components from different lots 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.
- Quality controls (ref ASC015K).

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. **Bentonite suspension:** mix thoroughly before use. When open, it can be used for up to 4 weeks, stored at 2-8°C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. It contains 0.9 g/l sodium azide.
2. **2% Tween 20:** it is ready to use. When open, it can be used for up to 4 weeks, stored at 2-8°C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. It contains 0.9 g/l sodium azide.
3. **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).
4. **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. Contains 0.05% Kathon CG as preservative.
5. **FPA calibrator:** restore each vial with 2 ml of Sample Diluent in order to obtain the FPA calibrator "C" (ng/ml), ready to use. This solution is stable for at least 8 hours at room temperature.

Warning: Bentonite suspension and Tween 20 contain 0.9 g/l sodium azide. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Flush with large volumes of water when discarding into a sink.

Warning: FPA calibrator is prepared with fibrinogen, extracted from normal human plasma. This latter was tested with registered methods and found negative for HIV 1 and 2 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. **Affinity purified rabbit antibodies specific for human FPA:** restore each vial with 2 ml Sample-Diluent in order to obtain the antibody ready to use. When open, it can be used for 1 week stored at 2-8°C, and provided that any bacterial contamination is avoided.
7. **Anti-rabbit IgG-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.
8. **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. Contains 0.05% Kathon CG as preservative.
9. **Wash Solution:** Incubate the vial for 15-30 minutes in a water bath 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 to prepare 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.
10. **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.
11. **Special FPA anticoagulant solution:** it is ready to use. When open, it can be used for up to 4 weeks, stored at 2-8°C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. It contains 0.9 g/l sodium azide.

Warning: Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Flush with large volumes of water when discarding into a sink.

12. **Stop Solution: 0.45M Sulfuric acid:** It is ready to use.

Cautions: Sulfuric acid, although diluted to 0.45M is caustic. As for any similar chemical, handle Sulphuric 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.



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1901

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

D.750.02/ZY/016A

www.aniara.com

PROCEDURE:

Specimen collection:

Blood (9 vol.) must be collected by a net venipuncture on the special anticoagulant mixture (1 vol.) provided for the assay of FPA (contains Trisodium Citrate, Heparin, Hirudin, Aprotinin and sodium azide) and discarding the first drops. Blood must be rapidly mixed with the anticoagulant and centrifuged at 2,500 g for 20 min. Plasma supernatant must be decanted and is then ready for bentonite treatment. Plasma must be treated with bentonite within 8 hours after collection or deep frozen within 4 hours, and stored up to 1 month at -20°C or below. Just before use, it must be thawed for 30 min. at 37°C in a water-bath, and treated with bentonite.

Bentonite treatment:

Cross-reactive fibrinogen must be removed by bentonite adsorption. Mix thoroughly the bentonite suspension in order to make it homogeneous. To 1 ml of the anticoagulated plasma, add 0.5 ml of bentonite suspension. Mix and agitate for 10 min. using an end-over-end agitator. Centrifuge for 20 min. at 2,500 g and collect 1 ml supernatant. Proceed to a new bentonite adsorption by adding again 0.5 ml of suspension to the 1 ml of supernatant, in a similar manner. The bentonite treated plasma is then fibrinogen free. It must be used within:

- 24 hours at room temperature or at 2-8°C.
- 1 month when stored frozen at -20°C or below.

Just before use, add 50 µl of 2% Tween 20 to 1 ml of bentonite adsorbed plasma.

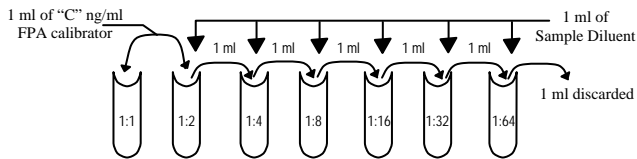
Nota: The bentonite treated plasma is two-fold diluted, and the measured FPA concentration must be multiplied by 2.

Preparation of tested samples and calibrators:

Tested sample: To 1 ml of the bentonite-adsorbed plasma containing Tween 20, add 0.1 ml of affinity purified rabbit antibodies specific for FPA. Incubate for 1 hour at 37°C.

Quality controls: For controls I and II, refer to the corresponding insert (ref. ASC015K).

Calibration: Prepare 1 ml of a serial two-step dilution of the FPA calibrator, at "C" (ng/ml), in Sample Diluent, from 1/1 to 1/64, as follows:



A calibration range of FPA, from C to C/64 (ng/ml) is obtained.

To 1 ml of each FPA concentration, add exactly 0.1 ml of affinity purified rabbit antibodies specific for FPA (restored with 2 ml Sample Diluent). Incubate for 1 hour at 37°C.

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
Incubation mixture of FPA calibrator or of tested sample or of Sample Diluent (blank)	200 µl	Introduce the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well.
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (a).
Conjugate (anti-rabbit IgG polyclonal antibody coupled with peroxidase. Restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent)	200 µl	Introduce the Anti-rabbit IgG-HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells (a).
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument.
TMB / H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (a, b).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (c)		
0.45 M Sulfuric Acid (4)	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45M sulfuric acid (b).
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450)(c, d).		

Nota:

- 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 plates 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.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-Elisa plate shaker can be used.
- For biochromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

RESULTS:

On a semi-log graph paper plot the FPA concentrations on abscissae and the corresponding absorbances on ordinates.

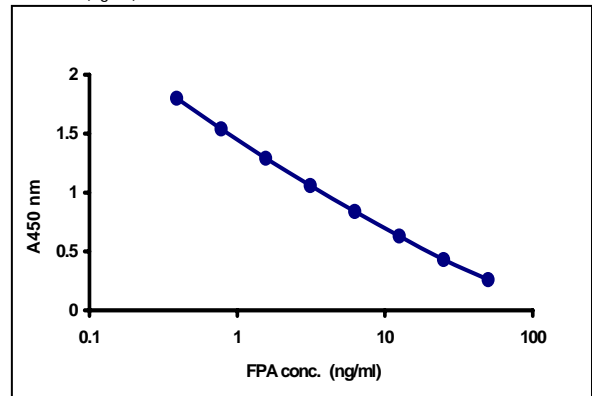
From the curve obtained, deduce directly the FPA concentration in samples tested by multiplying the value obtained by 2 (for the two-fold dilution of plasma resulting from the bentonite treatment).

For controls I and II, refer to the corresponding insert (ref.ASC015K) and specific flyer for the lot.

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, according to the indicated FPA concentration "C" (ng/ml) of the calibrator used.



EXPECTED RANGE:

- The FPA concentration in normal human plasma is usually below 3 ng/ml.

BIOCHEMISTRY:

- FPA is a 16 amino acid peptide, with a molecular weight of 1536, released from the amino terminal end of fibrinogen A α chains, upon the action of thrombin. Two molecules of FPA are released from one molecule of fibrinogen. The total FPA releasable from fibrinogen is then of 0.9% of the fibrinogen concentration. FPA has a very short half-life in body (< 3 min.).

APPLICATIONS:

- An increased FPA level (> 3 ng/ml), indicates the existence of an excess of thrombin activity. FPA is elevated in many clinical situations associated with blood activation (DIC, evolutive thrombosis, malignancies, ...). The Zymustest FPA assay can be used, for research purposes, for evidencing the existence of an excess of thrombin turnover, or the presence of thrombin generation during storage of blood or plasma fractions.

REFERENCES:

- Nossel HL, Younger LR, Wilner GD, Procupez T, Canfield RE, Butler VP Jr. Radioimmunoassay of human fibrinopeptide A. Proc Nat Acad Sci USA 1971; 68: 2350-53.
- Soria J, Soria C, Ryckewaert JJ. A solid phase immuno enzymological assay for the measurement of human fibrinopeptide A. Thromb Res 1980; 20: 425-435.
- Coccheri S, Mannucci PM, Palareti G, Gervasoni W, Poggi M, Gigano S. Significance of plasma fibrinopeptide A and high molecular weight fibrinogen in patients with liver cirrhosis. Br J Haematol 1982; 52/ 503-509.
- Amiral J, Walenga JM, Farreed J. Development and performance characteristics of a competitive enzyme immunoassay for fibrinopeptide A. Semin Thromb Hemost 1984; 10: 228-242.
- Auger MJ, Galloway MJ, Leinster SJ, Mc Verry BA, Mackie MJ. Elevated fibrinopeptide A levels in patients with clinically localised breast carcinoma. Haemostasis 1987; 17: 336-339.

ZYMUTEST FPA

Référence ARK016A
(Fibrino-Peptide A)
(Dosage CELIA du FPA)



Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation *in vitro* exclusivement

Uniquement à usage de recherche

Dernière révision : 22/06/2007

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST FPA est un dosage immuno-enzymatique de type compétitif (CELIA) du FPA, utilisable sur plasma humain traité à la bentonite ou tout autre milieu biologique où le FPA doit être mesuré. Si l'échantillon à doser contient du fibrinogène, celui-ci doit être enlevé (ex : adsorption du plasma humain sur bentonite), afin d'éviter toute réaction croisée.

PRINCIPE :

Le FPA est mesuré sur le plasma humain après adsorption du fibrinogène par la bentonite. Le FPA standard ou l'échantillon à doser sont pré-incubés avec l'anticorps de lapin anti-FPA humain, en quantité constante et limitée. Les anticorps anti-FPA n'ayant pas réagi avec le FPA sont alors mesurés sur une micro plaque ELISA, sensibilisée par du FPA synthétique et stabilisée. Ces anticorps se fixent sur le FPA immobilisé sur la plaque. Après lavage, les anticorps anti-FPA, fixés sur la plaque, sont révélés par l'immunoconjugué, anticorps de chèvre anti-IgG de lapin et couplé à la peroxydase (HRP). Après lavage, le substrat, 3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine (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 inversement proportionnelle au taux de FPA présent dans le plasma adsorbé par la bentonite ou dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant spécifique pour le dosage du FPA et fourni dans le coffret.
- Tout autre échantillon biologique où le FPA doit être mesuré.

REACTIFS :

1. **BS** : Un flacon de 50 ml de suspension de bentonite, prête à l'emploi.
2. **T20** : Un flacon de 5 ml de Tween 20, 2%, prêt à l'emploi.
3. **COAT** : Microplaque ELISA, contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par du FPA synthétique humain, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
4. **SD** : Un flacon de 50 ml de diluant échantillon, prêt à l'emploi.
5. **CAL** : Trois flacons de calibrateur FPA, lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de diluant échantillon SD afin d'obtenir un calibrateur à une concentration « C » (à environ 50 ng/ml de FPA).

Nota: La concentration en FPA du calibrateur peut varier de lot à lot et est précisément indiquée pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

6. **ABS** : Trois flacons d'anticorps de lapin purifiés par immunoaffinité spécifiques du FPA.
7. **IC** : Trois flacons d'immunoconjugué, anticorps polyclonal de chèvre, spécifique des IgG de lapin et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
8. **CD** : Un flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué, prêt à l'emploi.
9. **WS** : Un flacon de 50 ml de solution de lavage, 20 fois concentrée.
10. **TMB** : Un flacon de 25 ml de substrat de la peroxydase: 3,3',5,5' - Tétraméthylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
11. **ACS** : Un flacon de 20 ml de solution anti-coagulante spéciale pour dosage du FPA.
12. **SA** : Un flacon contenant 6ml d'Acide Sulfurique 0,45M, 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 kits 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 réglée à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.
- Contrôles de qualité (Réf. SC015K).

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. **Suspension de bentonite** : Prête à l'emploi. Bien mélanger avant utilisation. Après ouverture, elle peut être conservée à 2-8°C pendant 4 semaines en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Contient 0.9 g/l d'azide de sodium.
2. **Tween 20, 2%** : Solution prête à l'emploi. Après ouverture, cette solution peut être conservée à 2-8°C pendant 4 semaines en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Contient 0.9 g/l d'azide de sodium.

Précautions: La bentonite et le Tween 20 contiennent 0.9 g/l d'azide de sodium. L'azide de sodium (NaN₃) peut générer des composés explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.

3. **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 minipig fourni.
4. **Sample-Diluent** : Le diluant pour échantillons 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. Contient 0,05% de Kathon CG.
5. **FPA calibrator** : Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de "Sample-Diluent" afin d'obtenir une solution étalon prête à l'emploi, titrant « C » (ng/ml) de FPA. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins 8 heures à température du laboratoire.

Précautions: Le FPA calibrator est préparé 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 (1&2), 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-FPA** : anticorps de lapin anti-FPA humain purifiés par immunoaffinité (affinity purified rabbit anti-FPA antibodies). Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de "Sample-Diluent" afin d'obtenir une solution prête à l'emploi. Après reconstitution, la solution peut être conservée à 2-8°C, pendant 1 semaine, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
7. **Goat anti-rabbit IgG-HRP Conjugate** : 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.
8. **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. Contient 0.05% de Kathon CG.
9. **Wash Solution** : Incuber, environ 15 à 30 minutes, 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 dans son flacon d'origine. La solution de lavage diluée peut être utilisée jusqu'à 7 jours après préparation et conservée à 2-8°C, lorsqu'elle est protégée de toute contamination. Contient 0.05% de Kathon CG.
10. **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.
11. **Solution anti-coagulante FPA** : Solution prête à l'emploi. Après ouverture, elle peut être conservée à 2 - 8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Cette solution contient 0.9 g/l d'azide de sodium.

Précautions: L'azide de sodium (NaN₃) peut générer des composés explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.

12. **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.

D.750.01/ZY/016A



8580 Gove Court • Mason, OH 45404

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

MODE OPERATOIRE :

Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 vol) doit être collecté sur la solution anticoagulante FPA (1 vol) fournie dans le coffret (trisodium citrate, héparine, hirudine, aprotinine et **azide de sodium**). Mélanger rapidement le sang ainsi recueilli avec la solution anticoagulante puis centrifuger 20 minutes à 2500 g. Le surnageant plasmatique recueilli est prêt à être utilisé pour l'adsorption à la bentonite. Le traitement à la bentonite doit être réalisé dans les 8 heures qui suivent le prélèvement. Si le traitement n'est pas possible, le plasma doit être congelé dans les 4 heures et peut être conservé à -20°C ou moins, jusqu'à 1 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C et le traiter à la bentonite.

Traitement à la bentonite :

Avant dosage, le fibrinogène doit être enlevé du plasma par absorption à la bentonite. Pour cela, mettre en suspension la solution de bentonite par retournement du flacon en évitant de faire de la mousse. A 1 ml de plasma anticoagulé, ajouter 0.5 ml de suspension de bentonite. Mélanger délicatement et agiter doucement pendant 10 min. à température ambiante. Centrifuger 20 min. à 2500 g. Prélever 1 ml de surnageant. Renouveler le traitement 1 fois en ajoutant 0.5 ml de solution de bentonite à 1 ml de surnageant et procéder de la même manière que précédemment.

Le plasma ainsi traité est exempt de fibrinogène. Il doit être conservé :

- 24 heures à température ambiante ou à 2-8°C.
- 1 mois congelé à -20°C ou moins.

Avant utilisation, ajouter 50 µl de Tween 20, 2% à 1 ml de plasma traité par la bentonite. Le plasma ainsi traité est dilué 2 fois et le taux de FPA mesuré doit être multiplié par 2 afin d'obtenir la concentration finale du FPA dans le plasma à doser.

Plasma ou échantillon à tester :

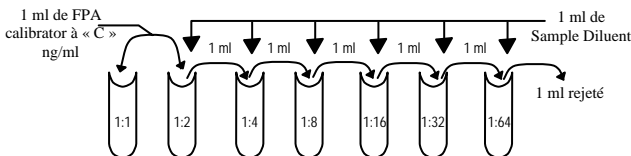
A 1 ml de plasma traité par la bentonite, et contenant du Tween 20, ajouter 0,1 ml d'anti-FPA. Incuber 1 heure à 37°C.

Contrôles de qualité :

Pour les contrôles I et II, se référer à la notice spécifique (réf. SC015K).

Gamme d'étalonnage :

Préparer la gamme d'étalonnage avec le calibrateur FPA (FPA calibrator), en réalisant une série de dilutions au rythme 2 dans le diluant pour échantillons (Sample Diluent), de 1/1 à 1/64 comme indiqué ci-dessous :



Une gamme d'étalonnage allant de C à C/64 (ng/ml) de FPA est obtenue.

A 1 ml de chaque dilution, ajouter très exactement 0.1 ml d'anti-FPA (reconstitué par 2 ml de Sample Diluent). Incuber 1 heure à 37°C.

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
Gamme étalon, échantillon à tester ou diluant échantillons (blanc)	200 µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou l'échantillon à tester dans les puits
Incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages.
Immunoconjugué Anti-rabbit-IgG-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits (a)
Incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages.
Substrat TMB / H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (a, b). <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température ambiante (18-25°C) (c)		
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).		

Remarques :

- 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.
- Éviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration.
- Pour une lecture bichromatique, le filtre 620 nm ou 690 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

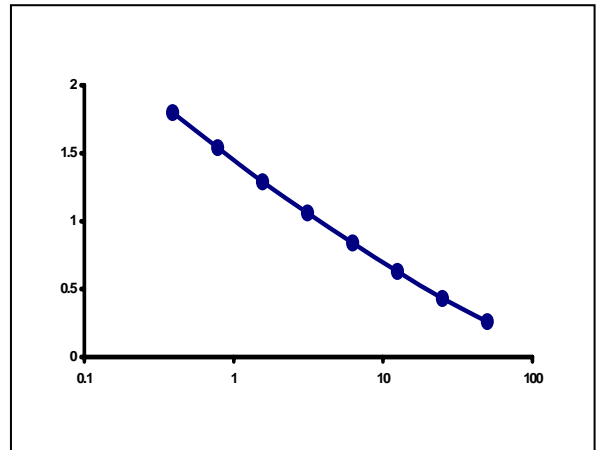
EXPRESSION DES RESULTATS :

- Sur du papier semi-logarithmique, porter en abscisses le taux de FPA, en ng/ml, et en ordonnées les DO 450 correspondantes.
- Sur la courbe obtenue, en déduire directement le taux de FPA dans le plasma testé en multipliant par 2 le résultat obtenu (pour prendre en compte la dilution au 1/2 dû au traitement par la bentonite).
- Pour les contrôles I et II, se référer à la notice (réf. SC015K) et au papillon spécifique du lot.

Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc.) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de FPA 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 FPA, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée en tenant compte de la concentration « C » (ng/ml) du calibrateur utilisé.



VALEURS NORMALES :

Le taux de FPA dans le plasma humain normal est habituellement inférieur à 3 ng/ml.

BIOCHIMIE :

- Le FPA est un peptide de 16 acides aminés, dont le poids moléculaire est de 1536 Da, libéré de l'extrémité amino terminale des chaînes A α du fibrinogène sous l'action de la thrombine. Deux molécules de FPA sont produites à partir de chaque molécule de fibrinogène.
- La quantité totale de FPA pouvant être libérée du fibrinogène représente ainsi 0.9% de la concentration du fibrinogène. Le FPA a une durée de vie très courte dans la circulation sanguine (< 3 min.).

APPLICATIONS :

Un taux élevé de FPA (> 3 ng/ml), révèle l'existence d'un excès de génération de thrombine, in vivo, au moment du prélèvement. Le taux de FPA est augmenté dans de nombreux états cliniques induisant une activation sanguine (CIVD, thrombose en phase évolutive, pathologie tumorale,...). Le dosage ZYMUTEST FPA peut être utilisé, à des fins de recherche, pour démontrer l'existence d'un excès de génération de thrombine, ou pour révéler l'activation et la formation de thrombine pendant la conservation du sang ou du plasma ou de leurs fractions.

REFERENCES :

- Nossel HL, Younger LR, Wilner GD, Procupez T, Canfield RE, Butler VP Jr. Radioimmunoassay of human fibrinopeptide A. Proc Nat Acad Sci USA 1971; 68: 2350-53.
- Soria J, Soria C, Ryckewaert JJ. A solid phase immuno enzymological assay for the measurement of human fibrinopeptide A. Thromb Res 1980; 20: 425-435.
- Coccheri S, Mannucci PM, Palareti G, Gervasoni W, Poggi M, Gigano S. Significance of plasma fibrinopeptide A and high molecular weight fibrinogen in patients with liver cirrhosis. Br J Haematol 1982; 52/ 503-509.
- Amiral J, Walenga JM, Farreed J. Development and performance characteristics of a competitive enzyme immunoassay for fibrinopeptide A. Semin Thromb Hemost 1984; 10: 228-242.
- Auger MJ, Galloway MJ, Leinster SJ, Mc Verry BA, Mackie MJ. Elevated fibrinopeptide A levels in patients with clinically localised breast carcinoma. Haemostasis 1987; 17: 336-339.

D.750.01/ZY/016A