

ZYMUTEST Tissue Factor (full length)

ARK035A

(Two-site, enhanced, ELISA immunoassay for measuring full length Tissue Factor)

In vitro research use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision: 09/06/2011

INTENDED USE:

The ZYMUTEST Tissue Factor kit is a two-site, enhanced, immuno-assay for measuring human full length Tissue Factor (FL-TF) in plasma and purified milieu, or in any biological fluid where FL-TF can be present.

ASSAY PRINCIPLE

In a first step, the TF-assay enhancer and the sample or calibrator are introduced into a microwell coated with a highly purified monoclonal antibody specific for human FL-TF. When present, FL-TF is captured onto the solid phase. Then, following a washing step, a monoclonal antibody specific for human FL-TF coupled to biotin (BIOT Ab) is introduced into the microwells and binds to another free epitope of immobilized FL-TF. Subsequently, following a new washing step, a Horseradish Peroxidase-Streptavidin conjugate (HRP-S) is introduced. Due to its high affinity for biotin, streptavidin binds to the biotinylated antibody. Following a last washing step, the highly sensitive peroxidase substrate (TMB-HS), in presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. When the reaction is stopped with Sulfuric Acid, a yellow colour is obtained. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human FL-TF in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate human plasma.
- Cell culture supernatants.
- Any biological fluid where TF must be measured.

REAGENTS:

1. **COAT: Micro ELISA plate**, containing 12 strips of 8 wells, coated with a monoclonal antibody specific for human FL-TF, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
2. **SD-TF**: 2 vials containing 40 ml of the specific **TF Sample Diluent**, green colored, containing 0.1% of Triton X-100, ready to use.
3. **AE-TF**: 1 vial containing 15 ml of **TF-Assay Enhancer**, green colored solution containing 0.1% of Triton X-100, ready to use.
4. **Cal**: 3 vials of lyophilised **Tissue Factor Calibrator**, containing "**C**" **pg/ml** of TF (about 500 pg/ml) following reconstitution, in a purified milieu.
5. **Cl**: 1 vial containing **1 ml** of lyophilised **Tissue Factor Control I** (high level).
6. **ClI**: 1 vial containing **1 ml** of lyophilised **Tissue Factor Control II** (low level).

Nota: The TF concentrations and acceptancy ranges for calibrator and controls can vary from lot to lot, and are indicated on the flyer provided in the kit.

7. **BIOT Ab (4X)**: 1 vial of **Anti-(h)-FL-TF biotinylated monoclonal antibody**, **4 fold concentrated**, lyophilised.
8. **HRP-S**: 3 vials of **HRP-Streptavidin conjugate**, lyophilised.
9. **CD-TF**: 1 vial of 25 ml of specific **TF Conjugate Diluent**, ready to use.
10. **WS**: 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated **Wash Solution**.
11. **TMB-HS**: 1 vial of highly sensitive peroxidase substrate: **3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine** containing hydrogen peroxide. Ready to use.
12. **SA**: 1 vial of 6 ml of **0.45M Sulfuric acid** (Stop solution). Ready to use.

Nota: Use only components from a same kit lot. 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 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.

TRACEABILITY TO THE REFERENCE MATERIAL:

The concentration of FL-TF, for each new lot of calibrators and controls, is established against the internal reference which concentration has been precisely determined. The calibrator and controls are prepared with recombinant FL-TF (1-263).

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 aluminium 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. **TF Sample Diluent**: It is ready to use. When opened, 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 and 0.1% Triton X-100.
3. **TF-Assay Enhancer**: It is ready to use. When opened, 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 and 0.1% Triton X-100.
4. **Tissue Factor Calibrator**: restore each vial with exactly **2 ml of TF Sample Diluent** in order to obtain a solution containing "**C**" **pg/ml of (h) TF** (see the flyer provided in the kit).
5. **Tissue Factor Control I** (high): restore with exactly **1 ml** of distilled water to obtain a solution containing about 350 pg/ml of (h) TF (see the flyer provided in the kit).
6. **Tissue Factor Control II** (low): restore with exactly **1 ml** of distilled water to obtain a solution containing about 75 pg/ml of (h) TF (see the flyer provided in the kit).

Nota: when restored, Tissue Factor calibrator and controls are stable for **8 hours** at room temperature (18-25°C), **72 hours at 2-8°C** or **2 months frozen at -20°C** or below.

6. **HRP-Streptavidine conjugate**: each vial must be restored with **7.5 ml of TF 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 (18-25°C), **4 weeks at 2-8°C** or **2 months frozen at -20°C** or below.
7. **Biotinylated Antibody (4X)**: each vial must be restored with **6 ml of TF Sample Diluent**. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial (vortex) in order to homogenize the content, **then withdraw the quantity of biotinylated antibody necessary for the test and dilute it 4 fold in SD-TF**. For example, for 4 strips an adapted dilution is 1.8 ml of biotinylated antibody and 5.4 ml of SD-TF. In its original vial, the restored biotinylated antibody is stable for at least **24 hours** at room temperature (18-25°C), **4 weeks at 2-8°C** or **6 months frozen at -20°C** or below.
8. **TF Conjugate Diluent**: It is ready to use. When opened, 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.
9. **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.
10. **TMB-HS substrate**: It is ready to use. When opened, it can be used for **4 weeks**, stored at **2-8°C**, and provided that any bacterial contamination is avoided during use.
11. **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.

D.750.02/ZY/035A



6560 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

Note: Bring the kit at room temperature, at least 30 min. before use. Store the unused reagents at 2-8°C. The stability studies at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature without damage.

SPECIMEN COLLECTION, HANDLING AND STORAGE:

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 colder for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within **4 hours**.

Note: Refer to GEHT or NCCLS/CLSI recommendations for further instructions on specimen collection, handling and storage. Discard any plasma presenting an unusual aspect (haemolysed, lipaemic aspect....).

PROCEDURE:

Tested plasmas or samples or controls:

The plasma samples and the Controls I and II must be tested **undiluted**. For other types of sample, the dilution factor must be adjusted to have a final FL-TF concentration between 25 and 500 "C" pg/ml in the tested samples. Dilutions of tested samples must be done in TF Sample diluent (TF-SD).

Calibration:

Using the TF calibrator at "C" pg/ml provided in the kit, prepare the following calibrators:

TF concentration (pg/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of TF calibrator	1.0 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.10 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. of Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.90 ml	0.95 ml	1 ml

Mix gently for a complete homogenisation.

The standard dilutions are stable for at least **8 hours** at room temperature (18-25°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
TF-Assay Enhancer (AE-TF)	100 µl	Introduce the TF-Assay enhancer in the micro ELISA plate wells
TF calibrator, or tested sample or controls or SD-TF (blank)	100 µl	Introduce the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well
Incubate for 2 hours at 37°C (a)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water before use)	300 µl	Proceed to 5 successive washings (b)
Biotinylated Antibody (restored with 6ml of SD-TF and diluted 4 fold in SD-TF)	200µl	Introduce the Biotinylated Antibody diluted 1:4 in SD-TF in the micro ELISA plate wells
Incubate for 2 hours at 37°C (a)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water before use)	300 µl	Proceed to 5 successive washings (b)
HRP-Streptavidine (restored with 7.5ml of Conjugate Diluent)	200µl	Introduce the HRP-Streptavidine in the micro ELISA plate wells
Incubate for exactly 30 minutes at room temperature (18-25°C) (a)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water before use)	300 µl	Proceed to 5 successive washings (b)
TMB-HS Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. (b) Nota : The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (c).
Incubate for exactly 10 minutes at room temperature (18-25 °C) (a)		
0.45 M Sulfuric Acid (5)	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 (c).
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm. (A450) . Subtract the blank value (d).		

Nota: Distribute calibrators, controls and tested specimen as rapidly as possible, in order to obtain a homogeneous immunological kinetics for TF binding. A too long delay (>10 min) between the distribution of the first and the last wells may have incidence on immunological kinetics and produce inaccurate results (underestimated value for the last wells).

- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. An incubation temperature of 18-25°C must be respected. Results can be affected by a too high (>25°C) or too low (<18°C) temperature, and measured A450 could then be too high or too low. It has to be considered when analyzing the results. A450 values generated in the assay are susceptible to be significantly increased if shaking is used throughout the incubation steps.
- 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 immobilised 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 substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction with sulphuric acid.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used

EXPRESSION OF RESULTS:

- On a linear graph paper, plot the **FL-TF concentrations (pg/ml)** on abscissa and the corresponding absorbances (**A450**) on ordinates. Draw the calibration curve that best fits your data.

- Users must construct their own calibration curve, obtained using their calibrators (See model on the flyer).

- For Controls and plasma samples tested undiluted, deduce directly the FL-TF concentrations from the calibration curve obtained. For obtaining the FL-TF concentration, the value read on the calibration curve must be multiplied by the dilution factor (ie x2 if the samples are tested at the 1:2 dilution...). The calibration is validated when quality controls are measured within their acceptance range, indicated for each lot on the flyer provided in the kit.

- Alternatively, an ELISA software (i.e. Dynex, Biolise, etc...) can be used for the calculation of concentrations. Choose the curve that best fits your data, as an example, it is possible to use Akima or 4 parameters interpolation. The FL-TF concentrations of CI and CII controls have been determined using Akima or 4 parameters interpolation. (The target values as well as acceptance ranges of controls must be verified in the exact laboratory working conditions and adjusted if required).

PERFORMANCES AND CHARACTERISTICS:

- Normal range:** The mean concentration of circulating Tissue Factor varies a lot from study to study. It should be in the range from 2 to 304 pg/ml (1). When assayed with Zymutest Tissue Factor (full length), normal plasmas (N=50) contain <25 pg/ml FL-TF, with a mean concentration < 3 pg/ml.
- Detection threshold:** about 3pg/ml.
- Intra-assay reproducibility (N= 12):** CV = 6% for CI, CV = 8% for CII.
- Inter-assay repeatability (N= 10):** CV = 5% for CI, CV = 5% for CII.
- Recovery in plasma:** about 65% for undiluted plasmas.
- Cross-reactivity:** No significant cross-reactivity was observed with: Factor II, Factor V, Factor VII, Factor IX, Factor X, Factor Xa, Truncated TFPI and TFPI.
- Interferences:** the kit has been optimized to minimize the interference of the potential presence of heterophilic antibodies in some particular plasmas, which could otherwise result in an overestimation of FL-TF concentration.

BIOCHEMISTRY:

Tissue Factor, (also known as coagulation factor III, or thromboplastin) is the physiologic trigger of blood coagulation. TF binds Factor VIIa to form FVIIa-TF complexes that cleave factors X and IX, initiating the whole coagulation cascade (3). TF is a 47kDa transmembrane protein (SDS-PAGE) constitutively expressed in sub-endothelial cells such as adventitial fibroblasts or smooth muscle cells. TF has three domains: an extracellular domain (aa 1-219), a transmembrane domains (aa 220-242), and a cytoplasmic tail (aa 243-263).

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

Level of TF in blood is increased in various pathological states such as malignancy, inflammation, atherosclerosis, sepsis, diabetes, sickle cell disease and acute coronary syndrome (2, 3, 4, 5). During sepsis, cytokines stimulate the expression of TF on endothelial cells and monocytes, leading to the activation of coagulation cascade (3). In the inflammatory environment of atherosclerotic plaques, on plaque rupture, highly procoagulant material including TF-containing microparticles is released into the blood, leading to rapid initiation of coagulation (1). TF plays an important role in angiogenesis and metastasis (4, 5).

REFERENCES:

- Parhami-seren et al., "Immunologic quantitation of tissue factors". J. Thromb. Haemost., 4:1747-1755, 2006.
- Steffel et al., "Tissue Factor in Cardiovascular Diseases: Molecular Mechanisms and Clinical Implications". Circulation, 113:722-731, 2006
- Zeerleder et al., "Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis". Chest, 128:2864-2875, 2005.
- Maly et al., "The Role of Tissue Factor in Thrombosis and Haemostasis". Physiol. Res., 56:685-695, 2007.
- Mackman, "The many faces of Tissue Factor". J. Thromb. Haemost., 7(Suppl. 1):136-139, 2009.
- Bokarewa M, Morrissey JH, Tarkowski A, "Tissue factor as proinflammatory agent", Arthritis Res 2002; 4(3): 190-195.
- Edgington TS et al., "The structural biology of expression and function of tissue factor", Thromb Haemost 1991, 66(1): 67-79.

ZYMUTEST Tissue Factor (full length)

ARK035A

(Méthode ELISA ultrasensible pour le dosage du Facteur Tissulaire entier)

A usage de recherche *in vitro* exclusivement



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision: 09/06/2011

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST Tissue Factor (full length) est une méthode ELISA ultrasensible, destinée à la mesure du Facteur Tissulaire entier (FL-FT) (1-263), sur plasma et milieu purifié, ou tout autre fluide biologique où le Facteur Tissulaire entier est présent.

PRINCIPE :

Dans un premier temps, la solution AE-TF et l'échantillon à tester sont introduits dans les puits de la plaque sensibilisée par un anticorps monoclonal de souris spécifique du FL-FT. 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 ajouté et se fixe sur l'anticorps biotinylié. Après une dernière étape de lavage, le substrat de la peroxydase (TMB-HS), en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est directement proportionnelle à la quantité de FL-FT humain présent dans l'échantillon à doser.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain citraté
- Sumageants de culture cellulaire
- Autres fluides biologiques où le FL-FT est présent.

REACTIFS :

1. **COAT : Microplaque ELISA** (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps monoclonal spécifique du FL-FT humain, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD-TF** : 2 flacons contenant 40 ml de **tampon de dilution pour échantillons TF** (TF Sample Diluent), coloré en vert, prêt à l'emploi, contenant 0.1% de Triton X-100.
3. **AE-TF** : 1 flacon contenant 15 ml de **solution** (TF Assay-Enhancer), colorée en vert, prête à l'emploi, contenant 0.1% de Triton X-100.
4. **Cal** : 3 flacons lyophilisés de **2 ml de Tissue Factor Calibrator (calibrateur FT)**.
5. **CI** : 1 flacon lyophilisé de **1 ml de Tissue Factor Control I (FT contrôle haut)**.
6. **CII** : 1 flacon lyophilisé de **1 ml de Tissue Factor Control II (FT contrôle bas)**.

Nota : Les concentrations exactes en FT et l'intervalle de confiance du calibrateur et des contrôles sont indiqués pour chaque lot sur le papillon fourni dans la trousse.

7. **BIOT Ab (4X)** : 1 flacon d'**anticorps monoclonal de souris spécifique du FL-FT humain, couplé à la biotine, 4 fois concentré** (Biotinylated Antibody), lyophilisé.
8. **HRP-S** : 3 flacons de **conjugué HRP-Streptavidine**, lyophilisé.
9. **CD-TF** : 1 flacon de 25 ml de **tampon de dilution pour le conjugué HRP-Streptavidine** (TF Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
10. **WS** : 1 flacon de 50 ml de **solution de lavage** (Wash Solution), 20 fois concentrée.
11. **TMB-HS** : 1 flacon de substrat de grande sensibilité : **3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine**, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
12. **SA** : 1 flacon de 25ml d'**acide sulfurique 0.45 M** (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 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.

TRACABILITE PAR RAPPORT AU MATERIEL DE REFERENCE :

La concentration en FL-FT des calibrateurs 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 calibrateurs et contrôles sont préparés avec un FL-FT recombinant (1-263).

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 fermé, ou dans le sachet minigrp, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à **2 - 8°C**.
2. **TF 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 et 0.1% de Triton X-100.
3. **TF-Assay Enhancer** : 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 et 0.1% de Triton X-100.
4. **Cal** : reconstituer par exactement **2 ml de Sample Diluent TF** afin d'obtenir une solution titrant « C » **pg/ml** (environ 500 pg/ml, se référer au papillon contenu dans le coffret) de FT humain.
5. **CI** : à reconstituer par **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).
6. **CII** : à reconstituer par **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).

Nota : après reconstitution, les calibrateurs et contrôles sont stables **8h à température ambiante (18-25°C)**, **72h à 2-8°C** et **2 mois à -20°C** ou en-dessous.

7. **Biotinylated Antibody (4X)** : le flacon doit être reconstitué par **6mL de Sample Diluent (SD-TF)** au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter pour homogénéiser (vortex), puis **prélever la quantité d'anticorps nécessaire pour le test et la diluer au 1/4 en Sample Diluent TF**. Par exemple, pour 4 barrettes, prélever 1,8 ml d'anticorps biotinylié et ajouter 5,4 ml de SD-TF. L'anticorps biotinylié, dans son flacon d'origine, est stable au moins **24 heures** à la température du laboratoire (18-25°C), **4 semaines à 2-8°C** et **6 mois congelé à -20°C** ou moins.
8. **HRP-Streptavidine conjugué** : chaque flacon de conjugué HRP-Streptavidine doit être reconstitué par **7.5 ml de TF Conjugate Diluent** au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. Le conjugué HRP-Streptavidine reconstitué est stable au moins **24 heures** à la température du laboratoire (18-25°C), **4 semaines à 2-8°C** et **2 mois congelé à -20°C** ou moins.
9. **TF 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. Il contient 0,05% de Kathon CG.
10. **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.
11. **TMB-HS** : Substrat TMB de grande sensibilité 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.
12. **Stop solution** : Solution contenant 0,45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi.

Précautions : Même dilué à 0,45M, l'acide sulfurique est caustique. Comme pour tout produit chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précautions 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 de réaliser le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C. Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

D.750.01/ZY/035A



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

COLLECTE, PREPARATION ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS TESTES :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur 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.

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

MODE OPERATOIRE :

Echantillons et contrôles :

Les échantillons de plasma et les contrôles I et II doivent être testés **pur**. 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 Facteur Tissulaire entier. La dilution doit être réalisée en diluant échantillon (SD-TF).

Calibration :

Utiliser le calibrateur FT titré à « C » pg/ml de FL-FT fourni dans le coffret. Préparer les solutions standards suivantes.

Concentration de FT (pg/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de FT Calibrateur	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

Mélanger délicatement pour obtenir une solution homogène.

Les dilutions de calibration sont stables **8 heures** à température du laboratoire (18-25°C).

Mode Opérateur :

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 micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
TF-Assay Enhancer (AE-TF)	100 µl	Introduire le TF-Assay Enhancer dans les puits de la microplaque ELISA
Calibrateur FT, ou échantillon ou contrôles, ou SD-TF (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)		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages (b).
Anticorps biotinylé (reconstitué par 6 ml de SD-TF puis dilué au 1/4 en SD-TF)	200µl	Introduire l'anticorps biotinylé dilué au 1/4 en SD-TF
Incuber 2 heures à 37°C (a)		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages (b).
HRP-Streptavidine (reconstituée par 7.5 ml de Conjugate Diluent TF)	200µl	Introduire le conjugué HRP-Streptavidine dans les puits de la microplaque ELISA
Incuber précisément 30 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300µl	Effectuer une série de 5 lavages (b).
Substrat TMB-HS	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (b). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (c)
Laisser la coloration se développer pendant 10 minutes exactement à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Stop solution (5)	50 µl	Arrêter la réaction en introduisant l'acide sulfurique 0.45M. 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. L'utilisation continue d'un agitateur est susceptible d'augmenter sensiblement les DO 450 dans le test, et n'est pas recommandée.
- 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, 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 FL-FT en pg/ml sur l'axe des abscisses et les DO450 correspondantes en ordonnées. Tracer la courbe d'étalonnage passant au mieux par les divers points.

- Pour la mesure des taux de FL-FT, 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 **directement** la concentration de FL-FT dans le plasma testé pur et les contrôles I et II. Pour un échantillon dilué, multiplier le taux obtenu par le facteur de dilution. (ex : x2 pour un échantillon testé à la dilution 1/2).

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 la courbe la mieux ajustée, de type Akima ou 4 paramètres par exemple. Les intervalles de confiance attribués aux contrôles ont été calculés en Akima ou 4 paramètres. (Les cibles et les intervalles d'acceptation des contrôles doivent être vérifiés dans les conditions de travail exactes du laboratoire et ajustés si besoin.)

PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES :

• **Zone normale :** Le taux moyen de FT circulant chez les individus sains est variable selon les publications, il se situe entre 2 et 304 pg/ml (1).

En utilisant le coffret Zymutest Tissue Factor (full length), la concentration antigénique en FT entier dans les plasmas normaux (N=50) est inférieure à 25 pg/ml, avec une concentration moyenne inférieure à 3 pg/ml.

• **Limite de détection :** environ 3 pg/ml.

• **Reproductibilité Intra-essai :** (N= 12): CV = 6% pour CI, CV = 8% pour CII.

• **Reproductibilité Inter-essai :** (N= 10) : CV = 5% pour CI, CV = 5% pour CII.

• **Recouvrement en plasma :** environ 65% pour un plasma testé pur.

• **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.

• **Interférences :** Le kit a été optimisé pour minimiser l'interférence des anticorps hétérophiles potentiellement présents dans le plasma, qui seraient sinon susceptibles d'entraîner des valeurs anormalement hautes dans le test.

BIOCHIMIE :

Le Facteur Tissulaire (aussi appelé facteur III, ou thromboplastine), est l'initiateur physiologique de la coagulation. Le FT joue le rôle de cofacteur du facteur VIIa, formant un complexe FVIIa-FT qui clive les facteurs IX et X, initiant ainsi la cascade de la coagulation (3). Cette protéine transmembranaire de 47kDa (SDS-PAGE) est exprimée constitutivement par les cellules sous-endothéliales comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses. Le FT comprend trois domaines : un domaine extracellulaire (aa 1-219), un domaine transmembranaire (aa 220-242) et une queue cytoplasmique (aa 243-263).

VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

Une expression anormale du FT a été décrite dans différents contextes pathologiques comme le cancer, l'inflammation, la sepsie à gram-négatives, l'athérosclérose, le diabète, l'anémie falciforme, et le syndrome coronarien aigu (2, 3, 4, 5). Dans la sepsie, la génération de cytokines entraîne l'expression du FT sur les cellules endothéliales et les monocytes, conduisant ainsi à l'activation de la coagulation (3). Dans l'environnement inflammatoire de la plaque d'athérome, au moment de la rupture, des produits hautement thrombogènes sont libérés dans le sang, notamment des microparticules contenant du FT, ce qui entraîne une initiation rapide de la coagulation (1). Le FT joue aussi un rôle important dans l'angiogenèse et la métastase tumorale (4, 5).

REFERENCES :

- Parhami-seren et al., "Immunologic quantitation of tissue factors". J. Thromb. Haemost., 4:1747-1755, 2006.
- Steffel et al., "Tissue Factor in Cardiovascular Diseases: Molecular Mechanisms and Clinical Implications". Circulation, 113:722-731, 2006
- Zeerleder et al., "Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis". Chest, 128:2864-2875, 2005.
- Maly et al., "The Role of Tissue Factor in Thrombosis and Haemostasis". Physiol. Res., 56:685-695, 2007.
- Mackman, "The many faces of Tissue Factor". J. Thromb. Haemost., 7(Suppl. 1):136-139, 2009.
- Bokarewa M, Morrissey JH, Tarkowski A, "Tissue factor as proinflammatory agent", Arthritis Res 2002; 4(3): 190-195.
- Edgington TS et al, "The structural biology of expression and function of tissue factor", Thromb Haemost 1991, 66(1): 67-79.