



ZYMUTEST tPA Antigen

Ref RK011A



www.hyphen-biomed.com



ELISA test pro stanovení tPA antigenu

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Revize:06/2023

POUŽITÍ:

ZYMUTEST tPA souprava je dvoukrokový immuno-test pro stanovení lidského tkáňového Aktivátoru Plasminogenu (tPA) v plazmě. Souprava může být použita k měření tPA:Ag v biologických tekutinách pouze pokud byl dosažen příslušný standard. Souprava umožňuje stejnoměrné stanovení tPA, ať už je volný a aktivovaný, nebo v komplexu s jeho inhibitory.

INFO:

Tkáňový aktivátor Plasminogenu (tPA) je 68 kDa protein, syntetizovaný a sekretovaný endotelálními buňkami. Zahajuje fibrinolyzu aktivováním plasminogenu na plasmin na povrchu sraženého fibrinu. Je složený z 563 aminokyselin.

V krvi je tPA rychle deaktivováno jeho hlavním inhibítorem, PAI-1, který se většinou nachází v přebytku. Cirkulující tPA je pak přítomen hlavně jako inaktivní, stabilní komplex PAI-1. Odstranění tPA má dvě fáze. První fáze má poločas okolo 5 minut a druhá fáze kolem 45 minut. tPA komplex se váže na receptory v játrech.

Koncentrace tPA v normální lidské plazmě je kolem <10ng/ml, zvyšuje se s věkem, fyzickou aktivitou a stresem.

PRINCIP:

V prvním kroku je ředěná plazma nebo biologický materiál napipetován do jamky mikrodestičky, ve které je navázána vysoce čistěná monoklonální protilátka specifická pro lidský tPA. Pokud je tento protein přítomen, naváže se na pevnou fázi. Následuje promývací krok. Poté je přidán do jamky imunokonjugát, což je monoklonální protilátka s navázanou křenuvou peroxidázou (HRP), který se váže na jiný volný epitop již navázaného tPA. Následuje opět promývací krok a přidání peroxidázového substrátu (TMB), který v přítomnosti peroxidu vodíku (H₂O₂) a peroxidázy vytváří zbarvení. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci lidského tPA:Ag v testovaném vzorku.

REAGENCE:

- COAT: Micro ELISA plate:** obsahuje 12 proužků po 8 jamkách, potažených myší monoklonální protilátkou specifickou pro lidský tPA, stabilizovanou, balenou v hliníkovém pouzdru hermeticky uzavřeném společně s desikantem. Obsahuje BSA.
- F-SD: Fibrinolysis sample diluent:** 2 lahvičky s obsahem 50 ml **Fibrinolysis diluentu** vzorku připraveného k použití. Obsahuje BSA.
- STD: tPA Standard 0, 1, 2, 3:** 4 lahvičky po 1 ml, lyofilizované, obsahující **tPA standard 0, 1, 2, 3 v různých koncentracích pro kalibraci** (standard je kalibrován proti NIBSC mezinárodnímu standardu). Každá lahvička, se rozpustí s 1 ml destilované vody. Přesná koncentrace tPA v takto připraveném kalibrátoru je uvedena na přiloženém letáku.
- CI: Plasma Control I High (UTA):** 1 lahvička s obsahem 1 ml, lyofilizováno. Po rozpuštění s 1 ml destilované vody je kontrolní plasma připravena k použití (lidská plazma, vysoká kontrola). Obsahuje BSA.
- CII: Plasma Control II Low (UTA):** lahvička s obsahem 1 ml, lyofilizováno. Po rozpuštění s 1 ml destilované vody je kontrolní plasma připravena k použití (lidská plazma, nízká kontrola). Obsahuje BSA.
- IC: Immunoconjugate (Anti-(h)-tPA-HRP immunoconjugate):** 3 lahvičky imunokonjugátů, lyofilizováno. Monoklonální protilátka s HRP. Po rozpuštění s 7,5ml diluentu pro imunokonjugát (CD) je reagentie připravena k použití. Obsahuje BSA.
- CD: Conjugate Diluent:** 1 lahvička po 25 ml diluentu, připravena k použití. Obsahuje BSA.
- WS: Wash solution:** 1 lahvička po 50 ml promývacího roztoku, 20krát koncentrovaného.
- TMB: 3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidine:** 1 lahvička po 25 ml diluentu, připravena k použití. Obsahuje peroxid vodíku.
- SA: 0,45M Kyselina sírová (Stop solution):** 1 lahvička po 6 ml, připraveno k použití. Koncentrace kontrol a kalibrátorů a přijatelné meze pro kontrolní plazmy jsou uvedeny na přiloženém letáku. Reagentie SD, CD a WS obsahují 0,05% Kathon CG a reagentie SA obsahuje kyselinu sírovou, viz VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Jedná se o produkt biologického původu, proto s ním musí být zacházeno s opatrností jako s potenciálně infekčním.
- V případě kontaminace se TMB substrát změní barvou na žlutou. V tomto případě musí být znehodnocen a musí se použít nová lahvička.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Užívejte komponenty pouze z kity stejné šarže. Nezaměňujte komponenty z kitů o různých šaržích v jednom testu.
- S reagentie zacházejte opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci během používání. Pokud je možné, snižte odpar reagentie zmenšením plochy kontaktu reagentie se vzduchem. Odpařování snižuje stabilitu reagentie v analyzátoru.
- Pro zajištění dostatečné stability uzavírejte lahvičky jejich vlastními zátkami.
- Studie stability trvající 3 týdny při 30°C prokázaly, že reagentie může být přepravována za pokojové teploty po krátký čas bez jejího poškození.

- Lidská plazma použitá k přípravě kalibrátoru a kontrol I a II byla testována registrovanou metodou a shledána negativní na přítomnost antigenu Hepatitidy B a protilátek HIV a HCV.
- Bovinní sérový albumin (BSA) byl připraven z bovinní plazmy, která byla testována na nepřítomnost infekčních agens a byla odebrána od zvířat bez BSE.
- I v nízkých koncentracích (0,45M) je kyselina sírová žiravina. Proto zacházejte s kyselinou sírovou opatrně, jako s podobnými chemikáliemi. Vyvarujte se kontaktu s očima a kůží.
- Pouze pro použití In Vitro.

CD, SD, WS: H317: Může vyvolat kožní alergické reakce.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ, SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Alespoň 30 minut před použitím zahřejte reagentie na pokojovou teplotu. Skladujte nepoužité reagentie při 2 – 8°C. Lahvičky jsou uzavírány pod vakuem. Abyste předešli ztrátě lyofilizátu, otevírejte lahvičky opatrně.

Pokud jsou reagentie správně použity a skladovány podle protokolu a bezpečnostních doporučení, souprava může být použita během 1 měsíce postupně, podle potřeby.

- COAT (ELISA mikrotitrační destička):** Otevírejte hliníkové pouzdro a vyjměte požadovaný počet 8-mi jamkových proužků pro analýzu. Pokud jsou mimo pouzdro, musí být testovací proužky použity do 30 minut. Nepoužité proužky mohou být skladovány v 2-8°C 4 týdny v jejich originálním hliníkovém pouzdru, za přítomnosti desikantu, hermeticky uzavřené, chráněné před vlhkostí a uložené v přiloženém skladovacím pouzdru (minigríp).
- F-SD (Fibrinolysis diluent vzorku):** Připraven k použití. Reagentie obsahuje 0,05% Kathon CG. Po otevření může být používán po 4 týdny, pokud je skladován při 2-8°C a pokud je zabráněno bakteriální kontaminaci během použití.
- STD (tPA standard 0, 1, 2, 3):** Rozpusťte každou lahvičku 1 ml destilované vody. Tento roztok představuje kalibrační rozmezí s danou hladinou tPA. Po rozpuštění, pokud je předejito odpařování nebo kontaminaci a reagentie je uchovávána v originální lahvičce je stabilní 8 hodin při pokojové teplotě. Pro opakované použití soupravy připravte 3 alikvoty každého standardu po jeho rozpuštění. Tyto alikvoty jsou po zmrazení stabilní 2 měsíce (-20°C a méně).
- CI (Kontrola I, lidská plazma, vysoká kontrola, UTA):** Rozpusťte s 1 ml destilované vody. Stabilita reagentie v originálním balení po rozpuštění, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
 - 8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C)
 - 24 hodin při 2-8°C
 - 2 měsíce při -20°C a méně.
- CII (Kontrola II, lidská plazma, nízká kontrola, UTA):** Rozpusťte s 1 ml destilované vody. Stabilita reagentie v originálním balení po rozpuštění, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
 - 8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C)
 - 24 hodin při 2-8°C
 - 2 měsíce při -20°C a méně.
- IC (Imunokonjugát anti-(h)-tPA-HRP):** Každá lahvička musí být rozpuštěna se 7,5 ml diluentu konjugátu (CD) alespoň 15 minut před použitím. Nechte částky kompletně rozpustit. Před použitím opatrně lahvičku promíchejte, aby se obsah homogenizoval. Stabilita reagentie v originálním balení po rozpuštění, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
 - 24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C)
 - 4 týdny při 2-8°C

- CD (Diluent konjugátu):** Připraven k použití. Reagentie obsahuje 0,05% Kathon CG. Stabilita reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
 - 4 týdny při 2-8°C

- WS (Promývací roztok):** Podle potřeby inkubujte lahvičku ve vodní lázni v 37°C dokud se zcela nerozpustí pevné částky. Promíchejte lahvičku a naředte požadovaný objem v poměru 1:20 v destilované vodě (obsah lahvičky 50 ml dovoluje získat 1 litr promývacího roztoku). Stabilita reagentie v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:
 - Nerozpuštěná – 4 týdny při 2-8°C
 - Rozpuštěná – 7 dní při 2-8°C

Obsahuje 0,05% Kathon CG.

- TMB:** Připraven k použití. Stabilita reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
 - 4 týdny při 2-8°C
- SA (Zastavovací roztok):** Zastavovací roztok obsahuje 0,45M kyseliny sírové, viz VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ. Připraven k použití. Stabilita reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
 - 4 týdny při 2-8°C

SKLADOVACÍ PODMÍNKY:

Nepoužité reagentie skladujte při 2 – 8 °C v originálním balení. V doporučených skladovacích podmínkách je souprava použitelná do data spotřeby, uvedeného na obalu.

Distributor: Diagnostica s.r.o, Za Trať 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz



REAGENCIE A VYBAVENÍ POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:

Reagencie:

Destilovaná voda.

Materiál:

8-kanálová pipeta nebo rozplňovací pipeta 50 – 300 µl.

pipety o různých objemech od 0-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl

Promývačka mikrotitračních destiček a třepačka.

ELISA Reader s vlnovou délkou 450 nm.

ODBĚR VZORKU:

Během přípravy a skladování vzorků dodržujte lokální předpisy (pro USA viz CLSI doc GP44-A4)³.

Vzorek:

Lidská plazma odebraná z citrátového antikoagulantu nebo EDTA lidská plazma. Skladovací podmínky jsou stejné jako s citrátovanou plazmou. Odběr Krev (9 objemů) musí být odebrána do citrátu sodného (1 objem, 0,109M) přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Centrifugace

Do 2 hodin po odběru použijte metodu ve vaší laboratoři validovanou pro získání plazmy chudé na destičky, např. 15 minut při 2 500 g a v pokojové teplotě 18-25°C.

Plazma musí být stočena do plastové zkumavky.

Skladování plazmy:

- 24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- 6 měsíce při -20°C

Vzorek plazmy rozmrazujte rychle při 37°C, promíchejte a testujte během 72 hodin. Zamíchejte po rozmražení a před testováním.

PROVEDENÍ:

Provedení testu:

1. Vzorky plazmy a kontroly I a II jsou testovány **neředěné** v jamkách mikrodestičky (po rozpuštění).

Pro předpokládanou koncentraci tPA > 20ng/ml mohou být vzorky i kontrolní plazmy ředěny 1:2, 1:5, 1:10 nebo více, podle předpokládané koncentrace tPA. Testované vzorky musí být pak ředěny F-SD (Fibrinolysis diluent vzorků).

2. 4 hladiny tPA Standard 0, 1, 2, 3 musí být rozpuštěny s 1ml destilované vody, pak použít **neředěné** přímo do jamek pásků. Kalibrační rozmezí je od 0 do kolem 20ng/ml koncentrace tPA.

Homogenizujte obsah jemným mícháním.

Standardní ředění jsou stabilní alespoň 6 hodin za pokojové teploty.

3. Odeberte požadovaný počet proužků z hliníkového pouzdra a dejte je do příslušného rámečku. Do jamek ELISA destičky přidávejte reagencie podle postupu níže:

Reagent	Objem	Testovací krok
Fibrinolysis diluent vzorku	100 µl	Pipetujte F-SD do jamek mikrodestičky
tPA standard nebo testované vzorky nebo kontroly nebo, nebo Fibrinolysis diluent vzorku pro blank	100 µl	Pipetování standard roztoku, kontrol nebo testovaného vzorku do jamek mikrotitrační destičky (a)
Inkubujte 1 hodinu v pokojové teplotě (18-25°C) (b)		
Promývací roztok (20x ředěný destilovanou vodou)	300 µl	Proveďte 5 promytí za použití promývačky (c)
Konjugát (anti tPA monoklonální PL s navázanou peroxidázou, naředěná 7,5 ml diluentu konjugátu	200 µl	Pipetování Anti-(h)-tPA-HRP imunokonjugátu do jamek destičky (b)
Inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25°C) (b)		
Promývací roztok (20x ředěný destilovanou vodou)	300 µl	Proveďte 5 promytí za použití promývačky (c)
TMB/H ₂ O ₂ Substrát	200 µl	Ihned po promytí pipetujte substrát do jamek. (c) Pozn.: pipetování substrátu, řádek za řádkem musí být v přesných časových intervalech (b,d)
Inkubujte přesně 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b)		
0,45 M Kyselina sirová	50 µl	Pipetujte ve stejných časových intervalech jako substrát, přidáním 0,45 M kyseliny sirové zastavíte rozvoj barvy. (d)
Počkejte 10 minut, aby se zbarvení stabilizovalo a měřte absorbanční při 450 nm (A450) (e). Odečtete hodnotu blanku.		

Poznámky:

- Pipetujte kalibrátory, kontroly a vzorky tak rychle, jak je to možné (do 10 minut), aby byla získána homogenní imunologická kinetika pro vazbu tPA.
- Během inkubace a vývoje zbarvení nenechávejte ELISA destičku v přímém slunečním světle. Použijte třepačku ELISA destiček.
- Nikdy nenechávejte destičku prázdnou mezi přidáním reagentů nebo po promytí. Následující reagent musí být přidán do 3 minut, aby se zabránilo vyschnutí destičky – poškodilo by navázané komponenty. Pokud je nezbytné, udržujte destičku naplněnou promývacím roztokem a vyprázdněte až před pipetováním další reagenty. Promývačka musí být nastavena tak, aby promývala destičku jemně. Je nutné se vyhnout příliš energickému vyprázdnění jamek, aby se nesnížila reaktivita destičky.
- Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do řádků musí být přesně určeny a stejné intervaly musí pak být při pipetování zastavovacího roztoku.
- Pro bichromatický odečet může být užita referenční vlnová délka 690 nm nebo 620 nm.

RYCHLÝ POSTUP (jednokroková metoda):

- Test může být proveden i jako jednokroková metoda. V tom případě musí být kalibrační křivka od 0 do 10 ng/ml. Standardy se rozpustí v 1 ml destilované vody a potom se naředí 2x (1:2) v Fibrinolysis diluentu vzorku (rozpuštění kalibrátorů je stejné jako u dvukrokové metody, ale jsou poté naředěny dvakrát).
- Imunokonjugát (IC) musí být rozpuštěn se 2 ml diluentu konjugátu (CD).
- Testovaná plazma musí být testována v ředění 1:2 nebo vyšším v F-diluentu vzorku (SD). Do jamky mikrodestičky se pipetuje imunokonjugát (IC) (50 µl) a následně 200 µl kalibračního roztoku nebo ředěné plazmy. Následuje 1 hodina inkubace za pokojové teploty a promývací krok. Přidá se 200 µl TMB do každé jamky, nechá se vyvíjet zbarvení po dobu 5 minut a pak se reakce zastaví přidáním 50 µl 0,45M kyseliny sirové (SA). Vykreslete kalibrační křivku a odečtete výsledky (ale od 0 do 10 ng/ml). Stanovení koncentrace tPA:Ag musí být násobena skutečným ředěním vzorku.

VÝSLEDEK:

- Výsledky jsou vyjádřeny v OD₄₅₀, získány ze vzorku a kontrol použitím kalibrační křivky.
- Stanovte kalibrační křivku s OD 405 nm podél osy Y a koncentrace tPA Ag, vyjádřena v ng/ml podél osy X. (Mód interpolace „best fit“, viz leták šarže).
- Ze získané křivky odečtete koncentraci tPA:Ag testovaného vzorku a kontrol C I a II. Pokud jste ředili vzorek, vynásobte výsledky použitým faktorem ředění.
- Alternativně lze pro odečet koncentrací využít ELISA software (např.: Dynex, Biolyse, ...)

LIMITY TESTU:

- Pro získání optimálního výkonu testu, který dodržuje specifikace, procesní instrukce validované společností HYPHEN BioMed musí být striktně dodrženy. Jakékoliv změny instrukcí postupu musí být validovány laboratoří.
- Jakékoliv reagencie s neobvyklým vzhledem nebo projevující známky kontaminace musí být vyřazeny.
- Jakákoliv plazma s koagulátem nebo projevující známky kontaminace musí být vyřazena.
- Přítomnost revmatoidního faktoru v plazmě vede k falešně zvýšeným tPA výsledkům.
- Nebyla zjištěna interference heparinu do 2 IU/ml a endogenní PAI-1 do 100 ng/ml.

PATOLOGIE:

- Zvýšení koncentrace tPA je pozorováno u různých patologických stavů (syndrom respirační tísně, infarkt myokardu, sepse, poranění, jaterní choroby) Během transplantace jater koncentrace tPA dramaticky stoupá v ahepatické fázi.
- Současné epidemiologické studie ukázaly asociaci mezi tPA:Ag koncentrací a vzestupem rizika kardiovaskulárních chorob. Zvýšený tPA:Ag je často spojen s vysokou koncentrací PAI-1 a s poklesem základního fibrinolytického potenciálu. Hodnota tPA:Ag je pak prediktivní pro kardiovaskulární patologii a vývoj onemocnění^{4,5}.

APLIKACE:

Stanovení tPA:Ag ve klinických vzorcích jako marker onemocnění.

Stanovení tPA:Ag v trombolýze rekombinantními tPA medikamenty.

CHARAKTERISTIKA:

Detekční mez ≤0,5 ng/ml.

Intra-assay: 3 – 8%.

Inter-assay: 5 – 10%.

REFERENCE:

1. Bos R. *et al.* Production and characterization of a set of monoclonal antibodies against Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA). Fibrinolysis, 1992; 6: 173-182.
2. Bos R. *et al.* A one step enzyme immunoassay for the determination of total tissue-type plasminogen activator (tPA) antigen in plasma. Blood Coag Fib, 1992; 3: 303-307.
3. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
4. Juhan-Vague I. and Alessi M.C. Fibrinolysis and risk of coronary artery disease. Fibrinolysis, 1996; 10(3): 127-136.
5. Stein P. *et al.* Activation of the fibrinolytic system in patients with coronary artery disease and hyperfibrinogenemia. Thromb Haemost, 1997; 77(5): 970-974.

SYMBOLY:

Použité symboly a znaky jsou uvedeny v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument definice symbolů.