

CE ZYMUTEST tPA Antigen # RK011A

HYPHEN BioMed

ZAC Neuville Université – 155, rue d'Eragry
95000 Neuville-sur-Oise – France
Tél. : 01 34 40 65 10 – Fax : 01 34 48 72 36
www.hyphe-biomed.com



Kompletní ELISA souprava pro stanovení Antigenu Tkáňového Aktivátoru Plasminogenu

Pouze pro účely „In Vitro“

Poslední revize 8/09/2011

POUŽITÍ:

ZYMUTEST tPA souprava je dvoukrokový immunoassay pro stanovení lidského tkáňového Aktivátoru Plasminogenu (tPA) v plazmě.

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.

VZOREK:

- Lidská citrátová plazma nebo Na₂EDTA plazma.

Pozn: Tato souprava může být použita pro měření tPA:Ag v biologických tekutinách pouze pokud je použit odpovídající standard.

REAGENCIE:

1. Micro ELISA destička, obsahuje 12 proužků po 8 jamkách, potažených vysoce čistěnou myší monoklonální protilátkou specifickou pro lidský tPA, stabilizovanou, balenou v hliníkovém pouzdru hermeticky uzavřeném společně s desikantem.

2. SD: 2 lahvičky s obsahem 50 ml **F-diluentu vzorku** připraveného k použití.

3. STD: 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.

4. CI: 1 lahvička s obsahem 1 ml lyofilizované kontrolní plazmy I vysoké (UTA) (lidská plazma).

5.CII: lahvička s obsahem 1 ml lyofilizované kontrolní plazmy II nízké (UTA) (lidská plazma)

Pozn.: Koncentrace tPA a akceptabilní meze pro kontrolní plazmy mohou kolísat od šarže k šarži. Přesné hodnoty jsou uvedeny na přiloženém letáku.

6. IC: 3 lahvičky **Anti-(h)-tPA-HRP imunokonjugátu** – monoklonální protilátky s navázanou HRP, lyofilizovaný.

7. CD: 1 lahvička 25 ml **diluentu konjugátu**, připraveného k použití.

8.: WS: 1 lahvička 50 ml **promývacího roztoku**, 20x koncentrovaného

9. TMB: 1 lahvička 25 ml peroxidázového substrátu: **3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine**, s obsahem peroxidu vodíku. Připraven k použití.

10. SA: 1 lahvička 6 ml **0,45 M kyseliny sírové** (zastavovací roztok). Připraven k použití.

Poznámka: Užívejte komponenty pouze z kitu stejné šarže. Nezaměňujte komponenty z kitů o různých šaržích v jednu testu.

REAGENCIE A VYBAVENÍ POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:

8-kanálová pipeta nebo rozplňovací pipeta 50 – 300 µl
1-kanálové 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
Destilovaná voda

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ, SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

V originálním balení, před použitím, pokud jsou skladovány v 2-8°C jsou neotevřené reagenty stabilní do data vytištěného na obalu.

- 1. ELISA mikrotitrační destička:** otevřete plastové 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.
- 2. F- diluent vzorku:** je připraven k použití. Po otevření může být používán po **4 týdny**, pokud je skladován při **2-8°C** a pokud je zabráněno bakteriální kontaminaci během použití. Obsahuje 0,05% Kathon CG.
- 3. tPA standard:** rozpustěte každou lahvičku **1 ml** destilované vody. Tento roztok je stabilní **8 hodin** při pokojové teplotě.

Pozn: pro opakované použití soupravy připravte 3 alikvoty každého standardu po jeho rozpuštění. Tyto alikvoty jsou po zamrazení stabilní 2 měsíce

- 4. Kontrola I (UTA)** (lidská plazma, vysoká): rozpustěte s **1 ml** destilované vody.
- 5. Kontrola II (UTA)** (lidská plazma, nízká): rozpustěte s **1 ml** destilované vody.

Pozn.: rozpouštěné kontroly jsou stabilní **8 hodin** za pokojové teploty, **24 hodin při 2-8°C** nebo **2 měsíce** zmrazené při **-20°C** nebo nižší.

Upozornění: Kalibrátor (3) a kontroly (4 a 5) jsou připraveny z normální lidské plazmy. Tyto plazmy byly testovány registrovanými metodami a sledány negativními na anti-HIV protilátky, HBsAg a anti-HCV protilátky. Přesto, žádný test nemůže vyloučit nepřítomnost infekčních agens. S každým produktem lidského původu musí být zacházeno s opatrností, jako s potenciálně infekčním.

Distributor: Diagnostica a.s., Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel. 283 109 137, Fax. 283 109 132, e-mail: info.@diagnostica.cz

IVD

6. **Imunokonjugát anti-(h)-tPA-HRP** : každá lahvička musí být rozpuštěna se **7,5 ml** diluentu konjugátu. Nechte částičky kompletně rozpustit. Před použitím opatrně lahvičku promíchejte, aby se obsah homogenizoval. Rozpuštěný konjugát je stabilní **24 hodin** za pokojové teploty, **4 týdny při 2-8°C**.
7. **Diluent konjugátu**: Připraven k použití. Po otevření může být užíván po **4 týdny**, pokud je skladován při **2-8°C** a je zabráněno bakteriální kontaminaci během použití. Obsahuje 0,05% Kathon CG.
8. **Promývací roztok**: Inkubujte lahvičku 15 – 30 minut ve vodní lázni v **37°C** dokud se zcela nerozpustí pevné částičky (pokud jsou přítomné). Promíchejte lahvičku a nadejte požadovaný objem v poměru 1:20 v destilované vodě (obsah lahvičky 50 ml dovoluje získat 1 litr promývacího roztoku). Promývací roztok musí být skladován při **2-8°C** ve své originální lahvičce a použit do **4 týdnů** po otevření. Ředěný promývací roztok musí být použit do **7 dnů**, pokud bylo zabráněno kontaminaci a pokud byl skladován při **2-8°C**. Obsahuje 0,05% Kathon CG.
9. **TMB substrát**: Připraven k použití. Po otevření může být používán po **4 týdny**, pokud je skladován při **2-8°C** a pokud bylo zabráněno bakteriální kontaminaci během používání.
10. **Zastavovací roztok**: Připraven k použití.

Upozornění: Kyselina sírová, přesto že ředěná na 0,45M, je žíravá. Jako se všemi podobnými látkami, zacházejte s kyselinou sírovou s velkou opatrností. Vyvarujte se kontaktu s kůží a očima. Užívejte ochranné brýle a rukavice.

Pozn.: soupravu přeneste do pokojové teploty nejméně 30 minut před použitím. Skladujte nepoužité reagenty při 2-8°C. Studie stability provedené při 30°C ukazují, že reagenty mohou být připravovány při pokojové teplotě bez poškození.

PROVEDENÍ:

Odběr vzorku:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109M citrátu sodného (1 díl) přímou venepunkcí, následuje oddělení plazmy centrifugací 20 minut při 2500 g. Citrátová plazma může být testována do **8 hodin** nebo skladována zmrazená při teplotě -20°C nebo nižší po dobu 6 měsíců. Plazmu rozmrazíte 15 minut při 37°C těsně před použitím. Rozmrazený vzorek musí být testován do **4 hodin**.

Mohou být též použity vzorky odebrané do EDTA. Skladovací podmínky plazmy jsou stejné jako pro odběr do citrátu.

Vzhledem k diurnálnímu kolísání by měl být tPA přednostně testován ze vzorků odebraných ráno.

Testovaná plazma, vzorek kontroly:

Vzorky plazmy a kontrola I a II jsou testovány **neředěné** (kontroly po rozpuštění). Pro očekávané koncentrace tPA >20 ng/l může být vzorek testován v ředění 1:2, 1:5 nebo větším dle očekávané koncentrace tPA. Testované vzorky ředíme (pokud je potřeba) v F- diluentu vzorku.

Kalibrace:

V soupravě jsou 4 hladiny tPA standardů – 0, 1, 2, 3. Po rozpuštění jsou testovány **neředěné**. Kalibrační rozmezí je od 0 do cca 20 ng/ml. Standardy opatrně míchejte pro dobrou homogenizaci před použitím. Naředěné standardy jsou stabilní 6 hodin při pokojové teplotě. Opatrně promíchejte. Ředěné standardy jsou stabilní **6 hodin** při pokojové teplotě.

Postup:

Vyjměte pro počet testů požadovaný počet proužků z hliníkového pouzdra a vložte je do přiloženého rámečku. Do jamek pak pipetujte reagenty dle následujícího postupu:

Reagent	Objem	Testovací krok
F diluent vzorku	100 µl	Pipetujte diluent vzorku do jamek mikrodestičky
tPA standard nebo testované vzorky nebo, nebo F-diluent vzorku pro blank	100 µl	Pipetování kalibrátoru nebo vzorku do jamek mikrotitrační destičky (a)
Inkubujte 1 hodinu v pokojové teplotě (18-25°C) (b)		
Promývací roztok (20x ředěný destilovanou vodou)	300 µl	Provedte 5 promytí za použití promývačky (b)
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 (c)
Inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25°C) (b)		
Promývací roztok (20x ředěný destilovanou vodou)	300 µl	Provedte 5 promytí za použití promývačky (a)
TMB/H ₂ O Substrát	200 µl	Okamžitě po promytí pipetujte substrát do jamek Pozn.: pipetování substrátu, řádek za řádkem musí být v přesných časových intervalech (c,d)
Inkubujte přesně 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b)		
0,45 M Kyselina sírová	50 µl	Pipetujte ve stejných časových intervalech jako substrát, přidáním 0,45 M kyseliny sírové zastavíte rozvoj barvy (c)
Počkejte 10 minut aby se zbarvení stabilizovalo a měřte absorbcí při 450 nm (A450). Odečtěte hodnotu blanku.		

- a) Ředění plazmy, kontrol nebo standardů 2x diluentem vzorku může být provedeno ve zkumavce. Potom se do jamky pipetuje 200 µl. Pipetuje kalibrátory, kontroly vzorky tak rychle, jak je to možné (do 10 minut), aby byla získána homogenní imunologická kinetika pro vazbu tPA.
- b) Vyvarujte se ponechání destičky na slunečním světle během inkubace a zejména během vývoje zbarvení.
- c) 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.
- d) Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do řádků musí být přesně určeny a stejné intervaly musí pak být při pipetování zastavovacího roztoku
- e) 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 diluentu vzorku (rozpuštění kalibrátorů je stejné jako u dvoukrokové 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 sírové (SA). Vykresejte kalibrační křivku a odečtěte výsledky (ale od 0 do 10 ng/ml).

Stanovení koncentrace tPA:Ag musí být násobena skutečným ředěním vzorku (1:2 nebo aktuálním ředícím faktorem)

VÝSLEDEK:

Na lineární grafický papír vyneste na jednu osu tPA:Ag koncentraci v ng/ml a na druhou osu odpovídající absorbance.

Uživatel musí stanovit vlastní kalibrační křivku, získanou z vlastní kalibrační řady. Z takto získané kalibrační křivky se odečtou tPA:Ag koncentrace pro testované vzorky a kontroly CI a CII. Pro ředěné vzorky vynásobte odečtenou hladinu dilučním faktorem.

Alternativně lze pro odečet využít ELISA software (Dynex, Biolyse)

OČEKÁVANÁ ROZMEŽÍ:

tPA:Ag koncentrace je v normální lidské plazmě obvykle <10 ng/ml. Stoupá s věkem, cvičením a stresem.

BIOCHEMIE:

Tkáňový Aktivátor Plasminogenu (tPA) je protein o MH 68 KDa. Je syntetizován a secernován endoteliálními buňkami. Zahajuje fibrinolýzu štěpením plasminogenu na plasmin na povrchu fibrinového koagula. Je složen z 563 aminokyselin.

V krvi je tPA rychle inaktivován svým hlavním inhibitorem PAI-1, který je obvykle v nadbytku. Cirkulující tPA je přítomen převážně v inaktivním stabilním komplexu s PAI-1. Clearance tPA je bifazická. Fáze 1 má poločas asi 5 minut a fáze 2 má poločas kolem 45 minut. Je vyvazován receptory v játrech.

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 je často spojen s vysokou koncentrací PAI-1 a s poklesem základního fibrinolytického potenciálu. Hodnota tPA:A je pak prediktivní pro kardiovaskulární patologii a vývoj onemocnění.

APLIKACE:

Stanovení tPA:Ag ve vzorku jako marker onemocnění, nebo při fibrinolýze rekombinantními tPA.

CHARAKTERISTIKA:

Detekční mez ≤0,5 ng/ml

Intra-assay: 3 – 8%

Inter-assay: 5 – 10%

Žádné signifikantní interference pro heparin do 2 IU/ml, endogenní PAI-1 do 100 ng/ml.

Souprava umožňuje homogenně měřit tPA (pokud je přítomen), volný a aktivní, nebo vázaný do komplexu se svými inhibitory.

REFERENCES:

1. Bos R., Siegel K., Otter M., Nieuwenhuizen W: Production and characterization of a set of monoclonal antibodies against Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA). *Fibrinolysis*, 1992; 6: 173-182.
2. Bos R., Hoegge-de Nobel E., Laterveer R., Meyer P. and Nieuwenhuizen W. 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. Juhan-Vague I., Alessi M.C.: Fibrinolysis and risk of coronary artery disease. *Fibrinolysis*, 1996; 10(3): 127-136.
4. Stein P., Heins M., Schoebel F.C., Pels K., Jax T.W., Stiegler H., Reinauer H., Strauer B.E., Leschke M. Activation of the fibrinolytic system in patients with coronary artery disease and hyperfibrinogenemia. *Thromb Haemost*, 1997; 77(5): 970-974.

Distributor: Diagnostica a.s., Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel. 283 109 137, Fax. 283 109 132, e-mail: info@diagnostica.cz

IVD