

# ZYMUPHEN® tPA Aktivität

Art.Nr. 521296

Bio-Immuno-Assay zur Bestimmung der  
tPA-Aktivität



Vertrieb und Support:

CoaChrom Diagnostica GmbH

www.coachrom.com | info@coachrom.com

Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111

Kostenfreie Nummern für Deutschland:

Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

## VERWENDUNGSZWECK:

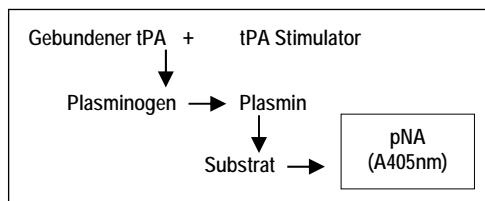
ZYMUPHEN tPA ist ein Bio-Immuno-Assay zur Bestimmung der tPA-Aktivität in humanem Citratplasma oder in biologischen Flüssigkeiten auf einer Mikrotiterplatte.

## ZUSAMMENFASSUNG:

tPA ist ein einkettiges 68 kDa-Glykoprotein, das aus 563 Aminosäuren besteht und von Endothelzellen synthetisiert wird. tPA initiiert die Fibrinolyse durch Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin an der Oberfläche des Fibringerinnsels. Es besteht aus 563 Aminosäuren. Im Blut wird tPA rasch durch PAI-1, der üblicherweise im Überschuss vorliegt, inaktiviert. Zirkulierender tPA liegt hauptsächlich inaktiv in einem stabilen Komplex mit PAI-1 vor. Der Abbau von tPA geschieht in 2 Phasen: die erste Phase hat eine Halbwertszeit von etwa 5 Minuten, die zweite Phase von etwa 45 Minuten. Es bindet an Rezeptoren der Leber. Die tPA-Aktivität in gesunden Individuen liegt bei etwa 0,5 IE/ml.<sup>1</sup>

## TESTPRINZIP:

Das verdünnte Testplasma bzw. die biologische Flüssigkeit wird zunächst in die mit einem hochgereinigten, monoklonalen Antikörper spezifisch für humanen tPA (der nicht mit dem aktiven Teil von tPA reagiert) beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Der vorhandene tPA bindet an die Platte. Nach einem Waschschrift in Anwesenheit eines tPA-Stimulators wird Plasminogen zu Plasmin aktiviert (Reagenz R2). Plasmin spaltet anschließend von einem spezifischen Substrat pNA ab. Dies führt zu einer Gelbfärbung, die durch Zugabe von Zitronensäure gestoppt wird. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zur Konzentration der tPA-Aktivität.



Probenmaterial: Humanes Citratplasma, pH 4,3 oder jede andere biologische Flüssigkeit, in der die tPA-Aktivität bestimmt werden soll.

## REAGENZIEN:

- COAT:** ELISA-Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem monoklonalen Maus-Anti-tPA Antikörper. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- SD-CIT:** 2 Flaschen mit je 50 ml Citrat-Phosphat-Probenverdünner, gebrauchsfertig.
- R1:** 2 Flaschen chromogenes Plasmin Substrat CS 41(03), lyophilisiert.
- R2:** 2 Flaschen Plasminogen Reagenz mit tPA Stimulator, lyophilisiert.
- CAL:** 2 Flaschen mit je 2,0 ml tPA Kalibrator, lyophilisiert.
- CI:** 2 Flasche mit je 0,5 ml tPA Kontrolle I (Hoch), lyophilisiert.
- CII:** 2 Flasche mit je 0,5 ml tPA Kontrolle II (Niedrig), lyophilisiert.
- WS:** 1 Flasche mit 50 ml 20-fach konzentrierter Waschlösung.
- CA:** 1 Flasche mit 6 ml Zitronensäure 2% (Stopplösung), gebrauchsfertig.

Die tPA-Sollwerte und Vertrauensbereiche des Kalibrators und der Kontrollen können von Charge zu Charge unterschiedlich sein, sind jedoch für jede Charge auf dem beiliegenden Datenblatt exakt angegeben.

Reagenz 2 enthält Natriumazid (0,9 g/l), die Anmerkungen und Warnhinweise unten sind zu beachten.

## ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Natriumazid kann mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren.
- Bei Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden. Es dürfen bei Durchführung des Tests keine Reagenzien aus Packungen mit unterschiedlichen Chargennummern gemischt werden, da die Reagenzien für die jeweilige Chargennummer der Packung optimiert sind.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu handhaben, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden. Die Verdunstung ist während des Reagenzgebrauchs durch Verringerung der Verdunstungsfläche so gering wie möglich halten. Verdunstung verringert die Reagenzstabilität in Analysenautomaten.
- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzflaschen nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.

## VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

- Mikrotiterplatte (COAT):** Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die jeweilige Testserie erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen. Nach Entnahme müssen die Mikrotiterstreifen innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen können im Aluminiumbeutel gemeinsam mit dem Trockenmittel und vor Feuchtigkeit geschützt, 4 Wochen bei 2-8°C im mitgelieferten Druckverschlussbeutel gelagert werden.
- Probendiluent (SD-CIT):** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann die Lösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- R1:** Den Inhalt der Flasche mit exakt 6 ml aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen und dabei gelegentlich schütteln. Der Inhalt ist vor jedem Gebrauch zu homogenisieren. Das Substrat ist in der Originalflasche oder in einem geschlossenen Kunststoffbehälter unter der Voraussetzung, dass jegliche Kontamination und Verdunstung vermieden wird, für 24 Stunden bei 2-8°C, 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil\*.
- R2:** Den Inhalt der Flasche mit exakt 6 ml aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen und dabei gelegentlich schütteln. Der Inhalt ist vor jedem Gebrauch zu homogenisieren. Das Reagenz ist in der Originalflasche oder in einem geschlossenen Kunststoffbehälter unter der Voraussetzung, dass jegliche Kontamination und Verdunstung vermieden wird, für 24 Stunden bei 2-8°C, 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil\*.
- tPA Kalibrator:** Um die Kalibrationslösung mit der Konzentration „C“ in IE/ml zu erhalten, den Inhalt der Flasche mindestens 15 Minuten vor Gebrauch mit genau 2 ml aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Das Reagenz ist in der Originalflasche oder in einem geschlossenen Kunststoffbehälter unter der Voraussetzung, dass jegliche Kontamination und Verdunstung vermieden wird, für mindestens 24 Stunden bei 2-8°C und 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil.
- CI:** tPA Kontrolle I (Hoch): Mit genau 0,5 ml aqua dest. mindestens 15 Minuten vor Gebrauch rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Die Kontrolle muss für die Testdurchführung 1:2 in Probenverdünner SD-CIT verdünnt werden.
- CII:** tPA Kontrolle II (Niedrig): Mit genau 0,5 ml aqua dest. mindestens 15 Minuten vor Gebrauch rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Die Kontrolle muss für die Testdurchführung 1:2 in Probenverdünner SD-CIT verdünnt werden.

Nach Rekonstitution sind die unverdünnten Kontrollen CI und CII 8 Stunden bei Raumtemperatur, 24 Stunden bei 2-8°C oder 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil\*.

- Waschlösung (WS):** Für 15-30 Minuten im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Feststoffe inkubieren. Schütteln und das für die Testreihe erforderliche Volumen 1:20 mit aqua dest. verdünnen. Aus 50 ml Konzentrat lässt sich folglich 1 l verdünnte Waschlösung herstellen. Nach dem Öffnen ist das Konzentrat in der Originalflasche 4 Wochen bei 2-8°C haltbar. Nach Verdünnung kann die Waschlösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 7 Tage bei 2-8°C gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- Stopplösung:** 2% Zitronensäure, gebrauchsfertig.

\*Kann einmalig gefroren und aufgetaut werden (so schnell wie möglich einfrieren). Bei 37°C so schnell wie möglich auftauen, wobei die Dauer an die Plasmavolumina anzupassen ist. Die Stabilität des aufgetauten Reagenz ist unter den Arbeitsbedingungen des jeweiligen Labors zu prüfen.

## LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zu dem auf der Verpackung aufgedruckten Verfalldatum stabil.

## ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENHALTEN SIND:

- Geeichte Pipetten, Stoppuhr.
- Waschgerät und Schüttler für Mikrotiterplatten.
- Spektrrophotometer oder Gerinnungsautomaten mit einer Wellenlängeneinstellung von 405 nm
- Aqua dest.
- Stoppuhr.

## PROBENGWINNUNG:

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen.

**Proben:** Humanes Plasma mit saurem Tri-Natrium Citrat als Antikoagulant.

**Blutabnahme:** Blut (9 Volumentteile) wird in 1 Volumenanteil 0,5 M saurem Citrat pH 4,3 als Antikoagulant abgenommen (z.B. Biopool® Stabylite™ Röhrchen). Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, um jegliche Inaktivierung von tPA zu vermeiden.

**Zentrifugation:** Die Herstellung von plattenarmem Plasma hat innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2500g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.

#### Lagerung der Plasmaproben<sup>2</sup> bis zu:

- 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 1 Monat tiefgefroren bei -20°C oder
- 18 Monate bei -70°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C zügig aufgetaut, anschließend behutsam gemischt und dann sofort getestet werden. Jegliche Niederschläge sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

#### TESTDURCHFÜHRUNG:

1) Kalibratoren sollten, wie in der unten stehenden Tabelle beschrieben, mit Probendiluent (SD-CIT) verdünnt werden, um den Kalibrationsbereich herzustellen („C“= definierte tPA-Konzentration)

Konzentration (IE/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volumen tPA Kalibrator (CAL)	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,05 ml	0 ml
Volumen Probendiluent (SD-CIT)	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	0,9 ml	0,95 ml	1 ml

2) Die Proben und Kontrollen sind 1:2 mit Probendiluent (SD-CIT) zu verdünnen. Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Die Verdünnungen sind für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil. Es sind die genauen Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollen zu beachten, die für das jeweilige Lot auf dem im Kit enthaltenen Zertifikat vermerkt sind.

3) Die für die jeweilige Testserie erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen einlegen. Die Reagenzzugabe erfolgt gemäß folgendem Pipettierschema:

Reagenz	Volumen	Vorgehen
Kalibrator oder 1:2 verdünnte Proben und Kontrollen oder Probenverdünner (Leerwert)	200 µl	Kalibratoren, Kontrollen und Proben <u>unverzüglich</u> in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren
<b>60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (a)</b>		
Waschlösung (20-fach in aqua dest. verdünnt)	300 µl	5 aufeinanderfolgende Waschrunde mit dem Wascherät durchführen (b)
R1 chromogenes Substrat, für 20 Minuten bei 37°C vorinkubiert und durchmischt	100 µl	Unmittelbar nach dem Waschrunde muss die Platte bei 37°C inkubiert und das Substrat hinzugefügt werden
R2 Plasminogen, für 20 Minuten bei 37°C vorinkubiert und durchmischt	100 µl	R2 Plasminogen Reagenz in die Mikrovertiefungen pipettieren (c)
<b>Exakt 30 Minuten bei 37°C inkubieren</b>		
Stopplösung (CA)	50 µl	In exakt den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe des Substrates die Farbentwicklung durch Zugabe von Zitronensäure 2% abstoppen (c)
Nach 10 Minuten Wartezeit zur Stabilisierung die Absorption bei 405 nm (A405) messen und den Leerwert abziehen (d).		

#### Anmerkung:

- Während der Inkubationsphasen, insbesondere während der Farbentwicklung, darf die Platte nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden. Ein Mikrotiterplatten-Schüttler kann verwendet werden. Die Inkubationstemperatur von 18-25°C muss eingehalten werden, da die bei 405 nm gemessenen Werte sonst zu hoch (>25°C) oder zu niedrig (<18°C) sein könnten. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, soll ein Mikrotiterplatten-Schüttler nur zu Beginn eines Arbeitsschrittes für maximal 1-2 Minuten zum Einsatz kommen. Er soll ausschließlich für eine gute Homogenität in der Mikrotitervertiefung sorgen. Das Schütteln während der gesamten Inkubationszeit kann zu falsch hohen Absorptionen führen. Die 1:2 Verdünnung kann direkt auf der Mikrotiterplatte durchgeführt werden. Dafür werden 100 µl Probenverdünner und 100 µl Probe oder Kontrolle in die Mikrovertiefung pipettiert. Die Zugabe der Reagenzien sollte zügig (innerhalb von 10 Minuten) erfolgen um eine gleichmäßig starke Bindung von tPA zu ermöglichen.
- Die Mikrovertiefungen dürfen zwischen der Zugabe einzelner Reagenzien oder nach einem Waschrunde niemals vollständig austrocknen. Um das Austrocknen der Mikrovertiefungen und damit eine Beschädigung der immobilisierten Komponenten zu verhindern, muss das folgende Reagenz innerhalb von 3 Minuten zugegeben werden. Falls erforderlich, können die Mikrovertiefungen mit Waschlösung gefüllt und erst kurz vor der Zugabe des folgenden Reagenz geleert werden. Um eine Verringerung der Aktivität zu vermeiden, muss das Wascherät die Mikrovertiefungen schonend waschen.
- Bei der Zugabe des Substrates müssen die Zeitintervalle, Reihe für Reihe, genau festgelegt und exakt eingehalten werden. Dies gilt in gleicher Weise für die Zugabe von R2 und der Stopplösung.
- Für eine bichromatische Ablesung können Referenzwellenlängen von 690 nm oder 620 nm verwendet werden.

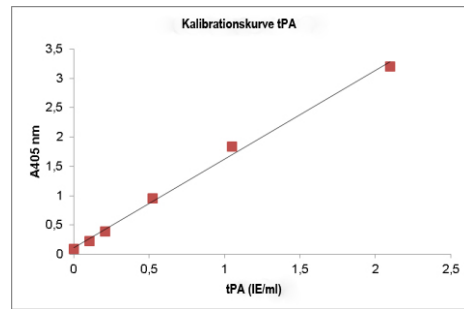
Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, jegliche Modifikationen und ihre Wirkung auf die Testergebnisse zu validieren.

#### KALIBRATION:

Im linearen Maßstab:

- Der Test ist linear von 0 bis zu ca. 2 IE/ml.

Bei der unten gezeigten Kalibrationskurve handelt es sich lediglich um ein Beispiel. Zur Bestimmung darf ausschließlich eine selbst erstellte Kalibrationskurve verwendet werden.



#### QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse.

Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen.

Zumindest bei Chargenwechsel, größeren Wartungsarbeiten am Analysenautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen, muss eine Neukalibration erfolgen. Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

#### ERGEBNISSE:

- Auf Millimeterpapier wird die tPA-Aktivität in IE/ml auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption A405 auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen.
- Jeder Anwender muss eine eigene Kalibrationskurve in Abhängigkeit der Kalibratorverdünnungen herstellen (z.B. lin-lin Regression). Der Wert der tPA-Aktivität in der jeweiligen Verdünnung des Probenplasmas kann direkt von der Kalibrationskurve abgelesen werden. Um die tPA-Aktivität in der Probe zu erhalten, muss der erhaltene Wert noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (x2 für die Kontrollen und Testplasma, das 1:2 verdünnt wurde). Die Kalibration ist gültig, wenn die gemessenen Werte der Kontrollen im Akzeptanzbereich, der dem beiliegenden Datenblatt zu entnehmen ist, liegen.
- Alternativ dazu kann eine Software zur Auswertung und Berechnung der Konzentrationen (z.B. Dynex, Biolise, etc.) verwendet werden. Die Zielwerte und Akzeptanzbereiche der Kontrollen wurden z.B. mit einer Lin-Lin Regressionskurve ermittelt. Jedes Labor sollte die Berechnungsmethode wählen, die am besten zu den erhaltenen Kontrollwerten passt.

#### EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um die optimale optimale Testleistung zu erzielen, muss die Durchführungsanleitung genau befolgt werden.
- Reagenzien mit ungewöhnlichem Aussehen oder einem Zeichen von Kontamination sind zu verwerfen.
- Plasmen mit einem Gerinnsel oder einer Kontamination sind zu verwerfen.

#### LEISTUNGSMERKMALE:

- Arbeitsbereich: 0 bis 2 IE/ml (0 bis 4 IE/ml, wenn das Plasma vor Gebrauch 1:2 verdünnt wurde)
- Nachweisgrenze: ≤ 0,1 IE/ml
- Wiederfindung im Plasma: 100% für die 1:2 Verdünnung, 98% für unverdünntes Plasma.
- Kreuzreaktivität: Es wurde keine signifikante Kreuzreaktivität mit Urokinase (uPA) beobachtet.
- Diese Präzisierung wurde mittels Qualitätskontrolle des Labors ausgewertet. Die folgenden Daten wurden erhalten:

Kontrollen	Intra Assay		Inter Assay	
	N	CV%	n	CV%
CI	12	7,7%	7	5,7%
CII	12	7,5%	7	8,6%

#### REFERENZEN:

- Bos R., et al. "Production and characterization of a set of monoclonal antibodies against Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA)". Fibrinolysis, 1992; 6: 173-182
- Woodhams B, Girardot O, Blanco M-J, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001. Vol 12, No 4. 229-236.

#### SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind gelistet in der ISO-Norm 15223-1.