



ZYMUTEST tPA Antigen

Art.Nr. RK011A

ELISA-Kit zur Bestimmung von tPA-Antigen



Vertrieb und Support:
Cochrom 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:

Der ZYMUTEST tPA Antigen ist ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung von humanem Gewebe-Plasminogenaktivator (tPA) im Plasma. Bei Verwendung eines geeigneten Standards kann der Testkit auch zur Bestimmung von tPA-Antigen in anderen biologischen Flüssigkeiten genutzt werden. Der Testkit ermöglicht die homogene Messung sowohl von freiem und aktivem tPA als auch mit seinen Inhibitoren komplexiertem tPA.

ZUSAMMENFASSUNG:

tPA ist ein einkettiges 68 kDa-Glykoprotein, das 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-Antigen-Konzentration in normalem humanem Plasma liegt gewöhnlich bei < 10 ng/mL. Sie erhöht sich mit Alter, Bewegung und Stress.

TESTPRINZIP:

Das verdünnte Testplasma bzw. die biologische Flüssigkeit wird zunächst in die mit einem hochgereinigten, monoklonalen tPA-Antikörper beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Der vorhandene tPA bindet an die Platte. Nach einem Waschschriff wird ein HRP-konjugierter monoklonaler Antikörper zugegeben und dieser bindet an die freien Epitope des immobilisierten tPA. Nach einem zweiten Waschschriff wird das Peroxidasesubstrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zugegeben. Unter diesen Bedingungen färbt sich TMB blau und schlägt beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach gelb um. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur tPA-Antigen-Konzentration der Probe.²

REAGENZIEREN:

- COAT: ELISA-Mikrotiterplatte**, enthält 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem monoklonalen Maus-Anti-tPA Antikörper. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt. Enthält BSA.
- SD:** 2 Flaschen mit je 50 mL **Fibrinolyse-Probenverdünner**, gebrauchsfertig. Enthält BSA.
- STD:** Je 1 Flasche **tPA-Kalibratoren 0, 1, 2, 3** mit je 1 mL (**0 bis etwa 20 ng/mL, kalibriert gegen den NIBSC-Referenzstandard**), lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit jeweils 1,0 mL aqua dest. erhält man die gebrauchsfertigen Kalibrationslösungen. Die exakte tPA-Antigen-Konzentration der einzelnen Kalibratoren ist dem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.
- CI:** 1 Flasche mit 1,0 mL **Kontrolle I Hoch** (UTA: uPA, tPA und Annexin V), lyophilisiertes Humanplasma. Nach Rekonstitution mit jeweils 1,0 mL aqua dest. erhält man die gebrauchsfertige Kontrolle. Enthält BSA.
- CII:** 1 Flasche mit 1,0 mL **Kontrolle II Niedrig** (UTA: uPA, tPA und Annexin V), lyophilisiertes Humanplasma. Nach Rekonstitution mit jeweils 1,0 mL aqua dest. erhält man die gebrauchsfertige Kontrolle. Enthält BSA.
- IC:** 3 Flaschen **Anti-(h)-tPA-HRP Immunkonjugat**. Monoklonaler Antikörper, spezifisch für humanes tPA-Antigen, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP), lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit jeweils 7,5 mL Konjugatverdünner (CD) erhält man das gebrauchsfertige Immunkonjugat. Enthält BSA.
- CD:** 1 Flasche mit 25 mL **Konjugatverdünner**, gebrauchsfertig. Enthält BSA.
- WS:** 1 Flasche mit 50 mL 20-fach konzentrierter **Waschlösung**.
- TMB:** 1 Flasche mit 25 mL **Peroxidasesubstrat** (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), versetzt mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂), gebrauchsfertig.
- SA:** 1 Flasche mit 6 mL **Stopplösung** (0,45 mol/L Schwefelsäure), gebrauchsfertig.

Die exakten Werte von Kontrollen und Kalibratoren sowie die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind dem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.

Die Reagenzien SD, CD und WS enthalten 0,05% Kathon CG, das Reagenz SA enthält Schwefelsäure. Die unten aufgeführten Warnhinweise sind zu beachten.

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- Falls das TMB-Substrat eine Gelbfärbung aufweist, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche zu verwenden.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden. Die Reagenzien sind in Bezug auf die jeweilige Charge optimiert.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, um jegliche Kontamination während der Verwendung zu vermeiden. Um Verdunstung der Reagenzien während der Verwendung soweit wie möglich zu vermeiden, ist die Verdunstungsfläche so gering wie möglich zu halten.
- 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.

- Das zur Herstellung der Kontrollen I und II verwendete humane Plasma wurde mit registrierten Methoden getestet und als negativ für HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper eingestuft.
- Das zur Herstellung des BSA verwendete bovine Plasma wurde mit registrierten Methoden negativ auf infektiöse Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen.
- Schwefelsäure ist, auch bei einer 0,45M-Verdünnung, ätzend und muss wie ähnliche Chemikalien mit höchster Vorsicht behandelt werden. Beim Umgang mit Schwefelsäure sind Schutzbrille und Handschuhe zu tragen, um Haut- und Augenkontakt zu vermeiden.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik.

CD, SD, WS: H317: Kann allergische Hautreaktionen hervorrufen.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEREN:

Die erforderlichen Testkitkomponenten müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Nicht benötigte Komponenten sind bei 2-8°C zu lagern. Die Flaschen sind unter Vakuum verschlossen. Bei den lyophilisierten Reagenzien sind die Gummistopfen vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden. Bei angemessener Verwendung und Lagerung unter Beachtung der empfohlenen Anweisungen und Warnhinweise kann der Testkit innerhalb eines Monats und wenn nötig streifenweise verwendet werden.

- COAT (ELISA-Mikrotiterplatte):** Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die jeweilige Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen. Nach Entnahme aus dem Beutel müssen die Streifen innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Zur Lagerung werden nicht benötigte Streifen in Gegenwart des Trockenmittels im originalen Aluminiumbeutel verschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Unter diesen Bedingungen sind die Streifen **4 Wochen bei 2-8°C** haltbar.
- SD (Fibrinolyse-Probenverdünner):** Gebrauchsfertig. Das Reagenz enthält 0,05% Kathon CG. Nach dem Öffnen kann das Reagenz in der Originalflasche unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.
- STD (tPA-Kalibratoren 0, 1, 2, 3):** Den Inhalt der Flaschen mit jeweils 1,0 mL aqua dest. rekonstituieren. Die Kalibratoren sind dann **8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)** oder -aliquotiert- für **2 Monate bei ≤ -20°C** stabil.
- CI:** Kontrolle I (UTA, Humanplasma, hoch): Mit 1,0 mL aqua dest. rekonstituieren.
- CII:** Kontrolle II (UTA, Humanplasma, niedrig): Mit 1,0 mL aqua dest. rekonstituieren. Die Kontrollen I und II sind nach Rekonstitution **8 Stunden bei Raumtemperatur, 24 Stunden bei 2-8°C** oder **2 Monate bei ≤ -20°C** stabil.
- IC (Anti-(h)-tPA-HRP Immunkonjugat):** Den Inhalt der Flasche mit genau 7,5 mL Konjugatverdünner (CD) rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig schütteln. Das rekonstituierte Konjugat ist **24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)** und **4 Wochen bei 2-8°C** stabil.
- CD (Konjugatverdünner):** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann die Lösung unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung in der Originalflasche **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- WS (Waschlösung):** Wenn nötig im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung von Feststoffen 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.
- TMB:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Substrat unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung in der Originalflasche **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.
- SA (Stopplösung):** Gebrauchsfertig. Enthält Schwefelsäure, der aufgeführte Warnhinweis ist zu beachten. Nach dem Öffnen kann die Stopplösung unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung in der Originalflasche **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.

LAGERUNG:

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

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.

Geräte:

- 8-Kanal-Pipette mit einem Pipettivolumen im Bereich von 50-300 µL
- Pipetten mit Pipettivolumina in den Bereichen von jeweils 0-20, 20-200 und 200-1000 µL
- Mikrotiterplattenwascher und -schüttler
- Mikrotiterplattenleser zur Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm

PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG:

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung in den USA sind im CLSI-Dokument GP44-A4 veröffentlicht).³

- Proben:** Das humane Plasma wird in Tri-Natrium Citrat als Antikoagulant abgenommen. Auch Na⁺-EDTA-Plasma kann verwendet werden, die Lagerbedingungen sind identisch mit denen von Citratplasma.
- Blutabnahme:** Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

- **Zentrifugation:** Die Herstellung von plättchenarmem 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 bis zu:**
 - 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
 - 6 Monate tiefgefroren bei -20°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C aufgetaut, gut durchmischt und dann umgehend getestet werden. Jegliche Ablagerungen sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Die Proben und rekonstituierte Kontrollen (CI und CII) werden **unverdünnt** getestet. Werden tPA-Konzentrationen > 20 ng/mL erwartet, müssen die Proben mit Fibrinolyse-Probenverdünner (SD) **1:2, 1:5, 1:10 oder höher** vorverdünnt werden.
2. Die rekonstituierten Kalibratoren 0, 1, 2, 3 mit tPA-Konzentrationen von 0-20 ng/mL (exakte Konzentrationen laut beiliegendem Datenblatt) werden unverdünnt eingesetzt. Die Kalibrationslösungen werden vorsichtig durchmischt und sind für **6 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)** stabil.
3. Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Dann nach folgendem Schema verfahren:

| Reagenz | Volumen | Vorgehen |
|--|---------|--|
| Fibrinolyse-Probenverdünner | 100 µL | In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren |
| Proben, Kalibratoren, Kontrollen, Leerwert (nur Fibrinolyse-Probenverdünner) | 100 µL | In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren (a) |
| Mischen. Für 60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (b) | | |
| Waschlösung (WS) | 300 µL | 5 aufeinanderfolgende Waschschriffe mit dem Waschgerät durchführen (c) |
| Immunkonjugat (IC) | 200 µL | In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren (c) |
| Mischen. Für 60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (b) | | |
| Waschlösung (WS) | 300 µL | 5 aufeinanderfolgende Waschschriffe mit dem Waschgerät durchführen (c) |
| Peroxidasesubstrat (TMB) | 200 µL | Unmittelbar nach dem letzten Waschschriff in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren (b, c, d) |
| Mischen. Farbentwicklung für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) ablaufen lassen (b) | | |
| Stopplösung (SA) | 50 µL | In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren um die Farbreaktion zu stoppen (d) |
| Zur Stabilisierung der Farbe für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren , die Absorption bei 450 nm (A₄₅₀) messen (e) und den Leerwert subtrahieren | | |

Anmerkungen:

- a. Die Zugabe der Reagenzien sollte zügig (innerhalb von 10 Minuten) erfolgen, um eine gleichmäßig starke Bindung von tPA zu erhalten.
- b. Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden. Es kann ein Mikrotiterplattenschüttler verwendet werden.
- c. Im Zuge der Entfernung der Waschlösung nach jedem einzelnen Waschschriff dürfen die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen niemals austrocknen, da dies die an der Platte immobilisierten Komponenten und die Reaktivität der Platte beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich, jedenfalls innerhalb von 3 Minuten nach Entfernung der Waschlösung, in die einzelnen Vertiefungen pipettiert werden. Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und ein abruptes Entfernen der Waschlösung vermieden wird.
- d. Bei der Zugabe des TMB-Substrates müssen die Zeitintervalle, Reihe für Reihe, genau festgelegt und exakt eingehalten werden. Dies gilt in gleicher Weise für die Zugabe der Stopplösung.
- e. Bei bichromatischen Ablesungen können Referenzwellenlängen von 690 nm oder 620 nm verwendet werden.

EINSTUFEN-METHODE:

- Der Test kann auch mittels rascher Einstufen-Methode durchgeführt werden. Die Kalibrationskurve reicht in diesem Fall von 0 bis 10 ng/mL (entsprechend der Zweistufen-Methode), die tPA-Kalibratoren werden mit 1,0 mL aqua dest. rekonstituiert und 1:2 mit Fibrinolyse-Probenverdünner (SD) verdünnt.
- Das Immunkonjugat (IC) wird mit 2,0 mL Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert.
- Testplasma und Kontrollen müssen 1:2 (oder höher) mit Fibrinolyse-Probenverdünner (SD) verdünnt werden. 50 µL Immunkonjugat (IC) werden in jede Mikrotitervertiefung pipettiert. 200 µL vorverdünnte Kalibratoren, Testplasma, Kontrolle bzw. Leerwert werden rasch zugefügt.

Anschließend wird 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubiert. Nach einem Waschschriff werden 200 µL Peroxidasesubstrat (TMB) in jede Vertiefung pipettiert. Nach 5 Minuten werden 50 µL Stopplösung (SA) zugegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Kalibrationskurve wird, wie unter „ERGEBNISSE“ beschrieben, erstellt (0-10 ng/mL). Die in den Proben und Kontrollen gemessene tPA-Antigen-Konzentration muss, falls der Verdünnungsfaktor höher als 2 ist (entsprechend der 1:2 Vorverdünnung), mit diesem multipliziert werden.

ERGEBNISSE:

- Die Ergebnisse lassen sich anhand der für die Proben und Kalibratoren mit der Kalibrationskurve gemessenen A₄₅₀-Werte ableiten.
- Die tPA-Antigen-Konzentration in ng/mL wird auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption A₄₅₀ auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen, wobei das „best fit“-Interpolationsverfahren zu wählen ist (das der Packung beiliegende Datenblatt ist zu beachten).
- Bei jedem Testansatz muss eine Kalibrationskurve unter Verwendung der Kalibratorkonzentrationen erstellt werden.
- Die tPA-Antigen-Konzentration der Probe bzw. Kontrolle kann direkt von der erhaltenen Kalibrationskurve abgelesen werden. Bei verdünnten Proben muss der erhaltene Wert noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (5, 10, ...).
- Alternativ kann eine ELISA-Software (z.B. Dynex, Biolise o.ä.) für die Berechnung der tPA-Antigen-Konzentrationen herangezogen werden.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Testleistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sind die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam zu beachten. Für die Validierung jeglicher Änderungen dieser Anweisungen ist das Labor verantwortlich.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Jegliche verdächtige Proben oder jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden. Plasmen, die Gerinnsel oder Anzeichen für Kontaminationen aufweisen, sind zu verwerfen.
- Die Anwesenheit von Rheumafaktor im Plasma führt zur Überschätzung der tPA-Antigen-Konzentration.
- Keine signifikante Beeinflussung durch Heparin bis zu 2 IE/mL und endogenes PAI-1 bis 100 ng/mL.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

- Ein Anstieg der tPA-Konzentration wird in vielen pathologischen Situationen beobachtet (respiratorisches Distresssyndrom, Myokardinfarkt, Sepsis, Schlaganfall, Lebererkrankungen etc.). Bei Lebertransplantationen wird ein dramatischer Anstieg von tPA während der anhepatischen Phase beobachtet.
- Studien haben einen Zusammenhang zwischen erhöhten tPA-Konzentrationen und kardiovaskulären Risikofaktoren gezeigt. Ein erhöhter tPA-Gehalt geht meist mit einer erhöhten Konzentration an PAI-1 und einem verringerten Fibrinolysepotential einher. Die Bestimmung von tPA kann daher als prädiktiver Wert für die kardiovaskuläre Symptomatik und den Krankheitsverlauf eingesetzt werden.^{4,5}

ANWENDUNGEN:

- Bestimmung von tPA-Antigen in klinischen Proben z.B. als kardiovaskulärer Risikofaktor.
- Bestimmung von tPA-Antigen bei Thrombolyse mit rekombinanten tPA-Präparaten.

TESTEIGENSCHAFTEN:

- Nachweisgrenze: ≤ 0,5 ng/mL.
- Intra-Assay: 3-8%.
- Inter-Assay: 5-10%.

REFERENZEN:

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. Bloods 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., 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

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Zeichenerklärungs-Blatt ist zu beachten.

Änderungen im Vergleich zur Vorversion