



# ZYMUTEST tPA Antigen

# ARK011A

(Complete ELISA kit for Tissue-Type Plasminogen Activator Antigen)

For in vitro use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision : 08/09/2011

## INTENDED USE:

The ZYMUTEST tPA kit is a two-site immuno-assay for measuring human Tissue-plasminogen Activator (tPA) in plasma.

## ASSAY PRINCIPLE:

In a first step, the diluted tested plasma is introduced into a microwell coated with a highly purified monoclonal antibody specific for human tPA. When present, this protein is captured onto the solid phase. Following a washing step, the immunoconjugate, which is a monoclonal antibody coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced, and binds to another free epitope of immobilized tPA. Following a new washing step, the peroxidase substrate, Tetramethylbenzidine (TMB) in presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), is introduced and a colour develops. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human tPA-Ag in the tested sample.

## TEST SAMPLE:

Trisodium Citrate or Na<sub>2</sub> EDTA anticoagulated human plasma.

**Nota:** This kit can be used to measure the tPA:Ag in biological fluids only if an appropriate standard is used.

## REAGENTS:

- COAT: Micro ELISA plate**, containing 12 strips of 8 wells, coated with a highly purified murine monoclonal antibody specific for human tPA, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
- SD:** 2 vials containing 50ml of **F-Sample Diluent**, ready to use.
- STD:** Four vials of 1ml, freeze-dried, **tPA Standard 0, 1, 2, 3 at different concentrations for calibration** (normal plasma checked with the NIBSC international standard). Each vial has to be restored with 1 ml of distilled water. The exact tPA-Ag concentration of these different levels of standards is indicated on the flyer provided in the kit.
- CI:** 1 vial containing 1 ml of lyophilised **Plasma Control I High (UTA)** (human plasma).
- CL:** 1 vial containing 1 ml of lyophilised **Plasma Control II Low (UTA)** (human plasma).

**Nota:** The tPA concentrations and acceptancy ranges for controls can vary from lot to lot, but are precisely indicated for each lot on the flyer provided in the kit.

- IC:** 3 vials of **Anti-(h)-tPA-HRP immunoconjugate**, a monoclonal antibody coupled to HRP, lyophilised.
- CD:** 1 vial of 25 ml of **Conjugate Diluent**, ready to use.
- WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated **Wash Solution**.
- TMB:** 1 vial of 25 ml peroxidase substrate: **3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine** containing hydrogen peroxide. Ready to use.
- 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 of kits, 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 0 to 20 µl, 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.

## 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.

- Micro ELISA plate:** open the plastic 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).
- F-Sample Diluent:** It is ready to use. When open, 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.
- tPA Standard 0, 1, 2, 3:** restore each vials with **1 ml** of distilled water. These solutions are stable for at least **8 hours** at room temperature.

**Nota:** For a multiple use of the kit, prepare 3 aliquots of each level of standard after reconstitution. These aliquots are then stable 2 months, stored frozen.

- Plasma Control I (UTA)** (human plasma, high): restore with **1 ml** distilled water.
- Plasma Control II (UTA)** (human plasma, low): restore with **1 ml** distilled water.

### Nota:

When restored, tPA controls are stable for 8 hours at room temperature, **24 hours at 2-8°C** or **2 months** frozen at **-20°C** or below.

### Warning:

Plasma tPA standard (3) and controls (4&5) are prepared with normal human plasma. This latter was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

- Anti-(h)-tPA-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with **7.5 ml** of **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 or for at least **4 weeks at 2-8°C**.
- Conjugate Diluent:** It is ready to use. When open, 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.
- 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.
- TMB substrate:** It is ready to use. When open, it can be used for **4 weeks**, stored at **2-8°C**, and provided that any bacterial contamination is avoided during use.
- 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.

### Nota:

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.

## PROCEDURE:

### Specimen collection:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M citrate anticoagulant (1 vol.) by a clean venipuncture; 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 below for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within **4 hours**.

EDTA collected human plasma may also be used. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

In order to avoid diurnal variations, tPA must be preferentially measured on fasting samples, collected in the morning.

D750-02/ZY/011A



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

### Tested plasma or controls:

The plasma samples and the Controls I and II are tested undiluted in the wells (after reconstitution).

For expected tPA concentrations > 20 ng/ml, plasma or samples can be tested with a dilution of 1:2, 1:5, 1:10, or more, according to the expected tPA concentration. Dilutions of tested samples must be done in F-Sample Diluent (F-SD).

### Calibration:

The 4 levels of tPA standard 0, 1, 2, 3 are reconstituted with 1ml of distilled water, then used undiluted directly into the wells of the plate. A calibration range from 0 to about 20ng/ml tPA concentration is obtained.

Mix gently for a complete homogenisation.

The standard dilutions are stable for at least 6 hours at room temperature.

### 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
F-Sample Diluent	100 µl	Introduce the F-SD in the micro ELISA plate wells.
tPA standards or tested samples or controls or F-Sample Diluent (blank)	100 µl	Introduce the standard solutions, the controls or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well. (a)
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (b).
Conjugate (anti tPA monoclonal antibody coupled with peroxidase. Restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent)	200 µl	Introduce the Anti-(h)-tPA- HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells (c).
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (a).
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. <b>Nota:</b> The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (c, d).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (b)		
0.45M Sulfuric Acid	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.
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450) (e). Subtract the blank values		

### Nota:

a) The two fold dilutions in F-SD of the plasma samples, the controls or of the standards can be performed in test tubes. Then, 200µl of the 1:2 diluted samples would be added in the micro ELISA plate wells.

Distribute calibrators, controls and tested specimen as rapidly as possible (within 10 minutes), in order to obtain an homogeneous immunological kinetics for tPA binding.

b) Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development.

c) 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 immobilized 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.

d) For addition of the TMB substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction.

e) For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

### RAPID PROCEDURE (ONE STEP METHOD)

The assay can be performed using a "one step method". In this case, the calibration curve must be from 0 to about 10 ng/ml, the four level of tPA standards being reconstituted with only 1 ml of distilled water and then diluted two fold (1:2) in F-Sample diluent (The calibrators are prepared as for the "2 step" method, but are two-fold diluted).

The immunoconjugate (IC) must be reconstituted with 2 ml of Conjugate Diluent (CD).

Tested plasma must be assayed at a two fold (1:2) dilution or at higher dilutions in F-Sample Diluent (SD). In the microwell, the immunoconjugate (IC) is introduced (50 µl), followed by introduction of 200µl of the calibration solution or the diluted plasma.

Following 1 hour incubation at room temperature and a washing step, TMB is introduced (200µl/well), colour is allowed developing for 5 min, and is then stopped with 50 µl of

0.45M sulfuric acid (SA). Draw the calibration curve as indicated in results (but from 0 to about 10 ng/ml). The tPA: Ag concentrations read must be multiplied by the sample dilution factor (i.e. 1:2, or the actual dilution factor).

### EXPRESSION OF RESULTS:

- On a linear graph paper plot the tPA:Ag concentrations, in ng/ml, on abscissa and the corresponding absorbances on ordinates. Draw the calibration curve that best fits your data.
- Users must construct their own calibration curve, obtained using their standard solutions (see model on the flyer).
- From the curve obtained, deduce directly the tPA:Ag concentration of the tested sample, and of the Controls CI and CII. For a diluted sample, multiply the obtained concentration by the applied dilution factor.
- Alternatively, an ELISA software (i.e. Dynex, Biolise, etc...) can be used for the calculation of concentrations.

### EXPECTED RANGE:

- The tPA:Ag concentration in normal human plasma is usually < 10 ng/ml.
- It increases with age, exercise and stress.

### BIOCHEMISTRY:

- Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA), is a 68 KDa protein, synthesised and secreted by endothelial cells. It initiates fibrinolysis by activating plasminogen to plasmin on the fibrin clot surface. It is composed of 563 amino acids.
- In blood, tPA is rapidly inactivated by its major inhibitor PAI-1, which is usually in excess. Circulating tPA is then present predominantly in an inactive stable complex with PAI-1. Clearance of tPA is biphasic, phase 1 having a half-life of about 5 minutes and phase 2 a half-life of about 45 minutes. It binds to receptors on liver.

### PATHOLOGICAL VARIATIONS:

- Elevated concentrations of tPA are observed in various pathological conditions (respiratory distress syndrome, myocardial infarction, septicaemia, stroke, liver diseases, etc...). During liver transplantation, tPA concentrations are dramatically increased in the anhepatic phase.
- Recent epidemiological studies have demonstrated an association between tPA:Ag concentrations and an increased risk of cardiovascular diseases. Elevated tPA:Ag is frequently associated with high PAI-1 concentrations and a decreased basic fibrinolytic potential. Assay of tPA:Ag is then of predictive value for cardiovascular pathology and disease evolution.

### APPLICATIONS:

- Assay of tPA:Ag in clinical samples, as a disease marker.
- Assay of tPA:Ag in thrombolysis with recombinant tPA drugs.

### ASSAY CHARACTERISTICS:

- Detection threshold ≤0.5 ng/ml.
- Intra-assay: 3-8%.
- Inter-assay: 5-10%.
- No significant interference of:
  - heparin up to 2 IU/ml
  - endogenous PAI-1 up to 100 ng/ml
- The kit allows measuring homogeneous tPA, whether its presentation is, free and active or complexed with its inhibitors.

### 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.



# ZYMUTEST tPA Antigen

Référence ARK011A  
(Dosage ELISA du tPA Antigène)



Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation *in vitro* exclusivement

Dernière révision : 08/09/2011

## METHODE :

La trousse ZYMUTEST tPA est un dosage ELISA sandwich du tPA Antigène (Tissue Type Plasminogen Activator) présent dans un milieu plasmatique.

## PRINCIPE :

Le dosage du tPA antigène, avec le coffret ZYMUTEST tPA Antigen, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée par un anticorps monoclonal purifié, spécifique du tPA Antigène, et stabilisée.

Le plasma à tester est introduit dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Le tPA se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, le tPA fixé sur la plaque est révélé par l'immunoconjugué, anticorps monoclonal couplé à la peroxydase (HRP), qui réagit avec les épitopes libres du tPA. Après lavage, le substrat, Tetramethylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), est introduit dans les puits de la plaque et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la coloration par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle au taux de tPA Ag présent dans l'échantillon testé.

## ECHANTILLONS :

Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na<sub>2</sub> EDTA.

**Nota :** Cette trousse de dosage peut être utilisée pour doser le tPA Antigène présent dans un milieu purifié à la condition d'utiliser un calibrateur approprié.

## REACTIFS :

- COAT :** Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps monoclonal de souris, spécifique du tPA humain, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
- SD :** 2 flacons de 50 ml de diluant échantillon (F-Sample Diluent), prêt à l'emploi.
- STD :** 4 flacons de 1 ml de tPA Standard 0, 1, 2, 3 à différentes concentrations pour une gamme de calibration, lyophilisés (plasma normal calibré par rapport au standard international du NIBSC), titrés en tPA antigène. Chaque flacon doit être reconstitué par 1 ml d'eau distillée. Le titre de chaque plasma étalon est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.
- CI :** 1 flacon de 1 ml de Plasma Control I (UTA) lyophilisé (Plasma humain, contrôle haut).
- CII :** 1 flacon de 1 ml de Plasma Control II (UTA) lyophilisé (Plasma humain, contrôle bas)

**Nota :** Les concentrations en tPA et les intervalles de confiance peuvent varier de lot à lot. Les valeurs obtenues sont indiquées sur le papillon fourni dans le coffret.

- IC :** 3 flacons d'immunoconjugué (Anti-(h)-tPA-HRP immunoconjugué), anticorps monoclonal, spécifique du tPA Ag et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
- CD :** 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué (Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
- WS :** 1 flacon de 50 ml de solution de lavage (Wash Solution), 20 fois concentrée.
- TMB :** Un flacon de 25 ml de substrat de la peroxydase: 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
- SA :** 1 flacon contenant 6 ml 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 provenant de différents lots de kits pour réaliser 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 0 à 20 µl, de 20 à 200 µl et de 200 à 1000 µl.
- Laveur de microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglée à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.

## 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.

- 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 refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à 2-8°C, dans le sachet plastique minigrup fourni.
- F-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.
- tPA Standard 0, 1, 2 et 3 :** Chaque flacon doit être reconstitué par 1 ml d'eau distillée afin de constituer une gamme de calibration titrée en tPA. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins 8 heures à température du laboratoire.

### Nota :

Après reconstitution, aliquoter chaque niveau de standard en 3 flacons pour une utilisation fractionnée du kit. Les aliquotes ainsi préparés sont stables 2 mois congelés.

- Plasma Control I (plasma humain, contrôle haut, UTA) :** reconstituer avec 1 ml d'eau distillée.
- Plasma control II (plasma humain, contrôle bas, UTA) :** reconstituer avec 1 ml d'eau distillée.

### Nota :

Après reconstitution, les plasmas contrôles I et II sont stables au moins 8 heures à température du laboratoire, 24 heures à 2-8°C, ou 2 mois congelés à -20°C ou en dessous.

### Précautions :

Les plasmas standard (3) et contrôles (4&5) sont préparés à partir de plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

- Anti-(h)-tPA-HRP immunoconjugué :** Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par 7.5 ml de "Conjugate Diluent", au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. L'immunoconjugué reconstitué est stable au moins 24 heures à la température du laboratoire et 4 semaines à 2-8°C.
- 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. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
- 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.
- Substrat TMB :** Prêt à l'emploi. A utiliser dans un délai de 4 semaines après ouverture, conservé à 2-8°C, sous réserve de contamination bactériologique lors de l'utilisation.
- Solution d'arrêt :** Acide sulfurique 0,45M, prêt à l'emploi

### Précaution :

Même dilué à 0,45 M, l'acide sulfurique est caustique. Comme pour tout réactif chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précaution, en particulier 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 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.

## MODE OPERATOIRE :

### Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du 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



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1901

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

D750-01/ZY/011A

www.aniara.com

37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins **4 heures** à température du laboratoire.

L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na<sub>2</sub> EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté. Afin d'éviter toute variation nyctémérale, les prélèvements doivent préférentiellement être réalisés le matin, à jeun.

#### Plasma à tester et contrôles :

Les **échantillons de plasma** et les **contrôles I et II** doivent être testés **purs**.

Pour des taux de tPA > 20 ng/ml, diluer les échantillons au 1/2, 1/5 ou au 1/10, ou plus selon la concentration attendue. La dilution doit être réalisée en diluant échantillon (F-SD).

#### Gamme d'étalonnage :

Les 4 niveaux de **tPA Standards 0, 1, 2, 3** sont reconstitués par 1 ml d'eau distillée, puis utilisés **purs** directement dans les puits de la plaque, pour une gamme d'étalonnage allant de 0 à environ 20ng/ml.

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions sont stables au moins **6 heures** à température ambiante.

#### Réalisation du dosage :

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

Réactif	Volume	Procédure
F-sample Diluent	100 µl	Répartir le diluant échantillon dans les puits.
tPA Standards, échantillons à doser, contrôles ou F-sample Diluent (blanc)	100 µl	Introduire les solutions standards, les contrôles CI et CII ou le plasma à doser dans les puits. (a)
<b>Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (b)</b>		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (b).
Immunoconjugué Anti-(h)-tPA-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits (c)
<b>Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (b)</b>		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Substrat TMB / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (c, d). <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer <b>pendant 5 minutes</b> à température du laboratoire (b)		
Acide sulfurique 0.45 M	50 µl	Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat.
Attendre <b>10 minutes</b> pour laisser stabiliser la coloration puis lire la <b>DO</b> obtenue à <b>450 nm (e)</b> . <b>Soustraire la valeur des blancs.</b>		

#### **Remarques :**

- La dilution au 1/2 en F-Sample Diluent de l'échantillon, des contrôles ou des standards, peut être réalisée au préalable en tube. Il s'agira alors d'introduire 200µl d'échantillon dilué au 1/2 dans les puits de la plaque ELISA. Effectuer les dépôts de l'étalonnage, des contrôles et des tests, le plus rapidement possible (ne pas excéder 10 minutes), pour une cinétique homogène des divers dosages.
- Éviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration.
- 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 TMB, 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, le filtre 620 nm ou 690 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

#### METHODE RAPIDE (1 temps) :

Le dosage du tPA antigène peut être réalisé en méthode rapide "un temps". Dans ce cas, la courbe d'étalonnage va de 0 à environ **10 ng/ml**. Les "tPA standard" (**Std 0, Std 1, Std 2, Std 3**) doivent alors être repris par **1 ml** d'eau distillée et dilués au 1/2 en « F-Sample Diluent ». On obtient une gamme d'étalonnage comme pour la méthode « 2 temps », diluée au 1/2.

- L'immunoconjugué (**IC**) doit être reconstitué par 2 ml de "Conjugate Diluent" (**CD**).
- Le plasma à tester est analysé dilué au moins au 1/2 en "F-Sample Diluent" (**SD**). Les contrôles (UTA) sont testés dilués au 1/2. Dans les puits de la plaque ELISA, introduire 50 µl d'immunoconjugué, et juste après 200 µl de point d'étalonnage ou de plasma dilué. Après 1 heure d'incubation à température du laboratoire, et lavage de la plaque ELISA, le substrat TMB (200 µl par puits) est ajouté et la réaction est arrêtée après 5 min. exactement par 50µl d'acide sulfurique 0,45 M (**SA**). Les DO sont mesurées à 450 nm et la courbe d'étalonnage est tracée comme indiquée dans le paragraphe "Expression des résultats" (**mais de 0 à environ 10ng/ml**). Le taux de tPA antigène mesuré doit être multiplié par le facteur de dilution de l'échantillon testé.

#### EXPRESSION DES RESULTATS :

- Sur du papier millimétré, porter en abscisses le taux de **tPA Ag en ng/ml**, et en ordonnées les **DO 450** correspondantes. Tracer la courbe d'étalonnage passant au mieux par les divers points (voir modèle présenté sur le papillon).
- Pour la mesure des taux de tPA:Ag, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée. Sur la courbe obtenue, déduire **directement** la concentration de tPA :Ag dans le **plasma testé pur** et les **contrôles I et II**. Pour un échantillon dilué, multiplier le taux obtenu par le facteur de dilution appliqué.
- Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc..) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de tPA Ag à partir de la courbe d'étalonnage.

#### VALEURS NORMALES :

La concentration de tPA Antigène dans le plasma humain normal est généralement < 10 ng/ml. Ce taux augmente avec l'âge, l'exercice physique et le stress.

#### BIOCHIMIE :

- Le tPA (Tissue Type Plasminogen Activator) est une protéine de 68 Kd, synthétisée et sécrétée par les cellules endothéliales. Il initie la fibrinolyse par activation du plasminogène en plasmine à la surface du caillot. Il est composé de 563 acides aminés.
- Dans le sang, le tPA est rapidement inactivé par son inhibiteur majeur, le PAI-1, qui se trouve généralement en excès. Le tPA circulant est en grande partie complexé au PAI-1 et de ce fait est inactif. La demi-vie du tPA, dans le sang, est biphasique, avec une première phase dont la demi-vie est de 5 minutes, et une deuxième phase, dont la demi-vie est de 45 minutes. Il se fixe au niveau du foie par l'intermédiaire de récepteurs.

#### VARIATIONS PATHOLOGIQUES:

- Des taux élevés de tPA sont observés dans des pathologies variées (syndrome de détresse respiratoire, infarctus du myocarde, septicémie, états de choc, pathologies du foie, etc...). Durant les greffes du foie, les concentrations de tPA sont très élevées lors de la phase anhépatique.
- Des études épidémiologiques récentes ont montré une corrélation entre le taux de tPA:Ag et l'augmentation du risque des maladies cardiovasculaires. Un taux élevé de tPA:Ag est fréquemment associé à un taux élevé de PAI-1 et à une diminution du potentiel fibrinolytique. Le dosage du tPA apparaît comme ayant une bonne valeur prédictive pour les pathologies cardiovasculaires et le pronostic de leur évolution.

#### APPLICATIONS :

Dosage du tPA Antigène dans des échantillons cliniques, comme marqueur de pathologie.

Dosage du tPA dans les traitements thrombolytiques (traitement par le tPA).

#### CARACTERISTIQUES :

- Limite de détection ≤ 0.5 ng/ml.
- Intra-assay : 3-8%.
- Inter-assay : 5-10%.
- Pas d'interférence significative de l'héparine jusqu'à 2 UI/ml et du PAI-1 endogène jusqu'à 100 ng/ml.
- Le coffret permet le dosage du tPA sous forme libre ou complexée, de façon homogène.

#### REFERENCES

- 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.
- 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.
- Juhan-Vague I., Alessi M.C.: Fibrinolysis and risk of coronary artery disease. Fibrinolysis, 1996; 10(3): 127-136.
- 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.