



# TECHNOZYM<sup>®</sup> t-PA Ag EDTA ELISA

For Research Use Only



REF	TC12007	TECHNOZYM <sup>®</sup> t-PA Ag EDTA ELISA	
REF	TC12001	TECHNOZYM <sup>®</sup> t-PA Antigen Calibrator Set	5 x 0.5 mL
REF	TC12003	TECHNOZYM <sup>®</sup> t-PA Antigen Control Set	2 x 0.5 mL

Symbols key / Symbolschlüssel / interpretazione dei simboli / explicación de símbolos / explicação dos símbolos / clé des symboles / Symbolnyckel / symbolforklaring / Tegnforklaring / Κλειδί συμβόλων / Използвани символи / символы / Ključova slova / Značenje simbola			
	Manufacturer / Hersteller / fabbricante / fabricante / fabricant / Tillverkaren / Fabrikanten / Produzent / Κατασκευαστής / Производитель / Производител / vŕobca / Proizvođač		Expiry date / Verfallsdatum / data di scadenza / fecha de caducidad / data de validade / date d'expiration / utgångsdatum / udløbsdato / Utløpsdato / Ημερομηνία λήξης / срок на годност / datum expirace/ срок годности / datum expirace / Rok trajanja
	Storage temperature / Lagertemperatur / temperatura di conservazione / temperatura de conservación / temperatura de conservação / température de stockage / lagringstemperatur / opbevaringstemperatur / Oppbevaringstemperatur / θερμοκρασία αποθήκευσης / съхранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovanja		Consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / consultare le istruzioni per l'uso / consulte las instrucciones de uso / consultar o manual de instruções / instruction d'utilisation / se användarinstruktioner / følg brugsvejledning / Følg bruksanvisningen / συμβουλευθείτε τις οδηγίες για τη χρήση / прочетете инструкцията за работа / potfeba fidiť se instrukciami / перед использованием читайте инструкцию / sledujte návod k použití / Pročítaj upustvo pre upotrebe
			Determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / determinações / déterminations / bestämmingar / bestemmelser / Bestemmelser / προσδιορισμοί / брой тестове / stanovení / определенний / ročet stanovení / Definicija
<b>AQUA</b>	Distilled water / destilliertes Wasser / acqua distillata / agua destilada / água destilada / eau distillée / destillerat vatten / destilleret vand / Destillert vann / απεσταγμένο νερό / destilirana voda / destilovaná voda / destilirana voda / destilovaná voda / Destilovaná voda	<b>LOT</b>	Lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / партиа / партида номер / šarže / lot / šarže / Serija
<b>BUF</b>	Reaction buffer / Reaktionspuffer / tampone di reazione / tampón de reacció / Tampão de reação / tampon de réaction / Reaktionsbuffer / Reaktionsbuffer / Reaktionsbuffer / διάλυμα αντίδρασης / Реакционен буфер / Рабочий буферный раствор / Reakční pufr / Reakcioni pufer	<b>MTP</b>	Microtiter plate / Mikrotiterplatte / placa microtiter / microplaca / microplaca / microplaques sensibilisées / Mikrotiterplatta / Mikrotiterplade / mikrotiterplate / плочка микротитлодότησης / Микротитърна плочка / Микропланшет / Mikrotitracijska destička / Mikrotitracione ploče
<b>CAL</b>	Calibrator / Kalibrator / Calibratore / calibrador / calibrador / calibreur / Kalibrator / Kalibrator / Kalibrator / Βαθμονομητής / Калибратор / калибратор / kalibrátor / Kalibrator	<b>REF</b>	Catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referência / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγων / каталожен номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj
<b>CONJ</b>	Conjugate / Konjugat / Coniugato / conjugado / conjugado / conjugaté / Konjugerad / Konjugat / Konjugat / συνδεδετικό / Конюгат / Конъюгат / Konjugát / Konjugat	<b>RTU</b>	Ready to use / gebrauchsfertig / pronto all'uso / listo para usar / pronto a usar / prêt à l'emploi / færdig att användas / færdig til brug / klar til bruk / έτοιμο προς χρήση / Готов за употреба / готов к использованию / k přímému použití / Razrediti ili rastvoriti
<b>CONT</b>	Control / Kontrolle / controllo / control / control / contrôle / Kontroll / Kontroll / Kontroll / διάλυμα ελέγχου / Контрол / Контрольный образец / Kontrola / Kontrola	<b>STOP</b>	Stop solution / Stopplösung / Soluzione di arresto / solución de parada / solução de paragem / solution d'arrêt / Stoppløsning / Stop-opløsning / Stoppløsning / διάλυμα παύσης / Стоп разтвор / Стоп-раствор / Zastavovací roztok / Stop solucija
<b>DIL</b>	Dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in / diluire o dissolvere in / diluir o dissolver / diluir ou dissolver em / diluer ou dissoudre dans / spädd eller upplös i / fortyndes eller opløses i / Fortyndes eller oppløses i / αραιωση ή διάλυση σε / разтворете или разрежете с / zředit anebo rozpustit v / разбавить или растворить в / nafedte nebo rozpustit v / razrediti ili rastvoriti u	<b>SUB</b>	Substrate / Substrat / substrato / substrato / substrato / substrat / Substrat / Substrat / Substrat / υπόστρωμα / Субстрат / Субстрат / Substrát / Substrat
<b>INC</b>	Incubation buffer / Inkubationspuffer / tampone di incubazione / tampón de incubació / tampão de incubação / tampon d'incubation / Inkubationsbuffer/ Inkubationsbuffer/ Vaskebufferkonsentrat / διάλυμα επώασης / Инкубационен буфер / Буфер для инкубации / Inkubační pufr / Inkubacioni pufer	<b>WASH</b>	Washing solution concentrate / Waschlösungskonzentrat / concentrado de solución de lavado / solución de lavado concentrada / tampão de lavagem concentrado / Tampon de lavage concentré / Vattenlösningenskoncentrat / Vaskeopløsningskoncentrat / vaskeløsningskoncentrat / συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης / Концентриран миеш разтвор / Концентрат промывочного раствора / Koncentrat promývacieho roztoku / Koncentrat solucije za ispiranje
<b>F I C</b>	RUO - For Research Use Only		



## PRODUCT DESCRIPTION

### INTENDED USE

The TECHNOZYM® t-PA Antigen ELISA can be used to determine t-PA antigen levels in samples with thrombotic disorders (deep vein thrombosis, myocardial infarction, stroke), malignancies or septicemia.

### COMPOSITION

- ELISA test strips (12) with 8 wells each, coated anti t-PA monoclonal antibody; the drying agent is supplied in an aluminium bag.
- Washing buffer concentrate (PBS; pH 7.3); containing detergent; 0.01% merthiolate; 1 bottle, 80 mL.
- Incubation buffer (PBS; pH 7.3); contains stabiliser protein; 0.05% proclin; and blue dye, 1 bottle, 90 mL, ready for use.
- Sample dilution buffer (PBS, EDTA); contains stabiliser protein; 1 bottle, 20 mL.
- Calibrators (Standards) numbered; lyophilised; 1 bottle each. **Concentrations are lot-dependent; consult label on the vial.**
- Control plasmas "low level" and "high level" for checking purposes lyophilised; 1 bottle each. **Concentrations are lot-dependent; consult the label on the vial.**
- Conjugate monoclonal Anti-t-PA POX; dyed blue; 1 bottle, 0.3 mL.
- Chromogen TMB (tetramethylbenzidine); 1 bottle, 12 mL; ready for use.
- Stopping solution sulphuric acid 0.45 mol/L; 1 bottle 12 mL; ready for use.
- Adhesive film: for ELISA test strips (2).

### MATERIAL REQUIRED (but not supplied with the kit)

- Distilled water
- Test tubes for diluting standard and samples
- Measuring cylinder (100 mL and 1000 mL)
- Precision pipettes (10, 100 and 1000 µL)
- Variable pipette (1000 µL)
- Multichannel and/or dispensing pipettes (100 and 200 µL)
- ELISA washer or multichannel pipette
- ELISA reader with 450 nm filter, with a 620 nm reference filter if available.
- Incubator (+37°C)

### WARNING AND PRECAUTIONS

- All human blood or plasma products as well as samples must be considered as potentially infectious. They have to be handled with appropriate care and in strict observance of safety regulations. The rules pertaining to disposal are the same as applied to disposing hospital waste. Calibrators and control plasmas made from human blood and any individual plasma involved in the procedure is HBsAg, HIV 1/2 Ab and HCV-Ab-negative (see labels on kit and/or bottles).
- Stopping solution (sulphuric acid) may irritate the skin. Should acid get into your eyes, wash out immediately with water and consult a doctor.
- The reagents sometimes contain preserving agents (merthiolate). Beware of swallowing! Avoid contact with skin or mucous membranes.

### STABILITY AND STORAGE

The expiry date printed on the labels applies to storage of the unopened bottles at +2...8°C.

Stability after reconstitution/opening:

Material/Reagent	State	Storage	Stability
Calibrators, control plasmas	after reconstitution	-20°C	6 months
ELISA test strip	after opening	+2...8°C with adhesive film in plastic bag with drying agent	expiry date
Washing buffer concentrate	after opening	+2...8°C	6 months
Washing buffer	1+11.5 dilution of concentrate	+2...8°C	3 weeks
Incubation buffer	after opening	+2...8°C	2 months
Sample dilution buffer concentrate	After opening	+2...8°C	2 month
Sample dilution buffer	1+1.5 dilution of concentrate	+2...8°C	3 weeks
Conjugate	after opening	+2...8°C	6 months
	working solution	room temperature +18...25°C	60 min.
Chromogen TMB	after opening	+2...8°C	expiry date

## TEST PROCEDURE

### PREPARATION OF SAMPLES

Sample material: Plasma  
Citrate, EDTA or CTAD plasmas can be used. Centrifuge for 15 minutes at a minimum of 2500 g (DIN 58905). The plasma sample may be stored for 3 hours at room temperature; otherwise the sample ought to be frozen immediately after centrifugation at -20°C or below. Plasmas are stable for 6 months at -20°C. Thawing and refreezing of plasma aliquots is not recommended.

Haemolytic and lipaemic plasma may be used. In no case may plasma samples be used if any evidence of coagulation is seen. Venous occlusion samples are obtained by applying a tourniquet around the upper arm with the pressure between the systolic and diastolic blood pressure, e.g. 100 mm Hg, for at least 10 minutes. Draw blood from the arm before the pressure is reduced. Cell supernatants and tumour extracts can be used, but this ELISA test has been optimized for plasma samples, therefore other dilution factors would have to be used accordingly.

### PREPARATION OF REAGENT

- Before starting the test, all the required components are to be brought to room temperature.
- Preparing the washing buffer:  
Dilute 1 part by volume washing buffer concentrate with 11.5 parts by volume distilled water (1+11.5). (Diluted washing buffer concentrate = washing buffer).  
There may be crystalline precipitations which will dissolve at +37°C within 10 minutes.
- Reconstituting calibrators and control plasmas:  
Calibrators and control plasmas are reconstituted with 500 µL distilled water and mixed for 10 seconds after a reconstitution time of 15 minutes (vortex mixer). Reconstituted components are clear to slightly turbid.
- Preparing the sample dilution buffer:  
Dilute 1 part by volume sample dilution buffer with 1.5 parts by volume distilled water (e.g. 20 mL buffer + 30 mL distilled water)
- Preparing the conjugate working solution (1+50):  
Dilute 1 part by volume conjugate with 50 parts by volume incubation buffer.

**For 8 test wells: Mix 20 µL conjugate with 1000 µL incubation buffer**

## PERFORMANCE OF THE TEST

<b>SAMPLE INCUBATION</b> (reference 1, 2)	Calibrators, control plasmas and samples into test wells	25 µL
	Add sample dilution buffer to all wells	75 µL
	cover test strips with film, incubate at +37°C	60 minutes
<b>CONJUGATE REACTION</b> (reference 1,2)	empty wells thoroughly, pipette conjugate working solution into wells cover test strip with film	100 µL
	incubate at +37°C	60 minutes
<b>WASHING</b> (reference 1,3,4)	washing buffer	3 x 200 µL
<b>SUBSTRATE REACTION</b> (reference 1,2)	pipette substrate solution into test wells, cover test strip with film	100 µL
	incubate at room temperature (+18...25°C)	20 minutes
<b>STOPPING</b> (reference 1,2)	pipette stopping solution into wells	100 µL
<b>MEASURING</b> (reference 5)	ELISA-Reader, 450 nm	shake 10 sec., measure within 10 minutes

### References for test performance

- Reagents of different lots must not be combined
- Precision and performance, among others, essentially depend on the following factors:
  - Thorough mixing of all substances used for dilution
  - Test calibrators, controls and samples in duplicates.
  - Incubation to be done at correct temperatures
  - Strict observance of the order of pipetting and of the time element as indicated:
  - The time for sample incubation, conjugate and substrate reaction as indicated starts after pipetting the last sample. Incubation times should not vary by more than ±10%.
  - During sample incubation and conjugate reaction, the time for pipetting the diluted calibrators/samples/control plasmas and/or conjugate solutions must not exceed 60 seconds per ELISA test strip (8 wells).
  - During substrate reaction and at stopping, the time needed for pipetting the substrate and/or the stopping solution must not exceed 10 seconds per ELISA test strip. Short pipetting times may be secured by using multichannel- and dispensing pipettes.
- Label/number strips with a water resistant pen in case the strips accidentally fall out of the frame during testing.
- After the last washing, wells must be aspirated thoroughly, turned upside down and positioned on a blotting paper; by gentle tapping, the last remnants must be removed.
- Measuring the difference in wave lengths at 450 and 620 nm or 450 and 690 nm, the precision of the test is increased.

### LIMITATION OF THE TEST

Samples which fall higher than the top calibrator standard must be retested at a higher dilution as a "hook dose" response may occur.

## ANALYSIS RESULTS

### CALCULATION OF THE RESULTS

Setting up a reference curve: X axis: Concentration t-PA antigen ng/mL

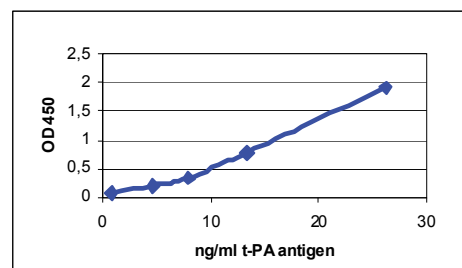
Y axis: Extinction

Graph plot is linear-linear with a linear or point to point fit

### Assessment of reference curve

- The extinction coefficient of the highest calibrator should be between 1.0 and 2.5.
- The evaluability of the test may be checked on the basis of the calculated control values.

### Example of standard curve.



### Measuring concentration of samples

- Read off the concentration from the reference curve.
- If there are samples with extinction coefficients higher than that of the highest point on the curve, they have to be prediluted with incubation buffer (1+1). The measured concentration then has to be multiplied with the dilution factor 2.

### REFERENCE RANGE

Normal range for t-PA antigen is between 2-8 ng/mL. It is recommended that individual laboratories establish their own ranges. For plasma obtained after venous occlusion values greater than 15 ng/mL, should be obtained.

A failure of t-PA levels to increase upon venous occlusion is indicative of an impaired fibrinolytic capacity and may indicate thrombotic tendencies.

### STANDARDISATION

The calibration material used is the WHO international standard for tissue plasminogen activator (t-PA).

### LITERATURE

J. Juhan-Vague, M.C. Alessi: Tissue-type plasminogen activator antigen. In: ECAT Assay Procedures; A manual of Laboratory Techniques; edited by J. Jespersen, R.M. Bertina and F. Haverkate, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1992, pg 131-13

## PRODUKTBESCHREIBUNG

### ANWENDUNG

Der TECHNOZYM® t-PA Antigen ELISA wird zur quantitativen Bestimmung der t-PA Antigenmenge bei Patienten mit thrombotischen Beschwerden (tiefe Beinvenenthrombose, Myokardinfarkt, Schlaganfall), bösartigen Tumoren oder Sepsis verwendet.

### ZUSAMMENSETZUNG

- ELISA-Teststreifen (12): mit jeweils 8 Testvertiefungen; beschichtet mit anti t-PA monoklonalem Antikörper, mit Trockenmittel im Aluminiumbeutel verpackt.
- Waschpufferkonzentrat (PBS; pH 7,3); detergentshaltig; 0,01% Merthiolat; 1 Flasche; 80 mL.
- Inkubationspuffer: (PBS; pH 7,3); blaugefärbt enthält Stabilisatorprotein; 0,05% Proclin; 1 Flasche; 90 mL; gebrauchsfertig
- Probenverdünnungspuffer (PBS, EDTA); enthält Stabilisatorprotein; 1 Flasche, 20 mL
- Kalibratoren (Standards): Nummeriert; lyophilisiert; jeweils eine Flasche.
- Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten**
- Kontrollplasma "high level" und "low level": zur Richtigkeitskontrolle; lyophilisiert; jeweils eine Flasche.
- Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten**
- Konjugat: Monoklonaler Anti-t-PA-POX; blaugefärbt; 1 Flasche; 0,3 mL
- Chromogenes Substrat: TMB (Tetramethylbenzidin) 1 Flasche, 12 mL, gebrauchsfertig
- Stopplösung: Schwefelsäure 0,45 mol/L; 1 Flasche; 12 mL, gebrauchsfertig
- Abklebefolien: für ELISA-Teststreifen, 2 Stück

### BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Kit enthalten)

- Aqua dest
- Röhrchen zur Verdünnung der Standards und Proben
- Messzylinder (100 und 1000 mL)
- Präzisionspipetten (10, 100 und 1000 µL)
- Variable Pipette (1000 µL)
- Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten (100 und 200 µL)
- ELISA-Waschgerät oder Mehrkanalpipette
- ELISA-Reader mit 450 nm Filter und 620 nm Referenzfilter falls verfügbar
- Inkubator (+37°C)

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle humanen Blut- bzw. Plasmaprodukte und Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln und wie Krankenhausmüll zu entsorgen. Die Kalibratoren und Kontrollen, hergestellt aus humanem Blut, und jedes hierzu verwendete Einzelplasma ist HbsAg, HIV 1/2 Ak und HCV-Ak negativ (siehe Außen- bzw. Flaschenetikett).
- Stopplösung (Schwefelsäure) kann zu Reizungen der Haut führen. Sollte Säure in die Augen gelangen, sofort mit viel Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen!
- Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel (Merthiolat). Nicht schlucken! Haut- oder Schleimhautkontakt vermeiden!

### LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Reagenzien sind ungeöffnet bei +2...8°C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Datum verwendbar.

Stabilität nach Rekonstitution:

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Stabilität
Kalibratoren, Kontrollplasma	nach Rekonstitution	-20 °C	6 Monate
ELISA-Teststreifen	nach Öffnen	+2...8 °C mit Abklebefolie in Alubeutel mit Trockenmittel	Verfallsdatum
Waschpufferkonzentrat	nach Öffnen	+2...8°C	6 Monate
Waschpuffer	1+11,5 Verdünnung des	+2...8°C	3 Wochen
Inkubationspuffer	nach Öffnen	+2...8°C	2 Monate
Probenverdünnungspuffer Konzentrat	nach Öffnen	+2...8°C	2 Monate
Probenverdünnungspuffer	1+1,5 Verdünnung des Konzentrats	+2...8°C	3 Wochen
	nach Öffnen	+2...8°C	6 Monate
Konjugat	Gebrauchslösung	Raumtemperatur +18...25°C	60 Minuten
	nach Öffnen	+2...8°C	6 Monate
Chromogenes Substrat	nach Öffnen	+2...8°C	Verfallsdatum

## TESTDURCHFÜHRUNG

### VORBEREITUNG DER PROBEN

Probenmaterial: Plasma  
Es können Citrat-, CTAD oder EDTA-Plasma verwendet werden. Zur Plasmagewinnung die Proben 15 min bei mindestens 2500 g (DIN 58905) zentrifugieren. Plasma kann 3 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden; andernfalls sollten die Proben sofort nach der Zentrifugation eingefroren werden (-20°C oder tiefer). Haltbarkeit bei -20°C: 6 Monate. Auftauen und Wiedereinfrieren von Plasma ist nicht empfohlen. Hämolytische und lipämische Plasmen können verwendet werden. Auf keinen Fall sollten Plasmaproben verwendet werden, bei denen Anzeichen von Koagulation zu sehen sind. Proben von venösen Verschlüssen erhält man, indem man den Oberarm für mindestens 10 Minuten abbindet (der Druck sollte dabei zwischen systolischem und diastolischem Blutdruck, z.B. 100 mm Hg, liegen). Blut abnehmen bevor der Druck reduziert wird. Zellkulturüberstände und Tumorextrakte können zwar verwendet werden, die geeigneten Verdünnungen müssen allerdings empirisch ermittelt werden, da dieser ELISA nur für Plasmaproben optimiert ist.

### VORBEREITUNG DES REAGENZES

- Vor Testbeginn alle benötigten Testkomponenten auf Raumtemperatur bringen.
- Herstellen des Waschpuffers: 1 Volumenteil Waschpufferkonzentrat mit 11,5 Volumenteilen Aqua dest. verdünnen (1+11,5). (Verdünntes Waschpufferkonzentrat = Waschpuffer). Eventuelle kristalline Niederschläge gehen bei +37°C innerhalb von 10 min in Lösung.
- Rekonstituieren der Kalibratoren und Kontrollplasma: Die Kalibratoren und Kontrollplasma werden mit 500 µL Aqua dest. rekonstituiert und nach einer Rekonstitutionszeit von 15 Minuten 10 Sekunden gemischt (Probenmischer). Rekonstituierte Komponenten sind klar bis leicht trüb.
- Herstellen des Probenverdünnungspuffers:  
1 Volumenteil Probenverdünnungspuffer mit 1,5 Volumenteilen Aqua dest verdünnen (1+1,5). (z.B. 20 mL Puffer + 30 mL Aqua dest)
- Herstellen der Konjugatgebrauchslösung (1+50): 1 Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnen.

**Für 8 Testvertiefungen: 20 µL Konjugat mit 1000 µL Inkubationspuffer mischen.**

## TESTVERFAHREN

<b>PROBEN-INKUBATION</b> (Hinweise 1,2)	Kalibratoren, Kontrollplasma, Proben in Testvertiefungen	25 µL
	Probenverdünnungspuffer in alle Testvertiefungen	75 µL
	Teststreifen mit Folie abdecken, bei +37°C inkubieren	60 Minuten
<b>KONJUGAT-REAKTION</b> (Hinweise 1,2)	Testvertiefungen entleeren und Konjugatgebrauchslösung in Testvertiefungen pipettieren	100 µL
	Teststreifen mit Folie abdecken, bei +37°C inkubieren	60 Minuten
<b>WASCHEN</b> (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 200 µL
<b>SUBSTRAT-REAKTION</b> (Hinweise 1,2)	Substratlösung in Testvertiefungen	100 µL
	Teststreifen mit Folie abdecken, bei RT inkubieren (+18...25°C)	20 Minuten
<b>STOPPEN</b> (Hinweise 1,2)	Stopplösung in Testvertiefung	100 µL
<b>MESSEN</b> (Hinweis 5)	ELISA-Reader, 450 nm	10 sek. Schütteln, Messung innerhalb von 10 Minuten

### HINWEISE

- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht kombiniert werden.
- Präzision und Wiederfindung hängen u.a. von folgenden Faktoren entscheidend ab:
  - Gute Durchmischung aller Verdünnungsansätze, 10 Sek. auf Probenmischer
  - Durchführung von Doppelbestimmungen
  - Inkubation bei der korrekten Temperatur
  - Genaue Einhaltung von Pipettierreihenfolge und Zeitakt
  - Die angegebene Zeit für die Probeninkubation, Konjugat- und Substratreaktion wird nach der Pipettierung der letzten Probe genommen. Inkubationszeiten sollten um nicht mehr als ± 10% variiert werden.
  - Bei der Probeninkubation und Konjugatreaktion darf die Zeit für die Pipettierung der verdünnten Kalibratoren/ Proben/ Kontrollplasma bzw. Konjugat-Lösung 60 Sek. pro ELISA-Teststreifen (8 Vertiefungen) nicht überschreiten.
  - Bei der Substratreaktion und beim Stoppen darf die Pipettierzeit der Substrat- bzw. Stopplösung 10 Sek. pro ELISA-Teststreifen nicht überschreiten. Kurze Pipettierzeiten werden durch Verwendung von Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten erreicht.
- Teststreifen mit wasserfestem Stift markieren, falls sie während des Testes versehentlich aus der Halterung fallen sollten.
- Nach dem letzten Waschvorgang müssen die Testvertiefungen leer gesaugt und auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden.
- Durch Differenzwellenlängenmessung bei 450 nm und 620 nm wird die Präzision des Tests erhöht.

### EINSCHRÄNKUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG

Proben, die einen höheren Wert als der höchste Kalibrator haben, müssen mit einer größeren Verdünnung nochmals getestet werden, um einen „Hook-Dose“ Effekt zu vermeiden.

## ANALYSENERGEBNISSE

### BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

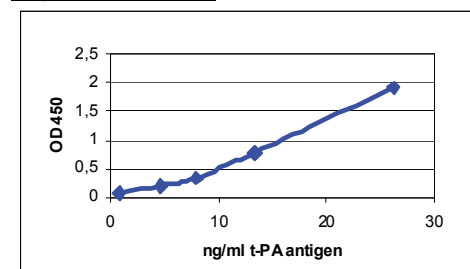
Erstellung der Bezugskurve: X-Achse: Konzentration t-PA Antigen ng/mL  
Y-Achse: Extinktion

Bezugskurve ist linear-linear, Werte Punkt zu Punkt oder mit linearer Regression verbinden

### Beurteilung der Bezugskurve

- Die Extinktion des höchsten Kalibrators sollte zwischen 1,0 und 2,5 liegen.
- Die Auswertbarkeit des Tests kann anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft werden

### Beispiel einer Standardkurve



### Konzentrationsbestimmungen der Proben

- Konzentrationen der Proben an der Bezugskurve ablesen.
- Sollte der Extinktionswert einer Probe höher als der des höchsten Standards liegen, so muss die Probe mit Inkubationspuffer vorverdünnt werden (1+1). Die ermittelte Konzentration wird in diesem Fall mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert.

### REFERENZBEREICHE

Normale Plasmaproben liegen zwischen 2-8 ng/mL. Jedes Labor sollte einen eigenen Normalbereich bestimmen. Für Plasmen von Patienten nach Stauversuch sollten Werte von über 15 ng/mL erhalten werden.

Ein fehlender Anstieg des t-PA-Antigens nach venösem Stau weist auf Verminderung der Fibrinolyse und damit auf erhöhte Thromboseneigung hin.

### STANDARDISIERUNG

Zur Kalibrierung wurde der WHO International Standard für tissue plasminogen activator (t-PA) verwendet.

### LITERATUR

I. Juhan-Vague, M.C. Alessi: Tissue-type plasminogen activator antigen. In: ECAT Assay Procedures: A manual of Laboratory Techniques; edited by J. Jespersen, R.M. Bertina and F. Haverkate, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1992, pg 131.

## DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

### INDICAZIONI D'USO

Il TECHNOZYM® t-PA Antigen ELISA può essere usato per determinare i livelli di antigene t-PA in pazienti con disturbi trombotici (trombosi venosa profonda, infarto del miocardio, ictus), tumori o setticemia.

### COMPOSIZIONE

- ELISA test strips (12) con 8 pozzetti ciascuna, rivestiti con anticorpi monoclonali anti t-PA, in busta di alluminio con dissecante.
- Washing buffer concentrato (PBS; pH 7,3); contiene detergente; 0,01% merthiolate; 1 bottiglia, 80 mL.
- Incubation buffer (PBS; pH 7,3); contiene proteina stabilizzante; 0,05% proclina; e blue dye, 1 bottiglia, 90 mL, pronto uso.
- Sample dilution buffer (PBS, EDTA); contiene proteina stabilizzante; 1 bottiglia, 20 mL.
- Calibratori (Standards) numerati; liofilizzati; 1 fiala ciascuno. **Concentrazioni lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla fiala di ciascun calibratore**
- Plasmi di controllo "livello basso" e "livello alto" liofilizzati; 1 fiala ciascuno. **Concentrazioni lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla fiala di ciascun controllo**
- Coniugato monoclonale Anti-t-PA POX; dyed blue; 1 fiala, 0,3 mL.
- Cromogeno TMB (tetramethylbenzidine); 1 fiala, 12 mL; pronto uso.
- Soluzione di stop: acido solforico 0,45 mol/L; 1 fiala 12 mL; pronto uso.
- Pellicola adesiva: per strips ELISA (2 fogli).

### MATERIALI NECESSARI NON FORNITI CON IL KIT

- acqua distillata
- provette per diluire standard e campioni
- cilindri graduati (100 mL e 1000 mL)
- pipette di precisione (10, 100 e 1000 µL)
- pipette regolabili (1000 µL)
- pipette multicanale o multidispensazione (100 e 200 µL)
- lavatore ELISA o pipetta multicanale
- lettore ELISA con filtri 450 nm, e filtro di riferimento a 620 nm
- Incubatore (+37°C)

### ATTENZIONI E PRECAUZIONI

- Tutti i prodotti del sangue o del plasma così come tutti i campioni devono essere considerati come potenzialmente infetti. Devono essere maneggiati con particolare attenzione e in stretta osservanza delle regole di sicurezza. Le regole riguardanti l'eliminazione sono le stesse applicate allo smaltimento riguardante gli ospedali. I calibratori e i plasmi controllo sono prodotti a partire da sangue umano e ogni plasma è stato testato e trovato negativo per gli anticorpi per l'HIV 1/2, HBs Ag e HVC (guardare l'etichetta sulle vials). Comunque tutti i prodotti derivati da sangue umano dovrebbero essere maneggiati con cura come se fossero materiale potenzialmente infetto.
- La Stopping Solution (acido solforico) potrebbe essere irritante per la pelle. Se l'acido viene a contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente e consultare un dottore.
- Qualche volta i reagenti contengono composti conservanti (merthiolato). Stare attenti a non ingerire! Evitare il contatto con la pelle o le membrane mucose.

### STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza riportata sull'etichetta è relativa alla conservazione della vial non aperta a +2...8°C. La stabilità dopo ricostituzione/apertura:

Stabilità dopo ricostituzione e aperture:

Material/Reagent	State	Storage	Stability
Calibratori, controlli	dopo ricostituzione	-20°C	6 mesi
ELISA test strip	dopo apertura	+2...8 °C with adhesive film in plastic bag with drying agent	expiry date
Washing buffer concentrato	dopo apertura	+2...8°C	6 mesi
Washing buffer	1+11,5 dil del concentrato	+2...8°C	3 settimane
tampone di incubazione	dopo apertura	+2...8°C	2 mesi
tampone di diluizione campioni concentrato	Dopo apertura	+2...8°C	2 mesi
tampone di diluizione campioni	1+1,5 dil del concentrato	+2...8°C	3 settimane
Coniugato	dopo apertura	+2...8°C	6 mesi
	soluzione di lavoro	T° ambiente +18...25°C	60 min.
Cromogeno TMB	dopo apertura	+2...8°C	data di scadenza

## PROCEDURA TEST

### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipologia campione: Plasma

Si possono usare plasmi Citrato, EDTA o CTAD. Centrifugare per 15 minuti ad almeno 2500 g (DIN 58905). I campioni dopo prelievo possono essere conservati fino a 3 ore a T° Ambiente. A -20°C possono essere conservati per 6 mesi. Evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti. Possono essere usati campioni emolizzati e lipemici. Non utilizzare il plasma in presenza di coaguli. Ottenere un prelievo venoso mediante laccio elastico con pressione sanguigna attorno a 100 mm Hg, per almeno 10 minuti. Prelevare il campione di sangue prima che la pressione si riduca. Possono essere usati anche sovrannatanti cellulari ed estratti di tumori, nonostante il saggio sia stato ottimizzato per siero e plasma, pertanto i fattori di diluizione per altri campioni devono essere autonomamente stabiliti.

### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Portare tutti i reattivi a T° ambiente prima dell'uso.
- Preparazione del washing buffer: Diluire 1 parte del washing buffer concentrato con 11,5 parti di acqua distillata (1+11,5). Agitare bene! Eventuali cristalli precipitate si sciolgono ponendo la soluzione diluita a +37°C per 10 minuti.
- Ricostituzione di calibratori e plasmi di controllo: Calibratori e plasmi di controllo vanno ricostituiti con 500 µL di acqua distillata e agitati al vortex per 15 minuti, agitare poi per altri 10 secondi dopo ricostituzione. I component ricostituiti possono essere trasparenti o leggermente torbidi.
- Preparazione del sample dilution buffer: Diluire 1 parte di sample dilution buffer con 1,5 parti di acqua distillata (es. 20 mL buffer + 30 mL acqua distillata)
- Preparazione del coniugato alla concentrazione di lavoro (1+50): Diluire 1 parte di coniugato con 50 parti di incubation buffer.

**per 8 test (pozzetti): Mescolare 20 µL di coniugato con 1000 µL di incubation buffer**

## SCHEMA DEL TEST

INCUBAZIONE CAMPIONI (rif. 1, 2)	Calibratori, plasmi di controllo e campioni nei pozzetti	25 µL
	aggiungere in tutti i pozzetti il sample dilution buffer	75 µL
	coprire i pozzetti, incubare a +37°C	60 minuti
REAZIONE CONIUGATO (rif. 1,2)	svuotare completamente i pozz., dispensare il coniugato preparato e coprire	100 µL
	incubare a +37°C	60 minuti
WASHING (rif. 1,3,4)	lavare	3 x 200 µL
REAZIONE SUBSTRATO (rif. 1,2)	dispensare il substrato e coprire	100 µL
	incubare a T° ambiente (+18...25°C)	20 minuti
STOP (rif. 1,2)	dispensare la soluzione di stop in tutti i pozzetti	100 µL
LETTURA (rif. 5)	leggere a 450 nm	shake 10 sec., measure within 10 minutes

### Riferimenti

- non mescolare reagenti di lotti diversi
- Precisione e performance, tra le varie cose, dipendono essenzialmente da questi fattori:
  - miscelare tutte le componenti usate per la diluizione 10 secondi con il Vortex Mixer.
  - utilizzare i calibratori, i controlli e i campioni in duplicato.
  - incubare alla temperatura indicata (RT: temperatura ambiente, +18...25°C).
  - Osservare rigorosamente l'ordine di dispensazione dei vari reagenti e i tempi come indicato
  - Il tempo di incubazione di coniugato, substrato e campioni inizia dopo dispensazione dell'ultimo campione. Il tempo di incubazione non dovrebbe variare più del 5%.
  - Durante la dispensazione dei campioni e del coniugato, il tempo di dispensazione dei calibratori/controlli, campioni e / o coniugato non dovrebbe eccedere i 60 secondi per strip (8 pozzetti)
  - Durante la reazione del substrato e della soluzione di stop, il tempo per la dispensazione non dovrebbe eccedere i 10 secondi per strip ELISA. Si possono abbreviare i tempi di dispensazione con l'uso di una multicanale
- contrassegnare con una penna indelebile ogni strip in caso di caduta accidentale dal telaio di plastica.
- Dopo l'ultimo lavaggio i pozzetti devono essere completamente aspirati, capovolti e posti su carta assorbente, rimuovendo le gocce rimanenti colpendo delicatamente sugli stessi
- La precisione del test è aumentata se si calcola la differenza tra la lettura a lunghezza d'onda 450 nm e quella a 620 nm o a 450 e 690 nm

### LIMITI DEL TEST

I campioni più elevate dell'ultimo punto curva devono essere diluiti ad una diluizione superior per evitare l'effetto uncino.

## ANALISI DEI RISULTATI

### CALCOLO DEI RISULTATI

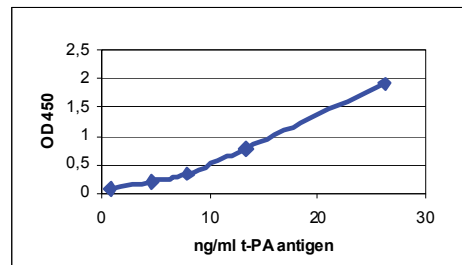
Costruzione della curva:

X axis: Concentrazione t-PA antigene ng/mL  
Y axis: densità ottica  
Porre in grafico: linear-linear o punto - punto

Validazione della curva

- l'OD del calibratore più alto dovrebbe essere compresa tra 1,0 e 2,5.
- la validità del test va controllata anche alla luce del valore ottenuto per i controlli.

Esempio di standard curve.



Misurazione della concentrazione dei campioni

- leggere la concentrazione dal riferimento della curva standard
- se vi sono campioni con OD superiore a quella del più alto punto della curva, essi vanno diluiti con l'incubation buffer (1+1). La concentrazione misurata andrà poi moltiplicata per il fattore di diluizione 2.

### INTERVALLO DI RIFERIMENTO

Range Normale per t-PA antigen = 2-8 ng/mL. Si raccomanda ad ogni laboratorio di stabilire i propri valori di riferimento. Per il plasma ottenuto mediante occlusione venosa i valori ottenuti dovrebbero essere superiori a 15 ng/mL.

La mancanza di incremento di livelli di t-PA dopo occlusione venosa è indicativa di capacità fibrinolitica ridotta e pertanto di tendenza trombotica.

### STANDARDIZZAZIONE

Il materiale di calibrazione usato è lo standard internazionale WHO per *tissue plasminogen activator (t-PA)*.

### LETTERATURA

J. Juhán-Vaghe, M.C.Alessi: Tissue-type plasminogen activator antigen. In: ECAT Assay Procedures: A manual of Laboratory Techniques, edited by J. Jesspersen, R.M.Bertina and F. Haverkate, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1992, pg 131-13

## DESCRIPCION DEL PRODUCTO

### APLICACION

El TECHNOZYM® t-PA Antigen ELISA se puede usar para determinar niveles de antígeno t-PA en pacientes con patologías tromboticas (trombosis venosa, infarto de miocardio) enfermedades oncológicas o septicemia.

### COMPOSICION

- Tiras de pruebas ELISA (12) con 8 pocillos cada una, tapizados con anticuerpo anti t-PA monoclonal, el agente deshidratante se suministra en una bolsa de aluminio.
- Tampón de lavado concentrado (PBS; pH 7,3); con detergente; 0,01% mertiolato; 1 botella de 80 mL
- Tampón de incubación (PBS; pH 7,3); contiene proteínas estabilizadoras; 0,05% proclín; y colorante azul, 1 botella de 90 mL, listo para usar.
- Tampón de muestra dilución (PBS, EDTA); contiene proteínas estabilizadoras, 1 botella de 20 mL.
- Calibradores (Standards) numerados; liofilizados; 1 vial de cada. **Las concentraciones dependen del lote, es preciso consultar la etiqueta del vial.**
- Plasma control "nivel bajo" y "nivel alto" liofilizado; 1 vial de cada.
- Conjugado monoclonal Anti-t-PA POX; teñido de azul; 1 vial, 0,3 mL
- Cromógeno TMB (tetramethylbenzidine); 1 botella, 12 mL; listo para usar.
- Solución de parada, ácido sulfúrico 0,45 mol/L; 1 botella 12 mL; listo para usar.
- Plástico adhesivo: para las tiras de pruebas de ELISA (2).

### MATERIAL NECESARIO (no suministrado con el kit)

- Agua destilada
- Tubos de ensayo para realizar diluciones de los standards y las muestras.
- Probeta graduada (100 y 1000 mL)
- Pipetas de precisión (10, 100 y 1000 µL)
- Pipeta variable (1000 µL)
- Pipeta multicanal o multidispensadora (100 y 200 µL)
- Lavador de placas ELISA o pipeta multicanal
- Lector ELISA con filtro 450 nm, con un filtro de 620 nm como filtro referencia.
- Incubador (+37 °C)

### PRECAUCIONES

- La sangre humana, los productos plasmáticos y las muestras deben ser considerados como potencialmente infecciosos. Deben ser manipulados con precaución y respetando siempre toda la normativa de seguridad. Las recomendaciones referentes a su eliminación son las mismas que las aplicadas a los residuos hospitalarios. Los calibradores y plasmata control obtenidos a partir de sangre humana y los plasmata utilizados son negativos para: HBsAg, HIV 1/2 Ab y HCV-Ab- (ver etiquetas en los kits y/o viales)
- Solución de parada (ácido sulfúrico) puede provocar irritación en la piel. Si accidentalmente cae en los ojos, lavar abundantemente con agua y solicitar consejo médico.
- Los reactivos algunas veces contienen agentes conservantes (merciolato). Se debe evitar pipetear con los labios ningún reactivo. Evitar el contacto con la piel o las mucosas.

### ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad que aparece en las etiquetas se refiere al almacenamiento de los reactivos antes de abrirse y almacenados entre +2...8°C.

La estabilidad una vez abierto y/o resuspendido es la siguiente:

Material/Reactivo	Estado	Almacenamiento	Estabilidad
Calibradores, plasmata control	Después reconstit.	-20°C	6 meses
Tiras ELISA	Después abierto	+2...8 °C con film adhesivo y en la bolsa con el	Fecha caducidad
Tampón lavado concentrado	Después abierto	+2...8°C	6 meses
Tampón lavado	1+11,5 dilución del concentrado	+2...8°C	3 semanas
Tampón incubación	Después abierto	+2...8°C	2 meses
Tampón de muestra dilución concentrado	Después abierto	+2...8°C	2 meses
Tampón de muestra dilución	1+1,5 dilución del concentrado	+2...8°C	3 semanas
Conjugado	Después abierto	+2...8°C	6 meses
	Solución trabajo	Temperatura ambiente +18...25°C	60 min.
Cromógeno TMB	Después abierto	+2...8°C	Fecha caducidad

### PROCEDIMIENTO TEST

#### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestra: Plasma

Se puede utilizar muestras de plasma con Citrato, EDTA o CTAD plasmata. Centrifugar durante 15 minutos a 2500 g (DIN 58905) o velocidad superior. Las muestras de plasma se pueden almacenar durante 3 horas a Temperatura ambiente; las muestras también se pueden congelar a -20°C o temperaturas inferiores después de la centrifugación. No son recomendables las congelaciones y descongelaciones repetidas. Los plasmata hemolíticos y/o lipémicos se pueden utilizar. En ningún caso de debe utilizar plasmata que muestren signos de coagulación. Las muestras por oclusión venosa se obtienen aplicando un torniquete en la parte superior del brazo con una presión entre la sistólica y diastólica Ej. 100 mm Hg, durante 10 minutos. Los sobrenadantes celulares y extractos tumorales pueden ser utilizados, pero el kit está optimizado para muestras de plasma. En muestras distintas al plasma puede ser necesario realizar diluciones distintas a las recomendadas.

#### PREPARACION DEL REACTIVO

- Antes de comenzar el test, deben dejarse atemperar todos los reactivos.
- Preparar el tampón de lavado. Diluir una parte del concentrado con 11,5 partes de agua destilada (1+11,5). Concentrado del Tampón de lavado diluido es igual a tampón de lavado. Pueden aparecer precipitados cristalinos que desaparecerán si se disuelve a +37°C durante 10'.
- Reconstitución de calibradores y plasmata control: Los calibradores y plasmata control se reconstituyen con 500 µL de agua destilada y una vez transcurridos 15 minutos de la reconstitución se mezclan bien durante 10 segundos (con un vortex). Los componentes reconstituidos son claros o ligeramente turbios..
- Preparar el tampón de muestra dilución: Diluir 1 parte del concentrado con 1,5 partes de agua destilada (1+1,5). (por ejemplo 20 mL tampón + 30 mL agua destilada)
- Preparar la solución de trabajo del conjugado (1+50): Diluir una parte de volumen de conjugado con 50 partes de volumen del tampón de incubación.

**Para 8 pocillos: Mezclar 20 µL conjugado con 1000 µL tampón incubación**

## REALIZACION DEL TEST

INCUBACION de la muestra (referencia 1, 2)	Calibradores, plasmata control y muestras en los pocillos del ELISA	25 µL
	Añadir tampón de muestra dilución a todos los pocillos.	75 µL
	tapar con el film plástico, incubar a +37°C	60 minutos
REACCION CONJUGADO (referencia 1,2)	Vaciar los pocillos, pipetear la solución de trabajo del conjugado en los pocillos y tapar con el film plástico	100 µL
	incubar a +37°C	60 minutos
Lavados (referencias 1,3,4)	Tampón lavado	3 x 200 µL
REACCION SUSTRATO (referencia 1,2)	Pipetear la solución sustrato en los pocillos de test y tapar con el film plástico	100 µL
	incubar a temperatura ambiente (+18...25°C)	20 minutos
Parada (referencia 1,2)	Pipetear la solución de parada en los pocillos	100 µL
LECTURA (referencia 5)	Lector palcas ELISA 450 nm	agitar 10 segundos. Medir en los 10 minutos siguientes.

#### Referencias para la realización del test

- No se pueden mezclar reactivos de lotes distintos
- La realización y precisión dependen principalmente de:
  - Mezclado minucioso de todas las sustancias usadas en una dilución.
  - Calibradores, controles y muestras usados en duplicado,
  - Incubaciones realizadas a las temperaturas indicadas.
  - Seguir el orden de pipeteo y los tiempos indicados.
- Los tiempos de incubación de muestras, conjugados y sustrato de reacción se deben contar desde el momento en que se pipetea la última muestra. Los tiempos no deben variar en más de ±10%.
- Durante la incubación de la muestra y la reacción del conjugado, el tiempo para pipetear los calibradores/muestras y plasmata controles y/o la solución de conjugado no debe exceder los 60 segundos por tira de ELISA (8 pocillos).
- Durante la reacción del sustrato y la parada, el tiempo necesario para pipetear el sustrato y/o la solución stop no debe exceder los 10 segundos por tira de ELISA. Se pueden garantizar tiempos cortos de pipeteado si se utiliza una pipeta multicanal y pipetas dispensadoras.
- Las tiras se deben marcar/numerar con lápices resistentes al agua por si ocurre algún incidente.
- Después del último lavado, los pocillos se deben aspirar concienzudamente y volcar sobre un papel de filtro.
- Determinando las diferencias a distintas longitudes de onda 450 y 620 nm o 450 y 690 nm, se incrementa la precisión del test.

### LIMITACION DEL TEST

Las muestras que sean superiores al calibrador alto se deberán volver a testar usando diluciones mayores.

## ANALISIS DE LOS RESULTADOS

### CALCULO DE RESULTADOS

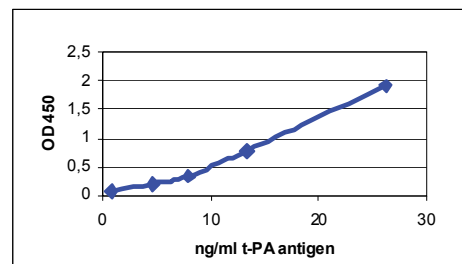
Curva de referencia :

Eje X: concentración antígeno t-PA ng/mL  
Eje Y: Densidad óptica

Comprobación de la curva standard

- El coeficiente de extinción del calibrador más alto debe estar entre 1,0-2,5.
- La validez del test va a depender de los valores del control.

Ejemplo de curva standard



#### Determinación concentraciones de las muestras

- Leer las concentraciones de la curva de referencia.
- Si las muestras son superiores al punto superior de la curva, se den diluir con el tampón de incubación (1+1) y volver a testar. La concentración que se obtenga se multiplicará por el factor de dilución 2.

### RANGO DE REFERENCIA

El rango normal para el antígeno t-PA es entre 2-8 ng/mL. Es importante que cada laboratorio establezca su rango de normalidad. Para plasma obtenido por oclusión venosa se pueden obtener valores superiores a 15 ng/mL.

La incapacidad de incrementar los valores de t-PA después de la oclusión venosa es indicativa de una capacidad fibrinolítica alterada y puede indicar tendencias tromboticas.

### ESTANDARIZACION

El material de calibración utilizado es el standard internacional WHO para el activador del plasminógeno tisular (t-PA)

### LITERATURA

J. Juhan-Vague, M.C.Alessi: Tissue-type plasminogen activator antigen. In: ECAT Assay Procedures; A manual of Laboratory Techniques; edited by J. Jespersen, R.M.Bertina and F. Haverkate, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1992, pg 131-13

## ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА

### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов TECHNOZYM® t-PA Antigen ELISA может быть использован для определения уровня антигена t-PA у пациентов с тромботическими расстройствами (тромбоз глубоких вен, инфаркт миокарда, инсульт), злокачественность или сепсис.

### СОСТАВ

- ИФА тест-стрипы (12) по 8 лунок каждый, покрытые анти-t-PA моноклональными антителами; осушитель находится в алюминиевом пакете.
- Концентрат промывочного буфера (PBS; pH 7,3); содержащий детергент; 0,01% мертиолат; 1 флакон, 80 мл.
- Инкубационный буфер (PBS; pH 7,3); содержит белок-стабилизатор; 0,05% проклина; и синий краситель, 1 флакон, 90 мл, готов к использованию.
- Буфер для разведения проб (PBS, EDTA); содержит белок-стабилизатор, 1 флакон 20 мл.
- Калибраторы (Стандарты), пронумерованные; лиофилизаты; 1 флакон каждого.
- Концентрации зависят от лота; смотрите наклейки на флаконах.
- Контрольные плазмы "низкий уровень" и "высокий уровень" для контроля, лиофилизаты; 1 флакон каждой. Концентрации зависят от лота; смотрите наклейки на флаконах.
- Кьюгат моноклональные анти-t-PA - пероксидаза; синего цвета; 1 флакон, 0,3 мл.
- Хромоген ТМВ (тетраметилбензидин); 1 флакон, 12 мл; готов к использованию.
- Стоп-раствор серная кислота 0,45 моль/л; 1 флакон 12 мл; готов к использованию.
- Адгезивная пленка для стрипов (2).

### ПОТРЕБУЮТСЯ МАТЕРИАЛЫ (не входят в набор)

- Дистиллированная вода
- Тест-пробирки для разведения стандартов и проб
- Мерный цилиндр (1000 мл)
- Прецизионные пипетки (10, 100 и 1000 мкл)
- Варипипетка (1000 мкл)
- Многоканальные пипетки и/или диспенсер (100 и 200 мкл)
- ИФА промыватель или многоканальная пипетка
- ИФА ридер со светофильтрами 450 и 620 нм.
- Инкубатор (+37°C)

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все продукты из человеческой крови или плазмы, а также пробы должны рассматриваться как потенциально инфицированные. Обращаться с ними следует осторожно и в строгом соответствии с правилами безопасности. Правила утилизации такие же, как для больничных отходов. Калибраторы сделаны из человеческой крови и любая индивидуальная плазма включенная в процедуру являются отрицательными по HBsAg, HIV 1/2 Ab и HCV-Ab (см. наклейки на флаконах).
- Стоп-раствор (серная кислота) может раздражать кожу. Если кислота попала в глаз, немедленно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Реагенты иногда содержат консерванты (мертиолат). Избегайте заглатывания! Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.

### СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Срок годности, напечатанный на этикетке, касается хранения не вскрытых флаконов при +2...8°C. Стабильность после растворения:

Материал/Реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Калибраторы, контрольные плазмы	После растворения	-20°C	6 месяцев
ИФА тест-стрипы	После вскрытия	+2...8°C с адгезивной пленкой в пластиковом пакете с осушителем	Срок годности
Концентрат промывочного буфера	После вскрытия	+2...8°C	6 месяцев
Промывочный буфер	1+11,5 разведенный концентрат	+2...8°C	3 недели
Инкубационный буфер	После вскрытия	+2...8°C	2 месяца
Концентрат буфера для разведения проб	После вскрытия	+2...8°C	2 месяца
Буфер для разведения проб	1+1,5 разведение концентрата	+2...8°C	3 недели
Кьюгат	После вскрытия	+2...8°C	6 месяцев
	Рабочий раствор	Комнатная температура +18...25°C	60 мин.
Хромоген ТМВ	После вскрытия	+2...8°C	До срока годности

### ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

#### ПОДГОТОВКА ПРОБ

Материал пробы: плазма  
Цитратная, ЭДТА или СТАД плазмы. Центрифугировать 15 мин. при минимум 2500 g (DIN 58905). Пробы плазмы могут храниться 3 часа при комнатной температуре, в противном случае пробы немедленно после центрифугирования должны быть заморожены при -20°C, или ниже. Плазмы стабильны до 6 месяцев при -20°C. Размораживать и повторно замораживать аликвоты плазмы не рекомендуется.  
Могут быть использованы гемолизованные и липемичные плазмы. Ни в коем случае не следует использовать только пробы с заменой коагуляцией. Пробы при закупорке вен получают наложением жгута в верхней части руки при разнице между систолическим и диастолическим давлением крови, например 100 мм Hg, по крайней мере, на 10 минут. Забирайте кровь из руки до того, как давление снизится.  
Клеточные супернатанты и экстракты опухолей могут быть использованы, но этот ИФА тест был оптимизирован для проб плазмы, поэтому, соответственно, следует использовать другие факторы разведения.

#### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

- Перед запуском тестов все требуемые компоненты должны достигнуть комнатной температуры.
- Подготовка промывочного буфера: Разбавьте 1 часть концентрата промывочного буфера 11,5 частями дистиллированной воды (1 + 11,5). Хорошо перемешайте! (Разбавленный концентрат промывочного буфера = промывочный буфер). Может быть кристаллический осадок, который будет растворяться при +37°C в течение 10 минут.
- Растворение калибраторов и контрольных плазм: Калибраторы и контрольные плазмы растворяются в 500 мкл дистиллированной воды и перемешайте 10 секунд после 15 минут растворения (на вихреке).
- Подготовка буфера для разведения проб: Разбавьте 1 часть буфера для разведения проб 1, 5 частями дистиллированной воды (например 20 мл буфера + 30 мл дистиллированной воды)
- Подготовка рабочего раствора кьюгата (1 + 50): Разбавьте 1 часть кьюгата 50 частями инкубационного буфера: Разбавьте 1 часть кьюгата 50 частями инкубационного буфера.

Для 8 лунок: Смешайте 20 мкл кьюгата с 1000 мкл инкубационного буфера

## ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕСТА

ИНКУБАЦИЯ ПРОБ (ссылки 1, 2)	Калибраторы, контрольные плазмы и пробы в лунках	25 мкл
	Добавьте во все лунки буфер для разведения проб	75 мкл
	Закройте стрипы пленкой, инкубируйте при +37°C	60 минут
РЕАКЦИЯ С КЬЮГАТОМ (ссылки 1, 2)	Тщательно опустошите лунки, пипетируйте рабочий раствор кьюгата в лунки, накройте стрипы пленкой инкубируйте при +37°C	100 мкл 60 минут
	Промывочный буфер	3 x 200 мкл
РЕАКЦИЯ С СУБСТРАТОМ (ссылки 1, 2)	Пипетируйте рабочий раствор субстрата в лунки, накройте стрипы пленкой	100 мкл
	Инкубируйте при комнатной температуре (+18...25°C)	20 минут
ОСТАНОВКА (ссылки 1, 2)	Пипетируйте стоп-раствор в лунки	100 мкл
ИЗМЕРЕНИЕ (ссылка 5)	ИФА-ридер, 450 нм	встряхните 10 сек., измерьте в течение 10 минут

### Ссылки

- Реагенты разных лотов не должны комбинироваться
- Точность и воспроизводимость, наряду с прочим, существенно зависят от следующих факторов:
  - Тщательного перемешивания всех веществ, используемых для разведения
  - Тестируйте калибраторы, контроли и пробы в дубляж.
  - Инкубацию должна проводиться при правильных температурах
  - Строго соблюдайте порядок пипетирования и указанное время действия:
  - Указанное время инкубации проб, реакций с кьюгатом и субстратом начинается после пипетирования последней пробы. Время инкубации не должно варьироваться более чем на ±10%.
  - Для инкубации проб и реакции с кьюгатом время пипетирования разбавленных калибраторов/проб/контрольных плазм и/или раствора кьюгата не должно превышать 60 секунд на стрип (8 лунок).
  - Для реакций с субстратом и стоп-раствором время, необходимое для пипетирования растворов субстрата и стоп-раствора не должно превышать 10 секунд на тест-стрип. Сокращение времени пипетирования может быть достигнуто использованием многоканальных пипеток, или диспенсера.
- Помечайте номер стрипа водостойким карандашом на случай выпадения стрипов в процессе тестирования.
- Последней промывки лунки должны быть тщательно осушены. Переверните плашку и осторожно постучите перевернутой плашкой по фильтровальной бумаге для удаления остатка промывочного буфера.
- Измерение при 450 и 620 нм или при 450 и 690 нм, повышает точность.

### ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

Пробы, которые выпали за верхний стандарт должны быть перетестированы при более высоком разведении, поскольку мог иметь место хук-эффект.

## РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА

### РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

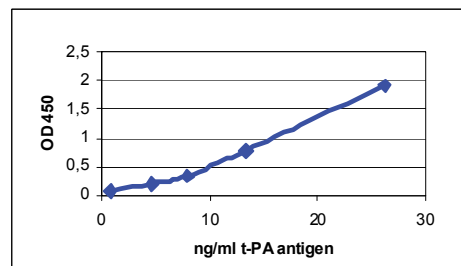
Построение калибровочной кривой: по оси X: концентрация антигена t-PA нг/мл  
По оси Y: Поглощение

График на миллиметровой бумаге с аппроксимацией от точки к точке

#### Оценка калибровочной кривой

- Поглощение самого высокого калибратора должно быть между 1,0 и 2,5.
- Правильность может быть проверена по рассчитанным величинам для контролей.

#### Пример стандартной кривой.



#### Измерение концентрации проб

- Считайте концентрацию с калибровочной кривой.
- Если поглощение пробы выше высшей точки калибровки, она должна быть разбавлена инкубационным буфером (1 + 1) и повторно протестирована. Измеренная концентрация умножается на фактор разведения 2.
- Набор t-PA измеряет как свободный t-PA, так и комплексы t-PA-PAI. Другие активаторы плазминогена не влияют на тест. Диапазон теста 2,5-20 нг/мл. Внутри- и меж-тестовые вариации менее 10 % и 5 %.

### ДИАПАЗОН НОРМЫ

Диапазон нормы для антигена t-PA составляет 2-8 нг/мл. Каждой лаборатории рекомендуется установить собственные нормы. Для плазмы, полученной после закупорки вен, могут быть получены величины больше чем 15 нг/мл. Неспособность уровней t-PA к увеличению при закупорке вен является указателем снижения фибринолитической емкости и может указывать на тромботические тенденции.

### СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Использованным калибровочным материалом является международный стандарт ВОЗ для тканевого активатора плазминогена (t-PA).

### ЛИТЕРАТУРА

I. Juhan-Vague, M.C.Alessi: Tissue-type plasminogen activator antigen. In: ECAT Assay Procedures; A manual of Laboratory Techniques; edited by J. Jespersen, R.M.Bertina and F. Haverkate, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1992, pg 131-13

## DESCRIPTION DU PRODUIT

### UTILISATION PRÉVUE

Le TECHNOZYM® t-PA Antigen ELISA peut être utilisé pour déterminer le taux de t-PA chez les patients avec des désordres thrombotiques (thrombose veineuse profonde, infarctus du myocarde, blessures), malignités ou septicémie.

### COMPOSITION

1. Barrettes (12 x 8 puits) ELISA tapissées avec un anticorps monoclonal anti-t-PA ; un sachet dessiccateur est glissé dans l'emballage.
2. Un flacon de 80 mL de Solution de lavage concentrée (PBS ; pH 7,3) contenant un détergent, du merthiolate (0,01%).
3. Un flacon de 90 mL de Tampon d'incubation prêt à l'emploi (PBS ; pH 7,3), contenant une protéine stabilisatrice ; du ProClin (0,05%) et un colorant.
4. Un flacon de 20 mL de Tampon de dilution de l'échantillon (EDTA, PBS), contenant une protéine stabilisatrice.
5. Plasmas calibrateurs, numérotés, un flacon pour chaque concentration.
6. Plasmas contrôles « bas » et « haut », lyophilisés, un flacon de chaque.
7. Un flacon de 0,3 mL d'anticorps monoclonal anti-t-PA couplé à la Peroxydase.
8. Un flacon de 12 mL de substrat de la peroxydase, tétraméthylbenzidine (TMB) prêt à l'emploi.
9. Un flacon de 12 mL de Solution d'Arrêt prête à l'emploi (Acide Sulfurique 0,45 mol/L).
10. Film adhésif pour les barrettes ELISA (x 2).

### MATÉRIEL REQUIS (mais non fourni)

1. Eau distillée
2. Tubes à essais pour réaliser les dilutions des échantillons et des contrôles
3. Une éprouvette graduée (100 et 1000 µL)
4. Des Micropipettes (10, 100 et 1000 µL)
5. Micropipette à volume variable (1000 µL)
6. Pipette multicanaux ou multipettes (100 et 200 µL)
7. Laveur ELISA ou une pipette multicanaux.
8. Lecteur de plaques ELISA avec des filtres à 450 nm et un filtre référence à 620 nm, si possible.
9. Etuve à +37°C.

### PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les échantillons de sang et de plasma doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec toutes les précautions nécessaires, en conformité avec les règles de sécurité en vigueur, et éliminés en tant que déchets hospitaliers. Les contrôles et les calibrateurs sont préparés à partir de plasmas humains. Chaque plasma a été testé individuellement et trouvé négatif pour la présence de l'antigène VHB, d'anticorps anti-HIV 1/2 et d'anticorps anti-HCV (voir étiquettes du coffret et des réactifs).
- La solution d'arrêt (acide sulfurique) est irritante pour la peau et pour les yeux (R36/38). Dans le cas du contact avec les yeux, lavez abondamment avec de l'eau et consultez un médecin.
- Les réactifs contiennent souvent un agent conservateur, le merthiolate. Ne pas avaler! Éviter le contact avec la peau et les muqueuses.

### STABILITÉ ET CONSERVATION

La date de péremption imprimée sur les étiquettes est valable pour les produits non ouverts, conservés à une température entre +2...8°C. Stabilité après reconstitution:

Réactif	Etat	Storage	Stabilité
Plasmas calibrateurs et contrôles	Après reconstitution	-20°C	6 mois
Barrettes ELISA	Après ouverture	+2...8°C*	Date d'expiration
Solution de lavage concentrée	Après ouverture	+2...8°C	6 mois
Solution de lavage 1X	Dilution 1+11,5 dans de l'eau	+2...8°C	3 semaines
Tampon d'incubation	Après ouverture	+2...8°C	2 mois
Tampon de dilution de l'échantillon (solution concentrée)	Après ouverture	+2...8°C	2 mois
Tampon de dilution de l'échantillon	Dilution 1+1,5 dans de l'eau	+2...8°C	3 semaines
Conjugué	Après ouverture	+2...8°C	6 mois
	Dilution de travail	Température ambiante +18...25°C	60 minutes
TMB	Après ouverture	+2...8°C	Date

\* Les barrettes ELISA doivent être conservées dans un sachet d'aluminium (à l'abri de la lumière), recouvertes de film adhésif.

### PROCEDURE DU TEST

#### PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE PLASMA

Des échantillons prélevés en tubes Citrate, EDTA et CTAD peuvent être utilisés. Pour la séparation plasmatique, centrifuger pendant 15 minutes à 2500 g (correspondant à DIN 58905). Les échantillons de plasma ne doivent pas être gardés à température ambiante plus de 3 heures. Vous pouvez congeler rapidement les échantillons après la centrifugation. Les échantillons conservés à -20°C peuvent être gardés ainsi pendant 6 mois. La re-congélation du plasma n'est pas conseillée après décongélation. Des plasmas hémolytiques et lipémiques peuvent être utilisés. Les plasmas avec une évidence de coagulation de doivent pas être utilisés en aucun cas. Des échantillons d'occlusion veineuse sont obtenus par application d'un garrot autour du bras avec la pression entre la pression systolique et diastolique du sang, p.ex. 100 mm Hg, pendant au moins 10 minutes. Prélever du sang à partir du bras avant que la pression soit diminuée.

Des surnageants de cultures cellulaires et des extraits tumoraux peuvent être utilisés. Dans ce cas, d'autres facteurs de dilution doivent être appliqués. Toutefois, ce test a été optimisé pour les échantillons de plasma.

#### PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. Avant de commencer le test, ramener les composantes du coffret à température ambiante.
2. Préparation de la solution de lavage (1+11,5) : diluer 1 volume de solution de lavage concentrée dans 11,5 volumes de d'eau distillée. Mélanger bien ! Un précipité blanc cristallin peut apparaître. Pour le faire dissoudre, mettez la solution pour 10 minutes à +37°C.
3. Reconstitution des plasmas calibrateurs et contrôles : reprendre les plasmas calibrateurs et contrôles avec 500 µL d'eau distillée. Après 15 minutes de temps de reconstitution, mélanger au vortex pendant 10 secondes. Les plasmas ont un aspect limpide ou légèrement trouble.
4. Préparation de la solution de travail du tampon de dilution des échantillons : (1+1,5) : diluer 1 volume de tampon de dilution des échantillons concentré dans 1,5 volumes de d'eau distillée. Par exemple : diluer 20 mL de tampon avec 30 mL d'eau distillée.
5. Préparation de la dilution de travail de conjugué (1+50) : Diluer 1 volume de solution concentrée de conjugué dans 50 volumes de tampon d'incubation.

## MODE OPÉRATOIRE

Incubation de l'échantillon (référence 1, 2)	Ajouter à tous les puits du tampon de dilution (sol. de travail)	75 µL
	Déposer dans les puits les calibrateurs, les contrôles ou les échantillons	25 µL
	Incuber à +37°C	60 minutes
Incubation du conjugué (référence 1, 2)	Vider bien les puits. Ajouter à tous les puits de la solution de travail conjugué	100 µL
	Incuber à +37°C	60 minutes
Lavage (référence 1,3,4)	Solution de lavage	3 x 200 µL
Réaction du substrat de la peroxydase (TMB) (référence 1, 2)	Déposer la solution substrat dans les puits et les couvrir d'un film	100 µL
	Incuber à température ambiante (+18...25°C)	20 minutes
Solution d'arrêt (référence 1, 2)	Ajouter de la solution d'arrêt dans chaque puits	100 µL
Mesure (référence 5)	Lecteur ELISA, longueur d'onde 450nm	Agiter pendant 10 secondes et mesurer dans les 10 minutes

Références pour le mode opératoire:

1. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être combinés.
2. La précision et la performance dépendent généralement des facteurs suivants :
  - Un mélange vigoureux de tous les composés avant leur utilisation.
  - Les calibrateurs, les contrôles et les échantillons testés en double.
  - Les incubations doivent être faites aux bonnes températures.
  - Le respect strict de l'ordre des étapes du test.
  - Les temps d'incubation de l'échantillon, du conjugué et du substrat démarrent lorsque le dernier puits est rempli. Ils ne doivent pas varier de plus de 10%.
  - Le temps de réaliser une étape du test sur une barrette (8 puits) ne doit pas excéder 1 minute.
  - Pendant la réaction du substrat de la peroxydase ou de l'arrêt, le temps d'ajout du substrat (TMB) ou de la solution d'arrêt ne doit pas excéder 10 secondes par barrette (8 puits). Un pipetage rapide est assuré avec une pipette multicanaux.
3. Notez ou numérotez les barrettes avec un feutre résistant à l'eau dans le cas d'un glissement accidentel de barrettes du cadre plastique, durant le lavage.
4. Après le dernier lavage, les puits doivent être vidés complètement. Retourner la plaque sur le verso, posez-la sur un papier absorbant et tapotez-la jusqu'à ce que les derniers résidus de solution de lavage soient éliminés.
5. La précision du test peut être améliorée en mesurant une différence d'absorbance à 450nm et 620 nm, ou à 450 nm et 690 nm.

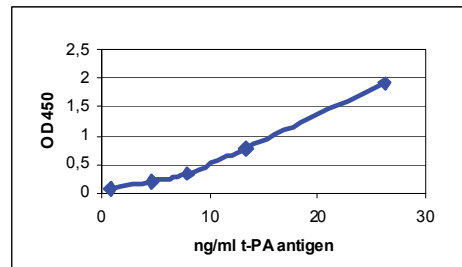
### LIMITES DU TEST

Les échantillons qui ont une DO plus élevée que le calibrateur le plus concentré doivent être testés une deuxième fois avec une dilution plus importante pour éviter des résultats faux négatifs.

### ANALYSE DES RÉSULTATS

#### CALCUL DES RÉSULTATS

La courbe de calibration : Axe X (abscisses) : concentration du t-PA (Ag) en ng/mL  
Axe Y (ordonnées) : Densité Optique mesurée pour chaque concentration (DO).



#### Evaluation de la courbe de calibration :

- La DO mesurée pour le calibrateur le plus concentré doit être comprise entre 1,0 et 2,5
- La validité du test peut être calculée sur la base des valeurs des contrôles

#### Exemple de courbe de calibration:

Mesure de la concentration des échantillons :

- Déterminer la concentration de chaque échantillon se référant à la courbe de référence.
- S'il y a des échantillons avec un signal (DO) supérieur au point de calibrage le plus concentré, ils peuvent être dilués dans du tampon d'incubation et testés une deuxième fois. La concentration ainsi mesurée doit être multipliée par le facteur de dilution pour connaître la concentration réelle de l'échantillon.

### GAMME DE RÉFÉRENCE

Un taux normal de t-PA (antigène) est compris entre 2-8 ng/mL. Il est recommandé aux laboratoires d'établir leur propre gamme de référence. Pour des plasmas obtenus après une occlusion veineuse, les valeurs obtenues doivent être supérieures à 15 ng/mL. Un défaut d'augmentation du niveau de t-PA après une occlusion veineuse est altération de la capacité fibrinolytique et peut indiquer une prédisposition à faire des thrombus.

### STANDARDISATION

Le matériel d'étalonnage utilisé est le Standard International de l'OMS pour l'Activateur tissulaire du plasminogène (t-PA).

### LITTÉRATURE

I. Juhán-Vágue, M.C.Alessi: Tissue-type plasminogen activator antigen. In: ECAT Assay Procedures: A manual of Laboratory Techniques; edited by J. Jespersen, R.M.Bertina and F. Haverkate, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1992, pg 131-13

Pour 8 puits (1 barrette): Mélanger 20 µL de conjugué avec 1000µL de tampon d'incubation.