

ZYMUPHEN tPA Activity

Ref 521296

Dosage bio-immunologique de l'activité de tPA sur microplaque
POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.
NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.

Français, dernière révision : 06-2016

UTILISATION :

Le coffret ZYMUPHEN tPA Activity est une technique immuno-enzymatique pour la détermination in vitro de l'activité de l'Activateur tissulaire du Plasminogène (tPA) dans le plasma acidifié, ou en milieu purifié, sur microplaque.

Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

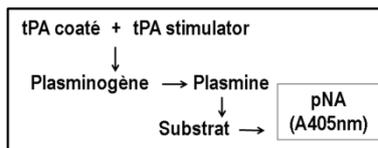
RÉSUMÉ ET EXPLICATION :

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 récepteurs¹.

PRINCIPE :

Dans un premier temps, le tPA présent dans l'échantillon, est retenu sur une plaque sensibilisée par un anticorps monoclonal de souris spécifique du tPA humain, et ne réagissant pas avec le site actif. Ensuite, amplifié par la présence du tPA stimulator (produits d'oxydation du fibrinogène) sur la plaque précoâtée, le tPA active le plasminogène (R2) en plasmine qui réagit avec son substrat spécifique (R1) en libérant du pNA, qui est mesuré à une longueur d'onde de 405nm. L'absorbance à 405nm est directement proportionnelle à la quantité de tPA initialement présent dans l'échantillon.



Echantillons :

- Plasma humain prélevé sur tube citrate acide (pH 4.30).
- Concentrés thérapeutiques.

REACTIFS :

1. **COAT** : Microplaque coâtée (Coated microplate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps monoclonal de souris spécifique du tPA humain, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD-CIT** : 2 flacons contenant 50 mL de **tampon de dilution pour échantillons**. (Citrate-Phosphate Sample Diluent), prêt à l'emploi.
3. **R1** : 2 flacons de **substrat** de la plasmine, lyophilisés.
4. **R2** : 2 flacons de **réactif plasminogène**, contenant du tPA stimulator, lyophilisés.
5. **CAL** : 2 flacons lyophilisés contenant 2 mL de **calibrateur tPA**.
6. **CI** : 2 flacons lyophilisés contenant 0.5 mL de **tPA Control High (contrôle haut)**.
7. **CL** : 2 flacons lyophilisés contenant 0.5 mL de **tPA Control Low (contrôle bas)**.
8. **WS** : Un flacon de 50 mL de **solution de lavage** (Wash Solution), 20 fois concentrée.
9. **CA** : Un flacon de 6 mL d'**acide citrique 2%** (Stop Solution) prêt à l'emploi.

Le taux exact pour chaque niveau d'étalon et de contrôles est indiqué sur le papillon fourni dans le coffret. Les concentrations de tPA des étalons et contrôles peuvent légèrement varier de lot à lot. Pour le dosage, se référer aux valeurs fournies sur le papillon du coffret utilisé.

Le réactif 2 contient de faibles quantités d'azide de sodium (0.9 g/L), voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Eviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air. L'évaporation réduit la stabilité du réactif à bord de l'automate.
- Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

PRÉPARATION ET STABILITÉ DES REACTIFS :

Les flacons sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

1. **Coated Microplate** : 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 minigrép fourni.
2. **CIT-Sample Diluent** : Prêt à l'emploi. La stabilité du réactif, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conserve dans son flacon d'origine ou dans un tube plastique de microcentrifugation fermé est de :
 - **4 semaines** à 2-8°C.
3. **R1** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 6 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Avant chaque utilisation, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps. Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine ou dans un tube plastique de microcentrifugation fermé est de :
 - **24 heures** à 2-8°C.
 - **8 heures** à température ambiante (18-25 °C).
 - **2 mois** congelé à -20°C ou moins*
4. **R2** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 6 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Avant chaque utilisation, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps. Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine ou dans un tube plastique de microcentrifugation fermé est de :
 - **24 heures** à 2-8°C.
 - **8 heures** à température ambiante (18-25 °C).
 - **2 mois** congelé à -20°C ou moins*
5. **tPA Calibrator** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 2 mL d'eau distillée au moins 15 minutes avant utilisation, afin d'obtenir un calibrateur prêt à l'emploi contenant un taux « C » (en UI/mL) de tPA. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine ou dans un tube plastique de microcentrifugation fermé est de :
 - **24 heures** à 2-8°C.
 - **8 heures** à température ambiante (18-25 °C).
6. **tPA Control I (haut)** : à reconstituer par **0.5 mL d'eau distillée** au moins 15 minutes avant utilisation. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Diluer ensuite **au 1/2 en SD-CIT**.
7. **tPA Control II (bas)** : à reconstituer par **0.5 mL d'eau distillée** au moins 15 minutes avant utilisation. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Diluer ensuite **au 1/2 en SD-CIT**. Stabilité des contrôles tPA, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservés dans leur flacon d'origine ou dans un tube plastique de microcentrifugation :
 - **24 heures** à 2-8°C.
 - **8 heures** à température ambiante (18-25 °C).
 - **2 mois** congelé à -20°C ou moins*
6. **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.
7. **Stop solution** : Solution d'acide citrique à 2%, prête à l'emploi.

*Décongelé une seule fois le plus rapidement possible à 37°C en adaptant la durée d'incubation au volume de réactif. La stabilité du réactif décongelé doit être vérifiée dans les conditions de travail du laboratoire.

CONDITIONS DE STOCKAGE :

Dans leur emballage d'origine, et conservé à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :

Réactifs :

- Eau distillée.

Matériels :

- Matériel de lavage pour microplaque ELISA (et agitateur)
- Spectrophotomètre, photomètre ou automates pour dosage chromogéniques réglé à une longueur d'onde de 405nm (plage lecture allant jusqu'à 4u de DO).
- Chronomètre, Pipettes calibrées.

PRELEVEMENTS :

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur.

Echantillons :

Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé sur citrate de sodium acide.

Prélèvement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate de sodium acide (1 vol) (citrate 0,5M, pH 4,30, ex : tube Biopool® Stabilyte™) afin d'éviter toute inactivation du tPA, par ponction veineuse franche. Le premier flacon doit être éliminé.

Centrifugation :

Dans les deux heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500 g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

Conservation du plasma :

- 4 heures à température ambiante (18-25°C)
- 1 mois à -20°C.
- 18 mois à -70°C.

Les échantillons de plasma congelé doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Après décongélation et avant utilisation, agiter vigoureusement afin de resuspendre tout précipité.

PROCEDURE :

Méthode de dosage :

1. Les étalons doivent être dilués dans du tampon Sample Diluent comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration ("C" = définie la concentration en tPA) :

Etalons	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
Volume de l'étalon	1 mL	0.5 mL	0.25 mL	0.1 mL	0.05 mL	0 mL
Volume du sample diluent	0 mL	0.5 mL	0.75 mL	0.9 mL	0.95 mL	1 mL

2. Les échantillons sont dilués dans du tampon SD-CIT Sample diluent comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Dilution
Contrôles	1/2
Echantillons à tester	1/2

Réaliser la gamme d'étalonnage et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés dans l'heure, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C).

Les concentrations exactes des calibrateurs et des contrôles sont indiquées pour chaque lot dans le papillon fourni avec le kit.

3. Introduire dans les barrettes :

Réactif	Volume	Procédure
Calibrateur tPA, ou contrôle ou échantillon à tester dilué au 1/2, ou Diluant échantillon (blanc)	200 µL	Introduire immédiatement les solutions standards ou les échantillons à doser dans les puits correspondants sur la micro plaque
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C)(a).		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µL	Effectuer une série de 5 lavages (b).
Réactif R1 substrat préincubé environ 20 min. à 37°C. et homogénéisé.	100 µL	Immédiatement après le lavage mettre la plaque (dans un bain-marie) à 37°C et introduire le substrat dans les puits.
Réactif R2 plasminogène préincubé environ 20 min. à 37°C. et homogénéisé.	100 µL	Introduire le réactif plasminogène dans les puits.
Incuber exactement 30 minutes à 37°C (bain-marie)		
Stop solution	50 µL	Arrêter la réaction en introduisant l'acide citrique 2%. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le réactif plasminogène. (a).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 405 nm. Soustraire les blancs (d).		

Nota:

Effectuer les dépôts de l'étalonnage, des contrôles et des tests, le plus rapidement possible, pour une cinétique homogène des divers dosages. Un délai trop important (> 10 min) entre les premiers et derniers dépôts peut influencer la cinétique immunologique et fausser les résultats

- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations. Bien respecter la température d'incubation (18-25°C). Si la température est trop forte (>25°C) ou trop faible (<18°C), les résultats sont susceptibles d'être affectés et les DO mesurées trop fortes ou trop faibles. En tenir compte pour l'analyse des résultats. L'utilisation continue d'un agitateur n'est pas recommandée car elle est susceptible d'augmenter sensiblement les DO obtenues dans le test.
- 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 réactif plasminogène R2, 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 citrique.
- Pour une lecture bromométrique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

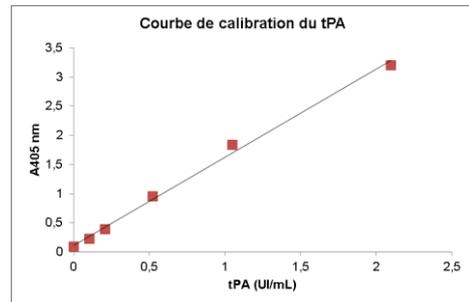
L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION :

En utilisant une échelle linéaire :

- Le test est linéaire de 0 à 2 UI/mL.

La courbe d'étalonnage ci-dessous, obtenue est indiquée à titre d'exemple uniquement. Seule la courbe d'étalonnage générée pour la série de dosages en cours doit être utilisée.



CONTROLE QUALITE :

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider le bon déroulement des tests ainsi que l'homogénéité des dosages pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire afin de valider le test. Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactifs, ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir et vérifier ses propres valeurs cibles, les zones d'acceptation et les performances attendues, selon les instruments et les protocoles utilisés.

RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer sur papier millimétré la droite étalon, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de tPA en UI/mL.
- Sur la courbe obtenue, déduire la concentration de tPA et multiplier le taux obtenu par 2 pour les échantillons et contrôles dilués au 1/2, et par D pour des échantillons dilués à 1/D.

- Les résultats sont exprimés en UI/mL.
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations. Choisir la courbe la mieux ajustée, à titre indicatif, une courbe de type Lin-Lin convient dans la plupart des cas. (Les valeurs cibles et intervalles d'acceptation des contrôles doivent être vérifiés dans les conditions de travail exactes du laboratoire, et ajustés si nécessaire).

Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du coffret, suivre scrupuleusement les instructions techniques.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.

PERFORMANCES :

- La limite basse de détection est $\leq 0,1$ UI/mL.
- Le domaine de mesure est compris entre 0 et 2 UI/mL.
- Recouvrement en plasma acidifié : 100% à la dilution 1/2, 98% au pur
- Pas de cross réactivité significative observée avec l'urokinase (uPA).
- Les études de performances sont réalisées en interne. Les performances sont évaluées avec les contrôles du laboratoire. Les résultats suivants sont obtenus :

Contrôles	Intra essais		Inter essais	
	n	CV%	n	CV%
CI	12	7.7%	7	5.7%
CII	12	7.5%	7	8.6%

REFERENCES :

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

SYMBOLES :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1.