

**ZYMUTEST tPA Antigen**

Ref RK011A

Dosage ELISA du tPA Antigène

Français, dernière révision 06-2023

**UTILISATION :**

Le coffret ZYMUTEST tPA est un dosage ELISA sandwich du tPA Antigène (Tissue Type Plasminogen Activator) présent dans un milieu plasmatique. Ce coffret peut être utilisée pour doser le tPA Antigène présent dans un milieu purifié à la condition d'utiliser un étalon approprié. Le coffret permet le dosage du tPA sous forme libre ou complexée, de façon homogène.

**RESUME 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 récepteurs.

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.

**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 de raifort (HRP), qui réagit avec les épitopes libres du tPA. Après lavage, le substrat, Tetraméthylbenzidine (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.

**REACTIFS :**

- COAT : Microplaque ELISA :** contenant 12 barrettes de 8 puits, coatée avec un anticorps monoclonal de souris, spécifique du tPA humain, puis stabilisée. La microplaque est emballée dans un sachet aluminium hermétiquement fermé en présence d'un déshydratant. Contient de la BSA.
- SD : Diluant Echantillon Fibrinolyse :** 2 flacons de 50 mL de diluant (Fibrinolyse Sample Diluent), prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- STD : tPA Standard 0, 1, 2, 3 :** 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. La concentration exacte de tPA de ces niveaux d'étalon est indiquée pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.
- CI : Contrôle Plasma I Haut UTA :** 1 flacon de 1 mL, lyophilisé. Après reconstitution par 1 mL d'eau distillée, le contrôle Plasma est prêt à l'emploi (Plasma humain, contrôle haut). Contient de la BSA.
- CII : Contrôle Plasma II Bas UTA :** 1 flacon de 1 mL, lyophilisé. Après reconstitution par 1 mL d'eau distillée, le contrôle Plasma est prêt à l'emploi (Plasma humain, contrôle bas). Contient de la BSA.
- IC : Immunoconjugué (Anti-(h)-tPA-HRP immunoconjugate) :** 3 flacons d'immunoconjugué, lyophilisés. Anticorps monoclonal, spécifique du tPA Ag et couplé à l'HRP. Après reconstitution par 7,5 mL de diluant pour immunoconjugué (CD), l'immunoconjugué est prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- CD : Diluant pour immunoconjugué :** 1 flacon de 25 mL de diluant, prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- WS : Solution de lavage :** 1 flacon de 50 mL, 20 fois concentrée.
- TMB : 3,3', 5,5'-Tetraméthylbenzidine :** 1 flacon de 25 mL, prêt à l'emploi. Contient de l'eau oxygénée.
- SA : Acide Sulfurique 0,45 mol/L (Stop Solution) :** 1 flacon de 6 mL, prêt à l'emploi.

La concentration exacte pour les contrôles et les étalons, ainsi que l'intervalle de concentration acceptable pour les contrôles sont indiqués sur le papillon fourni dans le coffret. Pour le dosage, se référer aux valeurs fournies sur le papillon du coffret utilisé.

Les réactifs SD, CD et WS contiennent 0,05% de Kathon CG et le réactif SA contient de l'acide sulfurique, 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.
- Si le substrat TMB devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- 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, en limitant la surface d'échange liquide-air. L'évaporation réduit la stabilité du réactif à bord de l'automate.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation 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 pendant une période courte, sans aucun dommage.
- Le plasma humain utilisé pour la préparation de l'étalon et des contrôles I et II a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VHC.

- Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- L'acide sulfurique, même dilué à 0,45 mol/L, 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.
- Pour usage de diagnostic *in vitro*.

CD/SD/WS : H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

**PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :**

Ramener le coffret à température ambiante, au moins 30 min avant le dosage. Conserver les réactifs non utilisés à 2-8°C. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation pour les produits lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

Lorsque les réactifs sont utilisés et conservés de façon appropriée, en conformité avec le protocole et les précautions recommandées, le coffret peut être utilisé sur une période de 1 mois, et barrette par barrette, si nécessaire.

- COAT (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 à 2-8°C** dans leur emballage d'origine, hermétiquement fermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, dans le sachet en plastique pour microplaque fourni (minigrp).
- SD (Fibrinolyse Sample Diluent) :** Prêt à l'emploi. Ce réactif contient 0,05% Kathon CG. La stabilité du réactif, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 4 semaines à 2-8°C.**
- STD (tPA Standard 0, 1, 2 et 3) :** Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL** d'eau distillée afin de constituer une gamme de calibration titrée en tPA. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 8 heures à température ambiante (18-25°C).**

Après reconstitution, aliquoter chaque niveau de standard en 3 flacons pour une utilisation fractionnée du kit. La stabilité des aliquotes est de :

- 2 mois congelé à -20°C ou moins.**
- CI (Plasma Control I (plasma humain, contrôle haut, UTA)) :** Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL** d'eau distillée. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
    - 8 heures à température ambiante (18-25°C).**
    - 24 heures à 2-8°C.**
    - 2 mois congelé à -20°C ou moins.**
  - CII (Plasma Control II (plasma humain, contrôle bas, UTA)) :** Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL** d'eau distillée. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
    - 8 heures à température ambiante (18-25°C).**
    - 24 heures à 2-8°C.**
    - 2 mois congelé à -20°C ou moins.**
  - IC (Anti-(h)-tPA-HRP immunoconjugate) :** Reconstituer chaque flacon d'immunoconjugué avec exactement **7,5 mL** de "Conjugate Diluent" au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter pour homogénéiser. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
    - 24 heures à température ambiante (18-25°C).**
    - 4 semaines à 2-8°C.**
  - CD (Conjugate Diluent) :** Prêt à l'emploi. Ce réactif contient 0,05% de Kathon CG. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
    - 4 semaines à 2-8°C.**
  - WS (Wash Solution) :** Incuber, si nécessaire, le flacon dans un bain-marie à **37°C** jusqu'à dissolution totale 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). La stabilité de la solution de lavage, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
    - 4 semaines à 2-8°C.**
- La stabilité de la solution de lavage diluée, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
- 7 jours à 2-8°C.**
- Ce réactif contient 0,05% de Kathon CG.
- TMB :** Prêt à l'emploi. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
    - 4 semaines à 2-8°C.**
  - SA (Stop Solution) :** Solution d'arrêt contenant 0,45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi. Voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
    - 4 semaines à 2-8°C.**

**CONDITIONS DE STOCKAGE :**

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

## REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :

### Réactifs :

- Eau distillée.

### Matériels :

- 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
- Matériel de lavage pour microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.

## PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS :

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI GP44-A4 pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation)<sup>3</sup>.

### Echantillons :

Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique). L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes qu'avec le plasma citaté.

### Prélèvement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0.109M) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube 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 2500g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

### Conservation du plasma :

- 24 heures à température ambiante (18-25°C)
- 6 mois à -20°C.

Les échantillons de plasma congelés doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongélation et avant utilisation.

## PROCEDURE :

### Méthode de dosage :

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

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 Echantillon Fibrinolyse (SD).

2. Les 4 niveaux de tPA Standards **0, 1, 2, 3** sont reconstitués par 1 mL d'eau distillée, puis utilisés **pur** 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.

3. Sortir la quantité nécessaire de barrettes du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

| Réactif   | Volume | Procédure   |
|---|--------|---|
| Fibrinolyse<br>Sample Diluent   | 100 µL | Répartir le diluant échantillon dans les puits.   |
| tPA Standards, échantillons à doser, contrôles ou Fibrinolyse sample Diluent (blanc)  | 100 µL | Introduire les solutions standards, les contrôles 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 | Effectuer une série de 5 lavages (c).   |
| 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 | Effectuer une série de 5 lavages. (c)   |
| Substrat TMB / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 200 µL | Immédiatement après lavage, introduire le substrat dans les puits (c).<br><i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément et à intervalles de temps exactes. (b, d) |
| Laisser la coloration se développer <b>pendant exactement 5 minutes</b> à température du laboratoire (18-25°C) (b)                                    |        |   |
| Acide sulfurique 0.45 M   | 50 µL  | Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat, arrêter la réaction en introduisant l'acide sulfurique 0,45M. (d)  |
| Attendre <b>10 minutes</b> pour laisser stabiliser la coloration puis lire la <b>DO</b> obtenue à <b>450 nm. Soustraire la valeur des blancs. (e)</b> |        |   |

### Nota :

- Effectuer les dépôts des contrôles et des échantillons, le plus rapidement possible (10 min), pour une cinétique immunologique homogène pour la fixation du tPA.
- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour microplaque ELISA est possible.
- 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 immobilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque, qui pourrait endommager les protéines immobilisées et réduire la réactivité 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, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620 nm ou à 690 nm.

## 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 « Fibrinolyse 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 "Fibrinolyse 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 50 µL 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 Résultats (**mais de 0 à environ 10 ng/mL**). Le taux de tPA antigène mesuré doit être multiplié par le facteur de dilution de l'échantillon testé.

## RESULTATS :

- Les résultats sont exprimés à l'aide des **DO<sub>450</sub>** obtenues pour les échantillons et le contrôle en utilisant la courbe de calibration.
- Tracer la droite de calibration, en portant en abscisses la concentration de tPA Ag (ng/mL), et en ordonnées les **DO 450nm**, en choisissant le mode d'interpolation « best fit » (se reporter au papillon contenu dans le coffret).
- 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.
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

## LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout prélèvement suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.
- La présence de facteur rhumatoïde dans le plasma surestime le dosage en tPA.
- Pas d'interférence significative de l'héparine jusqu'à 2 UI/mL et du PAI-1 endogène jusqu'à 100 ng/mL.

## 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<sup>4,5</sup>.

## APPLICATIONS :

Dosage du tPA Antigène dans des échantillons cliniques, comme marqueur de pathologie. Dosage du tPA Antigène dans les traitements thrombolytiques (traitement par le tPA).

## PERFORMANCES :

La limite de détection est ≤ 0.5 ng/mL.

CV intra essais : 3-8 %.

CV inter essais : 5-10 %.

## REFERENCES :

- Bos R. *et al.* Production and characterization of a set of monoclonal antibodies against Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA). Fibrinolysis, 1992; 6: 173-182.
- Bos R. *et al.* 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.
- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
- Juhan-Vague I. and Alessi M.C. Fibrinolysis and risk of coronary artery disease. Fibrinolysis, 1996; 10(3): 127-136.
- Stein P. *et al.* Activation of the fibrinolytic system in patients with coronary artery disease and hyperfibrinogenemia.. Thromb Haemost, 1997; 77(5): 970-974.

## SYMBLES :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.