

ZYMUTEST® PAI-1 Antigen

(Art.Nr. RK012A)

ELISA-Komplettkit zur Bestimmung von Gewebe-Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
 www.coachchrom.com | info@coachchrom.com
 Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
 Kostenfreie Nummern für Deutschland:
 Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3



In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK:

Der ZYMUTEST PAI-1 Antigen ist ein einstufiger Enzymimmunoassay zur Bestimmung von humanem Gewebe-Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) im Plasma und anderen Flüssigkeiten die PAI-1 Antigen enthalten.

TESTPRINZIP:

Zunächst wird das Immunkonjugat, ein Peroxidase (HRP)-konjugierter monoklonaler Anti-PAI-1 Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, die mit einem weiteren monoklonalen Anti-PAI-1 Antikörper beschichtet sind, pipettiert. Unmittelbar darauf wird verdünntes Testplasma zugegeben, wodurch die Immunreaktion startet. In der Probe vorhandenes PAI-1 Antigen bindet durch freie Epitope gleichzeitig an die HRP-konjugierten Antikörper des Immunkonjugates und an die monoklonalen Antikörper der Plattenbeschichtung. Nach einem Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zugegeben. Dies führt zur Blaufärbung des Testansatzes, die in eine Gelbfärbung umschlägt, sobald die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt wird. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zum PAI-1 Antigen Gehalt.

PROBENMATERIAL:

- Humanes Plasma mit Trinatriumcitrat oder Dinatrium-EDTA als Antikoagulant.
- Jede biologische Flüssigkeit, in der PAI-1 Antigen bestimmt werden soll.

REAGENZIEN:

1. **COAT:** ELISA-Mikrotiterplatte, enthält 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem stabilisierten monoklonalen Maus-Anti-PAI-1 Antikörper. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
2. **SD:** 2 Flaschen mit je 50 ml F(ibrinolyse)-Probenverdünner, gebrauchsfertig.
3. **STD:** 3 Flaschen PAI-1 Standard, lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit 2 ml F-Probenverdünner (SD) erhält man eine Lösung, die etwa 10 ng/ml rekombinantes humanes PAI-1 Antigen enthält. Die exakte PAI-1 Antigen Konzentration ist dem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.
4. **CI:** 1 Flasche mit 1 ml PAI-1 Kontrolle I Hoch (Humanplasma), lyophilisiert.
5. **CII:** 1 Flasche mit 1 ml PAI-1 Kontrolle II Niedrig (Humanplasma), lyophilisiert.

Anmerkung: Die PAI-1 Antigen Zielwerte und Vertrauensbereiche der Kontrollen sind von Charge zu Charge unterschiedlich und auf dem beiliegenden Datenblatt exakt angegeben.

6. **IC:** 3 Flaschen Anti-(h)-PAI-1-HRP Immunkonjugat. Monoklonaler Antikörper, spezifisch für humanes PAI-1 Antigen, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP), lyophilisiert
7. **CD:** 1 Flasche mit 25 ml Konjugatverdünner, gebrauchsfertig.
8. **WS:** 1 Flasche mit 50 ml 20-fach konzentrierter Waschlösung.
9. **TMB:** 1 Flasche mit 25 ml Peroxidasesubstrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), versetzt mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂), gebrauchsfertig.
10. **SA:** 1 Flasche mit 6 ml 0,45M Schwefelsäure (Stopplösung), gebrauchsfertig.

Anmerkung: Es dürfen ausschließlich Komponenten aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

- 8-Kanal-Pipette oder Multipipette zur Abgabe von Volumina von 50-300 µl.
- Pipetten zur Abgabe von Volumina von 0-20 µl, 20-200 µl und 200-1000 µl.
- Waschgerät und Schüttler für Mikrotiterplatten.
- Lesegerät für Mikrotiterplatten mit einer Wellenlängeneinstellung von 450 nm.
- Aqua dest.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN, LAGERUNG UND STABILITÄT:

In der Originalverpackung, bei 2-8°C gelagert, sind die ungeöffneten Reagenzien bis zum auf der Testpackung angegebenen Verfalldatum haltbar.

1. **ELISA-Mikrotiterplatte (COAT):** Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die jeweilige Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen. Nach Entnahme aus dem Beutel müssen die Streifen innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Zur Lagerung werden nicht benötigte Streifen in Gegenwart des Trockenmittels im originalen Aluminiumbeutel verschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Unter diesen Bedingungen sind die Streifen 4 Wochen bei 2-8°C haltbar.
2. **F-Probenverdünner (SD):** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Reagenz für 4 Wochen bei 2-8°C unter der Voraussetzung, dass jegliche Kontamination vermieden wird, aufbewahrt werden. Das Reagenz enthält 0,05% Kathon CG.
3. **PAI-1 Standard:** Um die Kalibrationslösung mit einem PAI-1 Gehalt von 10 ng/ml zu erhalten, wird der Inhalt der Flasche mit 2,0 ml F-Probenverdünner (SD) rekonstituiert. Die Lösung ist für mindestens 8 Stunden bei Raumtemperatur stabil.
4. **CI:** PAI-1 Kontrolle I (Humanplasma, hoch): Mit 1,0 ml aqua dest. rekonstituieren.
5. **CII:** PAI-1 Kontrolle II (Humanplasma, niedrig): Mit 1,0 ml aqua dest. rekonstituieren.

Anmerkung: Nach Rekonstitution sind die Kontrollen 8 Stunden bei Raumtemperatur, 24 Stunden bei 2-8°C oder 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil.

Warnung: PAI-1-Kalibrator und PAI-1-Kontrollen werden mit PAI-1, welches aus humanem Normalplasma gewonnen wird, hergestellt. Dieses wurde mit registrierten Methoden getestet und als negativ für HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper eingestuft. Kein Test kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Jedes Produkt humanen Ursprungs muss deshalb mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

6. **Anti-(h)-PAI-1-HRP Immunkonjugat (IC):** Jede Flasche wird mit 4,0 ml Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig geschüttelt. Das rekonstituierte Konjugat ist 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 4 Wochen bei 2-8°C stabil.
7. **Konjugatverdünner (CD):** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann die Lösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
8. **Waschlösung (WS):** Vorhandene Feststoffe sind durch Inkubation der Flasche für 15-30 Minuten bei 37°C im Wasserbad vollständig in Lösung zu bringen. Nach Durchmischung wird die erforderliche Menge 1:20 mit aqua dest. verdünnt (die in der Flasche enthaltenen 50 ml ermöglichen somit die Herstellung von 1 Liter verdünnter Waschlösung). Nach dem Öffnen ist das Konzentrat in der Originalflasche 4 Wochen bei 2-8°C haltbar. Nach Verdünnung kann die Waschlösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 7 Tage bei 2-8°C gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
9. **TMB Substrat (TMB):** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Substrat, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.
10. **Stopplösung (SA):** Gebrauchsfertig

Vorsichtsmaßnahmen: Schwefelsäure (SA) ist trotz Verdünnung auf 0,45 M ätzend und wie ähnliche Chemikalien mit größter Vorsicht zu handhaben. Jeglicher Haut- und Augenkontakt ist unter Verwendung von Handschuhen und Schutzbrillen zu vermeiden.

Anmerkung: Die erforderlichen Testkitkomponenten müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Nicht benötigte Komponenten sind bei 2-8°C zu lagern. Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Probengewinnung:

Blut (9 Volumenteile) wird in 0,109 M Citrat oder in CTAD (Citrat-Theophyllin-Adenosin-Dipyridamol) als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen und 20 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert.

Anschließend wird - um Plättchenaktivierung möglichst zu vermeiden - mit einer Pipettenspitze von der Mitte des Plasmaüberstandes lediglich etwa 1/3 des Plasmas zur Testung entnommen.

Das Citratplasma sollte innerhalb von 8 Stunden verwendet oder bei -20°C oder tiefer für bis zu 6 Monate eingefroren und kurz vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetaute Proben müssen innerhalb von 4 Stunden verwendet werden.

PAI-1 Antigen kann durch Plättchenaktivierung freigesetzt werden. Um dies zu vermeiden, müssen die Plättchen vorsichtig entfernt werden. Die Verwendung von CTAD Blutabnahmeröhrchen wird daher empfohlen. Um tägliche Schwankungen auszugleichen sollten Plasmen immer morgens vom nüchternen Patienten genommen werden.

EDTA-Plasmen können auf gleiche Weise verwendet werden, die Lagerungsbedingungen entsprechen denen für Citratplasma.

Proben- oder Kontrollplasmen:

Die Proben werden 1:5 mit F-Probenverdünner (SD) verdünnt. Werden PAI-1 Konzentrationen > 50 ng/ml erwartet, müssen die Proben in höherer Verdünnung (1:10, 1:20 oder höher) getestet werden.

Die Kontrollen CI und CII werden ebenfalls 1:5 mit F-Probenverdünner (SD) verdünnt.

Kalibratorverdünnungen:

Der mit 2,0 ml F-Probenverdünner (SD) rekonstituierte PAI-1-Standard mit der Konzentration „C ng/ml“ (siehe separat beiliegendes Datenblatt) wird wie folgt verdünnt:

PAI-1 Konzentration (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volumen PAI-1 Standard	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,05 ml	0 ml
Volumen F-Probenverdünner (SD)	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	0,9 ml	0,95 ml	1 ml

Diese Kalibratorverdünnungen vorsichtig durchmischen. Die Verdünnungen sind für mindestens 6 Stunden bei Raumtemperatur stabil.

Testdurchführung:

Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Dann nach folgendem Schema verfahren:

Reagenz	Volumen	Durchführung
Immunkonjugat (IC) (Mit 4,0 ml Konjugatverdünner rekonstituiert)	100 µl	In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren
Proben, Kalibratoren, Kontrollen, Leerwert (nur F-Probenverdünner)	100 µl	Unverzüglich in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren
Mischen (Manuell oder mit Schüttler), 60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren		
Waschlösung (20-fach mit aqua dest. verdünnt)	300 µl	5 aufeinanderfolgende Waschschrte mit dem Waschgerät durchführen (a)
TMB/H ₂ O ₂ Substrat (TMB)	200 µl	Unmittelbar nach dem letzten Waschschrte in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren (b, c)
Mischen, Farbentwicklung für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) ablaufen lassen (c)		
0,45M Schwefelsäure (SA)	50 µl	In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren um die Farbreaktion zu stoppen (b)
Nach 10 Minuten Wartezeit zur Stabilisierung die Absorption bei 450 nm (A ₄₅₀) messen (d) und den Blankwert abziehen.		

Anmerkung:

- Die Mikrotitervertiefungen dürfen zwischen der Zugabe einzelner Reagenzien oder nach einem Waschschrte niemals vollständig austrocknen. Um das Austrocknen der Mikrotitervertiefungen und damit eine Beschädigung der immobilisierten Komponenten zu vermeiden, muss das folgende Reagenz innerhalb der nächsten 3 Minuten zugegeben werden. Falls erforderlich, können die Mikrotitervertiefungen mit Waschlösung gefüllt verbleiben und erst kurz vor der Zugabe des folgenden Reagenz geleert werden. Um eine Verringerung der Aktivität zu vermeiden, muss das Waschgerät die Mikrotitervertiefungen schonend waschen.
- Bei der Zugabe des Substrates müssen die Zeitintervalle, Reihe für Reihe, genau festgelegt und exakt eingehalten werden. Dies gilt in gleicher Weise für die Zugabe der Stopplösung.
- Während der Inkubationsphasen, insbesondere während der Farbentwicklung, darf die Platte nicht dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden. Ein Mikrotiterplatten-Schüttler kann verwendet werden.
- Für eine bichromatische Ablesung können Referenzwellenlängen von 690 nm oder 620 nm verwendet werden.

ZWEISTUFEN-METHODE:

Der Test kann auch als Zweistufen-Methode durchgeführt werden.

- Der PAI-1 Standard wird ebenfalls mit 2,0 ml F-Probenverdünner (SD) rekonstituiert.
- Das Immunkonjugat (IC) wird (abweichend von der Einstufen-Methode) mit 7,5 ml Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert.
- Testplasma und Kontrollen mit F-Probenverdünner (SD) ebenfalls 1:5 (oder höher) vorverdünnen.
- In jede Mikrotiter-Vertiefung wird 100 µl Probenverdünner (SD) pipettiert.
- Unverzüglich danach werden jeweils 100 µl Probe, Kalibrator oder Kontrolle (entsprechend der Einstufenmethode) hinzugefügt.
- Anschließend wird 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubiert.
- Nach einem Waschschrte werden
- 200 µl Immunkonjugat (IC) in jede Vertiefung pipettiert.
- Es folgt ein weiterer Inkubationsschrte von 1 Stunde bei Raumtemperatur und
- ein weiterer Waschschrte.
- Danach werden 200 µl Substrat (TMB) in jedes Well pipettiert.
- Nach 5 Minuten werden 50 µl der Stopplösung zugegeben und die Absorption bei A₄₅₀ nm gemessen.

Die Anleitung zu den Waschschrten, Vorsichtsmaßnahmen sowie Interpretation der Ergebnisse sind ident mit der Einstufen-Methode.

ANGABE DER ERGEBNISSE:

- Auf linearem Millimeterpapier wird die PAI-1 Antigen Konzentration in ng/ml auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption A₄₅₀ auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Die Kurvenberechnung erfolgt z.B. mittels Akima oder smoothed cubic spline.
- Bei jedem Testansatz muss eine Kalibrationskurve unter Verwendung der Kalibrator-konzentrationen erstellt werden.
- Die PAI-1 Antigen Konzentration der Probe bzw. Kontrolle kann direkt von der erhaltenen Kalibrationskurve abgelesen werden. Bei verdünnten Proben muss der erhaltene Wert noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (5, 10,...). Eine beispielhafte Kalibrationskurve ist dem beiliegenden Datenblatt zu entnehmen. Die abgelesenen Ergebnisse für die Kontrollen CI und CII müssen mit 5 multipliziert werden.
- Alternativ kann eine ELISA-Software (z.B. Dynex, Biolise o.ä.) für die Berechnung der PAI-1 Antigen Konzentrationen herangezogen werden.

ERWARTETE WERTE:

- Die mit Zymustest PAI-1 Antigen gemessene Konzentration, liegt üblicherweise bei 1-25 ng/ml. (Anmerkung: Da kein internationaler Standard für PAI-1 Antigen verfügbar ist, gibt es bei den handelsüblichen PAI-1 Antigen Testen Unterschiede in der Standardisierung. Die Angabe des Messbereichs kann daher nur auf den jeweils verwendeten Testkit bezogen werden (6)).
- Die PAI-1 Konzentration steigt mit zunehmendem Alter an und ist abhängig vom Fettstoffwechsel, insbesondere von erhöhten Triglyzeridwerten.
- Die PAI-1 Konzentration schwankt im Tagesverlauf, die höchste Konzentration ist morgens nachweisbar.
- Die PAI-1 Antigen Konzentration steigt während der Schwangerschaft an.

BIOCHEMIE:

PAI-1 ist ein einkettiges 50 kDa-Glykoprotein, das von Endothelzellen und Hepatozyten synthetisiert wird. Im Plasma wird PAI-1 durch die Bindung an Vitronectin stabilisiert oder zirkuliert in inaktiver

Form, komplexiert mit tPA oder uPA. PAI-1 ist in latenter Form auch in Plättchen vorhanden. PAI-1 reguliert die Fibrinolyse durch die Inhibition von tPA oder Urokinase.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

- Erhöhte PAI-1 Antigen Konzentration finden sich bei thrombotischen Ereignissen, bösartigen Erkrankungen, hepatischen Störungen, in der postoperativen Phase und Sepsis. Weiters weisen maligne Gewebeproben erhöhte PAI-1 Antigen Werte auf.
- Mehrere Studien haben einen Zusammenhang zwischen erhöhten PAI-1 Konzentrationen und kardiovaskulären Risikofaktoren gezeigt (Adipositas, Hyperinsulinämie, Hypertriglyceridämie, arterielle Thrombosen etc.).

ANWENDUNGEN:

- Bestimmung von PAI-1 Antigen in klinischen Proben.
- Bestimmung von PAI-1 Antigen als kardiovaskulärer Risikofaktor.

TESTEIGENSCHAFTEN:

- Dieser Test, basierend auf einem monoklonalen Antikörper und zeigt eine homogene Reaktivität für die verschiedenen Formen von PAI-1 (latent, aktiv, gebunden an Vitronectin, komplexiert mit tPA bzw. uPA oder inaktiv).
- Detektionslimit ≤ 0.5 ng/ml.
- Intra-Assay: 3-8%.
- Inter-Assay: 5-10%.
- Keine signifikante Beeinflussung durch Heparin bis zu 2 IE/ml.

REFERENZEN:

- Declerck P.J., Alessi M.C., Verstreken M., Kruithof E.K.O., Juhan-Vague I., Collen D.: Measurement of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked-immunosorbent assay. Blood; 1998, 71, 220-25.
- Loskutoff D.J., Samad F.: The adipocyte and hemostatic balance in obesity. Studies on PAI-1. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1998, 18, 1-6.
- Fujii S.: PAI-1 in Thrombosis and Arteriosclerosis. Fibrinolysis and Proteolysis, 1997, 11, 137-140.
- De Maat MPM, De Bart A.C.W., Hennis BC, Meijer P., Havelmaar AC, Mulder PG, Kluff C. : Interindividual and Intraindividual variability in plasma Fibrinogen, tPA antigen, PAI-1 Activity and CRP in healthy, young volunteers and patients with angina pectoris. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1996, 16, 1156-62
- Smith F.B., Lee A.J., Rumley A., Fowkes G.R., Lowe G.O.R. : Tissue-Plasminogen-Activator, Plasminogen Activator Inhibitor and risk of peripheral arterial disease. Arteriosclerosis, 1995, 115, 35-43.
- Declerck PJ et al., Multicenter evaluation of commercially available methods for the immunological determination of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Thromb. Haemost., 1993, 7