



ZYMUTEST™ PAI-1 Antigen

REF RK012A
96 Tests



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.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

ELISA-Testkit zur quantitativen Bestimmung von PAI-1 Antigen

VERWENDUNGSZWECK:

Der Testkit ZYMUTEST™ PAI-1 Antigen ist ein ELISA-Test zur quantitativen Bestimmung von PAI-1 Antigen (Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1) in humanem Plasma.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN:

Technisch:

PAI-1 ist ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 50 kDa, 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 Inhibierung von tPA oder Urokinase.

Klinisch:

Erhöhte PAI-1 Antigen Konzentration finden sich bei Thrombosen, hepatischen Störungen, in der postoperativen Phase und bei Sepsis. Weiters weisen maligne Gewebeprobe erhöhte PAI-1 Antigen Werte auf.

Neuere Studien haben einen Zusammenhang zwischen erhöhten PAI-1 Konzentrationen und kardiovaskulären Risikofaktoren gezeigt (Adipositas, Hyperinsulinämie, Hypertriglyceridämie, arterielle Thrombosen etc.).

Bestimmung von PAI-1: Ag in klinischen Proben.
Messung von PAI-1 als kardiovaskulärer Risikofaktor.

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 das verdünnte Testplasma zugegeben, wodurch die Immunreaktion startet. In der Probe vorhandenes PAI-1:Ag 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:Ag-Gehalt im Testplasma.

REAGENZIEIN:

- COAT ELISA Mikrotiterplatte:** 12x8 enthält 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem monoklonalen Anti-PAI-1 Antikörper. Die Platte ist stabilisiert und luftdicht zusammen mit einem Trockenmittel in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- SD FIBRINOLYSIS Probenverdünner:** 2 Flaschen mit je 50 mL, gebrauchsfertig. Enthält Proclin und BSA.
- STD PAI-1 Standard:** 3 Flaschen mit je 2 mL, lyophilisiert. Enthält Humanplasma und BSA.
- CI PAI-1 PAI-1 Kontrolle I Hoch:** 1 Flasche mit 1 mL, lyophilisiert. Enthält Humanplasma und humanes PAI-1.
- CII PAI-1 PAI-1 Kontrolle II Niedrig:** 1 Flasche mit 1 mL, lyophilisiert. Enthält Humanplasma und humanes PAI-1.
- IC Immunkonjugat (Anti-(h)-PAI-1-HRP Immunkonjugat):** 3 Flaschen mit je 4 mL monoklonalem Maus-Antikörper, spezifisch für humanes PAI-1:Ag und gekoppelt an Peroxidase (HRP), lyophilisiert. Enthält BSA.
- CD ELISA Konjugatverdünner:** 1 Flasche mit 25 mL, gebrauchsfertig. Enthält Proclin und BSA.
- WS ELISA Waschlösung:** 1 vial mit 50 mL, 20x 20-fach konzentriert. Enthält Proclin.
- TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin:** 1 Flasche mit 25 mL, gebrauchsfertig. Enthält Wasserstoffperoxid (H₂O₂).
- Stop 0.45M Schwefelsäure:** 1 Flasche mit 6 mL, gebrauchsfertig.

Die Konzentrationen von Standard und Kontrollen können von Charge zu Charge leicht variieren. Die exakten chargenspezifischen Werte sind dem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE:

- Für die Herstellung einiger der in diesem Testkit enthaltenen Reagenzien wird Material humanen und tierischen Ursprungs verwendet. Verwendetes Humanplasma wurde mit anerkannten Methoden auf HIV 1- und HIV 2-Antikörper, HCV-Antikörper und HBs-Ag untersucht und für negativ befunden. Kein Test kann jedoch die Abwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit garantieren. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen deshalb mit größter Sorgfalt und unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.
- Bei der Entsorgung von Restmaterial sind die geltenden lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Benutzen Sie nur Reagenzien, die aus ein- und derselben Charge des Testkits stammen.
- Alterungsstudien zeigen, dass die Reagenzien bei Raumtemperatur versandt werden können und für den Versand bei Raumtemperatur stabil sind.
- Dieses *In-vitro*-Diagnostikum ist für den Einsatz im Labor vorgesehen.

REAGENZIEVORBEREITUNG:

Die Mikrotiterstreifen und Reagenzien müssen vor Gebrauch für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Gummistopfen der Flaschen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden.

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.

Den Inhalt jeder Flasche rekonstituieren mit exakt:

STD → 2 mL **SD FIBRINOLYSIS** um eine Lösung zu erhalten, die ca. 10 ng/mL PAI-1:Ag enthält. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

CI PAI-1 → 1 mL **Aqua dest.** Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

CII PAI-1 → 1 mL **Aqua dest.** Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

IC → 4 mL **CD ELISA** mindestens 15 Minuten vor Gebrauch. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts vorsichtig durchmischen.

SD FIBRINOLYSIS **TMB** **Stop** **CD ELISA**

Gebrauchsfertige Reagenzien.

WS ELISA Die Flasche schütteln und die Waschlösung **1:20 mit Aqua dest.** verdünnen (aus 50 mL Konzentrat lässt sich folglich 1 L verdünnte Waschlösung herstellen). Falls nötig im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Feststoffe inkubieren.

Eine Gelbfärbung des **TMB** Substrats deutet auf eine Kontamination hin. Die Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche zu verwenden.

LAGERUNG UND STABILITÄT:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie können bis zu dem auf dem Set aufgedruckten Verfalldatum verwendet werden.

COAT Nicht benötigte Streifen können im Original-Aluminiumbeutel (verschlossen, in Gegenwart des Trockenmittels), im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt und geschützt vor jeglicher Feuchtigkeit für **4 Wochen** bei 2-8°C gelagert werden.

Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

STD → **8 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C).

CI PAI-1 **CII PAI-1**

→ **24 Stunden** bei 2-8°C.
→ **8 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C).
→ **2 Monate** gefroren bei ≤ -20°C*

*Kann einmalig bei 37°C aufgetaut werden und muss dann umgehend verwendet werden.

IC → **4 Wochen** bei 2-8°C.

→ **24 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C).

Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach dem Öffnen unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

SD FIBRINOLYSIS

→ **4 Wochen** bei 2-8°C.

WS ELISA → **4 Wochen** bei 2-8°C.

→ **7 Tage** bei 2-8°C (verdünnte Lösung).

Stop **CD ELISA** **TMB**

→ **8 Wochen** bei 2-8°C.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZIEIN UND AUSTRÜTUNGEN:

Reagenzien:

- Aqua dest.

Materialien:

- 8-Kanal- oder Repetierpipette mit einem Pipettivolumen im Bereich von 50-300 µL.
- Einkanalpipetten mit variablen Pipettivolumina in den Bereichen von jeweils 0-20, 20-200 und 200-1000 µL
- Mikrotiterplattenwascher und -schüttler
- Mikrotiterplattenleser zur Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm

GEWINNUNG UND HERSTELLUNG DER PROBEN:

Das Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulans (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion mit einer Nadel. Das erste Röhrchen darf nicht verwendet werden. EDTA-Plasma kann ebenfalls verwendet werden. Herstellung und Aufbewahrung der Proben müssen in Einklang mit den gültigen örtlichen Vorschriften erfolgen (für die USA: Bitte beziehen Sie sich auf die Empfehlungen den CLSI GP44-A4⁷ (und CLSI H21-A5⁸) für weitere Informationen über Probengewinnung, Handhabung und Aufbewahrung).

Zur Plasma-Lagerung verweisen wir auf Referenzen^{7,8}.

Der Inhalt dieses Dokuments dient lediglich als Beispiel. Die aktuellste Version finden Sie in unserem geschützten Downloadbereich unter https://www.coachrom.com/insert. Bei Bedarf senden wir sie Ihnen aber auch gerne zu, bitte anfordern unter: info@coachrom.com

VORGEHENSWEISE:

Testdurchführung, Einstufen-Methode:

1. Proben und Kontrollen sind wie folgt unter Verwendung von **SD FIBRINOLYSIS** zu verdünnen:

Proben	Verdünnung
Kontrollen	1:5
Proben	1:5

Werden PAI-1:Ag-Konzentrationen > 50 ng/mL erwartet, müssen die Proben in höherer Verdünnung (1:10, 1:20 oder höher) getestet werden.

2. Unter Verwendung von **STD** mit einer Konzentration von "C" in ng/mL sind folgende Kalibrationslösungen herzustellen:

PAI-1-Konzentration (ng/mL)	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
Volumen STD	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,1 mL	0,05 mL	0 mL
Volumen SD FIBRINOLYSIS	0 mL	0,5 mL	0,75 mL	0,9 mL	0,95 mL	1 mL

Die Kalibrationslösungen werden vorsichtig durchmischt und sind für **6 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil.

3. Die Mikrotiterstreifen in den mitgelieferten Rahmen legen. Die Reagenzien in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte **COAT** pipettieren und den Test nach folgendem Schema durchführen:

Reagenz	Volumen	Durchführung
IC	100 µL	IC in die Vertiefungen pipettieren
STD oder CI PAI-1 oder CII PAI-1 oder zu testende Proben oder SD FIBRINOLYSIS (Leerwert)	100 µL	Unverzüglich in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren: STD oder CI PAI-1 oder CII PAI-1 oder zu testende Proben oder SD FIBRINOLYSIS
Vorsichtig entweder manuell oder auf einem Mikrotiterplattenschüttler mischen. Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (a)		
WS ELISA	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschriffe durchführen (a)
TMB	200 µL	Das Substrat unverzüglich in die Vertiefungen hinzupipettieren. Anmerkung: Die Verteilung des Substrats muss Reihe für Reihe genau und in exakten Zeitintervallen erfolgen (b,c).
Die Farbentwicklung für genau 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) ablaufen lassen (c)		
Stop	50 µL	Mit exakt identischer Verteilung und Zeitintervallen wie vorher für das Substrat Reihe für Reihe die 0,45 M Schwefelsäure in die Vertiefungen hinzupipettieren, um die Farbentwicklung zu stoppen (b,c).
Nach 10 Minuten Wartezeit zur Stabilisierung der Farbe ist die Absorption bei 450 nm zu messen und der Leerwert zu subtrahieren (d).		

- Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden. Es kann ein Mikrotiterplattenschüttler verwendet werden.
- Im Zuge des Hinzufügens der Reagenzien oder der Entfernung der Waschlösung nach jedem einzelnen Waschschriff dürfen die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen niemals austrocknen, da dies die an der Platte immobilisierten Komponenten beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 3 Minuten nach Entfernung der Waschlösung in die einzelnen Vertiefungen pipettiert werden. Falls nötig, kann die Platte mit Waschlösung gefüllt bleiben und erst direkt vor Zugabe des nächsten Reagenzes geleert werden. Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und ein abruptes Entfernen der Waschlösung vermieden wird.
- Die Zugabe des Substrats **TMB** von Reihe zu Reihe muss exakt und in genau definierten Zeitabständen erfolgen.
- Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von 620 oder 690 nm verwendet werden.

Variante: Zweistufen-Methode:

Der PAI-1:Ag Test kann auch als Zweistufen-Methode durchgeführt werden. Die Kalibrationskurve erstreckt sich von **0 bis C ng/ml** (wie bei der Einstufen-Methode). Der **STD** wird ebenfalls mit **2 mL SD FIBRINOLYSIS** rekonstituiert. Das **IC** wird (abweichend von der Einstufen-Methode) mit **7,5 mL CD ELISA** rekonstituiert. Das Testplasma muss mit fünffacher Verdünnung (1:5) bzw., falls höhere Konzentrationen als 50 ng/mL erwartet werden, mit höherer Verdünnung in **SD FIBRINOLYSIS** getestet werden.

In jede Mikrotiter-Vertiefung werden **100 µL SD FIBRINOLYSIS** pipettiert, unverzüglich danach folgen **100 µL** der Kalibrationslösung (vorbereitet entsprechend der Einstufen-Methode) oder **100 µL** des 1:5 verdünnten Testplasmas (Probe oder Kontrolle) (oder falls nötig mehr). Nach einer Inkubation von **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-25°C) und einem Waschschriff werden **200 µL IC** pro Vertiefung pipettiert. Es folgen ein weiterer Inkubationsschriff für **1 Stunde** bei Raumtemperatur und ein weiterer Waschschriff, danach werden **200 µL TMB** pro Vertiefung pipettiert. Nach **5 Minuten** werden **50 µL Stop** pro Vertiefung zugegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Anleitung zu den Waschschriffen, Vorsichtsmaßnahmen sowie Interpretation der Ergebnisse sind ident mit der Einstufen-Methode.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Gebrauch der gleichen Reagenzchargen die Validierung der Methodenkonformität und der homogenen Reaktivität des Tests.

Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. Für jede Testserie ist eine neue Kalibrationskurve zu erstellen.

In diesem Fall muss das Labor die Vertrauensbereiche festlegen und die erwarteten Leistungsmerkmale in seinem Analysesystem prüfen.

ERGEBNISSE:

- Die PAI-1-Konzentration in ng/mL wird auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption A450 auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen, wobei das „best fit“-Interpolationsverfahren zu wählen ist (das der Packung beiliegende Datenblatt ist zu beachten)
- Die Ergebnisse werden unter Verwendung der Kalibrationskurve mit den für die Proben und Kontrollen erhaltenen Absorptionen bei 450 nm ausgedrückt.
- Für die Messung der PAI-1:Ag Konzentration sollte nur die für die jeweilige Testserie erstellte Kalibrationskurve verwendet werden. Die PAI-1:Ag Konzentration der getesteten Probe wird von der erhaltenen Kurve abgeleitet. Bei verdünnten Proben muss der erhaltene Wert noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (5, 10, 20,...) (siehe Beispiel im beiliegenden Datenblatt).
- Die für **CI PAI-1** und **CII PAI-1** gemessenen Konzentration müssen mit 5 multipliziert werden.
- Alternativ kann eine ELISA-Software (z.B. Dynex, Biolise o.ä.) für die Berechnung der PAI-1:Ag Konzentrationen herangezogen werden.
- Die Ergebnisse müssen nach dem klinischen Zustand des Patienten interpretiert werden.

EINSCHRÄNKUNGEN:

- Bitte befolgen Sie die von HYPHEN BioMed validierten technischen Anweisungen auf Genaueste, um optimale Testergebnisse zu erzielen und den Spezifikationen zu entsprechen.
- Jedes Reagenz mit einem ungewöhnlichen Aussehen oder Anzeichen einer Kontamination muss verworfen werden.
- Auffällige Proben oder solche, die Anzeichen einer Aktivierung aufweisen, müssen verworfen werden.
- Wird ein Waschschriff nicht korrekt ausgeführt, kann die Negativkontrolle einen hohen Extinktionswert hervorufen. Um nicht-spezifische Farbentwicklung zu vermeiden, ist sicherzustellen, dass alle Waschschriffe korrekt ausgeführt werden

ERWARTETE WERTE:

- Der Referenzbereich des ZYMUTEST™ PAI-1 Antigen beträgt 1-25 ng/mL.
Anmerkung: Da kein internationaler Standard für PAI-1 Antigen verfügbar ist, gibt es bei den handelsüblichen PAI-1:Ag Testen Unterschiede in der Standardisierung. Die Angabe des Referenzbereichs kann daher nur auf den jeweils verwendeten Testkit bezogen werden.
- 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:Ag Konzentration steigt während der Schwangerschaft an.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Dieser auf einem monoklonalen Antikörper basierende Test zeigt eine homogene Reaktivität für die verschiedenen Formen von PAI-1 (latent, aktiv, gebunden an Vitronectin, komplexiert mit tPA bzw. uPA oder inaktiv).
- Nachweisgrenze ≤ 0,5 ng/mL.
- Intra-Assay-VK: 3-8%.
- Inter-Assay-VK: 5-10%.
- Keine Beeinflussung durch Heparine bis zu 2 IE/mL.

LITERATUR:

- Declerck P.J. et al. Measurement of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked-immunosorbent assay. Blood. 1998..
- Loskutoff D.J. and Samad F. The adipocyte and hemostatic balance in obesity. Studies on PAI-1. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1998.
- Fujii S. PAI-1 in Thrombosis and Arteriosclerosis. Fibrinolysis and Proteolysis. 1997.
- De Maat MPM et al. 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.
- Smith F.B. et al. Tissue-Plasminogen-Activator, Plasminogen Activator Inhibitor and risk of peripheral arterial disease. Arteriosclerosis, 1995.
- Declerck PJ et al., Multicenter evaluation of commercially available methods for the immunological determination of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Thromb. Haemost. 1993.
- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

SYMBOLE:

Die Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 aufgeführt, bitte beziehen Sie sich auf das beiliegende Dokument Definition der Symbole.

CD ELISA SD FIBRINOLYSIS WS ELISA H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Aktualisierung gegenüber der vorherigen Version.