

ZYMUTEST™ PAI-1 Aktivität

Art.Nr. RK019A

Bio-Immuno-Assay-Kit zur Bestimmung der Aktivität von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 11
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

VERWENDUNGSZWECK:

Der ZYMUTEST™ PAI-1 Aktivität ist ein Bio-Immuno-Assay zur Bestimmung der Aktivität von humanem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) im Blutplasma oder anderen biologischen Flüssigkeiten.

TESTPRINZIP:

Auf die mit rekombinantem Gewebe-Typ-Plasminogen-Aktivator (tPA) beschichtete Mikrotiterplatte wird zunächst ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter monoklonaler Anti-PAI-1-Antikörper (Immunkonjugat) pipettiert. Anschließend wird die verdünnte Probe dazugegeben und darin vorhandenes aktives PAI-1 bindet einerseits an den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten tPA, andererseits an das in Lösung befindliche Immunkonjugat. Nach einem Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid hinzugefügt. So erfolgt die HRP-vermittelte Oxidation von TMB zu einem blauen Farbstoff, der beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach gelb umschlägt. Die Farbintensität ist direkt proportional zur PAI-1-Aktivität in der Probe.

PROBENMATERIAL:

- Humanes Citrat-, CTAD- oder EDTA-Plasma.
- Andere biologische Flüssigkeiten.

IM TESTKIT ENTHALTENE KOMPONENTEN:

- **COAT:** Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Streifen mit 8 Vertiefungen, beschichtet mit rekombinantem tPA. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- **SD:** 2 Flaschen mit je 50 mL **F(ibrinolyse)-Probendiluent**, gebrauchsfertig. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **Cal:** 3 Flaschen **PAI-1-Aktivität-Kalibrationsplasma**, lyophilisiert.
- **CI und CII:** Je 1 Flasche **PAI-1-Kontrollplasma I (hoch)** und **PAI-1-Kontrollplasma II (niedrig)**, lyophilisiert.
- **CD:** 1 Flasche mit 25 mL **Konjugatdiluent**, gebrauchsfertig. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **IC:** 3 Flaschen **Anti-PAI-1-HRP-Immunkonjugat**, ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter, monoklonaler, für humanes PZ spezifischer Maus-Antikörper, lyophilisiert.
- **WS:** 1 Flasche mit 50 mL 20-fach konzentrierter **Waschlösung**. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **TMB:** 1 Flasche mit 25 mL **Peroxidasesubstrat** (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), versetzt mit Wasserstoffperoxid, gebrauchsfertig.
- **SA:** 1 Flasche mit 6 mL **Stopplösung** (0,45 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig.

Anmerkung: Zur Testdurchführung dürfen ausschließlich Komponenten aus Testkits derselben Charge verwendet werden. Davon ausgenommen sind Probendiluent (SD), Kontrollplasmen (CI und CII), Konjugatdiluent (CD), Waschlösung (WS), Peroxidasesubstrat (TMB) und Stopplösung (SA).

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENTHALTEN SIND:

- Aqua dest.
- Einkanalpipetten.
- 8-Kanal- oder Repetierpipette.
- Mikrotiterplattenwascher (optional).
- Mikrotiterplattenleser mit einer Messwellenlänge von 450 nm.

VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER KOMPONENTEN:

In der Originalverpackung bei 2-8°C gelagert sind die ungeöffneten Komponenten bis zum auf dem jeweiligen Etikett gedruckten Ablaufdatum haltbar.

- **COAT (ELISA-Mikrotiterplatte):** Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und innerhalb von 30 Minuten verwenden. Nicht benötigte Streifen werden in Gegenwart des Trockenmittels im Aluminiumbeutel wiederverschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Auf solche Weise bei 2-8°C gelagert, sind sie bis zum Ablaufdatum haltbar.
- **F-Probendiluent (SD):** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das F-Probendiluent, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.

- **Cal:** Mit 2 mL **F-Probendiluent (SD)** rekonstituieren. Das rekonstituierte Kalibrationsplasma ist 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 24 Stunden bei 2-8°C stabil.
- **CI und CII:** 30 Minuten vor Gebrauch mit 1 mL **Aqua dest.** rekonstituieren. Die rekonstituierten Kontrollplasmen sind 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C), 24 Stunden bei 2-8°C und 2 Monate bei ≤ -20°C stabil.

Anmerkung: Der Sollwert des Kalibrationsplasmas (Cal) sowie der Sollbereich der Kontrollplasmen (CI und CII) sind chargenabhängig und werden für jede Charge genau in Bezug auf den aktuellen WHO-Standard bestimmt. Sie werden auf dem beiliegenden Datenblatt angeführt.

Warnhinweis: Sowohl das Kalibrationsplasma (Cal) als auch die Kontrollplasmen (CI und CII) wurden aus humanem Plasma gewonnen, das mit validierten Methoden auf HBsAg, HCV-Antikörper sowie HIV-Antikörper untersucht und für negativ befunden wurde. Kein Test kann jedoch die Abwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit garantieren. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen deshalb unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

- **CD:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Konjugatdiluent, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.
- **IC:** Mit 2 mL bzw. 7,5 mL (siehe Abschnitt „Testdurchführung“) **Konjugatdiluent (CD)** rekonstituieren. Das rekonstituierte Immunkonjugat ist 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 4 Wochen bei 2-8°C stabil.
- **WS:** Für 15 bis 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Kristalle inkubieren. Schütteln und das für die Testreihe erforderliche Volumen 1:20 mit **Aqua dest.** verdünnen. Aus 50 mL Konzentrat lässt sich folglich 1 L verdünnte Waschlösung herstellen. Nach dem Öffnen ist das Konzentrat 4 Wochen bei 2-8°C haltbar. Nach Verdünnung kann die Waschlösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 1 Woche bei 2-8°C gelagert werden.
- **TMB:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Peroxidasesubstrat, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.
- **SA:** Gebrauchsfertig.

Anmerkung: Die erforderlichen Komponenten müssen 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 Testkits ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Komponenten bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Probengewinnung:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in Trinatrium-Citrat (0,109 M), CTAD oder Dinatrium-EDTA (1 Volumenteil) abgenommen und für 20 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma muss innerhalb von 4 Stunden getestet oder kann für bis zu 6 Monate bei ≤ -20°C gelagert werden. Gefrorenes Citratplasma wird im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und muss innerhalb von 4 Stunden getestet werden.

Anmerkungen:

- Für die Blutabnahme wird die Verwendung von CTAD-Röhrchen empfohlen. CTAD verhindert die Aktivierung von Thrombozyten, die große Mengen an PAI-1 freisetzen können.
- Der PAI-1-Spiegel im Plasma unterliegt tageszeitabhängigen Schwankungen. Daher sollte die Blutabnahme morgens im nüchternen Zustand erfolgen.

Proben und Kontrollen:

Proben- und Kontrollplasmen (CI und CII) werden 1:2 mit **F-Probendiluent (SD)** verdünnt getestet. Bei einer erwarteten PAI-1-Aktivität von > 20 ng/mL können Proben in höherer Verdünnung (z.B. 1:5) getestet werden.

Kalibration:

Unter Verwendung des Kalibrationsplasmas (Cal) mit einer PAI-1-Aktivität von **C ng/mL**, die auf dem beiliegenden Datenblatt angeführt ist, werden folgende Kalibrationslösungen hergestellt, die für 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil sind:

PAI-1-Aktivität (ng/mL)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volumen Kalibrationsplasma (Cal)	1.000 µL	500 µL	250 µL	100 µL	50 µL	0 µL
Volumen Probendiluent (SD)	0 µL	500 µL	750 µL	900 µL	950 µL	1.000 µL

Testdurchführung:

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

Ein-Stufen-Test

Reagenz	Volumen	Vorgehen
Immunkonjugat (IC), mit 2 mL Konjugatdiluent rekonstituiert	50 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ¹
Leerwert (Probendiluent), Kalibrationslösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:2 verdünnt) oder Proben (1:2 verdünnt)	200 µL	
Schütteln und für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ²		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschriffe (optional mit einem Waschgerät). ³
Peroxidasesubstrat (TMB)	200 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ⁴
Für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ^{2,5}		
Stopplösung (SA)	50 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ⁴
Für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren ² , die Absorption bei 450 nm (A ₄₅₀) messen ⁶ und den Leerwert abziehen.		

Zwei-Stufen-Test

Reagenz	Volumen	Vorgehen
Leerwert (Probendiluent), Kalibrationslösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:2 verdünnt) oder Proben (1:2 verdünnt)	200 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ¹
Schütteln und für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ²		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschriffe (optional mit einem Waschgerät). ³
Immunkonjugat (IC), mit 7,5 mL Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert	200 µL	In die Vertiefungen pipettieren.
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ²		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschschriffe (optional mit einem Waschgerät). ³
Peroxidasesubstrat (TMB)	200 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ⁴
Für 5 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. ^{2,5}		
Stopplösung (SA)	50 µL	In die Vertiefungen pipettieren. ⁴
Für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren ² , die Absorption bei 450 nm (A ₄₅₀) messen ⁶ und den Leerwert abziehen.		

Anmerkungen:

- Um eine homogene Antigenbindung zu gewährleisten müssen die Kalibrationslösungen, Kontrollen und Proben so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 10 Minuten pipettiert werden.
- Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden.
- Die Vertiefungen müssen schonend gewaschen werden und dürfen nach Entfernung der Waschlösung nach jedem Waschschriffe nicht austrocknen, da dies die darin immobilisierten Komponenten beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 3 Minuten nach Entfernung der Waschlösung pipettiert werden.
- Die Zugabe des Peroxidasesubstrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen. Diese Zeitabstände müssen bei der anschließenden Zugabe der Stopplösung eingehalten werden.
- Abhängig von der im Labor vorherrschenden Raumtemperatur kann die Farbentwicklung verkürzt werden, um eine optimale Reaktion (A₄₅₀-Wert der Kalibrationslösung C ≈ 2) zu erzielen.
- Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von 620 oder 690 nm verwendet werden.

ERGEBNISBERECHNUNG:

Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden die A₄₅₀-Werte der einzelnen Kalibrationslösungen gegen die jeweiligen errechneten PAI-1-Aktivitäten aufgetragen. Die Interpolation erfolgt z.B. durch quadratische Regression (Polynom zweiter Ordnung).

Anhand dieser Kalibrationskurve werden ausgehend von den A₄₅₀-Werten der Proben und Kontrollen die jeweiligen PAI-1-Aktivitäten ermittelt und mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert.

BIOCHEMIE:

PAI-1 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa und gehört zur Familie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). Er wird von Fettzellen, Leberzellen, Megakaryozyten und glatten Muskelzellen synthetisiert. Im Blut kommt PAI-1 einerseits im Plasma (ca. 1 bis 60 ng/mL), andererseits in Thrombozyten (ca. 200 bis 300 ng/mL) vor.

Aktiver PAI-1 ist instabil und geht innerhalb weniger Minuten in eine inaktive Konformation über. Im Plasma wird das aktive Molekül jedoch durch Bindung an Vitronectin stabilisiert. Somit liegt plasmatischer PAI-1 größtenteils in aktiver Form vor, während thrombozytärer PAI-1 vorwiegend inaktiv ist.

PAI-1 ist der wichtigste physiologische Inhibitor des Gewebe-Typ- und des Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivators (tPA und uPA). Durch Hemmung von tPA verhindert PAI-1 eine vorzeitige Auflösung des nach einer Verletzung der Blutgefäßwand entstehenden Blutgerinnsels. Durch Hemmung von uPA fungiert PAI-1 als Regulator der perizellulären Proteolyse im Rahmen von Gewebsumbau und Tumorerkrankung. Nach irreversibler Bindung an seine Substrate wird PAI-1 rasch aus dem Kreislauf eliminiert und in der Leber abgebaut.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

Mangelzustände sind extrem selten und können entweder quantitativ (Typ I) oder qualitativ (Typ II) sein. Es gibt jedoch Hinweise, dass niedrige PAI-1-Spiegel bei Vorliegen eines Von-Willebrand-Syndroms mit erhöhtem Blutungsrisiko einhergehen.

Etliche Studien haben einen Zusammenhang zwischen dem weitläufiger erhöhten PAI-1-Spiegel und Herz-Kreislauf-Erkrankungen gezeigt. Insbesondere wurde erhöhter PAI-1 als Risikofaktor für Atherosklerose, tiefe Beinvenenthrombosen und Myokardinfarkte beschrieben.

Erhöhte PAI-1-Spiegel finden sich außerdem typischerweise beim metabolischen Syndrom, das stark mit der Entwicklung von Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskulären Krankheitsbildern assoziiert ist.

Des Weiteren ist PAI-1 über verschiedene Mechanismen an der Regulierung von tumoralen Prozessen beteiligt und dient daher als positiver prognostischer Marker für eine Reihe maligner Erkrankungen.

TESTEIGENSCHAFTEN:

- Referenzbereich: < 5 ng/mL.
- Dynamischer Messbereich: 0-20 ng/mL.
- Nachweisgrenze: ≤ 0,5 ng/mL.
- Intra-Assay-VK: 3-8%.
- Inter-Assay-VK: 5-10%.

REFERENZEN:

- Abdul S, Boender J, Malfliet JJMC et al. Plasma levels of plasminogen activator inhibitor 1 and bleeding phenotype in patients with von Willebrand disease. *Haemophilia* 2017; 23: 437-43.
- Alessi MC, Peiretti F, Morange P et al. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: Possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* 1997; 46: 860-7.
- Booth NA, Simpson AJ, Croll A et al. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br J Haematol* 1988; 70: 327-33.
- Declerck PJ, Alessi MC, Verstreken M et al. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1998; 71: 220-5.
- Dellas C & Loskutoff DJ. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 2005; 93: 631-40.
- De Maat MPM, De Bart ACW, Hennis BC 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; 16: 1156-62.
- Fujii S. PAI-1 in thrombosis and arteriosclerosis. *Fibrinolysis Proteol* 1997; 11: 137-40.
- Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC et al. Deficient t-PA release and elevated PAI inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1987; 57: 67-72.
- Loskutoff DJ & Samad F. The adipocyte and hemostatic balance in obesity: Studies on PAI-1. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1-6.
- Smith FB, Lee AJ, Rumley A et al. Tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and risk of peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 1995; 115: 35-43.
- Van De Craen B, Declerck PJ & Gils A. The biochemistry, physiology and pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thromb Res* 2012; 130: 576-85.

Änderungen im Vergleich zur Vorversion