

ZYMUTEST® PAI-1 Aktivität (Art.Nr. RK019A)

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

VERWENDUNGSZWECK:

Der ZYMUTEST PAI-1 Aktivität ist ein Bio-Immuno-Assay zur Bestimmung der Aktivität von humanem Gewebe-Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) im Plasma und anderen Flüssigkeiten die PAI-1 enthalten.

TESTPRINZIP:

Das verdünnte Testplasma bzw. die biologische Flüssigkeit wird zunächst in die mit rekombinanten tPA beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Der vorhandene, aktive PAI-1 bindet an tPA und ist so an die Platte fixiert. Nach einem Waschschriff wird das Immunkonjugat, ein HRP-konjugierter, monoklonaler Maus-Antikörper, spezifisch für humanen PAI-1, zugegeben und bindet an die freien Epitope des immobilisierten PAI-1. Nach einem zweiten Waschschriff wird das Peroxidasesubstrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zugegeben. Unter diesen Bedingungen färbt sich TMB blau und schlägt beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach gelb um. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur PAI-1-Aktivität der Probe.

PROBENMATERIAL:

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

REAGENZILIEN:

- COAT:** ELISA-Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, beschichtet mit rekombinanten tPA. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- SD:** 2 Flaschen mit je 50 ml F(Ibrinolyse)-Probenverdünner, gebrauchsfertig.
- CAL:** 3 Flaschen PAI-1 Aktivität Kalibrator, lyophilisiert. Rekonstitution mit 2,0 ml F-Probenverdünner (SD). Die exakte PAI-1 Aktivität ist dem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen (etwa 10 ng/ml).
- CI:** 1 Flasche mit 1,0 ml PAI-1 Kontrollplasma I (Hoch), lyophilisiert.
- CII:** 1 Flasche mit 1,0 ml PAI-1 Kontrollplasma II (Niedrig), lyophilisiert.

Anmerkung: Die PAI-1 Aktivität Sollwerte und Vertrauensbereiche der Kontrollen können von Charge zu Charge unterschiedlich sein, sind jedoch für jede Charge auf dem beiliegenden Datenblatt exakt angegeben.

- IC:** 3 Flaschen Anti-(h)-PAI-1-HRP Immunkonjugat, ein HRP-konjugierter, monoklonaler Antikörper, lyophilisiert.
- CD:** 1 Flasche mit 25 ml Konjugatverdünner, gebrauchsfertig.
- WS:** 1 Flasche mit 50 ml 20-fach konzentrierter Waschlösung.
- TMB:** 1 Flasche mit 25 ml Peroxidasesubstrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), versetzt mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂), gebrauchsfertig.
- SA:** 1 Flasche mit 6 ml Stopplösung (0,45 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig

Anmerkung: Zur Testdurchführung dürfen ausschließlich Komponenten aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Es dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern kombiniert werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENHALTEN SIND:

- 8-Kanal- oder Repetierpipette mit einem Pipettiervolumen im Bereich von 50-300 µl
- Einkanalpipetten mit Pipettiervolumina 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
- Aqua dest.

VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZILIEN:

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

- 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.
- F-Probenverdünner (SD):** 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.
- PAI-1 Aktivität Kalibrator:** Um die Kalibrationslösung mit der Konzentration „C“ in ng/ml zu erhalten, den Inhalt der Flasche mit **2,0 ml F-Probenverdünner** rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig schütteln. Die Lösung ist für mindestens **8 Stunden bei Raumtemperatur** und **24 Stunden bei 2-8°C** stabil.

- CI:** PAI-1 Kontrollplasma I (Hoch): Mit **1,0 ml** Aqua dest. rekonstituieren.
- CII:** PAI-1 Kontrollplasma II (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: Die Kontrollplasmen werden aus humanem Plasma gewonnen, das mit validierten Methoden auf HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-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.

- Anti-(h)-PAI-1-HRP Immunkonjugat (IC):** Den Inhalt der Flasche mit **7,5 ml Konjugatverdünner (CD)** rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig schütteln. Das rekonstituierte Konjugat ist **24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 4 Wochen bei 2-8°C** stabil.
- 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.
- Waschlösung (WS):** Für 15-30 Minuten im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Feststoffe 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 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.
- TMB Substrat (TMB):** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Substrat, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.
- 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 Testpackungen ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Komponenten bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Probengewinnung:

Blut (9 Volumenteile) wird in 0,109 M Citrat oder in CTAD (Citrat-Theophyllin-Adenosin-Dipyridamol) als Antikoagulanzen (1 Volumenteil) abgenommen und für 20 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma muss innerhalb von 4 Stunden getestet werden. Alternativ kann es für bis zu 6 Monate bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Das gefrorene Plasma muss vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut und innerhalb von 4 Stunden getestet werden.

PAI-1 Antigen kann durch die Aktivierung von Plättchen freigesetzt werden. Der von den Plättchen freigesetzte PAI-1 ist größtenteils in inaktiver bzw. latenter Form vorhanden, um die Freisetzung zu vermeiden, müssen die Plättchen bestmöglich entfernt werden. Daher wird die Verwendung von CTAD Blutabnahmeröhrchen empfohlen.

Um tageszeitabhängige Schwankungen zu vermeiden, sollten Plasmen immer morgens vom nüchternen Patienten abgenommen werden.

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

Proben- oder Kontrollplasmen:

Die Proben müssen 1:2 (1+1) mit F-Probenverdünner (SD) verdünnt werden. Werden PAI-1 Konzentrationen >20 ng/ml erwartet, müssen die Proben in höherer Verdünnung (1:5, 1:10 oder höher) getestet werden.

Die Kontrollplasmen CI und CII werden ebenfalls 1:2 mit F-Probenverdünner (SD) verdünnt.

Kalibration:

Vom PAI-1 Kalibrator CAL mit der in der separaten Packungsbeilage angeführten Aktivität „C“ in ng/ml werden die nachstehenden Kalibratorverdünnungen hergestellt:

| PAI-1 Aktivität (ng/ml) | C | C/2 | C/4 | C/10 | C/20 | 0 |
|----------------------------------|------|--------|---------|--------|---------|------|
| PAI-1 Aktivität Kalibrator (CAL) | 1 ml | 0,5 ml | 0,25 ml | 0,1 ml | 0,05 ml | 0 ml |
| F-Probenverdünner (SD) | 0 ml | 0,5 ml | 0,75 ml | 0,9 ml | 0,95 ml | 1 ml |

Die Kalibrationslösungen werden vorsichtig durchmischt und sind für 4 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 vorgehen:

| Reagenz | Volumen | Vorgehen |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Leerwert (nur Probenverdünner), Kalibrationslösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:2 verdünnt) oder Proben (verdünnt) | 200 µl | In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren. |
| 60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren | | |
| Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt | 300 µl | 5 aufeinanderfolgende Waschschrte unter Verwendung eines Waschgerätes (a) |
| Immunkonjugat (IC), mit 7,5 ml Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert | 200 µl | In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren. |
| 60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren | | |
| Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt | 300 µl | 5 aufeinanderfolgende Waschschrte unter Verwendung eines Waschgerätes (a) |
| Peroxidasesubstrat (TMB) | 200 µl | Unmittelbar nach dem letzten Waschschrte in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren (b, c) |
| Farbentwicklung für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) ablaufen lassen (c) | | |
| Stopplösung (SA) | 50 µl | In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren, um die Farbreaktion zu stoppen (b) |
| Zur Stabilisierung der Farbe für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren, die Absorption bei 450 nm (A_{450}) messen und jeweils den Leerwert subtrahieren (d) | | |

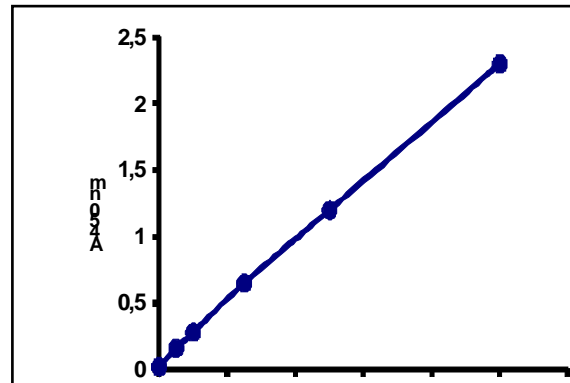
Anmerkung:

- 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 verhindern, 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 Reagenzes 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 direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden. Die Inkubationstemperatur von 18-25°C muss eingehalten werden, da die bei 405 nm gemessenen Werte sonst zu hoch (>25°C) oder zu niedrig (<18°C) sein könnten. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, soll ein Mikrotiterplatten-Schüttler nur zu Beginn eines Arbeitsschrittes für maximal 1-2 Minuten zum Einsatz kommen. Er soll ausschließlich für eine gute Homogenität in der Mikrotitervertiefung sorgen. Das Schütteln während der gesamten Inkubationszeit kann zu falsch hohen Absorptionen führen.
- Für eine bichromatische Ablesung können Referenzwellenlängen von 690 nm oder 620 nm verwendet werden.

ERGEBNISDARSTELLUNG:

- Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden die berechneten PAI-1 Aktivitätswerte in ng/ml auf der x-Achse gegen die bei 450 nm jeweils ermittelten Absorptionen (A_{450}) auf der y-Achse aufgetragen (lin-lin). Die Kurvenberechnung erfolgt z.B. mittels Akima oder smoothed cubic spline.
- Jeder Anwender muss seine eigene Kalibrationskurve in Abhängigkeit der Standardverdünnungen herstellen. Der Wert der PAI-1 Aktivität in der jeweiligen Verdünnung des Probenplasmas kann direkt von der erhaltenen Kalibrationskurve abgelesen werden. Um die PAI-1 Aktivität in der Probe zu erhalten, muss der erhaltene Wert noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (2, 5, 10, 20...).
- Die Werte für die Kontrollplasmen CI und CII müssen mit 2 multipliziert werden.
- Alternativ dazu kann eine Software zur Auswertung von ELISA-Testen zur Berechnung der Konzentrationen (z.B. Dynex, Biolise, etc.) verwendet werden.

BEISPIEL FÜR EINE KALIBRATIONSKURVE:



BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN:

- 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 Inhibierung von tPA oder Urokinase.
- Die PAI-1 Aktivität ist üblicherweise sehr gering (<5 ng/ml). Der größte Anteil an PAI-1 liegt in latenter oder inaktiver Form vor.

TESTEIGENSCHAFTEN:

Der auf einen monoklonalen Antikörper basierende Test ist spezifisch für die tPA gebundene aktive Form von PAI-1.

REFERENZEN:

- Declercq P.J., Alessi M.C., Verstreken M., Kruihof 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.