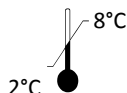


IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA

REF 822



Obelis s.a
 Bd. Général Wahis 53, 1030 Brussels, BELGIUM

INTENDED USE

The IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative measurement of human Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) antigen in plasma. This assay is for *in vitro* diagnostic use.

EXPLANATION OF THE TEST

Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1), a primary regulator of fibrinolysis, has been found in a number of different tissues, and cell types including macrophages/monocytes, hepatocytes, vascular endothelia, adipose tissue of the heart and lungs, and in platelets.^{1,2} The clinical interest in measuring PAI-1 in plasma is based on case studies in which levels of this serine protease inhibitor are associated with various thrombotic and fibrinolytic complications. Deficiency of PAI-1 activity is associated with bleeding disorders wherein the routine haemostatic screening tests are normal.^{3,4} High levels of PAI-1 activity are found in patients suffering from myocardial infarction, haemolytic uremic syndrome, and stroke.⁵⁻⁹ Levels of PAI-1 in the plasma of pregnant women are also correlated with gestational diabetes, reduced placental blood flow and preeclampsia.^{10,11,12} Patients with cirrhosis may also have elevated levels of PAI-1.¹³

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The IMUBIND Plasma PAI-1 ELISA uses microwells coated with a mouse monoclonal antibody directed against human PAI-1. PAI-1 standards and plasma samples are added to the wells and the antibody captures the PAI-1 antigen present during an incubation period. A peroxidase conjugated antibody against human PAI-1 is added to the well and this conjugate binds to the captured PAI-1 molecules. All unbound material is washed away and a peroxidase reactive enzyme substrate, ortho-phenylenediamine (OPD) is added to the wells. The subsequent peroxidase/substrate reaction yields a yellow colored solution. Addition of sulfuric acid stops the reaction and turns the color of the solution color orange. The absorbance of the solution is measured at 490 nm. The absorbance is directly proportional to the amount of PAI-1 present in the sample.

REAGENTS

- R1 96 Monoclonal Antibody Anti-Human PAI-1 Coated Microwells with 1 Acetate Sheet to cover the microwells during assays
- R2 1 vial PET Buffer (PBS-EDTA-Tween 20, powder), 15.15 g
- R3 1 vial PAI-1 Standard, 50 ng/mL (lyophilized)
- R4 1 vial PAI-1 Standard, 0 ng/mL (lyophilized)
- R5 1 vial Detection Antibody, 200 µL (concentrate)
- R6 2 tablets OPD Substrate (each tablet contains 10 mg of OPD-HCl)

*There are sufficient reagents to assay 44 plasma samples and generate a four-point standard curve (both tested in duplicate), for a total of 96 tests. Samples may be patient, control or reference plasmas.

WARNINGS and PRECAUTIONS

The source material for reagents in this kit have been found to be non-reactive for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), Hepatitis C Virus (HCV) and Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 (HIV-1, HIV-2) using US Food and Drug Administration approved methods. As no known test method can provide complete assurance that products derived from human blood will not transmit HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 or other blood-borne pathogens, this reagent should be handled as recommended for any potentially infectious human specimen.

Not for internal use in humans or animals. Do not use the kit components beyond the stated expiration date. Do not mix reagents from different kits. Avoid microbial contamination of the reagents. Do not smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are handled. Do not pipette reagents by mouth. Wear laboratory coat and disposable gloves throughout the test procedure and wash hands thoroughly afterwards. Avoid splashing or aerosol formation. Do not expose the OPD reagent to strong sunlight. Store OPD in the dark and do not allow it to come into contact with any oxidizing agents or metal parts.

PET buffer	Warning		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Detection antibody	Warning		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
OPD substrate	Warning	 	CONT o-Phenylenediamine dihydrochloride $C_6H_4(NH_2)_2 \cdot 2HCl$ H302, H319, H317, H341, H351, H410, P264, P280, P202, P261, P273, P301+P312, P330, P305+P351+P338, P302+P352

Hazard Statements¹⁴:

- H302 Harmful if swallowed.
- H317 May cause an allergic skin reaction.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H341 Suspected of causing genetic defects.
- H351 Suspected of causing cancer.
- H410 Very toxic to aquatic life with long lasting effects.

Precautionary Statements:	P202	Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
	P261	Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
	P264	Wash thoroughly after handling.
	P273	Avoid release to the environment.
	P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
	P301 + P312	IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/doctor if you feel unwell.
	P330	Rinse mouth.
	P302 + P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
	P305 + P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
	P337 + P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

0.22 micron filtered deionised water
 8-channel pipette covering 50 - 200 µL
 1-channel pipettes covering 10 - 1000 µL
 repetitive pipette 50 µL
 squeeze bottle, towels or thin sponge
 50 mL containers, e.g., plastic tubes
 microwell plate washer, microwell plate orbital shaker
 microwell plate reader set at a wavelength of 490 nm
 concentrated sulfuric acid (H₂SO₄)
 30% hydrogen peroxide (H₂O₂)
 centrifuge (capable of 1,500 x g)

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

A. PET Buffer (R2)

Dissolve the contents of the PET Buffer vial in 1 L of filtered deionised water. Mix for 15 minutes. Prepared buffer may be stored at:

	1 month
	2° - 8°C

B. PAI-1 Standards (R3, R4)

- Add 0.5 mL filtered deionised water to the 0 ng/mL PAI-1 Standard and the 50 ng/mL PAI-1 Standard vials. Agitate gently for three minutes. Treat the standards as you would a plasma sample (see SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION). Standards should be used within one hour after reconstitution. Reconstituted standards may also be aliquotted into tightly capped tubes and stored at:

	6 months
	-70°C or colder

- Prepare a 12.5 ng/mL standard and a 25 ng/mL standard for the calibration curve by adding the 50 ng/mL PAI-1 Standard and the 0 ng/mL PAI-1 Standard in the following ratios. Mix each tube for a few seconds. Pipette the 50 ng/mL and 0 ng/mL standards directly from their vials.

PAI-1 Standard	Volume of 0 ng/mL PAI-1 Standard	Volume of 50 ng/mL PAI-1 Standard
12.5 ng/mL	75 µL	25 µL
25 ng/mL	50 µL	50 µL

C. Detection Antibody (R5)

Prepare working strength Detection Antibody by diluting 1:50 with PET Buffer. For running all 96 microwells at one time, dilute 120 µL of Detection Antibody up to 6 mL in PET Buffer. If all 96 microwells are not to be used, dilute 20 µL of Detection Antibody up to 1 mL in PET Buffer for each 16 microwells that will be used. Working strength Detection Antibody may be stored in the dark for:

	1 month
	-20°C

D. Substrate (R6)

Add 1 tablet OPD substrate to 3 mL of filtered deionised water. After the tablet has fully dissolved, add 21 mL of filtered deionised water to the dissolved tablet for a final volume of 24 mL. Each 4 mL of substrate solution is sufficient for 16 sample wells. Prepared substrate may be aliquotted and stored at:

	1 month
	-20°C

E. Stop Solution

Prepare a 4.5 M H₂SO₄ solution by adding 5 mL of concentrated sulfuric acid (95-97%) to 15 mL of filtered deionised water. Mix well. Store unused Stop Solution at:

	2° - 8°C
---	----------

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Either citrate or EDTA collected platelet poor plasma may be used for this assay. See "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008¹⁵. Plasma collection should be performed as follows:

- Collect 9 parts of blood into 1 part of 3.2% (0.109M) trisodium citrate anticoagulant solution.
- Centrifuge the blood sample at 1,500 x g for 15 minutes.
- Plasma should be stored at 2° to 8°C and assayed within 2 hours. Alternatively, plasma may be stored for:

	2 weeks	6 months
	-20°C	-70°C

- Frozen plasma should be thawed rapidly at 37°C. Thawed plasmas should be stored at 2° to 8°C and assayed within 2 hours.

ASSAY PROCEDURE

- Six (6) antibody coated microwell strips are provided assembled in a plastic holder, giving the appearance of a fixed 96-microwell plate. Please note that the strips are constructed such that they fit into the frame in only one orientation. Open the foil pouch and remove the strip/frame assembly. In the foil pouch is a packet of desiccant. Do not discard this desiccant. Keep the desiccant in the pouch for storing unused microwell strips. Determine the number of microwells needed to generate the standard curve and assay the number of unknown specimen samples and references/ controls. Remember, it is recommended to assay standards and samples in duplicate. Remove the strips that will not be used, replace in the foil pouch and tightly reseal the pouch with the desiccant inside. Store the sealed pouch at 2° - 8°C until the expiration date printed on the pouch label.
- Add 50 µL of prepared PET Buffer to each microwell.
- Dilution of plasma samples is seldom necessary, but samples containing more than 50 ng/mL PAI-1 can be diluted with the 0 ng/mL PAI-1 Standard or tPA/PAI Depleted Plasma (BioMedica Diagnostics REF 273). The amounts of PAI-1 are then deduced from the calibration curve by multiplying the measured sample value by the dilution factor.
- Add 20 µL of PAI-1 standard or plasma sample to each microwell. Cover the wells with the acetate sheet provided. Place the strip/frame assembly on an orbital microwell plate shaker with agitation (at 500-600 rpm) and incubate for 1 hour at room temperature (20°-25°C).
- Remove the acetate cover sheet (do not discard) and add 50 µL of the Detection Antibody to each microwell. **Do not empty the wells.** Replace the acetate sheet over the microwells and incubate on the plate shaker (at 500-600 rpm) for 1 hour at room temperature (20°-25°C).
- Remove the acetate sheet and empty the contents of the microwells. Wash the wells four times with the PET Buffer. Washing can either be performed using microwell plate washing equipment or manually (fill the wells with PET Buffer with a pipette or squeeze bottle, wait three minutes, empty and remove droplets by tapping the plate 4-5 times face down against absorbing material. Repeat four times.
- Add Substrate as follows. If using all 96 microwells: add 30 µL of 30% H₂O₂ to all 24 mL of Substrate immediately before use and mix well. If using fewer than all 96 microwells: for each 16 microwells used, add 5 µL of 30% H₂O₂ to a 4.0 mL aliquot of Substrate and mix well. The H₂O₂ should be added to the Substrate just prior to use. Add 200 µL of the Substrate/H₂O₂ mixture to each microwell. Replace the acetate sheet over the microwells and incubate on the plate shaker (at 500-600 rpm) for 12 minutes at room temperature (20°-25°C).
- Stop the enzymatic reaction by adding 50 µL of Stop Solution. Add Stop Solution with the same speed and order as you added the Substrate. Store the strips in the dark until measuring the absorbances.
- Read the absorbance of the Substrate solutions at 490 nm on a microwell plate reader within 15 minutes.

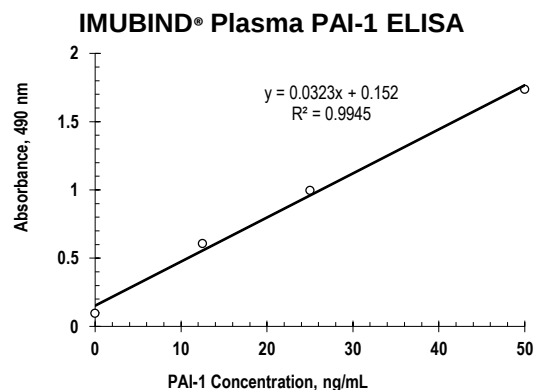
Procedural Note

Completely fill the microwells during the wash step and make sure the microwells are completely empty after each wash. Do not allow the microwells to dry out.

RESULTS

A standard curve is constructed by plotting the mean absorbance value measured for each PAI-1 standard versus its corresponding PAI-1 concentration. A standard curve should be constructed each time the assay is performed. The following curve is presented for demonstration purposes only.

Representative Standard Curve



CALCULATIONS

Interpolate the PAI-1 concentration of the plasma sample directly from the standard curve. A curve regression software function that is included with the microwell plate reader may be used to calculate the concentrations.

Plasma samples found to contain more than 50 ng/mL PAI-1 should be diluted with the 0 ng/mL PAI-1 Standard supplied or tPA/PAI Depleted Plasma (BioMedica Diagnostics REF 273).

TRACEABILITY OF CONTROL MATERIALS

Information regarding traceability of control materials is available upon request from BioMedica Diagnostics.¹⁶

QUALITY CONTROL

It is recommended that 2 plasma samples containing PAI-1 antigen between 6 to 14 ng/mL (low control) and 36 to 44 ng/mL (high control), be stored at -20°C or below, in small aliquots and used as quality control standards each time the assay is run. Failure to obtain a PAI-1 antigen level within two standard deviations of the mean for each control standard may invalidate the assay. The 50 ng/mL standard and the 0 ng/mL standard are provided to construct the standard curve and must not be used to check device performance.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

Many studies have shown that platelets are a source of PAI-1 in the bloodstream.^{1,2} Specimens not prepared according to the instructions, may be contaminated with platelets and therefore may have artificially high PAI-1 values. DO NOT subject plasma samples to more than one freeze-thaw cycle. As centrifugation cannot generate platelet-depleted plasma, there will be some platelets present. Successive freeze-thaw cycles will lyse any platelets and release PAI-1 into the sample. Plasmas subjected to more than one freeze-thaw cycle may have artificially high PAI-1 measurements.

Sodium azide present in a test sample will inhibit the peroxidase activity of the detection antibody. If azide was present in the sample, wash the well after the sample incubation and refill the well with 70 µL PET buffer before adding the conjugate.

Bacterial contamination in the filtered deionised water may cause aberrant results.

Each laboratory must determine separate normal ranges for EDTA or citrated collected plasma samples.

INTERFERENCES

The presence of bilirubin (1.5 mg/dL), cholesterol (228 mg/dL) and the appearance of slight to moderate hemolysis do not influence the determination of human PAI-1 in plasma.

EXPECTED VALUES

In a group of 167 healthy adults, 95% of plasma PAI-1 values were between 2 and 47 ng/mL using citrated plasmas. Each laboratory must determine its own normal range for both citrated and EDTA collected plasmas.

Studies show that PAI-1 activity correlates well with PAI-1 antigen in plasma samples.^{1,2} Nonetheless, platelets contain stored PAI-1 that is released in an inactive form, affecting PAI-1 antigen values but not PAI-1 activity values, so platelet release should be avoided. Values of PAI-1 antigen in human platelet-poor plasma have been reported to range between 4 and 43 ng/mL (mean of 18 ± 10 ng/mL with a correlation to PAI-1 activity of $r=0.80$).² Patients with recurrent deep vein thrombosis had higher PAI-1 antigen levels (mean of 44 ± 20 ng/mL).² PAI-1 antigen levels are also elevated during the third trimester of normal pregnancy.^{2, 11}

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

Studies evaluated the intra-assay and inter-assay variations of two sample concentrations assayed in quadruplicate over 10 runs (n=40). The following variations were found.¹⁶

Sample	Mean Assayed PAI-1 Value	Intra-Assay Variation	Inter-Assay Variation
No. 1	19 ng/mL	6.6%	9.0%
No. 2	40 ng/mL	5.4%	6.9%

Sensitivity

The assay quantifies various forms of human Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) antigen. It detects active and inactive forms of PAI-1 as well as PAI-1 complexed with tissue-type Plasminogen Activator (tPA) and urokinase-type Plasminogen Activator (uPA). The lower limit detection is 2.2 ng/mL PAI-1 in the undiluted sample when the assay is performed according to the procedure.¹⁶

REFERENCES

1. Sprengers, E.D., *et al.* Plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987; **69**: 381-87.
2. Declerck, P.J., *et al.* Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in biological fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988; **71**: 220-225.
3. Schleef, R.R., *et al.* Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. *Journal of Clinical Investigation* 1989; **83**: 1747.
4. Dieval, J., *et al.* A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1991; **77**: 528.
5. Hamsten, A., *et al.* Plasminogen activator inhibitor in plasma: Risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987; **2**: 3-8.
6. Juhan-Vague, I., *et al.* On Behalf of the ECAT Study Group. Fibrinolytic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients with Angina Pectoris. *Circulation* 1996; **94**: 2057-2063.
7. Thøgersen, A.M., *et al.* High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; **98**: 2241-47.
8. Bergstein, J.M., *et al.* Role of plasminogen activator inhibitor type-1 in the pathogenesis and outcome of the Hemolytic Uremic Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1992; **327**: 755-759.
9. Margaglione, M., *et al.* Abnormally High Circulation Levels of Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Inhibitor-1 in Patients with a History of Ischemic Stroke. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; **14**: 1741-1745.
10. He, S., *et al.* Increased blood flow resistance in placental circulation and levels of plasminogen activator inhibitors type 1 and 2 in severe preeclampsia. *Blood, Coagulation & Fibrinolysis* 1995; **6**: 703-708.
11. Cerneca, F., *et al.* Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy: Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy include a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Obstetrics & Gynecology* 1997; **73**: 31-36.
12. Bellart, J., *et al.* Coagulation and fibrinolysis parameters in normal pregnancy and in gestational diabetes. *American Journal of Perinatology* 1998; **15**: 479-486.
13. Tran-Thang, C., *et al.* Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in liver deficiencies caused by chronic alcoholism or infectious hepatitis. *Thrombosis & Haemostasis* 1989; **62**: 651.
14. EC Regulation No. 1272/2008.
15. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition. *CLSI Document H21-A5*, 2008; Vol. 28, No. 5.
16. Data on file at BioMedica Diagnostics, Stamford, Connecticut, USA 06902.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA ist ein "enzyme-linked immunosorbent assay" zur quantitativen Bestimmung des humanen Antigens des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors vom Type 1 (PAI-1) in Plasma.

ERKLÄRUNG DES TESTS

Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor vom Typ 1 (PAI-1) ist einer der wichtigsten Regulatoren der Fibrinolyse und wurde in verschiedenen Gewebetypen und Zelltypen wie z.B. Makrophagen/Monozyten, Hepatozyten, vaskulärem Endothel, adipösem Gewebe des Herzens und der Lunge sowie in Thrombozyten nachgewiesen.^{1,2} Das klinische Interesse an der PAI-1-Messung im Plasma beruht auf Fallstudien, bei denen Konzentrationen dieses Serinproteaseinhibitors mit verschiedenen thrombotischen und fibrinolytischen Komplikationen in Zusammenhang gebracht wurden. Ein Mangel an PAI-1-Aktivität führt zu Blutungsstörungen, wobei jedoch routinemäßige Screening-Gerinnungstests normale Ergebnisse erzielen.^{3,4} Hohe Werte der PAI-1-Aktivität werden in Patienten mit Myokardinfarkt, hämolytisch-urämischem Syndrom und Schlaganfall angetroffen.⁵⁻⁹ Die PAI-1-Plasmakonzentration schwangerer Frauen korreliert weiterhin mit Gestationsdiabetes, verminderter Blutversorgung der Plazenta und Präeklampsie.^{10,11,12} Auch Zirrhose-Patienten können erhöhte PAI-1-Spiegel aufweisen.¹³

TESTPRINZIP

Der IMUBIND PAI-1 ELISA-Test verwendet Mikrotitervertiefungen, die mit monoklonalen (Maus-) Antikörpern gegen Human-PAI-1 beschichtet sind. Den Vertiefungen werden PAI-1-Standards und Plasmaproben zugesetzt. Während der anschließenden Inkubation bindet sich der Antikörper an das in der Probe vorliegende PAI-1-Antigen. Nun wird mit Peroxidase konjugierter Antikörper gegen Human-PAI-1 zugefügt. Das Antikörperkonjugat lagert sich an die gebundenen PAI-1-Moleküle an. Anschließend wird alles ungebundene Material ausgewaschen und ein Peroxidase-reaktives Enzymsubstrat (Orthophenyldiamin, OPD) in die Vertiefungen eingebracht. Die einsetzende Peroxidase/Substrat-Reaktion bewirkt eine gelbliche Farbentwicklung in der Lösung. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird die Reaktion gestoppt und eine orange Färbung der Lösung bewirkt. Die Extinktion dieser Lösung wird bei 490 nm gemessen. Die Extinktion ist direkt proportional zur PAI-1-Konzentration in der Probe.

REAGENZIENTEN

- R1 96 PAI-1 Antikörper beschichteten Vertiefungen, mit Azetat-Abdeckblatt um die Vertiefungen während der Testdurchführung abzudecken.
 R2 1 Fläschchen PET-Puffer (PBS-EDTA-Tween 20, Pulver), 15.15 g
 R3 1 Fläschchen PAI-1 Standard, 50 ng/mL (lyophilisiert)
 R4 1 Fläschchen PAI-1 Standard, 0 ng/mL (lyophilisiert)
 R5 1 Fläschchen Detektionsantikörper, 200 µl (konzentriert)
 R6 2 Tabletten Substrat, OPD (10 mg OPD-HCL pro Tablette)

*Das Kit enthält ausreichend Reagenzien für die Untersuchung von 44 Plasmaproben und die Erstellung einer 4-Punkte-Standardkurve (jeweils doppelt getestet), für insgesamt 96 Tests. Bei den zu testenden Proben kann es sich um Patientenproben, Kontrollen oder Referenzplasma handeln.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Alle für die Herstellung der Reagenzien in diesem Kit verwendeten Ausgangsmaterialien wurden mit Hilfe einer von der FDA zugelassenen Methode auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Virus (HCV) und Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 und 2 (HIV-1 und HIV-2) getestet und für nicht-reaktiv befunden. Da sich die Übertragung von HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 und anderen im Blut zirkulierenden Infektionserregern durch Humanblutprodukte derzeit mit keiner bekannten Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen lässt, müssen diese Reagenzien wie potenziell infektiöse Humanproben gehandhabt werden.

Nicht zur internen Anwendung bei Mensch oder Tier. Die Kitbestandteile nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Kits zusammen verwenden. Eine bakterielle Kontamination der Reagenzien ist zu vermeiden. Wo mit Proben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, darf nicht geraucht, gegessen oder getrunken werden. Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Während des Testverfahrens Laborschutzbekleidung und Einweghandschute tragen; anschließend die Hände sorgfältig waschen. Verspritzen und die Bildung von Aerosolen ist zu vermeiden. Das OPD-Reagenz keiner starken Sonneneinstrahlung aussetzen. OPD dunkel lagern und den Kontakt mit oxidierenden Stoffen oder Metallen meiden.

PET buffer	Achtung		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Detection antibody	Achtung		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
OPD substrate	Achtung	  	CONT <chem>b-Phenylenediamine dihydrochloride C6H4(NH2)2 2HCl</chem> H302, H319, H317, H341, H351, H410, P264, P280, P202, P261, P273, P301+P312, P330, P305+P351+P338, P302+P352

Gefahren	H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
Aussagen¹⁴:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H319 Verursacht schwere Augenreizung. H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen. H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
Sicherheitshinweise:	P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/-Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P264 Nach Gebrauch gründlich waschen. P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301 + P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. P330 Mund ausspülen. P302 + P352 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305 + P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

WEITERE BENÖTIGTE MATERIALIEN

Gefiltertes, entionisiertes Wasser (0.22 Micron)
 8-Kanal-Pipette mit einem Volumen von 50 - 200 µL
 1-Kanal-Pipetten mit einem Volumen von 10 - 1000 µL
 Repetierpipette 50 µL
 Spülflasche
 Papiertücher oder Schwammtuch
 50 mL-Behälter, z.B. Petrischalen
 Waschgerät für Mikrotiterplatten
 Schüttler für Mikrotiterplatten
 Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit einer Wellenlänge von 490 nm
 Konzentrierte Schwefelsäure (H₂SO₄)
 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂)
 Zentrifuge (geeignet für 1500 x g)

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIENTEN

A. PET Buffer (R2)

Den Inhalt des PET-Puffer-Fläschchens in 1 Liter gefiltertem, entionisiertem Wasser auflösen. 15 Minuten mischen. Der gebrauchsfertige Puffer kann gelagert werden bei:

	1 Monat
	2° - 8°C

B. PAI-1 Standards (R3, R4)

- In die Fläschchen mit 0 ng/mL PAI-1 Standard bzw. 50 ng/mL PAI-1 Standard je 0.5 mL gefiltertes, entionisiertes Wasser geben. 3 Minuten lang vorsichtig mischen. Die Standards sind wie Plasmaproben zu behandeln (siehe Abschnitt PROBENNAHME UND – VORBEREITUNG). Die Standards sollten innerhalb einer Stunde nach Rekonstitution verwendet werden. Die rekonstituierten Standards können auch in fest verschließbare Röhrchen abgefüllt und gelagert werden bei:

	6 Monate
	-70°C oder kälter

- Stellen Sie für die Kalibrierkurve einen 12.5 ng/mL – Standard und einen 25 ng/mL-Standard her, indem Sie den 50 ng/mL PAI-1 Standard und den 0 ng/mL PAI-1 Standard im nachfolgend beschriebenen Verhältnis mischen. Jedes Röhrchen einige Sekunden lang mischen. Pipettieren Sie dabei den 50 ng/mL PAI-1 Plasma-Standard und den 0 ng/mL PAI-1 Standard direkt aus dem jeweiligen Fläschchen.

PAI-1 Standard	Menge des 0 ng/mL PAI-1 Standard	Menge des 50 ng/mL PAI-1 Standard
12.5 ng/mL	75 µL	25 µL
25 ng/mL	50 µL	50 µL

C. Detection Antibody (R5)

Das Detektionsantikörper wird 1:50 in PET Puffer verdünnt. Wenn alle 96 Vertiefungen verwendet werden, dann geben Sie 120 µL des Detektionsantikörper in 6 mL PET Puffer. Falls nicht alle 96 Vertiefungen verwendet werden, dann geben Sie 20 µL Detektionsantikörper in 1 mL PET Puffer für jeden Streifen mit 16 Vertiefungen. Verdünntes Detektionsantikörper kann im Dunkeln gelagert werden bei:

	1 Monat
	-20°C

D. Substrat (R6)

1 OPD-Substrat-tablette in 3 mL gefiltertes, entionisiertes Wasser geben. Nach vollständiger Auflösung der Tablette weitere 21 mL gefiltertes, entionisiertes Wasser zugeben, so dass ein Gesamtvolumen von 24 mL erreicht wird. 4 mL dieser Substratlösung reichen für 16 Vertiefungen aus. Das gebrauchsfertige Substrat kann in Teilmengen abgefüllt und aufbewahrt werden bei:

	1 Monat
	-20°

E. Stopplösung

Stellen Sie eine 4.5 M H₂SO₄-Lösung her, indem Sie 15 mL gefiltertem, entionisiertem Wasser 5 mL konzentrierte Schwefelsäure (95-97%) zusetzen. Gut mischen. Ungebrauchte Stopplösung aufbewahren bei:

	2° - 8°C
---	----------

PROBENNAHME UND-VORBEREITUNG

Für diesen Test können mit Zitrat oder EDTA versetzte, thrombozytenarme Plasmaproben verwendet werden. Siehe hierzu auch die NCCLS-Veröffentlichung H21-A5, Vol. 28, Nr. 5 vom 2008¹⁵ mit dem Titel "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition". Die Gewinnung der Plasmaprobe ist wie folgt durchzuführen:

- 9 Teile Blut in 1 Teil 3.2%-ige (0.109 M) gerinnungshemmende Trisatriumziträt-Lösung entnehmen.
- Blutprobe 15 Minuten lang bei 1500 x g zentrifugieren.
- Plasmaproben sind bei 2° - 8°C zu lagern und binnen 2 Stunden zu testen. Alternativ können die Plasmaproben auch aufbewahrt werden bei:

	2 Wochen	6 Monate
	-20°C	-70°C

- Gefrorenes Plasma sollte bei 37°C rasch aufgetaut werden. Aufgetaute Plasmaproben sind bei 2° - 8°C zu lagern und binnen 2 Stunden zu testen.

TESTVERFAHREN

- Die 6 mit Antikörper beschichteten Mikrotiterstreifen befinden sich in einem Plastikhalter und sehen aus wie eine einzige Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen. Bitte beachten Sie, dass die Streifen durch ihre Bauweise nur in einer Ausrichtung in den Rahmen passen. Öffnen Sie die Folienverpackung und entnehmen Sie den Rahmen mit den Teststreifen. In der Folienverpackung befindet sich ein Trockenmittel; werfen Sie dieses bitte nicht weg, sondern belassen Sie es in der Folie bei den unbenutzten Mikrotiterstreifen. Stellen Sie fest, wie viele Teststreifen Sie zur Ermittlung der Standardkurve und zum Testen von Patientenproben, Referenzplasma bzw. Kontrollen benötigen. Denken Sie daran, dass alle Standards und Proben doppelt zu testen sind. Geben Sie die nicht benötigten Streifen aus dem Rahmen zurück in die Folienverpackung mit dem Trockenmittel und verschließend Sie den Beutel fest. Den Beutel bis zum aufgedruckten Verfallsdatum bei 2°-8°C lagern.
- In jede Mikrovertiefung 50 µL gebrauchsfertig zubereiteten PET-Puffer geben.
- Plasmaproben müssen nur selten verdünnt werden. Proben mit einer PAI-1-Konzentration > 50 ng/mL können mit dem 0 ng/mL PAI-1 Standard oder mit tPA/PAI-1-freiem Plasma (BioMedica Diagnostics REF 273) verdünnt werden. Die PAI-1-Mengen werden dann von der Kalibrierkurve abgezogen, indem man die gemessene Konzentration der Probe mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.
- In jede Mikrotitervertiefung 20 µL PAI-1-Standard oder Plasmaprobe geben. Vertiefungen mit dem mitgelieferten Azetat-Abdeckblatt bedecken. Streifen mit Rahmen in den Mischer setzen und bei 500-600 upm 1 Stunde bei Zimmertemperatur (20°-25°C) inkubieren.

- Azetat-Abdeckblatt abnehmen (nicht wegwerfen!) und jeder Mikrotitervertiefung 50 µL Detektionsantikörper zusetzen. **Vertiefungen nicht entleeren!** Azetat-Abdeckblatt wieder auf die Vertiefungen legen und im Schüttler bei 500-600 upm 60 Minuten bei Zimmertemperatur (20°-25°C) inkubieren.
- Azetat-Abdeckblatt abnehmen und Inhalt der Vertiefungen ausleeren. Vertiefungen 4 mal mit PET-Puffer spülen. Dieser Waschschritt kann entweder mit einem Plattenwaschgerät oder manuell durchgeführt werden; zur manuellen Spülung füllen Sie den PET-Puffer mit einer Spülflasche oder Pipette in die Vertiefungen, warten 3 Minuten und leeren die Vertiefungen, indem Sie die Platte umkehren und 4-5mal auf ein Papiertuch ausklopfen. Diesen Vorgang 4 mal wiederholen.
- Substrat wie folgt zugeben: Bei Verwendung aller 96 Mikrotitervertiefungen unmittelbar vor Gebrauch den gesamten 24 mL Substrat 30 µL H₂O₂ zufügen und gut mischen. Bei Verwendung von weniger als 96 Mikrotitervertiefungen: Für jeden Streifen mit 16 Vertiefungen jeder 4.0 mL Teilmenge des Substrats je 5 µL H₂O₂ zugeben und gut mischen. H₂O₂ stets erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben. Jeder Vertiefung 200 µL der Substrat/H₂O₂-Mischung zusetzen. Vertiefungen mit dem Azetatblatt abdecken und im Schüttler bei 500-600 upm 12 Minuten bei Zimmertemperatur (20°-25°C) inkubieren.
- Zur Beendigung der enzymatischen Reaktion 50 µL Stopplösung zusetzen. Dabei in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit vorgehen wie bei der Substratzugabe. Streifen bis zur Extinktionsmessung im Dunkeln lagern.
- Messen Sie nun innerhalb von 15 Minuten die Extinktion der Substratlösungen mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm.

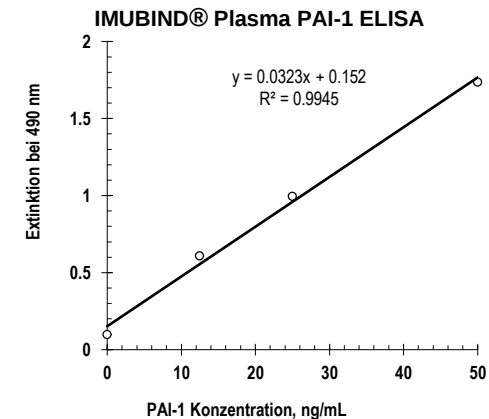
Hinweis zum Verfahren

Füllen Sie die Vertiefungen der Mikrotiterplatte während des Waschschrittes vollständig und vergewissern Sie sich nach jedem Waschschritt, dass die Vertiefungen vollständig geleert wurden. Die Vertiefungen dürfen nicht austrocknen.

ERGEBNISSE

Die Standardkurve wird ermittelt, indem man die mittleren, für die einzelnen PAI-1- Standards gemessenen Extinktionswerte im Verhältnis zu der entsprechenden PAI-1-Konzentration darstellt. Bei jeder Testdurchführung ist eine Standardkurve zu erstellen. Nachstehend ein Beispiel für eine Standardkurve (nur zu Demonstrationszwecken):

Repräsentative Standardkurve



BERECHNUNGEN

Die PAI-1-Konzentration der Plasmaprobe wird direkt aus der Standardkurve interpoliert. Zur Berechnung der Konzentrationen kann die Softwarefunktion zur Kurvenregression verwendet werden, die zum Photometer für Mikrotiterplatten gehört.

Plasmaproben mit > 50 ng/mL PAI-1 sind mit dem mitgelieferten 0 ng/mL PAI-1- Standard oder mit tPA/PAI-1-freiem Plasma (BioMedica Diagnostics REF 273) zu verdünnen und erneut zu testen.

RÜCKFÜHRBARKEIT DES KONTROLLMATERIALS

Informationen zur Rückführbarkeit des Kontrollmaterials sind bei BioMedica Diagnostics, Inc auf Anfrage erhältlich.¹⁶

QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen, 2 Plasmaproben mit einer Konzentration von 6-14 ng/mL PAI-1- Antigen (niedrige Kontrolle) bzw. 36-44 ng/mL (hohe Kontrolle) in kleinen Teilmengen bei einer Mindesttieftemperatur von -20°C aufzubewahren und bei jeder Testdurchführung als Qualitätskontrollstandards einzusetzen. Falls keine PAI-1-Antigenkonzentration innerhalb von 2 Standardabweichungen vom Mittelwert eines jeden Kontrollstandards erzielt wird, kann dies zur Ungültigkeit des Tests führen. Der 50 ng/mL-Standard und das 0 ng/mL PAI-1 Standard werden nur zur Erstellung der Standardkurve mitgeliefert und dürfen nicht zur Prüfung der Geräteleistung herangezogen werden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Thrombozyten eine Quelle von PAI-1 im Blutkreislauf sind.^{1,2} Nicht ordnungsgemäß vorbereitete Proben können durch Thrombozyten kontaminiert sein und daher einen künstlich erhöhten PAI-1-Wert aufweisen. Die Plasmaproben dürfen höchstens einmal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Da sich durch Zentrifugieren kein völlig thrombozytenfreies Plasma erzielen lässt, liegen immer noch einige Thrombozyten vor. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen führt zur Thrombozytenlyse und zur Freisetzung von PAI-1 in der Probe. Plasmaproben, die mehr als einmal eingefroren und aufgetaut wurden, können daher künstlich erhöhte PAI-1-Ergebnisse erzielen.

In der Probe vorliegendes Natriumazid hemmt die Peroxidase-Aktivität des konjugierten Antikörpers. Falls die Probe Azid enthält, ist die Testvertiefung nach der Probeninkubation sorgfältig zu spülen; vor Zugabe des Konjugats 70 µL PET-Puffer in die Vertiefung dispensieren.

Eine bakterielle Kontamination des gefilterten entionisierten Wassers kann die Ergebnisse verfälschen.

Jedes Labor muss seine eigenen Normalbereiche für EDTA-oder zitratthaltige Plasmaproben selbst ermitteln.

INTERFERENZEN

Das Vorliegen von Bilirubin (1.5 mg/dL), Cholesterol (228 mg/dL) oder einer leichten bis mäßigen Hämolyse in der Probe hat keinen Einfluss auf die Bestimmung von Human PAI-1 in der Plasmaprobe.

ERWARTETE WERTE

In einer Gruppe von 167 gesunden Erwachsenen wiesen bei Verwendung zitrierter Plasmaproben 95% der Personen Plasma-PAI-1-Werte zwischen 2 und 47 ng/mL auf. Jedes Labor muss seine eigenen Normalbereiche für EDTA-oder zitratthaltige Plasmaproben selbst ermitteln.

Studien zeigen, dass die PAI-1 Aktivität gut mit der PAI-1 Antigenkonzentration in Plasmaproben korreliert^{1,2}. Dennoch enthalten Thrombozyten gespeichertes PAI-1, das in inaktiver Form freigesetzt wird und die PAI-1-Werte, jedoch nicht die PAI-1-Aktivität beeinflusst. Daher ist es wichtig, die Thrombozytenfreisetzung zu vermeiden. PAI-1-Antigenwerte in thrombozytenarmem Humanplasma liegen gemäß der Literatur zwischen 4 und 43 ng/mL (Mittelwert 18 ± 10 ng/mL mit einer Korrelation zur PAI-1-Aktivität von r = 0.80).² Patienten mit rezidivierender Thrombose der tiefliegenden Venen wiesen höhere PAI-1-Antigenspiegel auf (Mittelwert 44 ± 20 ng/mL).² Außerdem ist die Konzentration des PAI-1-Antigens bei Gesunden im dritten Schwangerschaftsdrittel erhöht.^{2,11}

LEISTUNGSMERKMALE

Präzision

Es wurden Studien zur Ermittlung der Intra-Assay- und Inter-Assay-Variation (Abweichung innerhalb des Testlaufs sowie von Testlauf zu Testlauf) durchgeführt. Hierzu wurden zwei Probenkonzentrationen in 10 Testläufen jeweils vervierfachen getestet (n=40). Es ergab sich folgende Abweichung:¹⁶

Probe	Mittlerer getesteter PAI-1 Wert	Intra-Assay Variation	Inter-Assay Variation
Nr. 1	19 ng/mL	6.6%	9.0%
Nr. 2	40 ng/mL	5.4%	6.9%

Empfindlichkeit

Dieser Test erzielt eine quantitative Bestimmung verschiedener Formen des humanen Antigens des Plasminogen-Aktivatorinhibitors vom Typ 1 (PAI-1). Er misst sowohl die active als auch die inaktive Form von PAI-1 sowie PAI-1 im Komplex mit dem humanen Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) und mit dem Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivators (uPA). Die untere Nachweisgrenze des Tests beträgt bei vorschriftsgemäßer Testdurchführung 2.2 ng/mL PAI-1 in der unverdünnten Probe.¹⁶

LITERATURHINWEISE

1. Sprengers, E.D., et al. Plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987; **69**: 381-87.
2. Declerck, P.J., et al. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in biological fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988; **71**: 220-225.
3. Sleaf, R.R., et al. Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. *Journal of Clinical Investigation* 1989; **83**: 1747.

4. Dieval, J., et al. A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1991; **77**: 528.
5. Hamsten, A., et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: Risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987; **2**: 3-8.
6. Juhan-Vague, I., et al. on behalf of the ECAT Study Group. Fibrinolytic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients with Angina Pectoris. *Circulation* 1996; **94**: 2057-2063.
7. Thøgersen, A.M., et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; **98**: 2241-47.
8. Bergstein, J.M., et al. Role of plasminogen activator inhibitor type-1 in the pathogenesis and outcome of the Hemolytic Uremic Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1992; **327**, 755-759.
9. Margaglione, M., et al. Abnormally High Circulation Levels of Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Inhibitor-1 in Patients with a History of Ischemic Stroke. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; **14**: 1741-1745.
10. He, S., et al. Increased blood flow resistance in placental circulation and levels of plasminogen activator inhibitors type 1 and 2 in severe preeclampsia. *Blood, Coagulation & Fibrinolysis* 1995; **6**: 703-708.
11. Cerneca, F., et al. Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy: Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy include a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Obstetrics & Gynecology* 1997; **73**: 31-36.
12. Bellart, J., et al. Coagulation and fibrinolysis parameters in normal pregnancy and in gestational diabetes. *American Journal of Perinatology* 1998; **15**: 479-486.
13. Tran-Thang, C., et al. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in liver deficiencies caused by chronic alcoholism or infectious hepatitis. *Thrombosis & Haemostasis* 1989; **62**: 651.
14. EG Richtlinie 1272/2008.
15. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition. *CLSI Document H21-A5*, 2008; Vol. 28, No. 5.
16. Daten liegen bei BioMedica Diagnostics, Stamford, Connecticut, USA 06902.

FRANCAIS

METHODE

Le coffret de dosage IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA est une méthode sandwich ELISA pour le dosage quantitatif de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène humain actif de type I (PAI-1) antigène dans le plasma. Le coffret de dosage est à usage de diagnostic in vitro.

APPLICATION

L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène Type-1 (PAI-1), principal régulateur de la fibrinolyse, est présent dans différents tissus et cellules (macrophages/monocytes, les hépatocytes, les endothéliums vasculaires, le tissu adipeux du cœur et des poumons) et dans les plaquettes.^{1,2} L'intérêt clinique de la mesure de PAI-1 dans le plasma a été rapporté dans différentes études de cas dans lesquels une variation du taux de cet inhibiteur est associée à diverses complications thrombotiques et fibrinolytiques. Un déficit de l'activité du PAI-1 activité est associé à des saignements, dans ce cas les tests de screening des troubles hémostatiques sont normaux.^{3, 4} Des augmentations de l'activité du PAI-1 sont souvent rencontrées chez les patients souffrants d'infarctus du myocarde, de syndrome hémolytique et urémique, et d'accident vasculaire cérébral.⁵⁻⁹ Le taux de PAI-1 dans le plasma des femmes enceintes est également corrélé à un diabète gestationnel, une diminution du flux sanguin placentaire et à une prééclampsie.^{10, 11,12} Les patients atteints de cirrhose peuvent aussi avoir des taux élevés de PAI-1.¹³

PRINCIPE

Le coffret IMUBIND Plasma PAI-1 ELISA utilise des plaques Elisa coatées avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le PAI-1 humain. Le calibrateur PAI-1 et les échantillons de plasma à doser sont ajoutés dans les puits de la plaque. Le PAI-1:Ag présent dans l'échantillon se fixe sur la phase solide par un de ses épitopes durant la première période d'incubation. Après lavage, le PAI-1 fixé sur la plaque est révélé par l'immunoconjugué (anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre le PAI-1 humain et couplé à la peroxydase (HRP)), qui réagit avec les épitopes libres du PAI-1. Après lavage, le substrat, ortho-phénylènediamine (OPD) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits de la plaque et une coloration jaune se développe. L'arrêt de la coloration par l'acide sulfurique fait virer la coloration à l'orange. La Densité Optique (DO) de la coloration est mesurée à 490nm. Cette coloration est proportionnelle au taux de PAI-1:Ag présent dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

REAGENTS

R1 96 MicroElisa plaque coatées avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le PAI-1 humain PAI-1, emballée, en présence d'un sachet déshydratant. La plaque doit être recouverte pendant le dosage.
R2 1 flacon de diluant PET Buffer (PBS-EDTA-Tween 20, en poudre), 15.15 g
R3 1 flacon de PAI-1 Calibrateur, 50 ng/mL (lyophilisé)
R4 1 flacon de PAI-1 Calibrateur, 0 ng/mL (lyophilisé)

- R5 1 flacon d'immunoconjugué (Anti PAI-1 HRP), 200 µL (concentré)
 R6 2 comprimés de substrat OPD (ortho-phénylènediamine) (chaque comprimé contient 10 mg of OPD-HCl)

*les réactifs contenus dans le coffret permettent le dosage de 44 échantillons de plasma et la réalisation de 4 points d'étalonnage (testés en dupliquette), soit au total la réalisation de 96 dosages. Les échantillons peuvent être les échantillons de patients à doser, les contrôles ou les plasmas de référence.

Précautions:

Le plasma calibrateur et le plasma déficient sont préparés à partir de plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées (US Food and Drug Administration approved) et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

Ne pas inhaler, ingérer ou injecter y compris chez les animaux. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration. Ne pas interchanger les réactifs de différents lots. Eviter toute contamination bactérienne des réactifs. Ne pas fumer, manger ou boire dans le laboratoire ou les réactifs sont utilisés. Ne pas pipeter les réactifs avec la bouche.

Porter une blouse et des gants jetables se laver les mains après chaque manipulation. Éviter toutes éclaboussures ou formations d'aérosols. Ne pas exposer l'OPD à la lumière. Conserver l'OPD dans l'obscurité afin d'éviter tout contact avec des agents oxydants. Ne pas le mettre en contact avec du matériel métalliques.

PET buffer	attention		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Detection antibody	attention		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
OPD substrate	attention	  	CONT b-Phenylenediamine dihydrochloride $C_6H_4(NH_2)_2 \cdot 2HCl$ H302, H319, H317, H341, H351, H410, P264, P280, P202, P261, P273, P301+P312, P330, P305+P351+P338, P302+P352

Mentions de danger¹⁴:

H302 Nocif en cas d'ingestion.
 H317 Peut provoquer une allergie cutanée.
 H319 Provoque une sévère irritation des yeux.
 H341 Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
 H351 Susceptible de provoquer le cancer.
 H410 Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Les conseils de prudence:

P202 Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
 P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aérosols.
 P264 Se laver soigneusement après manipulation.
 P273 Éviter le rejet dans l'environnement.
 P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage.
 P301 + P312 EN CAS D'INGESTION: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
 P330 Rincer la bouche.
 P302 + P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
 P305 + P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
 P337 + P313 Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Filtre de 0.22 µm
- Eau distillée
- 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
- Eponges, pissette, papier absorbant
- Consommables de laboratoire (tubes,...)
- Matériel de lavage pour microplaques et agitateur
- Lecteur de microplaques ELISA réglé à une longueur d'ondes de 490 nm
- Acide sulfurique concentré
- Eau oxygénée
- Centrifugeuse (capacité 1500xg)

PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

A. Tampon PET (R2)

Dissoudre le contenu du flacon de tampon PET dans 1 L d'eau distillée filtrée. Agiter pendant 15 mn. Le tampon ainsi préparé peut être conservé à :

	1 mois
	2° - 8°C

B. PAI-1 Calibrateurs (R3, R4)

1. Reconstituer chaque calibrateur (50 ng/ml et 0 ng/ml) par 0.5 mL d'eau distillée. Agiter délicatement pendant 3 minutes. Traiter les calibrateurs de la même façon que les échantillons à doser (voir paragraphe Préparation des Echantillons). Les calibrateurs doivent être utilisés dans l'heure qui suit leur reconstitution. Les calibrateurs ainsi reconstitués peuvent être aliquotés dans des tubes hermétiquement fermés et conservés à :

	6 mois
	-70°C ou plus froid

2. Préparer le point d'étalonnage 12,5 ng/mL et 25 ng/mL de la courbe de calibration en utilisant le calibrateur titré à 50 ng/mL de PAI-1 et 0 ng/mL de PAI-1 comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Agiter les préparations pendant quelques secondes. Prélever la concentration 50 ng/mL et 0 ng/mL directement dans leur flacon d'origine.

PAI-1 Calibrateur	Volume de 0 ng/ml PAI-1 Calibrateur	Volume de 50 ng/ml PAI-1 Calibrateur
12,5 ng/ml	75 µl	25 µl
25 ng/ml	50 µl	50 µl

C. Préparation de l'immunoconjugué (R5)

Diluer l'immunoconjugué concentré au 1/50 en tampon PET. Pour l'utilisation de la plaque entière (96 puits), ajouter 120 µL d'immunoconjugué à 6 mL de tampon PET. En cas de fractionnement de la plaque, pour 16 puits de la plaque utilisée, ajouter 20 µL d'immunoconjugué à 1 mL de tampon PET. L'immunoconjugué dilué au 1/50 peut être conservé à l'abri de la lumière à :

	1 mois
	-20°C

D. Substrat (R6)

Dissoudre 1 comprimé de substrat OPD dans 3 mL d'eau distillée filtrée. Après totale dissolution, ajouter 21 mL d'eau distillée pour obtenir un volume final de 24 mL de solution de substrat. 4 mL de solution substrat sont nécessaires à l'utilisation de 16 puits de la plaque. Le substrat ainsi préparé peut être aliquoté et conservé à :

	1 mois
	-20°C

E. Solution d'arrêt

Préparer une solution d'acide sulfurique à 4,5 M H₂SO₄ en ajoutant 5 mL d'acide sulfurique concentré (95-97%) à 15 mL d'eau distillée filtrée. Bien homogénéiser et conserver la solution à :

	2° - 8°C
---	----------

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le prélèvement sanguin peut être réalisé sur du citrate ou de l'EDTA. Voir "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays ; Approved Guideline - Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008¹⁵. Le prélèvement sanguin doit être réalisé de la façon suivante :

1. Prélever 9 volumes de sang dans 1 volume de citrate trisodique à 3,2% (0,109M).
2. Centrifuger le tube de prélèvement à 1,500 x g pendant 15 minutes.
3. Le plasma doit être conservé à 2° - 8°C et dosé dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Eventuellement, le plasma peut être conservé à :

	2 semaines	6 mois
	-20°C	-70°C

4. Le plasma congelé doit être décongelé rapidement à 37°C. Le plasma décongelé doit être conservé à 2° - 8°C et testé dans les 2 heures qui suivent sa décongélation.

MODE OPERATOIRE

- 1. Les 6 barrettes coâtées de la microplaque sont fournies dans un sachet plastique en présence d'un de sachet déshydratant, assemblées de telle façon qu'elles donnent l'apparence d'une plaque entière. Il est à noter qu'une seule orientation des barrettes dans le cadre de la plaque est possible. Ouvrir le sachet, sortir le nombre de barrettes nécessaires. Ne pas retirer le sachet de déshydratant de l'emballage afin de conserver les barrettes non utilisées. Ne sortir que le nombre de barrettes nécessaires à la détermination de la courbe d'étalonnage, des contrôles et des échantillons à doser. Ne pas oublier qu'il est recommandé de réaliser les tests des calibrateurs et échantillons en dupliquette. Remettre les barrettes non utilisées dans le sachet en présence du sachet déshydratant. Conserver le sachet contenant les barrettes non utilisées à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet.
- 2. Ajouter 50 µL de tampon PET dans chaque puits.
- 3. Une dilution des échantillons n'est pas nécessaire, toutefois pour des taux de PAI-1 supérieur à 50 ng/ml, diluer le plasma dans le 0 ng/ml PAI-1 Calibratruer ou en plasma déficient en tPA/PAI (BioMedica Diagnostics REF 273). Le taux de PAI-1 de l'échantillon à doser est déduit de la courbe d'étalonnage en multipliant le taux obtenu par le facteur de dilution utilisé.
- 4. Ajouter 20 µL de PAI-1 calibrateur ou de plasma à doser dans chaque puits. Couvrir les puits avec le film acétate fourni. Mettre les barrettes sur un agitateur orbital (agitation à 500-600 rpm) et incuber 1 heure à température ambiante (20°-25°C).
- 5. Oter le film acétate (ne pas le jeter) et ajouter 50 µL d'immunoconjugué à chaque puits. **Ne pas vider les puits.** Replacer le film d'acétate sur les barrettes et mettre les barrettes sur un agitateur orbital pendant 1 heure à température ambiante (20°-25°C).
- 6. Oter le film d'acétate et vider le contenu des puits. Laver les puits 4 fois avec du tampon PET Buffer. Le lavage peut être réalisé soit en utilisant un laveur de microplaque soit manuellement. (remplir les puits avec du tampon PET au moyen d'une pipette ou d'une pissette), attendre 3 minutes, vider les puits et les tapoter sur du papier absorbant 4 à 5 fois pour éliminer tout liquide résiduel. Répéter 4 fois le lavage.
- 7. Ajouter le substrat de la façon suivante : pour une plaque entière (96 puits): ajouter extemporanément 30 µL d' H₂O₂ 30% à 24 mL de solution substrat et agiter. Pour une barrette de 16 puits, ajouter extemporanément 5 µL d' H₂O₂ 30% à un aliquote de 4,0 mL de la solution substrat et agiter. L' H₂O₂ doit être ajouté au substrat juste avant utilisation. Ajouter 200 µL du mélange Substrat/H₂O₂ à chaque puits. Remettre le film d'acétate sur les puits et incuber chaque barrette sur l'agitateur orbital (à 500-600 rpm) pendant 12 minutes à température ambiante (20°-25°C).
- 8. Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 50 µL de la solution d'arrêt. La solution d'arrêt doit être ajoutée en respectant le même temps de distribution que la solution substrat. Conserver les barrettes à l'abri de la lumière jusqu'à la lecture de la densité optique.
- 9. Lire la densité optique de la réaction à 490 nm dans les 15 minutes.

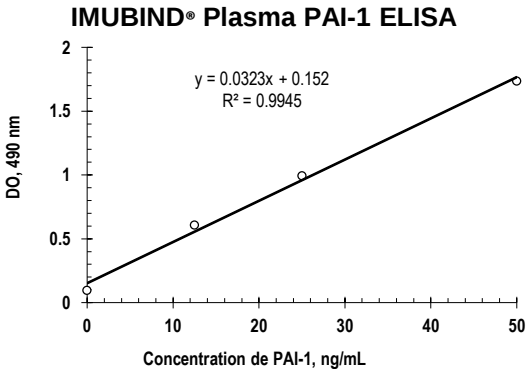
Note:

Vider totalement les puits pendant les étapes de lavage, s'assurer que les puits sont totalement vides après chaque lavage. Ne pas laisser sécher les puits entre chaque étape de la procédure.

RESULTATS

Sur papier millimétré, porter les concentrations du PAI-1:Ag en ng/ml sur l'axe des abscisses et les DO490 correspondantes en ordonnées. Pour la mesure des taux de PAI-1:Ag, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée. La courbe ci dessous est donnée à titre d'exemple.

Exemple de courbe d'étalonnage



CALCUL

Sur la courbe obtenue, déduire directement le taux de PAI-1:Ag de l'échantillon testé. Un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

Pour des taux de PAI-1 supérieurs à 50 ng/ml, l'échantillon doit être testé redilué soit le 0 ng/ml PAI-1 Calibrateur, soit en utilisant le plasma déficient tPA-PAI-1 (BioMedica Diagnostics REF 273).

TRACABILITE ET CONTROLE DES REACTIFS.

Toute information sur la traçabilité du contrôle de qualité des réactifs est disponible sur demande auprès de BioMedica Diagnostics¹⁶.

CONTROLE DE QUALITE

Il est recommandé d'utiliser 2 échantillons de plasma contenant des taux de PAI-1 Antigène à des concentrations comprises entre 6-14 ng/ml (Contrôle bas) et 36-44 ng/ml (contrôle haut), conservés aliquotés à -20°C ou en dessous, en tant que contrôle de qualité interne et pour chaque série de dosage.

Si le taux obtenu pour ces plasmas de contrôle se trouve en dehors du taux moyen attendu ± deux écarts types, le test peut être invalide. Le calibrateur 50 ng/ml et le plasma déficient fournis dans le coffret pour la réalisation de la courbe d'étalonnage ne peuvent pas être utilisés comme plasma de contrôle de qualité.

LIMITE DU TEST

Plusieurs études ont montré que les plaquettes sont une source de PAI-1 dans la circulation sanguine^{1, 2}. Les échantillons de plasmas n'ayant pas été préparés selon les recommandations de la notice, peuvent contenir des plaquettes résiduelles et entraîner un taux élevé de PAI-1:Ag. NE PAS TESTER des plasmas congelés et décongelés plus d'une fois. La centrifugation ne suffit pas à elle seule à éliminer toutes les plaquettes, des cycles de congélation, décongélation peuvent artificiellement augmenter le taux de PAI-1 en provoquant la lyse des plaquettes.

La présence d'azide de sodium dans le test inhibera la réactivité enzymatique de l'immunoconjugué. En cas de présence d'azide de sodium dans les échantillons, laver les puits après l'incubation des échantillons et ajouter 70 µl de tampon PET au puits de la plaque avant d'ajouter l'immunoconjugué.

Une contamination bactérienne de l'eau distillée filtrée peut être la cause de résultats aberrants.

Chaque laboratoire doit déterminer sa zone normale de dosage pour les échantillons prélevés sur EDTA ou citrate.

INTERFERENCES

La présence de bilirubine (1,5 mg/dL), cholestérol (228 mg/dL) et un prélèvement légèrement hémolysé n'interfère pas dans la détermination du taux de PAI-1 dans le plasma.

VALEURS ATTENDUES

Sur un groupe de 167 donneurs sains prélevés sur citrate, 95% des valeurs de PAI-1 Ag ont été trouvées entre 2 and 47 ng/mL. Chaque laboratoire doit déterminer sa zone normale de dosage pour les échantillons prélevés sur EDTA ou citrate. Des études ont montré que le taux de PAI-1 activité corrèle au taux de PAI-1 antigène dans le plasma.^{1,2} Néanmoins, les plaquettes contiennent du PAI-1 qui est libéré sous une forme inactive, affectant les valeurs PAI-1 antigène mais pas les valeurs d'activité PAI-1. Tout relarguage de plaquettes doit être évité. Les taux de PAI-1 antigène dans un plasma pauvre en plaquettes sont entre 4 et 43 ng/mL (moyenne de 18 ± 10 ng/mL avec une corrélation de PAI-1 activité de r=0,80).² Les patients atteints de thrombose veineuse profonde ont des taux plus élevés de PAI-1 antigène (moyenne de 44 ± 20 ng/mL).² Le PAI-1 antigène est également élevé au cours du troisième trimestre de la grossesse.^{2, 11}

PERFORMANCE CARACTERISTIQUES

Précision

Les études de dosage intra-essais et inter-essais réalisées en quadruplés sur 10 séries de dosages (N=40) ont donné les résultats suivants:¹⁶

Echantillon	Moyenne obtenue (PAI-1 Ag)	Intra-essai	Inter-essai
No. 1	19 ng/mL	6,6%	9,0%
No. 2	40 ng/mL	5,4%	6,9%

Sensibilité

Le dosage mesure les différentes formes de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène humain de type I (PAI-1) antigène. Les formes actives et inactives sont mesurées ainsi que les formes de PAI-1 complexées au (tissu-type Plasminogen) et l'uPA (urokinase-type Plasminogen Activator). Le seuil de détection est de 2,2 ng/mL de PAI-1 dans un plasma non dilué quand le dosage est réalisé conformément à la procédure décrite.¹⁶

REFERENCES

1. Sprengers, E.D., *et al.* Plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987; **69**: 381-87.
2. Declerck, P.J., *et al.* Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in biological fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988; **71**: 220-225.
3. Schleef, R.R., *et al.* Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. *Journal of Clinical Investigation* 1989; **83**: 1747.
4. Dieval, J., *et al.* A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1991; **77**: 528.
5. Hamsten, A., *et al.* Plasminogen activator inhibitor in plasma: Risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987; **2**: 3-8.
6. Juhan-Vague, I., *et al.* On Behalf of the ECAT Study Group. Fibrinolytic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients with Angina Pectoris. *Circulation* 1996; **94**: 2057-2063.
7. Thögersen, A.M., *et al.* High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; **98**: 2241-47.
8. Bergstein, J.M., *et al.* Role of plasminogen activator inhibitor type-1 in the pathogenesis and outcome of the Hemolytic Uremic Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1992; **327**: 755-759.
9. Margaglione, M., *et al.* Abnormally High Circulation Levels of Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Inhibitor-1 in Patients with a History of Ischemic Stroke. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; **14**: 1741-1745.
10. He, S., *et al.* Increased blood flow resistance in placental circulation and levels of plasminogen activator inhibitors type 1 and 2 in severe preeclampsia. *Blood, Coagulation & Fibrinolysis* 1995; **6**: 703-708.
11. Cerneca, F., *et al.* Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy: Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy include a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Obstetrics & Gynecology* 1997; **73**: 31-36.
12. Bellart, J., *et al.* Coagulation and fibrinolysis parameters in normal pregnancy and in gestational diabetes. *American Journal of Perinatology* 1998; **15**: 479-486.
13. Tran-Thang, C., *et al.* Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in liver deficiencies caused by chronic alcoholism or infectious hepatitis. *Thrombosis & Haemostasis* 1989; **62**: 651.
14. EC Directive 1272/2008.
15. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition. *CLSI Document H21-A5*, 2008; Vol. 28, No. 5.
16. Données sur le fichier, BioMedica Diagnostics, Stamford, Connecticut USA 06902.

ESPAÑOL

USO PROPUESTO

El IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA es un ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima para la determinación cuantitativa del antígeno humano del inhibidor del activador del plasminógeno del tipo 1 (PAI-1) en muestras de plasma.

EXPLICACIÓN DEL TEST

El inhibidor del activador del plasminógeno del tipo 1 (PAI-1), uno de los principales reguladores de la fibrinólisis, ha sido detectado en diversos tipos de tejidos y de células, p. ej. en macrófagos/monocitos, hepatocitos, endotelio vascular, en el tejido adiposo del corazón y los pulmones, así como en los trombocitos.^{1,2} El interés clínico en la medición del PAI-1 en el plasma se basa en estudios de casos individuales en los cuales los niveles de este inhibidor de proteasa serina están asociados con diversas complicaciones de tipo trombótico y fibrinolítico. Una actividad insuficiente del PAI-1 origina trastornos hemorrágicos, aunque los resultados de los tests rutinarios de screening hemostático sean normales.^{3,4} Se han observado niveles elevados de actividad del PAI-1 en pacientes con infarto de miocardio, síndrome urémico hemolítico e ictus.⁵⁻⁹ Asimismo los niveles del PAI-1 observados en el plasma de mujeres embarazadas guardan correlación con la diabetes gestacional, la reducción del flujo sanguíneo en la placenta y la preeclampsia.^{10,11,12} Los pacientes con cirrosis pueden presentar también niveles elevados de PAI-1.¹³

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test IMUBIND Plasma PAI-1 ELISA emplea micropocillos revestidos de un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el PAI-1 humano. Los estándares de PAI-1 y las muestras de plasma son vertidos en los micropocillos. Durante el periodo de incubación subsiguiente, el anticuerpo captura el antígeno PAI-1 presente en la muestra. A continuación, se añade a los micropocillos un anticuerpo conjugado con peroxidasa dirigido no ligado, se procede a verter en los pocillos un sustrato de la enzima reactiva a la peroxidasa: la ortofenilendiamina (OPD). La reacción peroxidasa/sustrato subsiguiente da lugar a una solución de color amarillo. La adición de ácido sulfúrico detiene la reacción y origina que la solución adopte un color naranja. La absorbancia de la solución se mide a 490 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de PAI-1 presente en la muestra.

REACTIVOS

- R1 96 microtitulo cubiertas de anticuerpo de PAI-1 y hoja de Acetato para cubrir las tiras durante el ensayo.
R2 1 vial de tampón PET (PBS-EDTA-Tween 20, en polvo), 15,18 g
R3 1 vial de estándar de PAI-1, 50 ng/mL (liofilizado)

- R4 1 vial de estándar de PAI-1, 0 ng/mL (liofilizado)
R5 1 vial Detection Antibody, 200 µL (concentrado)
R6 2 comprimidos de sustrato OPD (cada comprimido contiene 10 mg de OPD-HCl)

*El kit contiene reactivos suficientes para el análisis de 44 muestras de plasma y para generar una curva estándar de 4 puntos (ambos analizados en duplicado), para un total de 96 ensayos. Las muestras pueden ser plasma de pacientes, plasmas de control o plasmas de referencia.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS PARA LOS USUARIOS

El material de origen utilizado para los reactivos del presente kit ha sido testado empleando métodos aprobados por la FDA de Estados Unidos y ha sido calificado como no reactivo para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), del virus de la hepatitis C (HCV) y del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 y del tipo 2 (HIV-1, HIV-2). Dado que ninguno de los métodos analíticos conocidos puede garantizar de modo absoluto que los productos hemoderivados no puedan transmitir el HBsAg, el HCV, el HIV-1, el HIV-2 u otros agentes patógenos transportados por la sangre, estos reactivos deben ser tratados adoptando las mismas precauciones previstas para muestra humanas potencialmente infecciosas.

No lo emplee para uso interno en seres humanos o animales. No use los componentes del kit después de su fecha de caducidad. No mezcle reactivos pertenecientes a kits diferentes. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. No coma, beba, ni fume en los lugares donde se esté trabajando con las muestras o con los reactivos del kit. No use la boca para pipetear los reactivos. Utilice ropa de laboratorio y guantes desechables durante todo el procedimiento: al término del test, lávese bien las manos. Evite salpicaduras o formación de aerosol. No exponga el reactivo ortofenilendiamina (OPD) a la luz solar intensa. Conserve el OPD en lugar oscuro y evite que entre en contacto con agentes oxidantes o con metales.

PET buffer	atención		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Detection antibody	atención		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
OPD substrate	atención	  	CONT p-Phenylenediamine dihydrochloride $C_6H_4(NH_2)_2 \cdot 2HCl$ H302, H319, H317, H341, H351, H410, P264, P280, P202, P261, P273, P301+P312, P330, P305+P351+P338, P302+P352

Declaraciones peligros 14:	H302 Nocivo en caso de ingestión. H319 Provoca irritación ocular grave. H351 Se sospecha que provoca cáncer. H410 Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.	H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H341 Se sospecha que provoca defectos genéticos.
Los consejos de prudencia:	P202 No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P264 Lavarse concienzudamente tras la manipulación. P273 Evitar su liberación al medio ambiente. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P301 + P312 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si se encuentra mal. P330 Enjuagarse la boca. P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P305 + P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. P337 + P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.	

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

Agua desionizada filtrada (0,22 micrones)
Pipeta de 8 canales para dispensar de 50-200 µL
Pipetas de 1 canal para dispensar de 10-1000 µL
Pipeta repetitiva de 50 µL
Botella para enjuagado
Material absorbente o esponjilla
Contenedores de 50 mL, p. ej. placas Petri
Dispositivo de lavado para placas de micropocillos
Agitador orbital para placas de micropocillos
Espectrofotómetro para micropocillos con longitud de onda de 490 nm
Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄)
Peróxido de hidrógeno al 30% (H₂O₂)
Centrifugadora (capacidad: 1.500 x g)

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

A. Tampón PET (R2)

Disuelva el contenido del vial del tampón PET en 1 L de agua desionizada filtrada. Mezcle durante 15 minutos. El tampón preparado puede ser conservado a:

	1 mes
	2° - 8°C

B. Estándares PAI-1 (R3, R4)

- Agregue 0,5 mL de agua desionizada filtrada en cada uno de los viales de estándar de PAI-1 (0 ng/mL) y de estándar de PAI-1 (50 ng/mL). Agite cuidadosamente durante 3 minutos. Manipule los estándares como si fuesen muestras de plasma (véase "TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS"). Utilice los estándares inmediatamente después de haberlos reconstituido. Los estándares reconstituidos también pueden ser alícuotados en tubos de vidrio de cierre hermético y conservados a:

	6 meses
	-70°C o a temperaturas inferiores

- Prepare un estándar de 12,5 ng/mL y uno de 25 ng/mL para la curva de calibración agregando estándar de PAI-1 (50 ng/mL) y estándar de PAI-1 (0 ng/mL) en las proporciones indicadas a continuación. Mezcle cada tubo durante unos segundos. Pipetee los estándares de 50 ng/mL y 0 ng/mL directamente de sus viales.

Estándar PAI-1	Volumen del estándar de PAI-1 (0 ng/mL)	Volumen del estándar de PAI-1 (50 ng/mL)
12,5 ng/mL	75 µL	25 µL
25 ng/mL	50 µL	50 µL

C. Detection Antibody (R5)

Prepare el anticuerpo de detección en proporción de 1 en 50 en PET Buffer (R2). Si utiliza todos los 96 pozos, añadir 120 µL de Detection Antibody Conjugate (R5) a 5880 µL de PET Buffer. Si no todas las tiras se van a utilizar diluir 20 µL de Detection Antibody Conjugate en 980 µL de PET Buffer. El anticuerpo de detección puede ser conservado a:

	1 mes
	-20°C

D. Substrato (R6)

Vierta 1 comprimido de substrato OPD en 3 mL de agua desionizada filtrada. Una vez que se haya disuelto el comprimido, agregue 21 mL de agua desionizada filtrada para obtener un volumen final de 24 mL. 4 mL de solución del substrato son suficientes para 16 micropocillos de muestras. El substrato preparado así puede ser repartido en alícuotas y conservado congelado a:

	1 mes
	-20°C

E. Solución de paro

Prepare una solución de H₂SO₄ de 4,5 mol/L agregando 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (95-97%) a 15 mL de agua desionizada filtrada. Mezcle bien. Conserve la solución de paro no utilizada a:

	2° - 8°C
---	----------

TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para este ensayo puede emplearse plasma pobre en plaquetas con EDTA o citrato. Consulte el documento H21-A5 del CLSI, vol. 28, n° 5, 2008, con el título "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition"¹⁵. La toma de muestras de plasma deberá realizarse del siguiente modo:

- Recolecte 9 partes de sangre en 1 parte de solución anticoagulante de citrato trisódico al 3,2% (0,109 mol/L).
- Centrifugue la muestra de sangre a una velocidad de 1.500 x g durante 15 minutos.

- El plasma debe ser conservado a 2°-8°C y analizado en el intervalo de 2 horas. Como alternativa, el plasma puede ser conservado a:

	2 semanas	6 meses
	-20°C	-70°C

- Descongele el plasma congelado a 37°C rápidamente. El plasma descongelado debe ser conservado a 2°- 8°C y ser analizado en el intervalo de las 2 horas siguientes.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

- Las seis (6) tiras de micropocillos revestidos de anticuerpos vienen suministradas en un soporte de plástico y aparentan ser una sola placa compuesta de 96 micropocillos. Tenga en cuenta que las tiras están fabricadas de manera que caben en el soporte en una sola dirección. Abra el envoltorio protector y extraiga la unidad compuesta por las tiras y su soporte. En el interior del envoltorio hay también un saquito de desecante. No tire este desecante. Deje el desecante dentro del envoltorio para poder conservar las tiras de micropocillos no utilizadas. Determine el número de micropocillos necesarios para crear la curva estándar y analizar las muestras de los pacientes y las muestras de referencia/control. Recuerde que es recomendable analizar los estándares y las muestras por duplicado. Retire del soporte de plástico las tiras que no van a ser utilizadas, vuelva a colocarlas en el envoltorio y ciérrelas bien, asegurándose que contiene el saquito de desecante. Conserve el envoltorio protector bien cerrado a 2°-8°C como máximo hasta la fecha de caducidad impresa en su etiqueta.
- Agregue en cada micropocillo 50 µL de tampón PET preparado.
- Aunque diluir las muestras de plasma suele ser necesario sólo en raras ocasiones, las muestras con una concentración de PAI-1 > 50 ng/mL pueden ser diluidas con el estándar de PAI-1 (0 ng/mL) o con plasma exento de tPA/PAI-1 (BioMedica Diagnostic REF 273). Los volúmenes de PAI-1 se deducirán seguidamente en base a la curva de calibración, multiplicando la concentración medida en la muestra por el factor de dilución.
- Agregue en cada micropocillo 20 µL de estándar PAI-1 o de muestra de plasma. Cubra los pocillos con la hoja protectora de acetato suministrada. Coloque la unidad compuesta por la tira y su soporte en un agitador orbital para placas de micropocillos (velocidad: 500-600 rpm) e incúbelas durante 1 hora a temperatura ambiente (20°-25°C).
- Retire la hoja de acetato que cubre los pocillos (no la tire) y agregue en cada micropocillo 50 µL de conjugado de anticuerpos de detección. **No vacíe los pocillos.** Vuelva a cubrir los micropocillos con la hoja de acetato e incúbelos en el agitador de placas (velocidad: 500-600 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente (20°-25°C).
- Retire la hoja de acetato y vacíe el contenido de los micropocillos. Lave los pocillos cuatro (4) veces empleando el tampón PET. El lavado puede ser realizado empleando un dispositivo de lavado para placas de micropocillos, o bien manualmente (llene los pocillos con tampón PET mediante una pipeta o una botella para enjuagado, espere tres minutos, vacíelos y elimine las gotas invirtiendo la placa y golpeándola 4-5 veces sobre material absorbente. Repita esta operación cuatro (4) veces).
- Agregue el substrato del modo siguiente. Si se utiliza la totalidad de los 96 micropocillos: agregue 30 µL de H₂O₂ al 30% a los 24 mL de substrato inmediatamente antes del uso y mezcle bien. Si no se utilizan los 96 micropocillos: para cada tira de 16 micropocillos utilizada, agregue 5 µL H₂O₂ al 30% a una alícuota de 4,0 mL de substrato y mezcle bien. El H₂O₂ debe ser agregado al substrato justo antes del uso y no antes. Agregue 200 µL de la mezcla substrato/H₂O₂ en cada micropocillo. Coloque la hoja de acetato sobre los micropocillos e incube en el agitador a 500-600 rpm durante 12 minutos a temperatura ambiente (20°-25°C).
- Detenga la reacción enzimática agregando 50 µL de solución de parada. Proceda a la misma velocidad y en el mismo orden que al agregar el substrato. Mantenga las tiras en lugar oscuro hasta la medición de la absorbancia.
- Proceda a la lectura de la absorbancia de las soluciones del substrato en el intervalo de los siguientes 15 minutos, empleando un espectrofotómetro con longitud de onda de 490 nm.

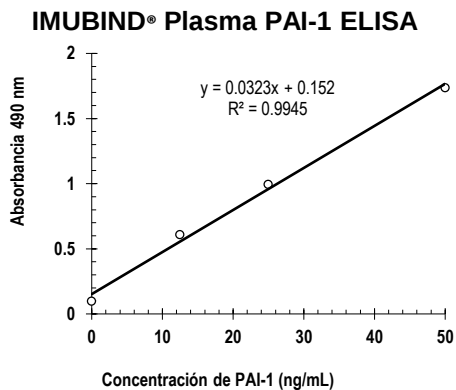
Nota

Durante la fase de lavado, llene completamente los pocillos y asegúrese de que queden completamente vacíos después de cada lavado. No permita que los pocillos se resequen.

RESULTADOS

La curva estándar se traza considerando el valor medio de la absorbancia medido para cada estándar PAI-1 en relación a su correspondiente concentración de PAI-1. Cada vez que se efectúe un ensayo se trazará una curva estándar. La curva que se muestra a continuación sirve sólo de ejemplo.

Curva Estándar Representativa



CÁLCULOS

Determine la concentración de PAI-1 de la muestra de plasma directamente por interpolación en base a la curva estándar. Para el cálculo de las concentraciones se puede utilizar una función de software para generar la regresión de la curva, suministrada junto con el espectrofotómetro para micropocillos.

Las muestras de plasma que contengan más de 50 ng/mL de PAI-1 deben ser diluidas con el estándar de PAI-1 (0 ng/mL) que se suministra, o bien con el plasma exento de tPA/PAI-1 (BioMedica Diagnostics REF 273).

TRAZABILIDAD DE LOS MATERIALES DE CONTROL

Si lo desea, solicite a BioMedica Diagnostics, información relativa a la trazabilidad de los materiales de control.¹⁶

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda conservar, en alícuotas pequeñas, 2 muestras de plasma que contengan antígeno PAI-1 en una concentración comprendida entre 6-14 ng/mL (control bajo) y 36-44 ng/mL (control alto) a -20°C o a temperaturas inferiores, y utilizarlas como estándares de control de calidad cada vez que se efectúe el ensayo. Si no se obtiene una concentración de antígeno PAI-1 entre 2 desviaciones estándares de la media para cada estándar de control, puede verse afectada la validez del ensayo. El estándar de 50 ng/mL y el plasma exento de PAI-1 son suministrados para crear la curva estándar y no deben ser utilizados para controlar las prestaciones de los instrumentos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Numerosos estudios realizados han mostrado que los trombocitos constituyen una fuente de PAI-1 en la circulación sanguínea.^{1,2} Las muestras que no son preparadas de acuerdo con las instrucciones pueden resultar contaminadas de trombocitos y presentar por lo tanto valores artificialmente elevados de PAI-1. NO someter las muestras de plasma a más de un ciclo de congelado/descongelado. Dado que no es posible obtener plasma exento de trombocitos mediante la centrifugación, seguirá habiendo presencia de algunos trombocitos. Ciclos sucesivos de congelado y descongelado originan la lisis de trombocitos y la liberación de PAI-1 en la muestra. Los plasmas sometidos a más de un ciclo de congelación y descongelación pueden presentar por lo tanto valores de PAI-1 artificialmente elevados.

El azida de sodio presente en una muestra de ensayo inhibe la actividad de la peroxidasa del conjugado de anticuerpos. Si en la muestra se ha detectado la presencia de azida de sodio, lave el pocillo al término de la incubación de la muestra y llene nuevamente el pocillo con 70 µL de tampón PET antes de agregar el conjugado.

La contaminación bacteriana del agua desionizada filtrada puede inducir a resultados aberrantes.

Cada laboratorio debe determinar sus propios rangos de valores normales para las muestras de plasma tomadas con EDTA o con citrato.

INTERFERENCIAS

La presencia de bilirrubina (1,5 mg/dL), colesterol (228 mg/dL) y la aparición de hemólisis de leve a moderada no incide en la determinación del PAI-1 humano en el plasma.

VALORES PREVISTOS

En un grupo de 167 adultos sanos, el 95% de los valores de PAI-1 en el plasma se situaba entre 2 y 47 ng/mL, utilizando plasmas citratados. Cada laboratorio debe determinar sus propios rangos normales para plasmas tomados con citrato y para los tomados con EDTA.

Estudios han demostrado que la actividad del PAI-1 guarda una buena correlación con el antígeno PAI-1 en muestras de plasma.^{1,2} Sin embargo, los trombocitos contienen una reserva de PAI-1 que, una vez liberada en forma inactiva, afecta a los valores del antígeno PAI-1, sin afectar por otro lado, a los valores de la actividad del PAI-1. Por esta razón, es importante evitar la liberación de trombocitos. Los valores del antígeno PAI-1 en plasma humano pobre en trombocitos se sitúan, según la literatura, en el rango entre 4 y 43 ng/mL (media de 18 ± 10 ng/mL con una correlación respecto a la actividad del PAI-1 de $r = 0,80$).² Los pacientes con trombosis venosa profunda recurrente presentan niveles de antígeno PAI-1 más elevados (media de 44 ± 20 ng/mL).² Los niveles de antígeno PAI-1 resultan también elevados durante el tercer trimestre del embarazo normal.^{2,11}

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES

Precisión

Se han realizado estudios para determinar los coeficientes de variación intraensayo e interensayo. Para ello se analizaron por cuatro dos (2) concentraciones de muestras en 10 procedimientos analíticos (n=40). Se constataron los coeficientes de variación siguientes.¹⁶

Muestra	Valor medio del PAI-1 analizado	Coefficiente de variación intraensayo	Coefficiente de variación interensayo
Nº 1	19 ng/mL	6,6%	9,0%
Nº 2	40 ng/mL	5,4%	6,9%

Sensibilidad

El ensayo permite la determinación cuantitativa de diversas formas de antígeno humano del inhibidor del activador del plasminógeno del tipo 1 (PAI-1) y detecta tanto la forma activa como la inactiva de PAI-1, así como el PAI-1 combinado con el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Si el ensayo es realizado según el procedimiento aquí indicado, el límite inferior de detección en la muestra sin diluir es de 2,2 ng/mL de PAI-1.¹⁶

BIBLIOGRAFÍA

1. Sprengers, E.D., *et al.* Plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987; **69**: 381-87.
2. Declerck, P.J., *et al.* Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in biological fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988; **71**: 220-225.
3. Schleef, R.R., *et al.* Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. *Journal of Clinical Investigation* 1989; **83**: 1747.
4. Dieval, J., *et al.* A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1991; **77**: 528.
5. Hamsten, A., *et al.* Plasminogen activator inhibitor in plasma: Risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987; **2**: 3-8.
6. Juhan-Vague, I., *et al.* on behalf of the ECAT Study Group. Fibrinolytic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients with Angina Pectoris. *Circulation* 1996; **94**: 2057-2063.
7. Thøgersen, A.M., *et al.* High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; **98**: 2241-47.
8. Bergstein, J.M., *et al.* Role of plasminogen activator inhibitor type-1 in the pathogenesis and outcome of the Hemolytic Uremic Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1992; **327**, 755-759.
9. Margaglione, M., *et al.* Abnormally High Circulation Levels of Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Inhibitor-1 in Patients with a History of Ischemic Stroke. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; **14**: 1741-1745.
10. He, S., *et al.* Increased blood flow resistance in placental circulation and levels of plasminogen activator inhibitors type 1 and 2 in severe preeclampsia. *Blood, Coagulation & Fibrinolysis* 1995; **6**: 703-708.
11. Cerneca, F., *et al.* Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy: Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy include a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Obstetrics & Gynecology* 1997; **73**: 31-36.
12. Bellart, J., *et al.* Coagulation and fibrinolysis parameters in normal pregnancy and in gestational diabetes. *American Journal of Perinatology* 1998; **15**: 479-486.
13. Tran-Thang, C., *et al.* Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in liver deficiencies caused by chronic alcoholism or infectious hepatitis. *Thrombosis & Haemostasis* 1989; **62**: 651.
14. Directiva 1272/2008/EC
15. Collection, Transport and Preparation of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition. *CLSI Document H21-A5*, 2008; Vol. 28, No. 5.
16. Datos registrados a disposición de BioMedica Diagnostics, Stamford, Connecticut, USA 06902.

ITALIANO

UTILIZZO

IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA è un test con immunoassorbente legato all'enzima per la misurazione dell'antigene umano dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) in campioni di plasma.

SOMMARIO

L'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), uno dei principali regolatori della fibrinolisi, è stato riscontrato in diversi tipi di tessuti e di cellule, tra cui macrofagi/monociti, epatociti, endotelio vascolare, tessuto adiposo del cuore e dei polmoni, nonché nelle piastrine.^{1,2} L'interesse clinico per la misurazione del PAI-1 nel plasma si basa su "case studies" in cui i livelli di questo inibitore della serina proteasi vengono associati a diverse complicanze di tipo trombotico e fibrinolitico. Un'insufficiente attività del PAI-1 si accompagna a disturbi emorragici; i test di screening emostatici eseguiti di routine sono comunque normali.^{3,4} Livelli elevati di attività del PAI-1 si osservano in pazienti affetti da infarto del miocardio, sindrome uremico-emolitica ed ictus.⁵⁻⁹ Anche i livelli di PAI-1 evidenziati nel plasma di donne in gravidanza sono correlati con diabete gestazionale, flusso sanguigno placentare ridotto e preeclampsia.^{10,11,12} I pazienti con cirrosi possono pure presentare livelli elevati di PAI-1.¹³

PRINCIPIO DEL METODO

Il test IMUBIND Plasma PAI-1 ELISA utilizza micropozzetti rivestiti di un anticorpo monoclonale di topo diretto contro il PAI-1 umano. Gli standard PAI-1 ed i campioni di plasma vengono aggiunti ai pozzetti e, durante il periodo di incubazione, l'anticorpo cattura l'antigene PAI-1 presente. Successivamente si procede all'aggiunta nel pozzetto di anticorpi policlonali di capra coniugati con perossidasi diretti contro il PAI-1 umano; questo coniugato si lega alle molecole di PAI-1 catturate. Dopo aver eliminato tutto il materiale non legato tramite lavaggio, si procede all'aggiunta nei pozzetti di un substrato dell'enzima reattivo per la perossidasi, l'o-fenilendiammina (OPD). La reazione perossidasi/substrato che segue dà luogo allo sviluppo di una soluzione di colore giallo. La reazione viene arrestata dall'aggiunta di acido solforico che induce un cambiamento del colore della soluzione che vira quindi all'arancione. L'assorbanza della soluzione viene misurata a 490 nm. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla quantità di PAI-1 presente nel campione.

REAGENTI

- R1 96 micropozzetti rivestiti di anticorpi di PAI-1 e foglio di protezione in acetato
- R2 1 flacone di tampone PET (PBS – EDTA – Tween 20, in polvere), 15,15 g
- R3 1 flacone di standard di PAI-1, 50 ng/mL (liofilizzato)
- R4 1 flacone di standard di PAI-1, 0 ng/mL (liofilizzato)
- R5 1 flacone di Detection Antibody, 200 µL (concentrato)
- R6 2 compresse di substrato OPD (ogni compressa contiene 10 mg di OPD-HCl)

*La quantità di reagenti fornita è sufficiente per l'analisi di 44 campioni di plasma e per costruire una curva standard a 4 punti (entrambi analizzati in duplicato), per un totale di 96 tests. Campioni di pazienti, controlli o plasma di riferimento sono campioni accettabili.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI D'IMPIEGO

Con i metodi approvati dalla FDA, il materiale d'origine utilizzato per i reagenti del presente kit è risultato non reattivo per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg), il virus dell'epatite C (HCV) e il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 e di tipo 2 (HIV-1, HIV-2). Nessuno dei metodi analitici conosciuti può garantire in modo assoluto che i prodotti derivati da sangue umano non siano in grado di trasmettere l'HBsAg, l'HCV, l'HIV-1, l'HIV-2 o altri agenti patogeni veicolati nel sangue; pertanto, si raccomanda di trattare questo reagente adottando le stesse precauzioni previste per i campioni umani potenzialmente infettivi.

Non per uso interno negli esseri umani o negli animali. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza. Non miscelare reagenti appartenenti a kit differenti. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti. Non fumare, mangiare o bere nei luoghi in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit. Non pipettare i reagenti con la bocca. Indossare camice da laboratorio e guanti monouso per tutta la durata del test e, al termine, lavarsi accuratamente le mani. Evitare schizzi o la formazione di aerosol. Tenere il reagente di OPD al riparo dalla luce intensa del sole. Conservare l'OPD al buio ed evitare che venga a contatto con agenti ossidanti o con parti metalliche.

PET buffer	Attenzione		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Detection antibody	Attenzione		H319, P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313

OPD substrate	Attenzione	  	CONT o-Phenylenediamine dihydrochloride <chem>C6H4(NH2)2·2HCl</chem>
H302, H319, H317, H341, H351, H410, P264, P280, P202, P261, P273, P301+P312, P330, P305+P351+P338, P302+P352			

Dichiarazioni Pericoli¹⁴:	H302 Nocivo se ingerito. H317 Può provocare una reazione allergica cutanea. H319 Provoca grave irritazione oculare. H341 Sospettato di provocare alterazioni genetiche. H351 Sospettato di provocare il cancro. H410 Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
Prudenza:	P202 Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P264 Lavare accuratamente dopo l'uso. P273 Non disperdere nell'ambiente. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P301 + P312 IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. P330 Sciacquare la bocca. P302 + P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. P305 + P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P337 + P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Acqua deionizzata filtrata (0,22 micron)
Pipetta da 8 canali per dispensare volumi da 50 – 200 µL
Pipette da 1 canale per dispensare volumi da 10 – 1000 µL
Pipetta ripetitiva da 50 µL
Flacone morbido ("squeeze bottle")
Materiale assorbente o spugna
Contenitori da 50 mL, per es. piastre Petri
Dispositivo di lavaggio per piastre a micropozzetti
Agitatore orbitale per piastre a micropozzetti
Lettore per piastre a micropozzetti programmato su una lunghezza d'onda di 490 nm
Acido solforico concentrato (H₂SO₄)
Perossido d'idrogeno al 30% (H₂O₂)
Centrifuga (capacità: 1.500 x g)

PREPARAZIONE DEI REAGENTI E STABILITÀ

A. Tampone PET (R2)

Dissolvere il contenuto del flacone di tampone PET in 1 L di acqua deionizzata filtrata. Miscelare per 15 minuti. Il tampone preparato può essere conservato ad:

	1 mese
	2° - 8°C

B. Standard PAI-1 (R3, R4)

- Aggiungere 0,5 mL di acqua deionizzata filtrata in ciascuno dei flaconi di standard di PAI-1 (0 ng/mL) e di standard di PAI-1 (50 ng/mL). Agitare delicatamente per 3 minuti. Trattare gli standard come se fossero campioni di plasma (cfr. sezione "PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI"). Utilizzare gli standard entro un'ora dalla ricostituzione. Gli standard ricostituiti possono essere anche ripartiti in aliquote in provette sigillate e conservati a:

	6 mesi
	-70°C o a temperature inferiori

- Preparare uno standard da 12,5 ng/mL ed uno da 25 ng/mL per la curva di calibrazione aggiungendo standard di PAI-1 (50 ng/mL) e standard di PAI-1 (0 ng/mL) in modo da ottenere i seguenti rapporti. Miscelare ciascuna provetta per alcuni secondi. Pipettare gli standard da 50 ng/mL e da 0 ng/mL direttamente dai rispettivi flaconi.

Standard PAI-1	Volume dello standard di PAI-1 (0 ng/mL)	Volume dello standard di PAI-1 (50 ng/mL)
12,5 ng/mL	75 µL	25 µL
25 ng/mL	50 µL	50 µL

C. Detection Antibody (R5)

Preparare l' anticorpo di rilevazione nella proporzione di 1:50 in PET Buffer (R2). Se tutti i 96 micropozzetti sono utilizzati, aggiungere 120 µL di Detection Antibody (R5) a 5880 µL di PET Buffer. Altrimenti, aggiungere 20 µL di Detection Antibody a 980 µL di PET Buffer per ciascuna delle strisce utilizzate. L'anticorpo di rilevazione può essere conservato a:

	1 mese
	-20°C

D. Substrato (R6)

Aggiungere 1 compressa di substrato OPD a 3 mL di acqua deionizzata filtrata. Una volta che la compressa si è completamente disciolta, aggiungerci 21 mL di acqua deionizzata filtrata per ottenere un volume finale di 24 mL. 4 mL di soluzione del substrato sono sufficienti per 16 pozzetti del campione. Il substrato così preparato può essere ripartito in aliquote e conservato congelato a:

	1 mese
	-20°C

E. Soluzione di arresto

Preparare una soluzione di H₂SO₄ da 4,5 mol/L aggiungendo 5 mL di acido solforico concentrato (95-97%) a 15 mL di acqua deionizzata filtrata. Miscelare accuratamente. Conservare la soluzione di arresto non utilizzata a:

	2° - 8°C
---	----------

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si può utilizzare plasma povero di piastrine raccolto in provette con EDTA o citrato. Consultare la sezione "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition"¹⁵, documento H21-A5 dell'CLSI, vol. 28, n. 5, 2008. Procedere al prelievo di campioni di plasma attenendosi alle seguenti istruzioni:

1. Raccogliere 9 parti di sangue in 1 parte di soluzione anticoagulante di citrato trisodico al 3,2% (0,109 mol/L).
2. Centrifugare il campione di sangue ad una velocità di 1.500 x g per 15 minuti.
3. Il plasma deve essere conservato a 2° - 8°C ed analizzato entro 2 ore. In alternativa, il plasma può essere conservato a:

	2 settimane	6 mesi
	-20°C	-70°C

4. Scongellare rapidamente il plasma congelato a 37°C. Il plasma scongelato deve essere conservato a 2° - 8°C ed analizzato entro 2 ore.

PROCEDURA

1. Le sei (6) strisce di micropozzetti rivestite di anticorpi vengono fornite in un supporto di plastica e sono assemblate in modo tale da sembrare una piastra fissa composta da 96 micropozzetti. Si prega di osservare che le strisce sono realizzate in modo tale da poter essere sistemate all'interno del supporto soltanto in una direzione. Aprire l'involucro protettivo ed estrarre il gruppo strisce/supporto. L'involucro protettivo contiene un sacchetto di essiccante. Non gettare via l'essiccante. Tenere l'essiccante dentro l'involucro protettivo per la conservazione delle strisce di micropozzetti non utilizzate. Determinare il numero di micropozzetti necessari per costruire la curva standard ed analizzare il numero di campioni di pazienti e di campioni di riferimento/controlli. Non dimenticare di analizzare gli standard ed i campioni del test in duplicato, secondo quanto raccomandato. Rimuovere le strisce che non verranno utilizzate, rimetterle nell'involucro protettivo e risigillare quest'ultimo accertandosi che contenga l'essiccante. Conservare l'involucro protettivo sigillato a 2° - 8°C fino alla data di scadenza stampata sulla rispettiva etichetta.
2. Aggiungere in ciascun micropozzetto 50 µL di tampone PET preparato.
3. Sebbene sia necessario diluire i campioni di plasma solo raramente, i campioni contenenti più di 50 ng/mL di PAI-1 possono essere diluiti con standard di PAI-1 (0 ng/mL) o con plasma privo di tPA/PAI-1 (REF 273 dell'BioMedica Diagnostics). I volumi di PAI-1 vengono in seguito rilevati in base alla curva di calibrazione moltiplicando il valore del campione misurato per il fattore di diluizione.

4. Aggiungere in ogni micropozzetto 20 µL di standard PAI-1 o di campione di plasma. Coprire i pozzetti con il foglio di acetato fornito. Collocare il gruppo strisce/supporto su un agitatore orbitale per piastre a micropozzetti (velocità: 500–600 rpm) ed incubare per 1 ora a temperatura ambiente (20° - 25°C).
5. Rimuovere il foglio di protezione in acetato (non gettare via) ed aggiungere in ogni micropozzetto 50 µL di coniugato di anticorpi di rilevazione. **Non svuotare i pozzetti.** Rimettere il foglio di acetato sopra i micropozzetti ed incubare nell'agitatore per piastre (velocità: 500–600 rpm) per 1 ora a temperatura ambiente (20° - 25°C).
6. Togliere il foglio di acetato e svuotare i micropozzetti. Lavare i pozzetti per quattro (4) volte con il tampone PET. Il lavaggio può essere eseguito utilizzando il dispositivo di lavaggio per piastre a micropozzetti oppure manualmente (riempire i pozzetti con tampone PET utilizzando una pipetta o un flacone morbido ("squeeze bottle"), lasciare trascorrere 3 minuti, svuotare e rimuovere le goccioline adesive battendo la piastra, dopo averla capovolta, per 4-5 volte su materiale assorbente. Ripetere quest'operazione per quattro (4) volte).
7. Aggiungere il substrato nel modo seguente. Se si utilizzano tutti i 96 micropozzetti: aggiungere 30 µL di H₂O₂ al 30% ai 24 mL di substrato immediatamente prima dell'uso e miscelare accuratamente. Se non si utilizzano tutti i 96 micropozzetti: per ciascuna striscia a 16 pozzetti utilizzata, aggiungere 5 µL di H₂O₂ al 30% ad un'aliquota da 4,0 mL di substrato e miscelare accuratamente. L'H₂O₂ deve essere aggiunta al substrato subito prima dell'uso. Aggiungere 200 µL della miscela substrato/ H₂O₂ a ciascun micropozzetto. Rimettere il foglio di acetato sopra i micropozzetti ed incubare nell'agitatore per piastre (velocità: 500–600 rpm) per 12 minuti a temperatura ambiente (20° - 25°C).
8. Bloccare la reazione enzimatica aggiungendo 50 µL di soluzione di arresto. Procedere alla stessa velocità e nello stesso ordine osservati per l'aggiunta del substrato. Conservare le strisce al buio fino a quando non si procede alla misurazione dell'assorbanza.
9. Entro 15 minuti, procedere alla lettura dell'assorbanza delle soluzioni del substrato utilizzando un lettore per piastre a micropozzetti regolato ad una lunghezza d'onda di 490 nm.

Annotazione procedurale

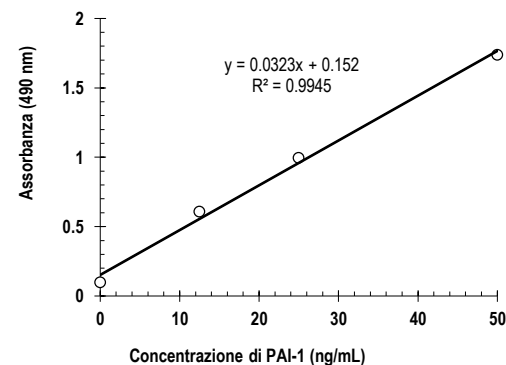
Durante la fase di lavaggio riempire completamente i micropozzetti ed assicurarsi che vengano completamente svuotati dopo ciascun lavaggio. Non fare asciugare i micropozzetti.

RISULTATI

La curva standard si costruisce tracciando il valore medio di assorbanza misurato per ciascuno standard PAI-1 in rapporto alla sua corrispondente concentrazione di PAI-1. Ogni volta che si esegue il test è necessario costruire una curva standard. La curva sotto riportata è solo a scopo esemplificativo.

Curva Standard Rappresentativa

IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA



CALCOLI

Determinare la concentrazione di PAI-1 del campione di plasma direttamente per interpolazione in base alla curva standard. Per il calcolo delle concentrazioni si può utilizzare una funzione software di regressione della curva, integrata nel lettore per piastre a micropozzetti.

I campioni di plasma contenenti una concentrazione di PAI-1 superiore a 50 ng/mL devono essere diluiti con lo standard di PAI-1 (0 ng/mL) fornito o con il plasma privo di tPA/PAI-1 (REF 273 dell'BioMedica Diagnostics).

ABILITÀ DEI MATERIALI DI CONTROLLO

È possibile richiedere delle informazioni relative alla rintracciabilità dei materiali di controllo presso l'BioMedica Diagnostics.¹⁶

CONTROLLO DI QUALITÀ

Si raccomanda di conservare 2 campioni di plasma contenenti antigene PAI-1 a concentrazioni comprese tra 6-14 ng/mL (controllo basso) e 36-44 ng/mL (controllo alto) in piccole aliquote, a -20°C o a temperature inferiori e di utilizzarli come standard del controllo di qualità ogni volta che si esegue il test. Se non si ottiene un livello di antigene PAI-1 entro 2 deviazioni standard dalla media per ciascuno standard di controllo, il test può risultare non valido. Lo standard da 50 ng/mL ed il plasma privo de PAI-1 vengono forniti per costruire la curva standard e non vanno utilizzati per controllare le prestazioni della strumentazione.

LIMITI DEL METODO

Da numerosi studi condotti è emerso che le piastrine rappresentano una fonte di PAI-1 nel circolo ematico.^{1,2} I campioni che non vengono preparati secondo le istruzioni fornite possono essere contaminati con piastrine e presentare pertanto valori artificialmente elevati di PAI-1, NON sottoporre i campioni di plasma a più di un ciclo di congelamento/scongelamento. Dal momento che non è possibile ottenere tramite centrifugazione plasma privo di piastrine, alcune piastrine continueranno necessariamente ad essere presenti. Cicli ripetuti di congelamento/scongelamento indurranno la lisi delle piastrine nonché il rilascio di PAI-1 nel campione. I campioni di plasma sottoposti a più di un ciclo di congelamento/scongelamento possono presentare valori di PAI-1 artificialmente elevati.

Il sodio azoturo presente in un campione in esame inibisce l'attività della perossidasi degli anticorpi coniugati. Se nel campione era stata riscontrata la presenza di sodio azoturo, lavare il pozzetto al termine dell'incubazione del campione e riempire di nuovo il pozzetto con 70 µL di tampone PET prima di procedere all'aggiunta del coniugato.

La contaminazione batterica dell'acqua deionizzata filtrata può portare a risultati aberranti.

Ciascun laboratorio deve determinare i propri range di valori normali separatamente per i campioni di plasma raccolti con EDTA o con citrato.

INTERFERENZE

La presenza di bilirubina (1,5 mg/dL), di colesterolo (228 mg/dL) o la comparsa di emolisi in forma da lieve a moderata non indice sulla determinazione del PAI-1 umano nel plasma.

VALORI ATTESI

In un gruppo di 167 adulti sani, il 95% dei valori di PAI-1 nel plasma è risultato compreso tra 2 e 47 ng/mL utilizzando i campioni di plasma raccolti con citrato. Ciascun laboratorio deve determinare il proprio range di valori normali sia per i campioni di plasma raccolti con citrato che per i campioni di plasma raccolti con EDTA.

Gli studi dimostrano che l'attività del PAI-1 è ben correlata con l'antigene PAI-1 nei campioni di plasma^{1,2}. Ciononostante, le piastrine contengono riserve di PAI-1 che, una volta rilasciato in forma inattiva, influenza sì i valori dell'antigene PAI-1 ma non quelli dell'attività PAI-1, ragion per cui il rilascio delle piastrine va evitato. È stato riportato che i valori dell'antigene PAI-1 nel plasma umano povero di piastrine risultano compresi nel range 4 - 43 ng/mL (media di 18 ± 10 ng/mL con una correlazione rispetto all'attività PAI-1 di r=0,80).² I pazienti con trombosi venosa profonda e ricorrente hanno presentato livelli di antigene PAI-1 più elevati (media di 44 ± 20 ng/mL).² I livelli di antigene PAI-1 risultano elevati anche durante il terzo trimestre di una gravidanza normale.^{2,11}

PRESTAZIONI

Precisione

Durante gli studi condotti sono state esaminate le variazioni intra-assay ed inter-assay di due (2) concentrazioni di campione analizzate in quadruplicato nel corso di 10 sedute analitiche (n=40). Sono state riscontrate le seguenti variazioni.¹⁶

Campione	Valore medio di PAI-1 misurato	Variazione intra-assay	Variazione inter-assay
N. 1	19 ng/mL	6,6%	9,0%
N. 2	40 ng/mL	5,4%	6,9%

Specificità

Il test permette la determinazione quantitativa di diverse forme di antigene umano dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) e rileva la forma sia attiva che inattiva del PAI-1 nonché il PAI-1 combinato con l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e l'attivatore del plasminogeno di tipo urocinasi (uPA). Se il test viene eseguito in base alla procedura,¹⁶ il limite di rilevazione inferiore nel campione intero (non diluito) è pari a 2,2 ng/mL di PAI-1.

BIBLIOGRAFIA

1. Sprengers, E.D., *et al.* Plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987; **69**: 381-87.
2. Declerck, P.J., *et al.* Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in biological fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988; **71**: 220-225.
3. Schleef, R.R., *et al.* Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. *Journal of Clinical Investigation* 1989; **83**: 1747.

4. Dieval, J., *et al.* A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1991; **77**: 528.
5. Hamsten, A., *et al.* Plasminogen activator inhibitor in plasma: Risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987; **2**: 3-8.
6. Juhan-Vague, I., *et al.* on behalf of the ECAT Study Group. Fibrinolytic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients with Angina Pectoris. *Circulation* 1996; **94**: 2057-2063.
7. Thøgersen, A.M., *et al.* High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; **98**: 2241-47.
8. Bergstein, J.M., *et al.* Role of plasminogen activator inhibitor type-1 in the pathogenesis and outcome of the Hemolytic Uremic Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1992; **327**, 755-759.
9. Margaglione, M., *et al.* Abnormally High Circulation Levels of Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Inhibitor-1 in Patients with a History of Ischemic Stroke. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; **14**: 1741-1745.
10. He, S., *et al.* Increased blood flow resistance in placental circulation and levels of plasminogen activator inhibitors type 1 and 2 in severe preeclampsia. *Blood, Coagulation & Fibrinolysis* 1995; **6**: 703-708.
11. Cerneca, F., *et al.* Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy: Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy include a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Obstetrics & Gynecology* 1997; **73**: 31-36.
12. Bellart, J., *et al.* Coagulation and fibrinolysis parameters in normal pregnancy and in gestational diabetes. *American Journal of Perinatology* 1998; **15**: 479-486.
13. Tran-Thang, C., *et al.* Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in liver deficiencies caused by chronic alcoholism or infectious hepatitis. *Thrombosis & Haemostasis* 1989; **62**: 651.
14. Direttiva CE 1272/2008.
15. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and of Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition. *CLSI Document H21-A5*, 2008; Vol. 28, No. 5.
16. Dati su file disponibili presso la BioMedica Diagnostics, Stamford, Connecticut, USA 06902.

	ENGLISH	DEUTSCH	FRANCAIS	ESPAÑOL	ITALIANO
	Definition of Symbols	Bedeutung der Symbole	Definizione dei simboli	Definición de símbolos	Définition des symboles
	Consult instructions for use	Gebrauchsanleitung beachten	Lire le mode d'emploi	Consulte las instrucciones para el Uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	Refer to SDS	SDS konsultieren	Reportez-vous à SDS	Consulte SDS	Consultare la SDS
	In vitro diagnostic medical device	Medizinisches Produkt zur in vitro-Diagnostik	Dispositif de diagnostic médical in vitro	Dispositivo para diagnóstico in vitro	Dispositivo medico per diagnosi in vitro
	Manufactured by	Hergestellt durch	Fabricant	Fabricado por	Prodotto da
	Temperature limitation: Store at 2°C to 8°C	Bei 2°C bis 8°C lagern	Conserver à une température de 2°C à 8°C	Conservar entre 2°C y 8°C	Conservare tra 2°C e 8°C
	Batch code / Lot number	Charge	Numéro de lot	Código de lote	Numero di lotto
	Expiration Date	Verfallsdatum	Date d'expiration	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Catalog number	Katalog-Nr	Numéro de référence dans le catalogue	Número de catálogo	Numero di catalogo
	CE Mark	CE-Siegel	Marque CE	Marca CE	Marchio CE
	European Authorised Representative	Autorisierte Vertretung für Europa	Représentant européen autorisé	Representante Europeo Autorizado	Rappresentante autorizzato per l'Europa
	Contains sufficient for <n> tests	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" tests
	Contains...	Enthält...	Contient...	Contiene...	Contiene...