

SPECTROLYSE® PAI-1

REF 101201

*a chromogenic assay for measuring
PAI-1 activity in human plasma*

*Chromogener Test zur Bestimmung
der PAI-1 Aktivität in humanem Plasma*



EC **REP**

american diagnostica GmbH
Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany
Tel. + 49 61 57 / 99 08 99 • Fax + 49 61 57 / 99 08 08

ENGLISH

INTENDED USE

SPECTROLYSE® PAI-1 is intended for the quantitative determination of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) activity in human plasma. The test is for *in vitro* diagnostic use.

EXPLANATION OF THE TEST

Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) is a rapid, specific inhibitor of plasminogen activator in plasma.¹⁻³ As a primary regulator of fibrinolysis, PAI-1 is found in a number of different tissues and cell types including macrophages and monocytes, hepatocytes, vascular endothelia cells, adipose tissue of the heart and lungs and platelets.⁴⁻⁵ 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 hemostatic screening tests are normal.⁶⁻⁷ An increased level of PAI-1 is a key factor in impaired fibrinolytic function and may be associated with thrombotic diseases.⁸⁻⁹ High levels of PAI-1 activity are found in patients suffering from myocardial infarction, hemolytic uremic syndrome, and stroke.¹⁰⁻¹⁴ Levels of PAI-1 in the plasma of pregnant women are also correlated with gestational diabetes, reduced placental blood flow and preeclampsia.¹⁵⁻¹⁸ Patients with cirrhosis may also have elevated levels of PAI-1.¹⁹

PRINCIPLE OF THE METHOD

Definition of the PAI-1 Unit of Activity

One unit of PAI-1 activity (IU) is defined as the amount of PAI-1 that inhibits one International Unit (IU) of human tPA.

SPECTROLYSE PAI-1 is a two-stage, indirect chromogenic assay for measuring PAI-1 levels in plasma as described by Chmielewska *et al.*¹⁹ and Eriksson *et al.*²⁰

In the first stage, a fixed amount of human tPA is added to a plasma sample and allowed to react with the PAI-1 present in the sample. Next, the sample is acidified to destroy alpha-2-antiplasmin that would otherwise interfere with the assay.

In the second stage, the residual tPA activity is measured by adding the sample to a mixture of human glu-plasminogen, poly-D-lysine and a chromogenic substrate for plasmin (PAR). The residual tPA activity in the plasma sample catalyzes the conversion of plasminogen to plasmin, which in turn hydrolyzes the chromogenic substrate. Poly-D-lysine is present as a stimulator of this tPA catalyzed conversion of plasminogen to plasmin. As the PAI-1 activity measured in the sample is based upon the residual tPA activity, the absorbance of the assayed is inversely proportional to the amount of PAI-1 activity in the sample.

REAGENTS

Spectrolyse PAI-1 contains reagents for 60 assays using a microwell test format. Note: The outer wells of a 96 microwell test plate are not used in the assay; only the 60 inner wells are used.

- R1 1 vial of Imidazole Buffer, pH 7.2, 10X concentrated, 3 mL
- R2 2 vials of Plasminogen Activator Reagent (PAR)
- R3 1 vial of 1-chain human tPA, 6000 IU/mL, lyophilized
- R4 1 vial of tPA/PAI-1 Depleted Plasma, 1 mL, lyophilized
- R5 1 vial of Acetate Buffer, pH 3.9, 7 mL
- R6 1 vial of Stop Reagent, 4 mL

WARNING

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 FDA 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.

For *In Vitro* Diagnostic Use. 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.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Reagents are stable until the expiration date printed on their vial labels when stored at 2°-8°C. Reconstitute and prepare each reagent according to the following instructions.

A. Imidazole Buffer (R1)

Prepare working strength Imidazole Buffer by diluting the 10X concentrate 1:10 with filtered deionized/distilled water (e.g. add 1 mL of concentrate to 9 mL of water). Working strength Imidazole Buffer is stable for:

	1 month
	2°-8°C

B. Plasminogen Activator Reagent (R2)

Reconstitute a vial with 6.25 mL of working strength Imidazole Buffer. Vortex vigorously for 1 minute. Let stand on ice for 15 minutes. Reconstituted PAR reagent is stable for:

	24 hours
	2°-8°C

C. 1-chain human tPA (R3)

To obtain a solution containing 6,000 IU/mL tPA, reconstitute with the volume of Acetate Buffer as specified on the vial label, mix gently and place on ice to obtain a solution containing 6000 IU/mL. Reconstituted tPA may be used for up to 4 days when stored at 2°-8°C. Prepare a 40 IU/mL tPA solution by adding 50 μ L of tPA to 7.5 mL of working strength Imidazole Buffer. Place this 40 IU/mL solution on ice until using in the assay. The 40 IU/mL tPA solution is stable for:

	24 hours
	2°-8°C

D. tPA/PAI-1 Depleted Plasma (R4)

Reconstitute the vial with 1.0 mL of filtered deionized/distilled water and gently mix. Allow 15 minutes for complete dissolution. The tPA/PAI-1 Depleted Plasma is stable for:

	2 weeks
	-20°C

E. Acetate Buffer (R5)

Supplied ready to use. Acetate Buffer is stable for:

	1 year
	2°-8°C

F. Stop Reagent (R6)

Supplied ready to use. Stop Reagent is stable for:

	1 year
	2°-8°C

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Citrate collected platelet poor plasma must 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, January 2008.²¹ Plasma collection should be performed as follows:

1. Using a syringe or evacuated siliconized tubes, collect 9 parts of blood into 1 part of 3.2% (0.109 M) trisodium citrate (dihydrate form) anticoagulant solution.
2. Centrifuge the blood sample at a minimum of 5,000 x g for 10 minutes to yield platelet poor plasma. The plasma should have fewer than 10⁴ platelets/μL. Platelets may also be removed by passing the plasma through a 0.22 micron filter.
3. Plasma should be stored at 2°-8°C and assayed within 2 hours. Alternatively, plasma may be stored at -70°C for up to 6 months.
4. Frozen plasma should be thawed rapidly at 37°C. Thawed plasmas should be stored at 2°-8°C and assayed within 2 hours.

Note: Samples taken with minimal stasis from resting subjects should be used. Large diurnal variations of PAI-1 activity have been reported, morning values being about twofold higher than afternoon values.²² This should be taken into consideration when designing clinical studies and routine applications.

PROCEDURE

Materials Provided – See Reagents

Materials Required But Not Provided

96 well round bottom or flat bottom microwell plate
acetate cover sheet for microwell plate
filtered deionized or distilled water
tPA/PAI depleted plasma (SD REF 273)*
pooled normal plasma, plasmas with known PAI-1 levels
50-300 μL eight channel multi-pipette
0-200 μL, 200-1000 μL single pipettes
3 mL, 15 mL and 50 mL plastic conical tubes
microwell plate reader for reading absorbance at 405 nm
37°C water bath
melting ice

* may be used to dilute and retest samples with PAI-1 level > 30.0 IU/mL

A. Preparation of 40 IU/mL and 0 IU/mL "PAI-1 Standards"

Initial standards are prepared by adding a known amount of 40 IU/mL tPA or buffer to the tPA/PAI-1 depleted plasma. Since PAI-1 inhibits tPA, the tPA/PAI-1 depleted plasma that is mixed with buffer is called the 40 IU/mL "PAI-1 Standard". The absence of tPA is equivalent to having PAI-1 present. The tPA/PAI-1 depleted plasma that is mixed with the 40 IU/mL tPA solution is called the 0 IU/mL "PAI-1 Standard". The presence of tPA is equivalent to having no PAI-1 activity.

Prepare PAI-1 standards of 0 IU/mL "PAI-1" and 40 IU/mL "PAI-1" in plastic test tubes as indicated in the table below. Incubate the 0 IU/mL and 40 IU/mL PAI-1 standards for 15 minutes at 25°C.

"PAI-1" Standard	Volume of tPA/PAI-1 Depleted Plasma	Volume of 40 IU/mL tPA Solution	Volume of Imidazole Buffer
0 IU/mL	50 μL	50 μL	None
40 IU/mL	50 μL	None	50 μL

B. Preparation of Plasma Samples

Dilute each plasma sample to be assayed 1:2 with the 40 IU/mL tPA solution, i.e. 50 μL of plasma sample + 50 μL of tPA solution. Incubate each plasma sample for 15 minutes at 25°C to allow for the tPA and PAI-1 to react. Samples should be prepared at the same time as the "PAI-1" standards.

C. Incubation of "PAI-1" Standards and Plasma Samples

1. To the tubes containing standards and samples, add 100 μL Acetate Buffer and mix.
2. Incubate 20 minutes in 37°C water bath.
3. Add 2.0 mL of filtered deionized water and mix.

D. Preparation of Intermediate "PAI-1" Standards

Prepare intermediate "PAI-1" standards of 10 IU/mL, 20 IU/mL and 30 IU/mL in plastic test tubes as follows:

"PAI-1" Standard	Volume of 40 IU/mL "PAI-1" Standard	Volume of 0 IU/mL "PAI-1" Standard
10 U/mL	25 μL	75 μL
20 U/mL	50 μL	50 μL
30 U/mL	75 μL	25 μL

E. PAI-1 Activity Determination

When utilizing the entire set of reagent (assaying 60 test points), to assure uniform temperature distribution throughout the microwell plate, the outer microwells of the plate are not used to assay standards or samples but are filled with deionized or distilled water. When utilizing less than the entire set of reagents (assaying less than 60 test points), all unused inner microwells should be filled with water.

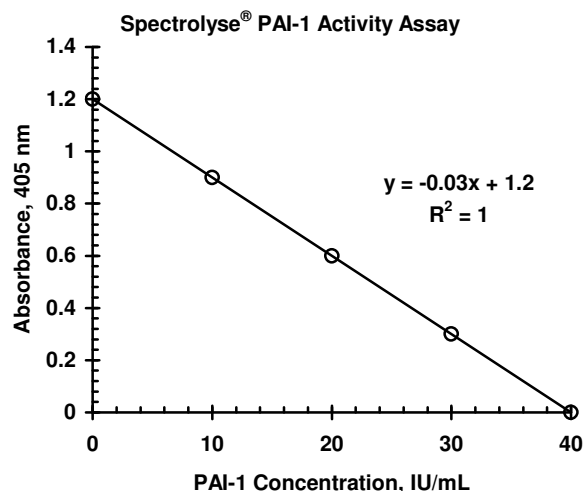
It is recommended to assay all standards and samples in duplicate.

1. Add 20 µL of "PAI-1" standard or sample to a microwell.
2. Add 200 µL of ice cold PAR to standards and samples.
3. Seal the plate with the acetate cover sheet.
4. Incubate by floating the microwell plate in a water bath at 37°C for 90 minutes.
5. Remove from the water bath and add 50 µL Stop Reagent to each microwell.
6. Measure the solution absorbance at 405 nm.

RESULTS

Prepare a calibration curve by plotting the absorbance 405 nm for each "PAI-1" standard against its corresponding concentration. A standard curve should be generated each time the assay is performed. The curve shown is for demonstration purposes only.

Representative Standard Curve



CALCULATION

Interpolate the PAI-1 activity of the plasma sample directly from the standard curve. Curve regression software may be used to calculate the concentrations.

Plasma samples found to contain a PAI-1 level greater than 30.0 IU/mL must be diluted at least 1:4 with tPA/PAI-1 depleted plasma and retested. Multiply the result by the dilution factor to obtain the PAI-1 concentration of the original plasma sample.

LIMITATION OF PROCEDURE

Discolored plasma samples (e.g., due to hemolysis or increased bilirubin) may give artificially high absorbance values. This can be corrected by using the following procedure. In a separate plastic test tube, mix 500 µL diluted Imidazole Buffer, 100 µL Stop Reagent and 25 µL of the discolored plasma. Measure the absorbance. Subtract this value from the absorbance of the regularly assayed sample to obtain a corrected value to be used for PAI-1 calculations. In practice, this correction procedure is seldom necessary.

EXPECTED VALUES

Plasma samples from 104 healthy adults (57 male, 47 female) were assayed in duplicate and the data analyzed according to the recommendations set forth in CLSI Document C28-A2.²³ The following PAI-1 values were measured:

Population	PAI-1 Activity, IU/mL		
	Mean	Median	Upper Limit
Adult Male	11.9	9.7	26.8
Adult Female	7.1	4.4	26.2
Total	9.7	7.0	26.7

It is recommended that each laboratory establish its own normal reference range from its local population. A minimum of 20 healthy blood donors, including both men and women, spanning the adult age range, should be used. When establishing the normal reference range, collection and preparation of the normal plasma samples must be in the same manner as the plasma samples to be tested. If frozen samples are tested exclusively, then the normal reference ranges should be established using frozen normal samples. It is not recommended to test mixed plasma populations of fresh and frozen samples for establishing the normal reference ranges or for routine testing. The normal reference range data should be obtained over a period of several days to account for day-to-day variations.

QUALITY CONTROL

Control plasmas should be tested with each group of tests run, with a change in personnel or work shift, or according to the testing laboratory's guidelines. A pooled normal plasma and a patient's plasma with a confirmed high level of PAI-1, aliquoted and stored at -70°C, may be used as controls. The values for the control plasmas should fall within the stated ranges. If the values for the controls exceed the stated ranges, and it has been determined that the equipment is performing properly, the results should be discarded and samples should be rerun with fresh reagents.

TRACEABILITY OF CALIBRATORS AND CONTROL MATERIAL

Information on traceability of calibrators and control material is available upon request.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy

A study performed to evaluate SPECTROLYSE PAI-1 against another commercially available PAI-1 activity assay gave a correlation coefficient of 0.953 for 34 samples tested, with a regression equation of $y = 1.0787x - 4.76$.

Precision

Precision of SPECTROLYSE PAI-1 was determined by assaying three different plasma samples. The samples were each assayed 4 times per run over 20 runs. The results were calculated using duplicate measurements for each plasma (n=40). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were determined to be as follows:²⁴

Plasma	PAI-1 Activity, IU/mL	n	Intra-Assay CV	Inter-Assay CV
1	10.4	40	3.6%	12.9%
2	13.8	40	3.4%	7.5%
3	22.2	40	2.4%	3.9%

Specificity

The specificity of the assay has been confirmed by assaying plasma samples neat, incubated with an inhibitory monoclonal anti-human PAI-1 IgG and incubated with a non-relevant monoclonal IgG. Incubation with the inhibitory monoclonal anti-human PAI-1 results in either complete quenching or a significant reduction of the PAI-1 activity in the sample, demonstrating that the activity measured is from PAI-1. The results are summarized in the following table.

Sample	PAI-1 Activity, IU/mL				
	Neat	W/Anti-PAI-1 IgG Added	W/Anti-PAI-2 IgG Added	W/Anti-PAI-3 IgG Added	W/Non-Relevant IgG Added
1	29.5	9.3	29.6	29.5	28.7
2	18.2	0	17.2	17.6	9.7
3	35.5	0	35.0	35.0	34.0
4	20.2	0	20.4	19.9	16.3

Sensitivity

The lower limit of detection of the assay has been determined to be 4.6 IU/mL.²⁴

The upper limit of detection of the assay has been determined to be 30.0 IU/mL.²⁴

BIBLIOGRAPHY

1. Wiman, B., *et al.* Inactivation of tissue plasminogen activator in plasma: demonstration of a complex with a new rapid inhibitor. *J Biol Chem* 1984, **259**: 3644-3647.
2. Kruithof, E. K. O., *et al.* Demonstration of a fast acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma. *Blood* 1984, **64**: 907-913.
3. Chmielewska, K., Rånby, M., and Wiman, B. Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. *Thromb Res* 1983, **31**: 427-436.
4. Sprengers, E. D., *et al.* Plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987, **69**: 381-87.
5. 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.
6. Schleef, R.R., *et al.* Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. *Journal of Clinical Investigation* 1989, **83**: 1747-1752.
7. Dieval J., *et al.* A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1991, **77**: 528.
8. Hamsten, A., Wiman, B., deFaire, U. and Blombäck, M. Increased plasma levels of rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Eng J Med* 1985, **313**: 1557-1563.
9. Isacson, S. and Nilsson, I. M. Defective fibrinolysis in blood and vessel walls in recurrent "idopathic" venous thrombosis. *Acta Chir Scand* 1972, **138**: 313-319.
10. Hamsten, A., *et al.* Plasminogen activator inhibitor in plasma: Risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987, **2**: 3-8.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Wiman B, Csemiczky G, Marsk L and Robbe H. The fast inhibitor of tissue plasminogen activator during pregnancy. *Thromb Haemostas* 1984; **52** (2): 124-126.
16. 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.
17. 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. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1997, **73**: 31-36.
18. Bellart, J., *et al.* Coagulation and fibrinolysis parameters in normal pregnancy and in gestational diabetes. *American Journal of Perinatology* 1998, **15**: 479-486.
19. 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.
20. Eriksson, E., *et al.* Determination of plasminogen activator inhibitor5 in plasma using tPA and chromogenic single point poly-D-lysine stimulated assay. *Thromb Res* 1989, **50**: 91-101.
21. 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, January.
22. Kluft, C., Verheijen, J. H., Rijken, D. C., Chang, G. T. G., Jie, A. F. H. and Onkelinx, C: Diurnal fluctuations in the activity of the fast acting tPA inhibitor. Progress in Fibrinolysis, Volume VII, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1985, p. 117-119.
23. How To Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Second Edition, CLSI Document C28-A2, Vol. 20, No. 13, June 2000.

24. Data on file, Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, CT 06902.

SPECTROLYSE is a registered trademark of Sekisui Diagnostics, LLC, registered with the United States Patent and Trademark Office and equivalent government agencies in certain other countries.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Spectrolyse® PAI-1 ist ein chromogener Test für die quantitative Bestimmung der Plasminogenaktivator-Inhibitor-Typ-1 (PAI-1) Aktivität in humanem Plasma. Der Test ist nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet. Keine Verwendung in Mensch oder Tier.

ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

Der Plasminogen Aktivator Inhibitor vom Type-1 (PAI-1) ist ein effizienter und spezifischer Inhibitor der Plasminogen Aktivatoren im Plasma.¹⁻³ Als einer der wichtigsten Regulatoren der Fibrinolyse, kommt PAI-1 in verschiedenen Gewebetypen und Zelltypen wie z.B. Makrophagen/Monozyten, Hepatozyten, vaskulärem Endothel, adipösem Gewebe des Herzens und der Lunge sowie in Thrombozyten vor.⁴⁻⁵ 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.⁶⁻⁷ Ein erhöhter PAI-1 Spiegel spielt eine Schlüsselrolle bei beeinträchtigten fibrinolytischen Funktionen und kann mit thrombotischen Erkrankungen assoziiert sein.⁸⁻⁹ Hohe PAI-1-Aktivitäts Werte werden in Patienten mit Myokardinfarkt, hämolytisch-urämischem Syndrom und Schlaganfall angetroffen.¹⁰⁻¹⁴ Die PAI-1 Plasmawerte schwangerer Frauen korrelieren außerdem mit Gestationsdiabetes, verminderter Blutversorgung der Plazenta und Präeklampsie.¹⁵⁻¹⁸ Auch Zirrhose-Patienten können erhöhte PAI-1-Spiegel aufweisen.¹⁹

PRINZIP DER METHODE

Definition der PAI-1 Aktivitätsunits

Eine PAI-1 Aktivitäts-Einheit (IU) ist definiert als die PAI-1 Menge, die eine Internationale Einheit (IU) humanes tPA inhibiert.

SPECTROLYSE PAI-1 ist ein "zwei-Schritt", indirekter chromogener Test für die Bestimmung der PAI-1 Konzentration in Plasma. Die Methode wurde von Chmielewska *et al.*³ und Eriksson *et al.*²⁰ beschrieben. Im ersten Schritt wird eine definierte Menge an tPA (tissue type Plasminogen Aktivator) zu der Plasmprobe gegeben, welcher mit dem in der Probe vorhandenem PAI-1 reagiert. Danach wird die Probe angesäuert, um Alpha-2-Antiplasmin, das mit dem tPA Nachweis interferieren könnte, zu zerstören. In einem zweiten Schritt wird die restliche tPA Aktivität bestimmt. Hierzu wird eine Mischung aus Glu-Plasminogen, Poly-D-Lysin und einem chromogenen Plasminsubstrat zugegeben.

Poly-D-Lysin fungiert als Stimulator für die tPA-katalysierte Umwandlung von Plasminogen in Plasmin, welches dann das chromogene Substrat hydrolysiert. Die Menge an farbigem Produkt ist indirekt proportional zur PAI-1 Aktivität in der Probe.

REAGENZIEN

Spectrolyse® PAI-1 enthält ausreichend Reagenzien für 60 Bestimmungen bei der Durchführung in Mikrotiterplatten. Beachte: die äußeren Vertiefungen der 96-Mikrotiterplatte werden nicht verwendet, nur die inneren 60 Vertiefungen werden verwendet.

- R1 1 Fläschchen mit Imidazol-Puffer, 10fach konzentriert, 3 mL
- R2 2 Fläschchen mit Plasminogen Aktivator Reagenz (PAR)
- R3 1 Fläschchen mit single-chain human tPA, 6000 IU, lyophilisiert
- R4 1 Fläschchen mit tPA/PAI-1 Mangelplasma, 1 mL, lyophilisiert
- R5 1 Fläschchen mit Azetat-Puffer, pH 3.9, 7 mL
- R6 1 Fläschchen mit Stopp-Reagenz, 4 mL

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Alle für die Herstellung der Reagenzien in diesem Test 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.

Nur für *in vitro* Diagnostik Zwecke verwenden. Nicht zur internen Anwendung bei Mensch oder Tier. Die Testbestandteile nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Testpackungen zusammen verwenden. Eine bakterielle Kontamination der Reagenzien ist zu vermeiden. Wo mit Proben oder Testreagenzien 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.

REKONSTITUTION DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Die Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn sie bei 2°-8°C gelagert werden. Die Reagenzien werden wie folgt rekonstituiert und angesetzt.

A. Imidazol-Puffer (R1)

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wird das 10fach-Konzentrat 1:10 mit gefiltertem deionisierten Wasser verdünnt (z.B. 1 ml Konzentrat und 9 ml Wasser). Der gebrauchsfertige Imidazol-Puffer ist stabil für:

	1 Monat
	2°-8°C

B. Plasminogen Aktivator Reagenz (R2)

Den Inhalt des Fläschchens mit 6.25 mL gebrauchsfertigem Imidazol-Puffer rekonstituieren. Vortex für eine minute und 15 minuten auf Eis stehen lassen. Das rekonstituierte PAR Reagenz ist stabil für:

	24 Stunden
	2°-8°C

C. Single-chain human tPA (R3)

Den Inhalt des Fläschchens mit dem auf dem Etikett angegebenen Volumen Azetat-Puffer rekonstituieren, vorsichtig mischen und auf Eis stellen. Diese Lösung hat eine tPA-Konzentration von 6000 IU/mL, und kann 4 Tage bei 2°-8°C aufbewahrt werden. Zur Herstellung einer 40 IU/mL tPA Lösung werden 50 μ L tPA zu 7.5 mL gebrauchsfertigem Imidazol-Puffer gegeben. Diese Lösung bis zur Verwendung auf Eis aufbewahren. Die 40 IU/mL tPA Lösung ist stabil für:

	24 Stunden
	2°-8°C

D. tPA/PAI-1 Mangelplasma (R4)

Den Inhalt des Fläschchens mit 1.0 mL gefiltertem deionisierten Wasser rekonstituieren und vorsichtig mischen. Lösung mind. 15 Minuten stehen lassen damit Plasma vollständig gelöst ist. Das tPA/PAI-1 Mangelplasma ist stabil für:

	2 Wochen
	-20°C

E. Azetat-Puffer (R5)

Puffer ist gebrauchsfertig. Der Azetat-Puffer ist stabil für:

	1 Jahr
	2°-8°C

F. Stopp-Reagenz (R6)

Reagenz ist gebrauchsfertig. Das Stopp-Reagenz ist stabil für:

	1 Jahr
	2°-8°C

PROBENABNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Thrombozyten armes Zitratplasma für den Test verwenden. Siehe ""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, January 2008.²¹ Die Vorbereitung der Blutproben sollte wie folgt durchgeführt werden:

1. Mit Hilfe einer Spritze oder eines Vakuum-Silikon-Röhrchens 9 Teile Blut abnehmen und in 1 Teil 3.2% (0.109 M) Trinatrium-Zitrat Antikoagulant Lösung geben.
2. Blut Proben bei 5,000 x g für 10 Minuten zentrifugieren um Plättchen-armes Plasma zu erhalten. Das Plasma sollte weniger als 10⁴ Plättchen/ μ L enthalten. Zur Entfernung der Plättchen kann das Plasma auch durch einen 0.22 μ m Filter filtriert werden.
3. Das Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert werden und innerhalb von 2 Std. bestimmt werden. Alternativ kann das Plasma bei -70°C bis zu 6 Monate gelagert werden.
4. Gefrorenes Plasma sollte zügig bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetautes Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert und innerhalb von 2 Std. bestimmt werden.

Note: Die Blutabnahme sollte bei geringer Stauung von ruhenden Probanden erfolgen. Große tageszeitliche Schwankungen der PAI Aktivität sind beschrieben, die Werte morgens sind ca. zweifach höher als Werte vom Nachmittag.²² Dies sollte sowohl bei der Routineanwendung als auch bei der Planung klinischer Studien bedacht werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Testkomponenten – Siehe Reagenzien

Notwendige Materialien, die nicht mitgeliefert werden

96-Vertiefungen Rundboden- oder Flachboden-Mikrotiterplatten
Azetatfolie zur Abdeckung der Mikrotiterplatte
gefiltertes deionisiertes oder destilliertes H₂O
tPA/PAI Mangelplasma (SD REF 273)*
gepooltes humanes Normalplasma, Plasmen mit bekannten PAI-1 Konzentrationen
8 - Kanalpipette für Volumenbereich von 50-300 μ L
1 - Kanalpipette für Volumenbereich von 0-200 μ L und 200 -1000 μ L
3 mL, 15 mL and 50 mL Zentrifugenröhrchen
Mikrotiterplatten Reader mit einer Wellenlänge von 405 nm
37°C Wasserbad

* kann erforderlich sein, wenn Proben mit PAI-1 Konzentrationen > 30.0 IU/mL verdünnt und erneut getestet werden müssen.

A. Herstellung der "40 IU/mL" und "0 IU/mL" PAI-1 Standards

Die initialen Standards werden hergestellt indem eine definierte Menge tPA, 40 IU/mL, oder Puffer zu dem tPA/PAI-1 Mangelplasma gegeben werden. Da PAI-1 tPA inhibiert, wird das Plasma, welches nur mit Puffer versetzt wurde und kein tPA enthält, als "40 IU/mL" PAI-1 Standard bezeichnet. Die Abwesenheit von tPA wird

gleichgesetzt mit der Anwesenheit von PAI-1. Das Plasma, welches mit 40 IU/mL tPA Lösung versetzt wurde, wird als "0 IU/mL" PAI-1 Standard bezeichnet. Die Abwesenheit von tPA wird mit der Abwesenheit von PAI-1 Aktivität gleichgesetzt.

Zur Herstellung der PAI-1 Standards mit 0 IU/mL PAI-1 und 40 IU/mL PAI-1 werden die folgenden Volumina wie nachfolgend beschrieben in Plastikröhrchen pipettiert. Die angesetzten Standards sollten für 15 Minuten bei 25°C inkubiert werden, damit tPA und PAI-1 miteinander reagieren können

"PAI-1" Standard	tPA/PAI-1 Mangelplasma	40 IU/mL tPA Lösung	Imidazol-Puffer
0 IU/mL	50 μ L	50 μ L	-
40 IU/mL	50 μ L	-	50 μ L

B. Vorbereitung der Plasmaproben

Jede zu untersuchende Plasmaprobe wird 1:2 mit der 40 IU/mL tPA-Lösung verdünnt (z.B. 50 μ L Plasmaprobe + 50 μ L der tPA-Lösung). Die Proben 15 Minuten bei 25°C inkubieren, damit das tPA mit dem PAI-1 reagieren kann. Die Proben sollten zu gleichen Zeit angesetzt werden wie die „PAI-1“ Standards.

C. Inkubation der PAI-1 Standards und der Plasmaproben

1. zu den Standard- und Proben-Röhrchen 100 μ L Azetat-Puffer zugeben und mischen.
2. 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubieren.
3. 2.0 mL gefiltertes deionisiertes Wasser zugeben und mischen.

D. Herstellung der mittleren PAI-1 Standards

Die mittleren PAI-1 Standards 10 IU/mL, 20 IU/mL und 30 IU/mL PAI-1, werden in Plastikröhrchen wie folgt angesetzt:

"PAI-1" Standard	Volumen des "40 IU/mL" PAI-1 Standards	Volumen des "0 IU/mL" PAI-1 Standards
10 IU/mL	25 μ L	75 μ L
20 IU/mL	50 μ L	50 μ L
30 IU/mL	75 μ L	25 μ L

E. Bestimmung der PAI-1 Aktivität

Es sollte immer eine gleichmäßige Temperaturverteilung über die gesamte Mikrotiterplatte gewährleistet sein. Wenn der komplette Test (60 Messpunkte) auf einmal durchgeführt wird, werden die äußeren Vertiefungen mit deionisiertem oder destilliertem Wasser gefüllt und nur die inneren Vertiefungen mit Proben oder Standards belegt. Wenn weniger als 60 Messpunkte bestimmt werden, sollten auch die inneren nicht verwendeten Vertiefungen mit Wasser gefüllt werden.

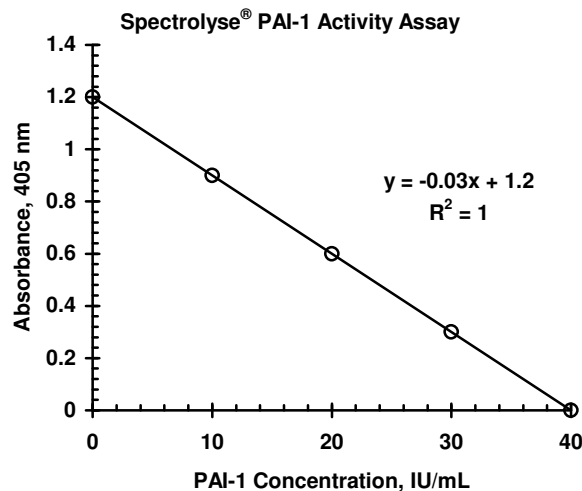
Es wird empfohlen alle Standards und Proben als Duplikate zu bestimmen

1. 20 µL PAI-1 Standard oder Plasmaprobe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
2. 200 µL eiskaltes Plasminogen Aktivator Reagenz zu den Standards und Proben geben.
3. Mikrotiterplatte mit der Azetatfolie abdecken.
4. Mikrotiterplatte 90 Minuten schwimmend in einem 37°C Wasserbad inkubieren.
5. Mikrotiterplatte aus dem Wasserbad nehmen und 50 µl Stopp-Reagenz in jede Vertiefung pipettieren.
6. Die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm messen.

ERGEBNISSE

Es wird eine Standardkurve erstellt indem die Absorption bei 405 nm von jedem PAI-1 Standard gegen die entsprechende PAI-1 Konzentration aufgetragen wird. Bei jeder Testdurchführung ist eine Standardkurve zu erstellen. Eine repräsentative Standardkurve ist im Folgenden dargestellt.

Repräsentative Standardkurve



BERECHNUNG

Die PAI-1 Aktivität der vermessenen Plasmaproben ist direkt aus der Standardkurve zu interpolieren. Zur Bestimmung der PAI-1 Konzentrationen kann das Kurven-Regressions-Programm des verwendeten Mikrotiterplatten Readers verwendet werden. Plasmaproben die höhere PAI-1 Konzentrationen als 30.0 IU/mL liefern, müssen mindestens 1:4 mit dem tPA/PAI-1 Mangelplasma verdünnt werden und erneut getestet werden. Die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren, um die tatsächliche PAI-1 Konzentration in der unverdünnten Probe zu erhalten.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Verfärbte Plasmaproben (z.B. bedingt durch Hämolyse oder erhöhten Bilirubingehalt) können artifiziell hohe Absorptionswerte liefern. Dies kann mit folgender Methode korrigiert werden. In ein Plastikröhrchen werden 500 µl gebrauchsfertiger Imidazol-Puffer, 100 µl Stopp-Reagenz und 25 µl Plasma pipettiert und die Absorption bei 405 nm gemessen. Dieser Wert wird vom Absorptionswert der Probe subtrahiert, um den korrigierten Wert für die Berechnung der PAI Aktivität zu erhalten. In der Praxis ist diese Korrekturprozedur jedoch nur selten notwendig.

ERWARTETE WERTE

Plasmaproben von 104 gesunden erwachsenen Spendern (57 männlich, 47 weiblich) wurden als Duplikate vermessen, die ermittelten Daten wurden gemäß den Empfehlungen des CLSI Dokuments C28-A2 analysiert.²³ Die folgenden PAI-1 Werte wurden bestimmt:

Population	PAI-1 Aktivität, IU/mL		
	Mean	Median	Oberes Limit
Erwachsene Männer	11.9	9.7	26.8
Erwachsene Frauen	7.1	4.4	26.2
Gesamt	9.7	7.0	26.7

Jedes Labor sollte seinen Normalbereich für PAI-1 aufgrund der örtlichen Population selbst bestimmen. Ein Minimum von 20 gesunden erwachsenen Blutspendern (männlich und weiblich) - verschiedene Altersgruppen umfassend - sollte eingesetzt werden. Probenabnahme und Vorbereitung der Referenz-Plasmen muss in der gleichen Weise erfolgen wie die der späteren Patientenplasmen. Wenn nur eingefrorene Proben getestet werden, dann sollte der Normalbereich ebenfalls mit eingefrorenen Plasmen ermittelt werden. Es wird nicht empfohlen, frische und eingefrorene Plasmen für die Bestimmung des Normalbereichs oder die Routinetestung zu mischen. Die Bestimmung des Normalbereichs sollte über einen Zeitraum von mehreren Tagen erfolgen, um Tag-zu-Tag Schwankungen auszugleichen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollplasmen sollten bei jeder Testdurchführung mitgeführt werden, oder entsprechend den Vorgaben der Laborrichtlinien. Als Kontrollen können ein gepooltes Normalplasma und ein Patientenplasma mit einem gesicherten hohen PAI-1 Wert verwendet werden, diese können aliquotiert bei -70°C gelagert werden. Die Werte der Kontrollplasmen müssen in den definierten Bereich fallen. Wenn die Werte der Kontrollen außerhalb des definierten Bereichs liegen, und sichergestellt ist, dass die Geräte ordnungsgemäß funktionieren, sollten die Messdaten nicht verwendet werden und die Testung der Proben mit frisch angesetzten Reagenzien wiederholt werden.

RÜCKFÜHRBARKEIT DES KONTROLLMATERIALS

Informationen zur Rückführbarkeit des Standards und des Kontrollmaterials sind auf Anfrage erhältlich.

LEISTUNGSMERKMALE

Richtigkeit

Der SPECTROLYSE PAI-1 Tests wurde mit einem anderen kommerziellen PAI-1 Aktivitäts-Test verglichen. Die Untersuchung von 34 Proben ergab einen Korrelations-Koeffizienten von 0.953 mit einer Regressionsgleichung von $y = 1.0787x - 4.76$.

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision des Spectrolyse PAI-1 Tests wurden drei verschiedene Plasmaproben analysiert. Die Proben wurden 4mal pro Durchlauf in 20 Durchläufen analysiert. Die Ergebnisse wurden als Doppelbestimmungen berechnet (n =40). Die folgenden intra-Assay und inter-Assay Variationskoeffizient (VK) wurden ermittelt:²⁴

Plasma	PAI-1 Aktivität, IU/mL	n	Intra-Assay VK	Inter-Assay VK
1	10.4	40	3.6%	12.9%
2	13.8	40	3.4%	7.5%
3	22.2	40	2.4%	3.9%

Spezifität

Zur Bestimmung der Spezifität des Test wurden Plasmaproben ohne Zusatz oder nach Zusatz eines inhibitorischen monoklonalen anti-human PAI-1 Antikörpers oder eines nicht-relevanten monoklonalen Antikörpers inkubiert. Inkubation in Gegenwart des inhibitorischen monoklonalen anti-human PAI-1 Antikörpers führte zur vollständigen Inhibition bzw. zu einer signifikanten Reduktion der PAI-1 Aktivität in den Probe. Dies spricht dafür, dass die gemessene Aktivität auf PAI-1 zurückzuführen ist. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	PAI-1 Aktivität, IU/mL				
	Ohne Zusatz	Anti-PAI-1 IgG Zusatz	Anti-PAI-2 IgG Zusatz	Anti-PAI-3 IgG Zusatz	Nicht-relevanter IgG Zusatz
1	29.5	9.3	29.6	29.5	28.7
2	18.2	0	17.2	17.6	9.7
3	35.5	0	35.0	35.0	34.0
4	20.2	0	20.4	19.9	16.3

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze des Tests liegt bei 4.6 IU/mL.²⁴

Die obere Nachweisgrenze des Tests liegt bei 30.0 IU/mL.²⁴

LITERATURSTELLEN

1. Wiman, B., *et al.* Inactivation of tissue plasminogen activator in plasma: demonstration of a complex with a new rapid inhibitor. *J Biol Chem* 1984, **259**: 3644-3647.
2. Kruithof, E. K. O., *et al.* Demonstration of a fast acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma. *Blood* 1984, **64**: 907-913.
3. Chmielewska, K., Rånby, M., and Wiman, B. Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. *Thromb Res* 1983, **31**: 427-436.
4. Sprengers, E. D., *et al.* Plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987, **69**: 381-87.
5. 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.
6. Schleef, R.R., *et al.* Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. *Journal of Clinical Investigation* 1989, **83**: 1747-1752.
7. Dieval J., *et al.* A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1991, **77**: 528.
8. Hamsten, A., Wiman, B., deFaire, U. and Blombäck, M. Increased plasma levels of rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Eng J Med* 1985, **313**: 1557-1563.
9. Isacson, S. and Nilsson, I. M. Defective fibrinolysis in blood and vessel walls in recurrent "idopathic" venous thrombosis. *Acta Chir Scand* 1972, **138**: 313-319.
10. Hamsten, A., *et al.* Plasminogen activator inhibitor in plasma: Risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987, **2**: 3-8.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Wiman B, Csemiczky G, Marsk L and Robbe H. The fast inhibitor of tissue plasminogen activator during pregnancy. *Thromb Haemostas* 1984; **52 (2)**: 124-126.
16. 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.
17. 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. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1997, **73**: 31-36.
18. Bellart, J., *et al.* Coagulation and fibrinolysis parameters in normal pregnancy and in gestational diabetes. *American Journal of Perinatology* 1998, **15**: 479-486.
19. 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.
20. Eriksson, E., *et al.* Determination of plasminogen activator inhibitor5 in plasma using tPA and chromogenic single point poly-D-lysine stimulated assay. *Thromb Res* 1989, **50**: 91-101.
21. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays; Approved Guidelines-Fourth Edition, CLSI Document H21-A4, Vol. 23, No. 35, December 2003.
22. Kluft, C., Verheijen, J. H., Rijken, D. C., Chang, G. T. G., Jie, A. F. H. and Onkelinx, C: Diurnal fluctuations in the activity of the fast acting tPA inhibitor. Progress in Fibrinolysis, Volume VII, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1985, p. 117-119.
23. How To Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Second Edition, CLSI Document C28-A2, Vol. 20, No. 13, June 2000.

24. Data on file, Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, CT 06902.

SPECTROLYSE ist ein geschützter Markenname von Sekisui Diagnostics, LLC.