

CE ZYMUTEST PAI-1 Antigen

ARK012A

(Complete ELISA kit for Tissue- Plasminogen Activator Inhibitor Type I)

In vitro diagnostic use only

ANIARA

Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision: 03/11/2008

INTENDED USE:

The ZYMUTEST PAI-1 Antigen kit is a one step, two site immuno-assay for measuring human Tissue- Plasminogen Activator Inhibitor, type I (PAI-1) in plasma, or in any fluid where PAI-1: Ag can be present.

ASSAY PRINCIPLE:

First, the immunoconjugate, which is a monoclonal antibody specific for PAI-1: Ag coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced into the microwells coated with another monoclonal antibody specific for PAI-1: Ag. Then, the diluted tested sample is immediately introduced, and the immunological reaction starts. When present, PAI-1: Ag binds onto the monoclonal antibody coated solid phase through one epitope, and fixes the second monoclonal antibody coupled to HRP by another epitope. Following a washing step, the peroxidase substrate, 3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine (TMB), in presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. When the reaction is stopped with Sulfuric Acid, a yellow colour is obtained. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human PAI-1: Ag in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate or Na₂ EDTA anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where PAI-1: Ag must be measured.

REAGENTS:

1. **COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with a murine monoclonal antibody specific for human PAI-1: Ag, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
2. **SD:** 2 vials containing 50ml of F-Sample Diluent, ready to use.
3. **STD:** 3 vials of PAI-1 Standard, lyophilised. When restored with 2 ml of F-Sample Diluent, a solution containing about 10 ng/ml of recombinant human PAI-1: Ag is obtained. The exact PAI-1:Ag concentration is indicated on the flyer provided in the kit.
4. **CI:** 1 vial containing 1 ml of lyophilised Plasma PAI-1 Control I High (human plasma).
5. **CL:** 1 vial containing 1 ml of lyophilised Plasma PAI-1 Control II Low (human plasma).

Nota: The PAI-1: Ag concentrations and acceptancy ranges for controls can vary from lot to lot, and are indicated on the flyer provided in the kit.

6. **IC:** 3 vials of Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugate, a monoclonal antibody coupled to HRP, lyophilised.
7. **CD:** 1 vial of 25 ml of Conjugate Diluent, ready to use.
8. **WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated Wash Solution.
9. **TMB:** 1 vial of 25 ml peroxidase substrate: 3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine containing hydrogen peroxide. Ready to use.
10. **SA:** 1 vial of 6 ml of 0.45M Sulfuric acid (Stop solution). Ready to use.

Nota: Use only components from a same kit lot. Do not mix components from different lots, when running the assay.

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- 8-channel or repeating pipette allowing dispensing 50-300 µl.
- 1-channel pipettes at variable volumes from 0 to 20 µl, 20 to 200 µl and 200 to 1000 µl.
- Micro ELISA plate washing equipment and shaker.
- Micro ELISA plate reader with a wavelength set up at 450 nm.
- Distilled water.

REAGENTS PREPARATION, STORAGE AND STABILITY:

In their original packaging box, before use, when stored at 2-8°C, the unopened reagents are stable until the expiration date printed on the box.

1. **Micro ELISA plate:** open the plastic pouch and take off the required amounts of 8 well strips for the test series. When out of the pouch, the strips must be used within

30 minutes. Unused strips can be stored at 2-8°C for 4 weeks in their original aluminium pouch, in presence of the desiccant, hermetically closed and protected from any moisture, and stored in the provided microplate storage bag (minigrip).

2. **F-Sample Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
3. **PAI-1 Standard:** restore each vial with 2 ml of F-Sample Diluent in order to obtain a solution containing about 10 ng/ml. This solution is stable for at least 8 hours at room temperature.
4. **Plasma PAI-1 Control I** (human plasma, high): restore with 1 ml distilled water.
5. **Plasma PAI-1 Control II** (human plasma, low): restore with 1 ml distilled water.

Nota: when restored, PAI-1 controls are stable for 8 hours at room temperature, 24 hours at 2-8°C or 2 months frozen at -20°C or below.

Warning: Plasma controls I and II (4&5) and standard (3) are prepared with normal human plasma. This latter was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

6. **Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with 4 ml of Conjugate Diluent. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial gently in order to homogeneize the content. The restored conjugate is stable for at least 24 hours at room temperature or for at least 4 weeks at 2-8°C.
7. **Conjugate Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
8. **Wash Solution:** Incubate the vial for 15-30 minutes in a water bath at 37°C until complete dissolution of solids, when present. Shake the vial and dilute the amount required 1:20 in distilled water (the 50 ml contained in the vial allow preparing 1 liter of Wash Solution). The Wash Solution must be stored at 2-8°C in its original vial and used within 4 weeks following opening. The diluted Wash Solution must be used within 7 days, when protected from any contamination and stored at 2-8°C. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
9. **TMB substrate:** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8°C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use.
10. **Stop solution:** It is ready to use.

Cautions: Sulfuric acid, although diluted to 0.45M is caustic. As for any similar chemical, handle Sulfuric acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

Nota: Bring the kit at room temperature, at least 30 min. before use. Store the unused reagents at 2-8°C. The stability studies at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature without damage.

PROCEDURE:

Specimen collection:

Blood (9 vol.) must be collected, through a clean venipuncture avoiding any blood activation, on 0.109M citrate anticoagulant (1 vol.) or on CTAD (Citrate-Theophylline-Adenoside-Dipyridamole) tubes; plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; in order to avoid platelet activation, it is recommended to collect 1:3 of plasma supernatant by aiming the pipette tip at the middle of this supernatant; citrated plasma should be tested within 8 hours or stored frozen at -20°C or below for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within 4 hours.

PAI-1: Ag can be released from platelets upon activation or disruption. In order to avoid an overestimation of PAI-1, platelets must be accurately removed. Use of CTAD tubes, which prevent from platelet activation, is recommended.

In order to avoid diurnal variations, PAI-1 should be tested on fasting samples, collected at morning.

EDTA collected human plasma may also be used. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

D.750.02/ZY/012A

ANIARA

8560 Gove Court · Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Tested plasma or sample or controls:

The sample must be tested diluted **five fold (1:5)** in the F-Sample Diluent. For expected PA-1: Ag concentrations > 50 ng/ml, plasma or samples can be tested at a higher dilution, **1:10, or 1:20, or more.**

Plasma Controls I and II must be tested diluted **five fold (1:5)**, with F-Sample Diluent.

Calibration:

Using the "C ng/ml" PAI-1 standard provided in the kit, prepare the following standard solutions.

PAI-1 concentration (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of PAI-1 Standard	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. of F-Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Mix gently for a complete homogenisation.

The standard dilutions are stable for at least **6 hours** at room temperature.

Assay procedure:

Remove the required number of strips from the aluminium pouch, for the series of measures to be performed. Then put the strips in the frame provided. In the different wells of the micro ELISA plate introduce the reagents and perform the various assay steps as indicated on the following table:

Reagent	Volume	Procedure
Conjugate anti (h)-PAI-1-HRP. (Restored with 4 ml of conjugate Diluent)	100 µl	Introduce the Anti-(h)-PAI-1- HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells
PAI-1 Standard or tested sample or F- sample diluent (blank)	100 µl	Introduce immediately the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well
Mix gently on a plate shaker or manually and incubate for 1 hour at room temperature		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument. (a)
TMB/H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. Nota : The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (b, c).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (c)		
0.45 M Sulfuric Acid (5)	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45M sulfuric acid (b).
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450) . Subtract the blank value (d).		

Nota:

- Never let the plates empty between the addition of the reagents or following the washing step. The next reagent must be added within 3 minutes, in order to prevent the plate from drying, which could damage the immobilised components. If necessary, keep the plate filled with Wash Solution and empty it just before the introduction of the next reagent. The washing instrument must be adjusted in order to wash the plates gently, and to avoid a too drastic emptying, which could lower plate reactivity.
- For addition of the TMB substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

TWO STEP METHOD:

- The assay can also be performed with a two step method. The calibration curve is from **0 to C ng/ml** (as for the one step method), the PAI-1 standard being reconstituted with **2 ml** of F-Sample Diluent (SD).
- The immunoconjugate (IC) must be reconstituted with **7.5 ml** of Conjugate Diluent (CD).
- Tested plasma must be assayed at a five fold (1:5) dilution or at higher dilutions in F-Sample Diluent (SD), if required.

- In each microwell, **100 µl** of SD are introduced, immediately followed by **100µl** of the calibration solution (prepared as for the one step method) or 100µl of the diluted tested plasma. Following a **1 hour** incubation at room temperature (18-25°C) and a washing step, **200µl/well** of immunoconjugate (IC) are introduced. Following a new **1 hour** incubation at room temperature and a washing step, the colour development with TMB (**200µl/well**) is allowed to develop for **5 min**, and is then stopped with **50 µl** of 0.45M sulfuric acid (SA). A450 is then measured. Washing and operating cautions, as well as results interpretation, are the same as recommended for the one step method.

EXPRESSION OF RESULTS:

- On a linear graph paper plot the **PAI-1: Ag concentrations (ng/ml)** on abscissa and the corresponding absorbances (**A450**) on ordinates.
- Users must construct their own calibration curve, obtained using their standard dilutions. From the curve obtained, deduce the PAI-1: Ag concentration for the tested sample. For obtaining the PAI-1: Ag concentration in this sample, the value read on the calibration curve must be multiplied by the dilution factor (i.e. **5, 10, 20,....**) (See model on the flyer).
- For controls I and II, the concentrations measured must be multiplied by **5**.
- Alternatively, an ELISA software (i.e. Dynex, Biolise, etc...) can be used for the calculation of concentrations.

EXPECTED RANGE:

- The normal range for PAI-1 : Ag concentrations tested with Zymutest PAI-1 Ag is from 1 to 25 ng/ml. (**Nota**: in the absence of reference material for PAI-1:Ag assays, there is an important heterogeneity of PAI-1 concentrations measured with the various commercial assays. The normal range must be considered respectively to the device used (6)).
- PAI-1 increases with age and lipid metabolism, especially with triglyceride concentration.
- PAI-1 presents diurnal variations, the highest concentrations being measured at morning.
- PAI-1: Ag concentration increases during pregnancy.

BIOCHEMISTRY:

- PAI-1 is a single chain glycoprotein, synthesised by endothelial cells and hepatocytes and with a molecular weight of 50,000 daltons. In plasma it is stabilised by binding to vitronectin, or circulates as inactive complexes with tPA or uPA. PAI-1 is also present in platelets, but in the latent form. PAI-1 regulates fibrinolysis by inhibiting tPA or urokinase.

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

- PAI-1 Antigen is increased in thrombosis, malignant diseases, hepatic disorders, post surgical period, sepsis. It is also elevated in malignant tissue extracts.
- Recent studies have demonstrated a relationship between increased PAI-1 concentrations and cardiovascular risk factors (obesity, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, arteriothrombosis...).

APPLICATIONS:

- Assay of PAI-1: Ag in clinical samples.
- Measurement of PAI-1 as a cardiovascular risk factor.

ASSAY CHARACTERISTICS:

- This monoclonal antibody based assay, has a homogeneous reactivity to the various forms of PAI-1, latent, active, bound to vitronectin, complexed to tPA, or to uPA, or inactive.
- Detection threshold ≤ 0.5 ng/ml.
- Intra-assay: 3-8%.
- Inter-assay: 5-10%.
- No significant interference of heparin up to 2 IU/ml

REFERENCES:

- Declerck P.J., Alessi M.C., Verstreken M., Kruithof E.K.O., Juhan-Vague I., Collen D. : Measurement of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked-immunosorbent assay. Blood ; 1998, 71, 220-25.
- Loskutoff D.J., Samad F. : The adipocyte and hemostatic balance in obesity. Studies on PAI-1. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1998, 18, 1-6.
- Fujii S. : PAI-1 in Thrombosis and Arteriosclerosis. Fibrinolysis and Proteolysis, 1997, 11, 137-140.
- De Maat MPM, De Bart A.C.W., Hennis BC, Meijer P., Havelmaar AC, Mulder PG, Klufft C. : Interindividual and Intraindividual variability in plasma Fibrinogen, tPA antigen, PAI-1 Activity and CRP in healthy, young volunteers and patients with angina pectoris. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1996, 16, 1156-62
- Smith F.B., Lee A.J., Rumley A., Fowkes G.R., Lowe G.O.R. : Tissue-Plasminogen-Activator, Plasminogen Activator Inhibitor and risk of peripheral arterial disease. Arteriosclerosis, 1995, 15, 35-43.
- Declerck PJ et al., Multicenter evaluation of commercially available methods for the immunological determination of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Thromb. Haemost., 1993, 70(5), 858-63.

CE ZYMUTEST PAI-1 Antigen

ARK012A

(Méthode ELISA en un temps pour le dosage du PAI-1 Antigène)
(Tissu Plasminogen Activator Inhibitor Type I)

ANIARA

Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation diagnostic *in vitro* exclusivement

Dernière révision: 03/11/2008

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST PAI-1 Antigen est une méthode ELISA en une étape, destinée à la mesure du PAI-1:Ag dans le plasma humain, ou tout autre milieu biologique où le PAI-1:Ag est présent.

PRINCIPE :

Dans un premier temps, l'immunoconjugué, un anticorps monoclonal de souris spécifique du PAI-1:Ag et couplé à la peroxydase (HRP), est introduit dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée par un second anticorps monoclonal également spécifique du PAI-1 : Ag. Immédiatement après, l'échantillon à tester dilué est introduit et la réaction immunologique débute. Le PAI-1 : Ag présent dans l'échantillon se fixe sur la phase solide par un de ses épitopes, et réagit avec le second anticorps monoclonal couplé à la peroxydase par un deuxième épitope. Après une étape de lavage, le substrat de la peroxydase, 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité de PAI-1:Ag présente dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.
- Tout autre liquide biologique où le PAI-1:Ag doit être mesuré.

REACTIFS :

1. **COAT** : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps monoclonal spécifique du PAI-1 humain, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons contenant 50 ml de **tampon de dilution pour échantillons** (F-Sample Diluent), prêt à l'emploi.
3. **STD** : 3 flacons de **Standard PAI-1 : Ag** (PAI-1 Standard), lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué avec 2 ml de F-Sample Diluent afin d'obtenir une solution titrée en PAI-1 : Ag. Le titre de la solution est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.
4. **CI** : 1 flacon lyophilisé contenant 1 ml de **Plasma PAI-1 Control I (Plasma contrôle haut)**.
5. **CII** : 1 flacon lyophilisé contenant 1 ml de **Plasma PAI-1 Control II (Plasma contrôle bas)**.

Nota : La concentration en PAI-1 : Ag et l'intervalle de confiance des contrôles sont indiqués sur le papillon fourni dans la trousse.

6. **IC** : 3 flacons d'**immunoconjugué** (Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugué), anticorps monoclonal de souris couplé à la peroxydase (HRP), lyophilisé.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de **tampon de dilution pour l'immunoconjugué** (Conjugate Diluent) prêt à l'emploi.
8. **WS** : Un flacon de 50 ml de **solution de lavage** (Wash Solution), 20 fois concentrée.
9. **TMB** : Un flacon de substrat : 3,3',5,5' - **Tetraméthylbenzidine**, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
10. **SA** : Un flacon de 6ml d'**acide sulfurique 0.45 M** (Stop Solution) prêt à l'emploi.

Nota : Utiliser uniquement les réactifs provenant de coffrets d'un même lot. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kit pour effectuer un dosage.

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- 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.
- Matériel de lavage pour microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.

PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Dans leur emballage d'origine, avant toute utilisation et conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

1. **Micro ELISA plate** : Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Les barrettes sorties du sachet aluminium doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à 4 semaines dans leur emballage d'origine, hermétiquement refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à 2 - 8°C, dans le sachet plastique minigrup fourni.

2. **F-Sample Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0,05 % de Kathon CG.
3. **PAI-1 Standard** : reconstitué par 2 ml de F-Sample Diluent afin d'obtenir une solution contenant environ 10 ng/ml de PAI-1:Ag. Cette solution est stable au moins 8 heures à température du laboratoire.
4. **Plasma PAI-1 Control I** (plasma humain, haut) : à reconstituer par 1 ml d'eau distillée.
5. **Plasma PAI-1 Control II** (plasma humain, bas) : à reconstituer par 1 ml d'eau distillée.

Nota : Une fois reconstitués, les contrôles I et II sont stables 8 heures à température du laboratoire, 24 heures à 2-8°C ou 2 mois congelés à -20°C ou plus.

Précautions : Le standard (3) et les plasmas contrôles I et II (4 & 5) sont préparés à partir de plasma humain. Ce dernier a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt 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.

6. **Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugué** : chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par 4 ml de **Conjugate Diluent** au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. L'immunoconjugué reconstitué est stable au moins 24 heures à la température du laboratoire et 4 semaines à 2-8°C.
7. **Conjugate Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Il contient 0,05% de Kathon CG.
8. **Wash Solution** : Incuber, si nécessaire, le flacon de solution de lavage dans un bain-marie à 37°C jusqu'à totale dissolution des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée. Les 50 ml de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution. Après ouverture, le flacon est stable 4 semaines à 2-8°C, à l'abri de toute contamination. La solution de lavage diluée peut être utilisée jusqu'à 7 jours après préparation, lorsqu'elle est protégée de toute contamination et conservée à 2-8°C. Ce réactif contient 0,05% de Kathon CG.
9. **TMB substrate** : Substrat TMB prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
10. **Stop solution** : Solution contenant 0,45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi.

Précautions : Même dilué à 0,45M, l'acide sulfurique est caustique. Comme pour tout produit chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précautions en utilisant des gants et en portant des lunettes de protection. Eviter tout contact avec la peau et les yeux.

Nota : Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min. avant de réaliser le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

MODE OPERATOIRE :

Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0,109 M (1 volume) ou sur tube spécial type CTAD (Citrate, Théophilline, Adénoside, Dipyridamole) par ponction veineuse franche afin d'éviter toute activation sanguine ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; afin d'éviter la contamination par les plaquettes, il est conseillé de ne prélever que le tiers du surnageant plasmatique, en pointant l'embout de la pipette au milieu de ce surnageant ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 8 heures ou conservé congelé, à -20°C au moins, pendant 6 mois maximum. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 4 heures à température du laboratoire. Le PAI-1:Ag peut être relargué des plaquettes après activation ou lyse. Pour éviter toute surestimation du PAI-1:Ag, les plaquettes doivent être correctement éliminées. L'utilisation de tubes CTAD, prévenant l'activation plaquettaire, est alors recommandée. Afin d'éviter toute variation nyctémérale, le PAI-1:Ag doit être testé sur des échantillons prélevés le matin, à jeun. Le plasma humain prélevé sur EDTA peut être aussi utilisé. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

D.750.01/ZY/012A

ANIARA

8560 Gove Court - Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Echantillons et contrôles :

Les échantillons doivent être testés dilués 5 fois (1:5) en F-Sample Diluent. Pour des concentrations de PAI-1:Ag > 50 ng/ml, le plasma ou les échantillons peuvent être testés à des dilutions plus élevées, 1:10, ou 1:20, ou plus.

Les contrôles I et II doivent être testés dilués 5 fois (1:5), en F-Sample Diluent.

Calibration :

Utiliser le standard PAI-1:Ag ayant un taux « C » de PAI-1:Ag, indiqué pour chaque lot de réactifs, sur le papillon inclus dans le coffret, préparer les solutions standards suivantes.

Concentration de PAI-1 : Ag (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de PAI-1 Standard	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. de F-Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Mélanger délicatement pour obtenir une solution homogène.

Les dilutions de calibration sont stables 6 heures à température du laboratoire.

Mode Opérateur :

Sortir la quantité nécessaire de barrettes de 8 puits du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Conjugué anti (h)-PAI-1-HRP. (reconstitué avec 4 ml de Conjugate Diluent)	100 µl	Introduire l'immunoconjugué Anti-(h)-PAI-1-HRP dans les puits de la microplaque ELISA
PAI-1 Standard ou échantillon à tester ou F-Sample Diluent (blanc)	100 µl	Introduire immédiatement les solutions standards ou les échantillons à doser dans les puits correspondants sur la micro plaque ELISA
Mélanger délicatement soit manuellement, soit sur un agitateur de microplaques. Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C).		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Substrat TMB/H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (a). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (b, c)
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire. (c)		
0,45 M Sulfuric Acid (5)	50 µl	Arrêter la réaction en introduisant 0.45M d'acide sulfurique. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat. (b).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs (d).		

Nota:

- Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage afin de préserver les protéines insolubilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. Régler le laveur de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.
- Lors de la distribution du substrat TMB, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Il doit être le même lors de l'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique.
- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour micro-plaques ELISA est possible.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

VARIANTE : METHODE 2 TEMPS :

- Le dosage du PAI-1 antigène peut également être réalisé en méthode "deux temps". La courbe d'étalonnage va de 0 à C ng/ml (comme pour la méthode 1 temps). Le "PAI-1 standard" (Std) doit être repris par 2 ml de F-Sample Diluent (SD).
- L'immunoconjugué (IC) doit être reconstitué par 7,5 ml de "Conjugate Diluent" (CD).
- Le plasma à tester est analysé dilué 5 fois en "F-Sample Diluent" (SD), ou davantage si des taux supérieurs à 50ng/ml sont attendus.
- Dans chaque puits de la plaque ELISA, introduire 100µL de F-Sample Diluent (SD), puis 100µL de la gamme d'étalonnage (réalisée comme pour la méthode 1 temps) ou 100 µL de plasma à tester dilué 1/5 (ou plus si nécessaire). Après 1 heure d'incubation à température du laboratoire (18-25°C), laver la plaque et ajouter 200 µl

d'immunoconjugué (IC) par puits. Incuber 1 heure à température du laboratoire, laver la plaque, et ajouter le substrat TMB (200 µl par puits). Arrêter la coloration après 5 min. à l'aide de 50µl d'acide sulfurique 0,45 M (SA) par puits, et mesurer la DO à 450 nm. Pour les lavages, les précautions opératoires, et l'interprétation des résultats, procéder comme indiqué pour la méthode 1 temps.

EXPRESSION DES RESULTATS :

- Sur papier millimétré, porter les concentrations du PAI-1 : Ag en ng/ml sur l'axe des abscisses et les DO450 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. Sur la courbe obtenue, déduire directement le taux de PAI-1 : Ag de l'échantillon testé. Pour obtenir le taux du PAI-1 : Ag dans l'échantillon, la valeur lue sur la courbe de calibration doit être **multipliée par le facteur de dilution utilisé (ex : 5,10, 20.....)** (voir modèle présenté sur le papillon).
- Pour les contrôles I et II, la concentration mesurée doit être multipliée par 5.
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

VALEURS ATTENDUES :

- La concentration en PAI-1 Ag dans les plasmas normaux, mesurée avec le coffret Zymutest PAI-1 Ag, est usuellement comprise entre 1 et 25 ng/ml. (Nota : en l'absence de matériel de référence pour les dosages de PAI-1 : Ag, il existe une grande hétérogénéité pour les concentrations de PAI-1 : Ag mesurées selon le réactif utilisé. La zone normale doit être interprétée en fonction du dispositif utilisé (6)).
- La concentration en PAI-1 augmente avec l'âge et le métabolisme des lipides, particulièrement en fonction du taux des triglycérides.
- Le PAI-1 présente des variations nyctémérales, et les concentrations les plus fortes de PAI-1 sont dosées le matin.
- La concentration en PAI-1 Ag augmente pendant la grossesse.

BIOCHIMIE :

- Le PAI-1 est une glycoprotéine composée d'une seule chaîne protéique, et est synthétisé par la cellule endothéliale et les hépatocytes. Son poids moléculaire est de 50 000 daltons. Dans le plasma, il est stabilisé par fixation à la vitronectine.
- Le PAI-1 est aussi présent dans les plaquettes, mais sous sa forme latente. Le PAI-1 régule la fibrinolyse en inhibant le tPA et l'urokinase.

VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

- Le PAI-1 Antigène est augmenté dans les thromboses, les cancers, les maladies hépatiques, en post chirurgie, et lors de septicémies. Il est également augmenté dans les extraits tumoraux.
- Des études récentes ont montré une bonne corrélation entre l'augmentation du taux de PAI-1 et les facteurs de risque cardiovasculaire (obésité, hyperinsulinémie, hypertriglycéridémie,....).

APPLICATIONS :

- Dosage du PAI-1 dans des études cliniques.
- Mesure du PAI-1 en tant que marqueur du risque cardiovasculaire.

CARACTERISTIQUES :

- La trousse de dosage utilisant deux anticorps monoclonaux spécifiques du PAI-1, a une sensibilité identique pour les différentes formes de PAI-1; latent, actif, fixé à la vitronectine, complexé au tPA, ou à l'uPA, inactif.
- Limite de détection ≤ 0.5 ng/ml.
- Intra-assay : 3-8%.
- Inter-assay : 5-10%.
- Pas d'interférence significative de l'héparine jusqu'à 2 UI/ml.

REFERENCES :

- Declerck P.J., Alessi M.C., Verstreken M., Kruithof E.K.O., Juhan-Vague I., Collen D. : Measurement of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked-immunosorbent assay. Blood ; 1998, 71, 220-25.
- Loskutoff D.J., Samad F. : The adipocyte and hemostatic balance in obesity. Studies on PAI-1. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1998, 18, 1-6.
- Fujii S. : PAI-1 in Thrombosis and Arteriosclerosis. Fibrinolysis and Proteolysis, 1997, 11, 137-140.
- De Maat MPM, De Bart A.C.W., Hennis BC, Meijer P., Havelmaar AC, Mulder PG, Klufft C. : Interindividual and Intraindividual variability in plasma Fibrinogen, tPA antigen, PAI-1 Activity and CRP in healthy, young volunteers and patients with angina pectoris. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1996, 16, 1156-62
- Smith F.B., Lee A.J., Rumley A., Fowkes G.R., Lowe G.O.R. : Tissue-Plasminogen-Activator, Plasminogen Activator Inhibitor and risk of peripheral arterial disease. Arteriosclerosis, 1995, 15, 35-43.
- Declerck PJ et al., Multicenter evaluation of commercially available methods for the immunological determination of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Thromb. Haemost., 1993, 70(5), 858-63.