








# TECHNOZYM<sup>®</sup> PAI-1 Actibind<sup>®</sup> ELISA



REF	TC16075	TECHNOZYM <sup>®</sup> PAI-1 Actibind <sup>®</sup> ELISA	
REF	TC16077	TECHNOZYM <sup>®</sup> PAI-1 Actibind <sup>®</sup> Calibrator Set	5 x 0.2 mL
REF	TC16079	TECHNOZYM <sup>®</sup> PAI-1 Actibind <sup>®</sup> Control Set	2 x 0.2 mL

## symbols key / Symbolschlüssel / interpretazione dei simboli / explicación de símbolos / explicação dos símbolos / clé des symboles / Symbolnyckel / symbolforklaring / Tegnforklaring / Κλειδί συμβόλων / Използвани символи / символы / Ključova slova / Značenje simbola

	manufacturer / Hersteller / fabbricante / fabricante / fabricante / fabricant / Tillverkaren / Fabrikanten / Produzent / Κατασκευαστής / Производитель / Производител / Производител / výrobce / Proizvođač		expiry date / Verfallsdatum / data di scadenza / fecha de caducidad / data de validade / date d'expiration / utgångsdatum / udløbsdato / Utløpsdato / Ημερομηνία λήξης / срок на годност / datum expirace/ срок годности / datum expirace / Rok trajanja
	storage temperature / Lagertemperatur / temperatura di conservazione / temperatura de conservación / temperatura de conservação / température de stockage / lagringstemperatur / opbevaringstemperatur / Oppbevaringstemperatur / θερμοκρασία αποθήκευσης / съхранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovanja		consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / consultare le istruzioni per l'uso / consulte las instrucciones de uso / consultar o manual de instruções / instruction d'utilisation / se användarinstruktioner / følg brugsvejledning / Følg bruksanvisningen / συμβουλευθείτε τις οδηγίες για τη χρήση / прочетете инструкцията за работа / potfeba fidiť se instrukcemi / перед использованием читайте инструкцию / sledujte návod k použití / Pročitaj upustvo pre upotrebe
	CE-mark / CE-Kennzeichnung / marchio CE / marca de CE / Simbolo da CE / marquage CE / CE-märkning / CE-mærket / CE-merke / CE-σημάδι / CE марка / CE-označení / маркировка CE / značka CE / CE-marka		determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / déterminations / bestämmingar / bestemmelser / Bestemmelser / προσδιορισμοί / брой тестове / stanovení / определний / роčet stanovení / Definicija
<b>AQUA</b>	distilled water / destilliertes Wasser / acqua distillata / água destilada / água destilada / eau distillée / destillerat vatten / destilleret vand / Destillert vann / απεσταγμένο νερό / децтилирана вода / destilovaná voda / дистиллированная вода / destilovaná voda / Serija	<b>LOT</b>	lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / парти / партида номер / šarže / lot / šarže / in vitro diagnostika
<b>BUF</b>	Reaction buffer / Reaktionspuffer / tampone di reazione / tampón de reacció / Tampão de reação / tampon de réaction / Reaktionsbuffert / Reaktionsbuffer / Reaktionsbuffer / διάλυμα αντίδρασης / Реакционен буфер / Рабочий буферный раствор / Reakčni pufr / Reakcioni pufer	<b>MTP</b>	microtiter plate / Mikrotiterplatte / placa microtiter / microplaca / microplaca / microplaques sensibilisées / Mikrotiterplatta / Mikrotiterplade / mikrotiterplate / πλάκα μικροτιτλοδότησης / Микротитрѐна плака / Микропланшет / Mikrotitrační destička / Mikrotitracione ploče
<b>CAL</b>	Calibrator / Kalibrator / Calibratore / calibrador / calibrador / calibreur / Kalibrator / Kalibrator / Kalibrator / Βαθμονομητής / Калибратор / калибратор / kalibrátor / Kalibrator	<b>REF</b>	catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referência / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγων / каталожен номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj
<b>CONJ</b>	Conjugate / Konjugat / Coniugato / conjugado / conjugado / conjugaté / Konjugerad / Konjugat / Konjugat / συνδεδετικό / Конюгат / Коньюгат / Konjugát / Konjugat	<b>RTU</b>	ready to use / gebrauchsfertig / pronto all'uso / listo para usar / pronto a usar / prêt à l'emploi / færdig att användas / færdig til brug / klar til bruk/ έτοιμο προς χρήση / Готов за употреба / готов к использованию / k přímému použití / Razrediti ili rastvoriti
<b>CONT</b>	Control / Kontrolle / controllo / control / control / contrôle / Kontroll / Kontroll / Kontroll / διάλυμα ελέγχου / Контрол / Контрольный образец / Kontrola / Kontrola	<b>STOP</b>	stop solution / Stopplösung / Soluzione di arresto / solución de parada / solução de paragem / solution d'arrêt / Stopplösning / Stop-opløsning / Stoppløsning / διάλυμα παύσης / Стоп раствор / Стоп-раствор / Zastavovací roztok / Stop solucija
<b>DIL</b>	dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in / diluire o dissolvere in / diluir o dissolver / diluir ou dissolver em / diluer ou dissoudre dans / spädd eller upplös i / fortyndes eller opløses i / Fortyndes eller opløses i / αραιωση ή διάλυση σε / растворите или разрежете с / zředit anebo rozpustit v / разбавить или растворить в / naředte nebo rozpustte v / razrediti ili rastvoriti u	<b>SUB</b>	substrate / Substrat / substrato / substrato / substrato / substrat / Substrat / Substrat / Substrat / υπόστρωμα / Субстрат / Субстрат / Substrát / Substrat
<b>INC</b>	incubation buffer / Inkubationspuffer / tampone di incubazione / tampón de incubación / tampão de incubação / tampon d'incubation / Inkubationsbuffert/ Inkubationsbuffer/ Vaskebufferkonsentrat / διάλυμα επώασης / Инкубационен буфер / Буфер для инкубации / Inkubační pufr / Inkubacioni pufer	<b>WASH</b>	washing solution concentrate / Waschlösungskonzentrat / concentrado de solución de lavado / solución de lavado concentrada / tampão de lavagem concentrado / Tampon de lavage concentré / Vattenlösningsskoncentrat / Vaskeopløsningskonsentrat / vaskeløsningskonsentrat / συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης / Концентриран миеш разтвор / Концентрат промывочного раствора / Koncentrát promývacieho roztoku / Koncentrat solucije za ispiranje
<b>IVD</b>	in vitro diagnostic use / in vitro Diagnostikum / diagnostico in vitro / diagnóstico en vitro / diagnóstico in vitro / diagnostic in vitro / för in vitro diagnostik / in vitro diagnostik / in vitro diagnostisk bruk / рηση διαγνωστικής εντόβ σωλήνα / за ин vitro диагностика / pro in vitro diagnostiku / использовать для диагностики in vitro / diagnosticky prostfedek in vitro / Destilísana Voda		



**PRODUCT DESCRIPTION**

**INTENDED USE**

The TECHNOZYM® PAI-1 Actibind® ELISA can be used to determine active PAI-1 levels in patients with thrombotic disorders (deep vein thrombosis, myocardial infarction stroke), malignancies or septicemia.

**COMPOSITION**

1. ELISA test strips (12); with 8 wells each, precoated with tPA immobilized via a monoclonal anti tPA coating antibody; in an aluminium bag.
2. Washing buffer concentrate (PBS; pH 7.3); containing detergent; 0.01% merthiolat; 1 bottle, 80 ml.
3. Incubation buffer (PBS; pH 7.3); contains stabiliser protein; 0.05% proclin; and dye, 1 bottle, 90 ml, ready for use.
4. Calibrators (Standards) numbered; lyophilised; 1 bottle each. **Concentrations are lot-dependent; consult label on the vial.**
5. Control plasmas "low level" and "high level" for checking purposes lyophilised; 1 bottle each. **Concentrations are lot-dependent; consult the label on the vial.**
6. Conjugate monoclonal Anti-PAI-1-POX; dyed blue; 1 bottle, 0.3 ml.
7. Chromogen TMB (tetramethylbenzidine); 1 bottle, 12 ml; ready for use.
8. Stopping solution sulphuric acid 0.45 mol/l; 1 bottle 12ml; ready for use.
9. Adhesive film: for ELISA test strips (2).

**MATERIAL REQUIRED** (but not supplied with the kit)

1. Distilled water
2. Test tubes for diluting standard and samples
3. Measuring cylinder (1000 ml)
4. Precision pipettes (10, 100 and 1000 µl)
5. Variable pipette (1000 µl)
6. Multichannel and/or dispensing pipettes (100 and 200 µl)
7. ELISA washer or multichannel pipette
8. ELISA reader with 450 nm filter, with a 620 nm reference filter if available.
9. Incubator (37 °C)

**WARNING AND PRECAUTIONS**

- All human blood or plasma products as well as samples must be considered as potentially infectious. They have to be handled with appropriate care and in strict observance of safety regulations. The rules pertaining to disposal are the same as applied to disposing hospital waste.
- Calibrators and control plasmas are made from human blood and any individual plasma involved in the procedure is HBsAg, HIV 1/2 Ab and HCV-Ab-negative (see labels on kit and/or bottles).
- Stopping solution (sulphuric acid) may irritate the skin. Should acid get into your eyes, wash out immediately with water and consult a doctor.
- The reagents sometimes contain preserving agents (merthiolate). Beware of swallowing! Avoid contact with skin or mucous membranes.

**STABILITY AND STORAGE**

The expiry date printed on the labels applies to storage of the unopened bottles at + 2...8 °C.

Stability after reconstitution/opening:

Material/ Reagent	State	Storage	Stability
Calibrators, controls plasmas	after reconstitution	-20 °C	6 months
ELISA test strip	after opening	2 ... 8 °C with adhesive film in plastic bag with drying agent	expiry date
Washing buffer concentrate	after opening	2 ...8 °C	6 months
Washing buffer	1+11.5 dilution of concentrate	2 ... 8 °C	3 weeks
Incubation buffer	after opening	2 ... 8 °C	2 months
Conjugate	after opening	2 ... 8 °C	6 months
	working solution	room temperature	60 minutes
Chromogen TMB	after opening	2 ... 8 °C	expiry date

**TEST PROCEDURE**

**PREPARATION OF SAMPLES**

Sample material: plasma  
 It is highly recommended to use commercially available collecting tubes which contain platelet stabilizing agents e.g. CTAD (Greiner). 90% of PAI-1 antigen is contained in the platelets so it is essential to ensure during sample collection that the platelets are not damaged which would result in elevated plasma levels. Citrated or EDTA plasmas can be used. Centrifuge for 15 minutes at a minimum of 2500g (DIN 58905). The plasma sample may be stored for 3 hours at room temperature; otherwise the sample ought to be frozen immediately after centrifugation at -20°C or below. Plasmas are stable for 6 months at -20°C.  
 Serum samples should not be used as they show high PAI-1 levels which is related to the platelet PAI-1 content. Cell supernatants and tumour extracts can be used, but this ELISA test has been optimized for plasma samples, therefore other dilution factors would have to be used accordingly.

**PREPARATION OF REAGENT**

1. Before starting the test, all the required components are to be brought to room temperature.
2. Preparing the washing buffer: Dilute 1 part by volume washing buffer concentrate with 11.5 parts by volume distilled water (1+11.5). Mix well! (Diluted washing buffer concentrate = washing buffer). There may be crystalline precipitations which will dissolve at 37°C within 10 minutes.
3. Reconstituting calibrators and control plasmas: Calibrators and control plasmas are reconstituted with 200 µl distilled water and mixed for 10 seconds after a reconstitution time of 15 minutes (vortex mixer). Reconstituted components are clear to slightly turbid.
4. Preparing the conjugate working solution (1+50): Dilute 1 part by volume conjugate with 50 parts by volume incubation buffer.

**For 8 test wells: Mix 20 µl conjugate with 1000 µl incubation buffer**

**PERFORMANCE OF THE TEST**

<b>WASHING</b> (reference 1,3,4)	washing buffer	5 x 200 µl
<b>SAMPLE AND CONJUGATE REACTION</b> (reference 1,2)	Calibrators, control plasmas and samples	25 µl
	conjugate working solution	75µl
	Pipette in wells, cover test, strips with film, incubate at 37°C	45 minutes
<b>WASHING</b> (reference 1,3,4)	washing buffer	5 x 200 µl
<b>SUBSTRATE REACTION</b> (reference 1,2)	pipette substrate solution into test wells	100 µl
	Cover test strips with film, incubate at RT (20 – 25°C)	15 minutes
<b>STOPPING</b> (reference 1,2)	pipette stopping solution into wells	100 µl
<b>MEASURING</b> (reference 5)	ELISA-Reader, 450 nm	shake 10 sec., measure within 10 minutes

**References**

1. Reagents of different lots must not be combined
2. Precision and performance, among others, essentially depend on the following factors:
  - Thorough mixing of all substances used for dilution
  - Test calibrators, controls and samples in duplicates.
  - Incubation to be done at correct temperatures
  - Strict observance of the order of pipetting and of the time element as indicated:
  - The time for sample incubation, conjugate and substrate reaction as indicated starts after pipetting the last sample. Incubation times should not vary by more than ±10%.
  - During sample incubation and conjugate reaction, the time for pipetting the diluted calibrators/samples/control plasmas and/or conjugate solutions must not exceed 60 seconds per ELISA test strip (8 wells).
  - During substrate reaction and at stopping, the time needed for pipetting the substrate and/or the stopping solution must not exceed 10 seconds per ELISA test strip. Short pipetting times may be secured by using multichannel- and dispensing pipettes.
3. Label/number strips with a water resistant pen in case the strips accidentally fall out of the frame during testing.
4. After the last washing, wells must be aspirated thoroughly, turned upside down and positioned on a blotting paper; by gentle tapping, the last remnants must be removed.
5. Measuring the difference in wave lengths at 450 and 620 nm or at 450 and 690 nm, the precision of the test is increased.

**LIMITATION OF THE TEST**

Samples which fall higher than the top calibrator standard must be retested at a higher dilution as a hook dose response may occur above.

**ANALYSIS RESULTS**

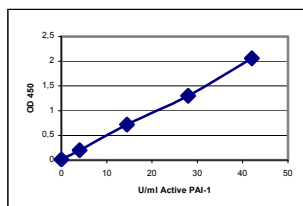
**CALCULATION OF THE RESULTS**

Setting up a reference curve: X axis: Concentration active PAI-1 U/ml  
 Y axis: Extinction  
 Graph plot is linear-linear with a linear or point to point fit

Assessment of reference curve

- The extinction coefficient of the highest calibrator should be between 1.0 and 2.5.
- The validity of the test may be checked on the basis of the calculated control values.

Example of standard curve.



Measuring concentration of samples

- Read off the concentration from the reference curve.
- If there are samples with extinction coefficients higher than that of the highest point on the curve, they have to be prediluted with incubation buffer (1:2 or 1:4). The measured concentration then has to be multiplied with the dilution factor 2 or 4.

**REFERENCE RANGE**

Normal Plasma levels range from 1-7U/ml. It is recommended that individual laboratories establish their own normal range. Active PAI-1 levels above 20U/ml may indicate reduced fibrinolytic capacity and, thus, increased thrombotic tendency. Measures should be taken to reduce the risk of thrombosis in individuals with elevated PAI-1 plasma levels. The TECHNOZYM® PAI-1 Actibind® ELISA exclusively measures free, active PAI-1 and is not affected by other forms of PAI-1 or other plasminogen activator inhibitors.

**STANDARDISATION**

The calibration material used is the WHO International Standard for Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1).

**LITERATURE**

- 1) H.Pannekoek, H. Veerman, H. Lambers, P. Diergaarde, C.L. Verweij A.-J. van Zonneveld, J.A. van Mourik. Endothelial plasminogen activator inhibitor PAI-1) A new member of the serpin genes family. EMBO J. 5: 2539-2544, 1986.
- 2) V. Caroll, M. Griffiths, M. Geiger, C. Merlo, M. Furlan, F. Lamille and B.R. Binder: Fibrinolytic parameters in 200 survivors of myocardial infarction.: Thromb. Haemost. 73: 1137 No 6 (abstr.) 1995
- 3) J. Chmielewska, M. Ranby, B. Wiman. Effect of fibrin on the reaction between plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. Fibrinolysis Supplement 1, 1989, abstract 224.
- 4) E.K.O.Kruthof, C.Tran-Zhang, F.Bachmann. Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets. Thromb. Haemost.55: 201-205, 1986.

## PRODUKTBESCHREIBUNG

### ANWENDUNG

Der TECHNOZYM® PAI-1 Actibind® ELISA kann zur spezifischen Quantifizierung der PAI-1 Aktivität im Rahmen thromboembolischer Erkrankungen (tiefe Venenthrombose, Myokardinfarkt, Apoplexie) sowie bei malignen Erkrankungen und bei Sepsis eingesetzt werden.

### ZUSAMMENSETZUNG

- ELISA-Teststreifen (12) mit jeweils 8 Testvertiefungen; beschichtet mit tPA der über einen monoklonalen tPA Antikörper gebunden ist; im Aluminiumbeutel verpackt.
- Waschpufferkonzentrat (PBS, pH 7,3); detergentshaltig; 0,01% Merthiolat; 1 Flasche; 80 ml.
- Inkubationspuffer (PBS; pH 7,3); enthält Stabilisatorprotein und Farbstoff; 0,05% Proclin; 1 Flasche; 90 ml; gebrauchsfertig
- Kalibratoren (Standards): Nummeriert; lyophilisiert; jeweils eine Flasche. **Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten!**
- Kontrollplasmen "high level" und "low level"; zur Richtigkeitskontrolle; lyophilisiert; jeweils eine Flasche. **Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten!**
- Konjugat: Monoklonaler Anti-PAI-POX; blaugefärbt; 1 Flasche; 0,3 ml
- Chromogenes Substrat: TMB (Tetramethylbenzidin) 1 Flasche, 12 ml, gebrauchsfertig
- Stopplösung: Schwefelsäure 0,45 mol/l; 1 Flasche; 12 ml, gebrauchsfertig
- Abklebefolien: für ELISA-Teststreifen, 2 Stück

### BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Kit enthalten)

- Aqua dest
- Röhrchen zur Verdünnung der Standards und Proben
- Messzylinder (1000ml)
- Präzisionspipetten (10, 100 und 1000 µl)
- Variable Pipette (1000µl)
- Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten (100 und 200 µl)
- ELISA-Waschgerät oder Mehrkanalpipette
- ELISA-Reader mit 450 nm Filter (und 620nm Referenzfilter falls verfügbar)
- Inkubator (37°C)

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Alle humanen Blut- bzw. Plasmaprodukte und Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln und wie Krankenhausmüll zu entsorgen.
- Die Kalibratoren und Kontrollen, hergestellt aus humanem Blut, und jedes hierzu verwendete Einzelplasma ist Hb<sub>s</sub>Ag, HIV 1/2 Ak und HCV-Ak negativ (siehe Außen- bzw. Flaschenetikett).
- Stopplösung (Schwefelsäure) kann zu Reizungen der Haut führen. Sollte Säure in die Augen gelangen, sofort mit viel Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen!
- Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel (Merthiolat). Nicht schlucken! Haut- oder Schleimhautkontakt vermeiden!

### LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Reagenzien sind ungeöffnet bei +2...8°C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Datum verwendbar.

Stabilität nach Rekonstitution/nach Öffnen:

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Stabilität
Kalibratoren, Kontrollplasmen	nach Rekonstitution	-20 °C	6 Monate
ELISA-Teststreifen	nach Öffnen	2 ... 8 °C mit Abklebefolie in Alubeutel mit Trockenmittel	Verfallsdatum
Waschpufferkonzentrat	nach Öffnen	2 ... 8°C	6 Monate
Waschpuffer	1+11,5 Verdünnung des Konzentrats	2 ... 8 °C	3 Wochen
Inkubationspuffer	nach Öffnen	2 ... 8 °C	2 Monate
Konjugat	nach Öffnen	2 ... 8 °C	6 Monate
	Gebrauchslösung	Raumtemperatur	60 Minuten
Chromogenes Substrat	nach Öffnen	2 ... 8 °C	Verfallsdatum

## TESTDURCHFÜHRUNG

### VORBEREITUNG DER PLASMAPROBEN

Probenmaterial: Plasma.

Es wird ausdrücklich empfohlen handelsübliche Blutentnahmeröhrchen zu verwenden, die Thrombozyten Stabilisatoren enthalten, z. B. CTAD (Greiner). 90% des PAI-Antigens sind in Thrombozyten enthalten. Daher ist es absolut notwendig sicherzustellen, dass während der Probengewinnung kein Zerfall der Thrombozyten stattfinden kann, der zu künstlich erhöhten Plasmakonzentrationen des PAI führen würde.

Es können Citrat- oder EDTA- Plasmen verwendet werden. Zur Plasmagewinnung die Proben 15 min bei mindestens 2500g (DIN 58905) zentrifugieren. Plasmaproben können 3 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden; anderenfalls sollten die Proben sofort nach der Zentrifugation eingefroren werden (-20°C oder tiefer). Haltbarkeit bei -20°C: 6 Monate.

Serum Proben sollten nicht verwendet werden, da sie sehr hohe PAI Konzentrationen aufweisen, die aus den Thrombozyten stammen. Zellkulturüberstände und Tumorextrakte können zwar verwendet, die geeigneten Verdünnungen müssen allerdings empirisch ermittelt werden, da dieser ELISA nur für Plasmaproben optimiert ist.

### VORBEREITUNG DES REAGENZES

- Vor Testbeginn alle benötigten Testkomponenten auf Raumtemperatur bringen.
- Herstellen des Waschpuffers: 1 Volumenteil Waschpufferkonzentrat mit 11,5 Volumenteilen Aqua dest. verdünnen (1+11,5). Gut mischen! (Verdünntes Waschpufferkonzentrat = Waschpuffer). Eventuelle kristalline Niederschläge gehen bei 37°C innerhalb von 10 min in Lösung.
- Rekonstituieren der Kalibratoren und Kontrollplasmen: Die Kalibratoren und Kontrollplasmen werden mit 200 µl Aqua dest. rekonstituiert und nach einer Rekonstitutionszeit von 15 Minuten 10 Sekunden gemischt (Probenmischer). Rekonstituierte Komponenten sind klar bis leicht trüb.
- Herstellen der Konjugatgebrauchslösung (1+50):1 Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnen.

**Für 8 Testvertiefungen: 20 µl Konjugat mit 1000 µl Inkubationspuffer mischen.**

## TESTVERFAHREN

<b>WASCHEN</b> (Hinweis 1,3,4)	Waschpuffer	<b>5 x 200 µl</b>
<b>PROBEN UND KONJUGAT REAKTION</b> (Hinweis 1,2)	Kalibratoren, Kontrollplasmen, Proben	<b>25 µl</b>
	Konjugatgebrauchslösung	<b>75µl</b>
	In Testvertiefungen pipettieren, mit Folie abdecken, bei 37°C inkubieren	<b>45 Minuten</b>
<b>WASCHEN</b> (Hinweis 1,3,4)	Waschpuffer	<b>5 x 200 µl</b>
<b>SUBSTRAT- REAKTION</b> (Hinweis 1,2)	Substratlösung in Testvertiefungen pipettieren	<b>100 µl</b>
	mit frischer Folie abdecken, bei RT (20 – 25°C) inkubieren	<b>15 Minuten</b>
<b>STOPPEN</b> (Hinweis 1,2)	Stopplösung in Testvertiefungen pipettieren	<b>100 µl</b>
<b>MESSEN</b> (Hinweis 5)	ELISA-Reader, 450 nm	10 Sek.schütteln, Messung innerhalb von 10 Minuten

### Hinweise

- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht kombiniert werden.
- Präzision und Wiederfindung hängen u.a. von folgenden Faktoren entscheidend ab:
  - Gute Durchmischung aller Verdünnungsansätze, 10 Sek. auf Probenmischer
  - Durchführung von Doppelbestimmungen
  - Inkubation bei der korrekten Temperatur
  - Genaue Einhaltung von Pipettierreihenfolge und Zeittakt:
  - Die angegebene Zeit für die Probeninkubation, Konjugat- und Substratreaktion wird nach der Pipettierung der letzten Probe genommen. Inkubationszeiten sollten um nicht mehr als ± 10% variiert werden.
- Bei der Probeninkubation und Konjugatreaktion darf die Zeit für die Pipettierung der verdünnten Kalibratoren/ Proben/ Kontrollplasmen bzw. Konjugat-Lösung 60 Sek. pro ELISA-Teststreifen (8 Vertiefungen) nicht überschreiten.
- Bei der Substratreaktion und beim Stoppen darf die Pipettierzeit der Substrat- bzw. Stopplösung 10 Sek. pro ELISA-Teststreifen nicht überschreiten. Kurze Pipettierzeiten werden durch Verwendung von Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten erreicht.
- Teststreifen mit wasserfestem Stift markieren, falls sie während des Testes versehentlich aus der Halterung fallen sollten.
- Nach dem letzten Waschvorgang müssen die Testvertiefungen leer gesaugt und auf saugfähigem Papier ausgeklöpft werden.
- Durch Differenzwellenlängenmessung bei 450 nm und 620 nm wird die Präzision des Tests erhöht.

### EINSCHRÄNKUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG

Proben, die einen höheren Wert als der höchste Kalibrator haben, müssen mit einer grösseren Verdünnung nochmals getestet werden, da ansonsten ein „Hook-Dose“ Effekt auftreten könnte

## ANALYSENERGEBNISSE

### BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

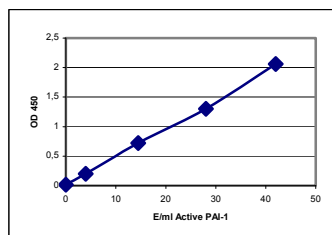
**Erstellung der Bezugskurve:** X-Achse: Konzentration „active PAI-1“ E/ml  
Y-Achse: Extinktion

Bezugskurve ist linear-linear, Werte Punkt zu Punkt oder mit linearer Regression verbinden

### Beurteilung der Bezugskurve

- Die Extinktion des höchsten Kalibrators sollte zwischen 1,0 und 2,5 liegen.
- Die Auswertbarkeit des Tests kann anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft werden

### Beispiel einer Standardkurve



### Konzentrationsbestimmungen der Proben

- Konzentrationen der Proben an der Bezugskurve ablesen.
- Sollte der Extinktionswert einer Probe höher als der des höchsten Standards liegen, so muss die Probe mit Inkubationspuffer vorverdünnt werden (1:2 oder 1:4). Die ermittelte Konzentration wird in diesem Fall mit dem Verdünnungsfaktor 2 oder 4 multipliziert.

### REFERENZBEREICHE

Der normale PAI-1 Plasmagehalt liegt zwischen 1-7E/ml. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalbereich bestimmt. PAI-Aktivitätswerte über 20E/ml weisen auf Verminderung der Fibrinolyse und damit auf erhöhte Thromboseneigung hin. Der TECHNOZYM® PAI-1 Actibind® ELISA erfasst ausschliesslich freien aktiven PAI-1. Er ist insamandig gegenüber anderen Plasminogenaktivator-Inhibitoren.

### STANDARDISIERUNG

Zur Kalibrierung wurde der WHO International Standard für Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1) verwendet.

### LITERATUR

- 1) H. Pannekoek, H. Veerman, H. Lambers, P. Diergaarde, C.L. Verweij A.-J. van Zonneveld, J.A. van Mourik. Endothelial plasminogen activator inhibitor PAI-1: A new member of the serpin genus family. *EMBO J.* 5, 2539-2544, 1986.
- 2) V. Carroll, M. Griffiths, M. Gesper, C. Merlo, M. Furian, F. Lämmle and B.R. Binder. Fibrinolytic parameters in 200 survivors of myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 73: 1137 No 6 (abstr.) 1995
- 3) J. Chmielewska, M.Ranby, B.Wiman. Effect of fibrin on the reaction between plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Fibrinolysis Supplement 1*, 1986, abstract 224.
- 4) E.K.G. Krut'ofil, C. Tran-Zhang, F. Bachmann. Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets. *Thromb. Haemost.* 55: 201-205, 1986.

**DESCRIPTION DU PRODUIT**

**UTILISATION PRÉVUE**

Le TECHNOZYM® PAI Actibind® ELISA peut être utilisé pour doser le PAI-1 activité chez les patients qui présentent des désordres thrombotiques (Thrombose veineuse profonde, Infarctus du Myocarde), cancer ou septicémie.

**CONTENU**

- 1 x 12 Barrette ELISA de 8 puits : Chaque puits est pré-coaté avec du t-PA immobilisé via des anticorps monoclonaux anti t-PA. (Un agent déshydratant est emballé dans un sac aluminium pour une meilleure conservation des barrettes)
- 1 x 80 ml Tampon de lavage concentré : (PBS; pH 7,3) ; contient un détergent; 0,01% de merthiolate
- 1 x 90 ml Tampon d'incubation : (PBS; pH 7,3) ; contient un stabilisateur de protéines : 0,05% procline et colorant, **prêt à l'emploi.**
- 5 x 0,2 ml Calibrateurs numérotés de 1 à 5 : Lyophilisés, **Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les flacons.**
- 5 x 0,2 ml Plasmas de contrôle haut et bas : Lyophilisés, **Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les flacons.**
- 1 x 0,3 ml Conjugué concentré : Anticorps monoclonal Anti-PAI-1-POX ; colorant bleu
- 1 x 12 ml Substrat Chromogène : TMB (tétraméthylbenzène); **prêt à l'emploi.**
- 1 x 12 ml Solution d'arrêt : Acide sulfurique 0,45 mol/L; **prêt à l'emploi.**
- 2 x 1 Film adhésif : Pour les barrettes ELISA

**MATÉRIEL REQUIS** (non fourni dans le coffret)

1. Eau distillée
2. Tubes de dilution pour les standards et les échantillons
3. Epruvette graduée de 1000 mL
4. Pipettes de précision (10, 100, 1000 µL)
5. Pipette réglable (1000 µL)
6. Pipettes multi canaux (100, 200 µL)
7. Automate de lavage ELISA ou pipette multi canaux.
8. Lecteur de plaque ELISA équipé d'un filtre à 450 nm et si possible d'un filtre de référence à 620 nm.
9. Incubateur (37 °C)

**AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS**

- Tous les produits sanguins et plasmatiques doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec soin et ceci dans la stricte observation des règles de sécurité. Les règles concernant le stockage des déchets sont identiques à celles appliquées à l'hôpital.
- Les calibrateurs et contrôles plasmatiques sont élaborés à partir de sang humain, et chaque plasma utilisé est vérifié HbsAg, VIH 1 et VIH 2 Ac et HCV-Ac négatif (voir les étiquettes sur le coffret et/ou sur les flacons).
- Une solution d'arrêt (acide sulfurique) peut être irritante pour la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec de l'eau distillée et consulter un médecin.
- Les réactifs contiennent des agents préservant (merthiolate). Ne pas avaler! Eviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

**STABILITÉ ET STOCKAGE**

Tous les composants non ouverts de ce coffret doivent être utilisés avant la date de péremption indiquée et se conservent entre 2 et 8°C. La stabilité des composants après ouverture, reconstitution et/ou dilution est documentée dans le tableau ci-dessous:

Matériel/Réactif	État	Stockage	Stabilité
Calibrateur et plasmas de contrôles	Après reconstitution	-20°	6 mois
Barrette ELISA	Après ouverture	2-8 °C sous film adhésif avec agent déshydratant dans un sac en plastique	Date de péremption
Tampon de lavage concentré	Après ouverture	2-8 °C	6 mois
Tampon de lavage	Dilution au 1+11,5 du tampon de lavage concentré	2-8 °C	3 semaines
Tampon d'incubation	Après ouverture	2-8 °C	2 mois
Conjugué	Après ouverture	2-8 °C	6 mois
	Solution de travail	Température ambiante	60 minutes
Substrat TMB	Après ouverture	2-8 °C	Date de péremption

**PROCÉDURE DU TEST**

**PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS**

**Matériel :** Plasma  
 Il est hautement recommandé d'utiliser des tubes de collectes disponibles sur le commerce contenant les agents stabilisants des plaquettes sanguines par exemple CTAD (Greiner). 90% des Antigènes PAI-1 sont contenus dans les plaquettes sanguines, il est donc essentiel d'assurer leur absence de dommage lors de la collecte d'échantillon qui aurait pour conséquence d'élever le taux de PAI-1 plasmatique.  
 Les plasmas citratés ou enrichis en EDTA peuvent être utilisés. Centrifuger pendant 15 minutes avec une FCR (force centrifuge radiale) d'au moins 2500g (DIN 58905). Les échantillons de plasmas peuvent être conservés pendant 3 heures à température ambiante, autrement, ils doivent être immédiatement congelés à -20° minimum après centrifugation. Les plasmas ainsi obtenus sont stables à -20°C pendant 6 mois.  
 Les échantillons de sérum ne doivent pas être utilisés car ils présentent un taux élevé de PAI-1 corrélié au contenu plaquettaire en PAI-1. Les surnageants de culture cellulaire et les extraits de tumeur peuvent être utilisés, mais ce test ELISA a été optimisé pour l'utilisation d'échantillons plasmatiques, il faudra en conséquence utiliser d'autres facteurs de dilution.

**PRÉPARATION DES RÉACTIFS**

1. Tous les composants doivent être amenés à la température ambiante avant de commencer le test.
2. **Préparation du tampon de lavage:** Diluer 1 volume de tampon de lavage concentré avec 11,5 volumes d'eau distillée (1+11,5). Bien mélanger. Il se peut qu'il y ait des précipitations cristallines: celles-ci se dissolvent à 37°C en 10 minutes.
3. **Reconstitution des calibrateurs et des plasmas de contrôle:** Les calibrateurs et les plasmas de contrôle sont reconstitués avec 200 µL d'eau distillée et mélangés au vortex pendant 10 secondes après un temps de reconstitution de 15 minutes. Les composants ainsi reconstitués sont claires ou légèrement troubles.
4. **Préparation de la solution de travail du conjugué (1+50):** Diluer 1 volume de solution de conjugué concentré dans 50 volumes de tampon d'incubation. (1+50).

**Pour une barrette de 8 puits: Mélanger 20 µL de conjugué concentré dans 1000 µL de tampon d'incubation.**

**PERFORMANCE DU TEST**

<b>LAVAGE</b> (référence 1, 3, 4)	Pipeter le <b>tampon de lavage</b> dans les puits. Répéter l'opération 5 fois.	<b>5 x 200 µL</b>
<b>VIDER LES PUIITS PAR ASPIRATION PUIS TAPOTER LA PLAQUE APRÈS RETOURNEMENT SUR DU PAPIER ABSORBANT POUR BIEN ÉLIMINER LES RESTES DE TAMPON</b>		
<b>INCUBATION DE L'ÉCHANTILLON ET DU CONJUGUE</b> (références 1, 2)	Pipeter les <b>calibrateurs, plasmas de contrôle et échantillons dilués</b> dans chaque puits.	<b>25 µL</b>
	Pipeter la <b>solution de travail du conjugué</b> dans chaque puits.	<b>75 µL</b>
	Couvrir les barrettes avec un film Incuber à <b>37°C</b>	<b>45 minutes</b>
<b>LAVAGE</b> (référence 1, 3, 4)	Pipeter le <b>tampon de lavage</b> dans les puits. Répéter l'opération 5 fois.	<b>5 x 200 µL</b>
<b>VIDER LES PUIITS PAR ASPIRATION PUIS TAPOTER LA PLAQUE APRÈS RETOURNEMENT SUR DU PAPIER ABSORBANT POUR BIEN ÉLIMINER LES RESTES DE TAMPON</b>		
<b>RÉACTION DU SUBSTRAT</b> (référence 1,2)	Pipeter la <b>solution de substrat</b> dans chaque puits. Couvrir les barrettes avec un film.	<b>100 µL</b>
	Couvrir les barrettes avec un film puis incuber à <b>température ambiante (20-25°C)</b>	<b>15 minutes</b>
<b>SOLUTION D'ARRÊT</b>	Pipeter la <b>solution d'arrêt</b> dans chaque puits	<b>100 µL</b>
<b>MESURE</b> (référence 5)	Lecteur de plaque ELISA, <b>450 nm</b>	Agiter 10 secondes, Mesurer dans les 10 minutes qui

Température ambiante: 20-25°C

**Références:**

1. Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de différents lots.
2. La performance et la précision du test dépendent des facteurs suivants:
  - Bien mélanger les substances utilisées lors des dilutions.
  - Les calibrateurs, les contrôles et les échantillons doivent être testés en double.
  - Les incubations doivent être effectuées à la bonne température.
  - Respecter strictement l'ordre de pipetage et le temps pour chaque élément comme indiqué.
  - Le temps d'incubation des échantillons, conjugués, et substrat démarre après le pipetage du dernier échantillon. Les temps d'incubation ne doivent pas varier de +/- 10%.
  - Durant l'incubation de l'échantillon et la réaction du conjugué, le temps nécessaire au pipetage du calibrateur/échantillon/plasma de contrôle dilué et/ou des solutions de conjugué, ne doivent pas excéder 60 secondes par barrette de test ELISA (8 puits).
  - Durant la réaction du substrat et lors de l'arrêt de la réaction, le temps nécessaire au pipetage du substrat et/ou la solution d'arrêt ne doit pas excéder 10 secondes par barrette ELISA. Pour cela utiliser de préférence une pipette multi canaux.
3. Numérotez les barrettes avec un feutre résistant à l'eau au cas où les bandes tombent accidentellement de la plaque durant le test.
4. Après le dernier lavage, les puits doivent être rigoureusement secs : Pour cela positionner la plaque d'analyse sur du papier absorbant et taper doucement la plaque d'analyse.
5. Mesurer l'absorbance à 450 et 620 nm ou à 450 et 690 nm, la précision du test est alors augmentée.

**LIMITES DU TEST**

Les échantillons présentant des valeurs plus élevées que le calibrateur le plus élevé doivent être testés à nouveau avec un facteur de dilution plus important.

**ANALYSE DES RÉSULTATS**

**CALCUL DES RÉSULTATS**

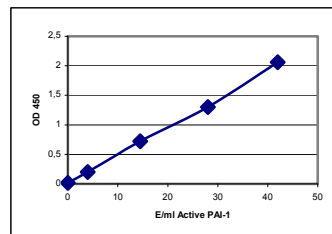
**Établissement de la courbe de référence:** Axe X : Concentration de PAI-1 U/ml (1 U/mL=100%)  
 Axe Y : Absorbance

La courbe de référence est linéaire ou en point au point.

**Évaluation de la courbe de référence:**

- Le coefficient de la courbe d'extinction du calibrateur le plus grand doit se situer entre 1,0 et 2,5.
- La validité du test doit être vérifiée sur la base des valeurs calculées des contrôles.

**Exemple de la courbe standard**



**Mesure des concentrations des échantillons:**

- Lire la concentration à partir de la courbe de référence.
- Si des échantillons présentent un coefficient d'extinction supérieur à celui du plus haut point de la courbe de référence, il doit alors être pré-dilué avec le tampon d'incubation (au 1/2ème ou 1/4ème), et la concentration mesurée doit alors être multipliée par 2 ou 4.

**GAMME DE RÉFÉRENCE**

Le taux normal de plasma est compris entre 1-7U/ml. Il est recommandé que les différents laboratoires établissent leur propre zone de normalité. Les taux de PAI-1 au-delà de 20U/ml indiquent une capacité fibrinolytique réduite et donc une augmentation de la tendance à la thrombose. Des mesures doivent être prises pour réduire le risque de thrombose chez les individus présentant un taux élevé de PAI-1 plasmatique. TECHNOZYM® PAI-1 Actibind® ELISA mesure exclusivement le PAI-1 libre actif et n'est pas affecté par d'autres formes de PAI-1 ou autres activateurs ou inhibiteurs plasminogènes.

**STANDARDISATION**

Le matériel de calibration utilisé est le standard International pour l'Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène (PAI-1) homologué par l'OMS.

**LITTÉRATURE**

1) H.Pannekoek, H. Veerman, H. Lambers, P. Diergaarde, C.L. Verweij A.-J., van Zonneveld, J.A. van Mourik. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI-1) A new member of the serpin genes family. *EMBO J.* 5: 2539-2544, 1986.  
 2) V. Carroll, M. Griffiths, M. Geiger, C. Merlo, M. Fujian, F. Lämmlle and B.R. Binder. Fibrinolytic parameters in 200 survivors of myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 73: 1137 No 6 (abstr.) 1995  
 3) J. Chmielewska, M.Ranby, B.Wiman. Effect of fibrin on the reaction between plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Fibrinolysis Supplement 1*, 1988, abstract 224.  
 4) E.K.O. Kruithof, C. Tran-Zhang, F.Bachmann. Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets. *Thromb. Haemost.* 55: 201-205, 1986.