

**ZYMUTEST™ PAI-1 Antigen**

REF RK012A

96 testů

Kvantitativní měření pro detekci PAI-1 Antigen ELISA metodou

Poslední revize: 11-2022

POUŽITÍ:

ZYMUTEST™ PAI-1 Antigen souprava je ELISA test pro kvantitativní stanovení PAI-1 antigenu (Inhibitor aktvátoru Tkáň-Plasminogen, Typ I) v lidské plazmě.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ:**Technické:**

PAI-1 je jednořetězcový glykoprotein, tvořený endoteliálními buňkami a hepatocyty. Jeho molekulární hmotnost je 50,000 daltonů. V plazmě je stabilizován vázáním na vitronektin nebo v oběhu jako inaktivní komplexy tPA nebo uPA.

PAI-1 je také přítomen v destičkách, ale v latentní formě. PAI-1 reguluje fibrinolýzu nhibicí tPA a urokinázu.

Klinické:

PAI-1:Ag je zvýšený při trombóze, rakovině, poruše jatek, po-operační době, sepsi. Také je zvýšený v extraktech malign tkáně.

Nedávné studie ukázaly spojitost mezi zvýšenou koncentrací PAI-1 a kardiovaskulárním rizikovým faktorem (obezita, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemie, arteriothombóza, ...).

Měření PAI-1:Ag v klinických vzorcích je vhodný k posouzení kardiovaskulárního rizikového faktoru.

PRINCIP:

Do ELISA jamky pokryté monoklonální protilátkou specifickou na PAI-1:Ag je přidán imunokonjugát – myšší monoklonální protilátka specifická na PAI-1:Ag spojená s křenuvou peroxidázou (HRP). Poté se přidá ředěný vzorek a začne imonologická reakce. Pokud je PAI-1Antigen přítomen ve vzorku, naváže se jedním epitopem na pevnou fázi a druhým na druhou monoklonální protilátku s HRP. Po promytí se přidá peroxidázový substrát (3,3', 5,5' – Tetramethylbenzidine – TMB) v přítomnosti peroxidu vodíku a vytvoří se modré zbarvení. Reakce se zastaví kyselinou sírovou, která změní zbarvení na žluté. Přítomné zbarvení je přímo úměrné koncentraci lidského PAI-1:Ag v měřeném vzorku.

REAGENCIE:

- COAT ELISA mikrodestička:** [12x8] obsahuje 12 proužků po 8 jamkách, pokryté monoklonální protilátkou specifickou na lidský PA-1:Ag. Stabilizováno, baleno v hliníkovém obalu v přítomnosti desikantu.
- SD FIBRINOLYSIS** Diluent vzorku: 2 lahvičky po 50 ml, připraveno k použití. Obsahuje Proclin a BSA.
- STD PAI-1 standard:** 3 lahvičky po 2 ml PAI-1 standardu, lyofilizováno. Obsahuje lidskou plazmu a BSA.
- CI PAI-1 PAI-1 Kontrolní plazma I Vysoká:** 1 lahvička po 1 ml, lyofilizováno. Obsahuje lidskou plazmu a lidský PAI-1.
- CII PAI-1 PAI-1 Kontrolní plazma I Nízká:** 1 lahvička po 1 ml, lyofilizováno. Obsahuje lidskou plazmu a lidský PAI-1.
- IC** Immunokonjugát (Anti-(h)-PAI-1-HRP imunokonjugát): 3 lahvičky po 4 ml myšší monoklonální protilátky specifické na PAI-1:Ag s navázanou peroxidázou. Lyofilizováno, obsahuje BSA.
- CD ELISA** Diluent konjugátu: 1 lahvička po 25 ml, připraveno k použití. Obsahuje Proclin a BSA.
- WS ELISA** Promývací roztok: 1 lahvička po 50 ml, [20x] 20 krát koncentrovaná. Obsahuje Proclin.
- TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine:** 1 lahvička po 25 ml, připraveno k použití. Obsahuje peroxidu vodíku.
- Stop 0.45M Kyselina sírová:** 1 lahvička po 6 ml, připraveno k použití.

Koncentrace standard a control se mohou lišit mezi šaržemi. Pro vlastní měření odkazujeme na leták přiložený k balení.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

- Některé reagenty obsažené v těchto soupravách obsahují materiály lidského a zvířecího původu. Kdykoliv je pro přípravu těchto reagentů nutná lidská plazma, je potřebné testovat plazmu na protilátky proti HIV 1, HIV 2 a HCV a pro povrchový antigen hepatitidy B schválenými metodami a výsledky musí být negativní. Žádné testy nemohou zcela vyloučit přítomnost infekčních agens. Z tohoto důvodu je třeba při manipulaci s tímto biologickým materiálem učinit veškerá opatření nezbytná při používání potenciálně infekčních produktů.
- Odpad musí být likvidován v souladu s příslušnými místními předpisy.
- Používejte pouze reagenty ze stejné série soupravy.
- Studie stability ukazují, že reagenty mohou být přepravovány při pokojové teplotě bez degradace.
- Toto zařízení pro diagnostické použití *in vitro* je určeno pro odborné použití v laboratoři.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Nechte ELISA proužky a reagenty stabilizovat alespoň 30 minut při pokojové teplotě před použitím. Víčka otevírejte opatrně, abyste zabránili ztrátě produktu.

COAT Otevřete hliníkové pouzdro a vyjměte požadovaný počet proužků. Proužky použijte do 30 minut.

Rozpusťte obsah každé lahvičky s přesností:

STD → 2 mL **SD FIBRINOLYSIS** abyste získali roztok obsahující přibližně 10 ng/ml PAI-1:Ag. Promíchejte do úplného rozpuštění.

CI PAI-1 → 1 mL **destilované vody**. Dobře promíchejte do úplného rozpuštění.

CII PAI-1 → 1 mL **destilované vody**. Dobře promíchejte do úplného rozpuštění.

IC → 4 mL **CD ELISA** alespoň 15 minut před použitím. Opatrně promíchejte do úplného rozpuštění.

SD FIBRINOLYSIS **TMB** **Stop** **CD ELISA**

Reagenty jsou připraveny k použití.

WS ELISA Promíchejte obsah lahvičky a naředte promývací roztok **1:20 v destilované vodě** (50 ml by měl stačit na 1 l promývacího roztoku po naředění). V případě potřeby inkubujte ve vodní lázni při **37°C** až do úplného rozpuštění.

Pokud **TMB** substrát zežloutne, je kontaminovaný. Substrát znehodnotte a načněte novou lahvičku.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagenty musí být skladovány při teplotě 2-8°C ve svém originálním balení. Za těchto podmínek mohou být používány až do doby expirace vytištěné na soupravě.

COAT Nepoužité proužky mohou být skladovány při 2-8°C **4 týdny** v jejich originálním balení (hermeticky uzavřeny v přítomnosti desikantu), skladovány v přiloženém plastovém pytlíku (minigrip) a chráněno před vlhkostí.

Stabilita reagenty po rekonstituci bez jakýchkoli kontaminací nebo vypařování a skladované uzavřené je:

STD → **8 hodin** při pokojové teplotě (18-25°C).

CI PAI-1 **CII PAI-1**

→ **24 hodin** při 2-8°C.

8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).

2 měsíce zamazeno při -20°C nebo méně*

*Rozmrazujte pouze jednou co nejrychleji při 37°C a ihned použijte.

IC → **4 týdny** při 2-8°C.

24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).

Stabilita reagenty po otevření bez jakýchkoli kontaminací nebo vypařování a skladované uzavřené je:

SD FIBRINOLYSIS
→ **4 týdny** při 2-8°C.

WS ELISA → **4 týdny** při 2-8°C.
7 dní při 2-8°C pro ředěný roztok.

Stop **CD ELISA** **TMB**
→ **8 týdnů** při 2-8°C.

POŽADOVANE REAGENCIE A MATERIAL (NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY):**Reagenty:**

- Destilovaná voda.

Materiály:

- 8smi kanálová nebo opakovací pipeta schopná pipetovat objemy 50-300 µL.
- Pipety různých objemů od 0 do 20 µL, od 20 do 200 µL a od 200 do 1000 µL.
- Prmývačka ELISA destiček a klepačka.
- Analýzátor pro Micro ELISA s vlnovou délkou 450 nm.

ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU:

Krev (9 dílů) musí být opatrně odebrána do antikoagulantu citrátu trisodného (1 díl) (0,109 M, 3,2%) přímou venepunkcí. První zkumavku zlikvidujte. EDTA z lidské plazmy se také může použít.

Vzorky by měly být připravovány a skladovány v souladu s místními pokyny (pro USA viz pokyny CLSI GP44-A4⁷ (a CLSI H21-A5⁸) s dalšími informacemi o odběru, manipulaci a skladování).
Informace o skladování plazmy naleznete v referencích^{7,8}.

POSTUP:

Jednokroková metoda:

1. Vzorky a kontroly by měly být rozpuštěny v **SD FIBRINOLYSIS** viz níže:

Vzorky	Ředění
Kontrol	1:5
Vzorky	1:5

Pro předpokládané koncentrace PAI-1:Ag > 50 ng/ml musí být vzorky naředěny **1:10, 1:20, nebo více**.

2. Stanovte kalibrační křivku pomocí **STD** reagentie o koncentraci "C" ng/mL, viz níže:

Koncentrace PAI-1 (ng/ml)	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
Objem STD	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Objem SD FIBRINOLYSIS	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Opatrně homogenizujte.

Ředění je stabilní **6 hodin** při pokojové teplotě (18-25°C).

3. Do přiloženého rámečku vložte poroučky. Do jamek přidejte **COAT** a proveďte měření dle následující tabulky:

Reagencie	Objem	Procedura
IC	100 µl	Přidejte IC do jamek ELISA destičky.
STD nebo CI PAI-1 nebo CII PAI-1 nebo vzorky nebo SDFIBRINOLYSIS (blank)	100 µl	<p>Okamžitě přidejte:</p> <p>STD nebo CI PAI-1 nebo CII PAI-1 nebo Vzorky nebo SD FIBRINOLYSIS do jamek mikrodestičky.</p>
Opatrně promíchejte ručně nebo v třepačce. Inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25°C) (a)		
WS ELISA	300 µl	Proveďte 5 promytí za sebou. (a)
TMB	200 µl	Okamžitě přidejte do jamek substrát. Pozn.: Distribuce substrátu do každé jamky musí zachovat stejný interval (b,c) .
Zbarvení nechte vyvíjet 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (c)		
Stop	50 µl	Ve stejných časových intervalech mezi jamkami jako při přidání substrátu přidejte do jamek 0,45M kyselinu sírovou (b,c)
Počkejte 10 minut, aby se zbarvení stabilizovalo. Poté měřte absorbanci při 450 nm. Hodnoty odečítáte od blank vzorku (d).		

a) Vyvarujte se ponechání destičky na slunečním světle během inkubace a během rozvoje zbarvení. Může být použita třepačka mikroELISA destiček.

b) Nikdy nenechejte destičku prázdnou mezi pipetováním reagentů nebo po promytí. Následující reagentie musí být přidána do 3 minut, aby se předešlo vyschnutí destičky – mohlo by poškodit vázané komponenty. Pokud je nezbytné, ponechte destičku naplněnou promývacím roztokem a vyprázdněte ji těsně před přidáním další reagentie. Promývačka musí být nastavena tak, aby promývala destičku jemně. Příliš drastické odsávání by mohlo snížit reaktivitu destičky.

c) Pro pipetování **TMB** substrátu – časový interval při pipetování každého řádku musí být přesně dodržován. Ten samý interval musí být i při pipetování zastavovacího roztoku.

d) Pro bichromatický odečet může být jako druhá vlnová délka použita 690 nm nebo 620 nm.

Variace: Dvoukroková metoda:

PAI-1:Ag měření může být provedeno jako dvoukroková metoda. Kalibrační rozmezí je od 0 do C ng/ml (jako s jedнокrokovou metodou). **STD** je rozpuštěna s 2 ml **SD FIBRINOLYSIS**. **IC** musí být rozpuštěno s 7,5 ml **CD ELISA**.

Pokud je předpokládaná koncentrace vyšší jak 50 ng/ml, plazma musí být měřena s pětinásobným (1:5) nebo vyšším ředěním v **SD FIBRINOLYSIS**.

Do každé jamky ELISA destičky přidejte 100 µl **SD FIBRINOLYSIS** a ihned poté 100 µl plazmy ředěné 1:5 nebo více (vzorek nebo kontrola).

Následuje inkubace po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě (18-25°C) a promývání. Poté přidejte 200 µl **IC** do každé jamky. Inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě, promyjte a přidejte 200 µl **TMB** do každé jamky.

Tvorbu zbarvení zastavíte po 5 minutách přidáním 50 µl **Stop** do každé jamky. Měřte OD zbarvení při 450 nm.

Veškerou manipulaci, promývání a interpretaci výsledků provádějte stejně jako v jedнокrokové metodě.

KONTROLA KVALITY:

Použití komerčních kontrolních materiálů umožní validaci kalibrační křivky stejně jako homogenity v sérii a mezi sériemi při použití stejné šarže reagentie.

Začleněte kontrolu kvality do každé série testů, dle doporučení pro správnou laboratorní praxi. Kalibrace by měla být provedena pro každou sérii testů, nejméně při změně šarže reagentie, po významné opravě nebo údržbě analyzátoru, nebo když jsou výsledky kontrol kvality mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř si musí definovat vlastní přijatelné rozmezí a verifikovat průběh měření na analytickém systému.

VÝSLEDKY:

- Vykrejte kalibrační křivku s OD 450 nm na ose Y a koncentraci PAI-1 v ng/ml na ose X v "best fit" interpolačním módu (viz leták přiložený k balení).
- Výsledky jsou vypočítány pomocí získané OD450 vzorku a kontrol a odečtené z kalibrační křivky.
- Pro měření PAI-1:Ag koncentrace použijte kalibrační křivku pro danou sérii. Z této kalibrační křivky odečtete koncentraci PAI-1:Ag vzorku – výsledky musí být násobeny použitým ředícím faktorem (tedy 5, 10, 20, atd., viz leták přiložený k balení).
- Pro **CI PAI-1** a **CII PAI-1** naměřené koncentrace musí být násobeny 5ti.
- Pro výpočet výsledků může být použit specifický software (např.: Dynex, Biolise, atd.).
- Výsledky by měly být interpretovány podle klinického a biologického stavu pacienta.

OMEZENÍ:

- K zajištění optimálního výkonu testu a splnění specifikací je nutné se řídit technickými instrukcemi ověřenými společností HYPHEN BioMed.
- Jakékoliv reagentie vykazující neobvyklé příznaky nebo známky kontaminace nesmí být použity.
- Jakékoliv podezřelé vzorky nebo ty, které vykazují známky aktivace, nesmí být použity.
- Pokud neproběhně správně promývání, negativní kontrola může vykazovat vyšší hodnoty absorbance. Abyste se vyhnuli nespecifickému vývoji barvy, zkontrolujte promývání destičky.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

- Normální rozmezí pro koncentraci PAI-1:Ag naměřené s ZYMUTEST™ PAI-1 Ag je od 1 do 25 ng/ml. (Pozn.: v absence referenčního materiálu pro PAI-1:Ag měření ke důležitá heterogenita PAI-1 koncentrací měřených s jinými komerčními metodami. Normální rozmezí musí být zváženo dle použitého přístroje (6)).
- PAI-1 se zvyšuje s věkem a metabolismem lipidů, hlavně s koncentrací triglyceridů.
- PAI-1 má denní variance, kdy nejvyšší koncentrace byla naměřena ráno.
- Koncentrace PAI-1:Ag je zvýšená během těhotenství.

CHARAKTERISTIKA:

- Tato metoda je založena na monoklonální protilátce a má homogenní reaktivitu na různé variance PAI-1 – latentní, aktivní, navázané na vitronektin, v komplexu s tPA nebo uPA a inaktivní.
- Detekční hranice je ≤0.5 ng/ml.
- Intra-assay: 3-8%.
- Inter-assay: 5-10%.
- Nebyla zaznamenána žádná závažná interference Heparinu do 2 IU/ml.

REFERENCE:

1. Declerck P.J. et al. Measurement of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked-immunosorbent assay. Blood. 1998..
2. Loskutoff D.J. and Samad F. The adipocyte and hemostatic balance in obesity. Studies on PAI-1. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1998.
3. Fujii S. PAI-1 in Thrombosis and Arteriosclerosis. Fibrinolysis and Proteolysis. 1997.
4. De Maat MPM et al. 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.
5. Smith F.B. et al. Tissue-Plasminogen-Activator, Plasminogen Activator Inhibitor and risk of peripheral arterial disease. Arteriosclerosis, 1995.
6. Declerck PJ et al., Multicenter evaluation of commercially available methods for the immunological determination of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Thromb. Haemost. 1993.
7. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
8. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

SYMBOLY:

Použité symboly a značky uvedené v normě ISO 15223-1 viz dokument definic symbolů.

CD ELISA **SD FIBRINOLYSIS** **WS ELISA** H317: Může způsobit alergickou kožní reakci.

Změny ve srovnání s předchozí verzí.