

ZYMUTEST™ PAI-1 Antigen



REF RK012A
96 tests

Dosage quantitatif pour la détection du PAI-1 Antigène par ELISA

Français, dernière révision : 11-2022

UTILISATION:

Le coffret ZYMUTEST™ PAI-1 Antigen est un test ELISA pour le dosage quantitatif du PAI-1 Antigène (Tissu Plasminogène Activator Inhibitor Type I), utilisable sur plasma humain.

RESUME ET EXPLICATION:

Technique :

Le PAI-1 est une glycoprotéine composée d'une seule chaîne protéique, synthétisée 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 ou circule comme complexe inactif avec tPA ou uPA.

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.

Clinique :

Le PAI-1 :Ag 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, thromboses artérielles, ...).

Dosage du PAI-1:Ag dans des études cliniques.

Mesure du PAI-1 en tant que facteur de risque cardiovasculaire.

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. Lorsque la réaction est arrêtée avec l'acide sulfurique, une couleur jaune est obtenue. Cette coloration est directement proportionnelle au taux de PAI-1:Ag humain présent dans l'échantillon testé.

REACTIFS:

- COAT** Microplaque ELISA : [12x8] contenant 12 barrettes de 8 puits, coatées avec un anticorps monoclonal spécifique du PAI-1 :Ag humain, puis stabilisées emballées dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
- SD FIBRINOLYSIS** Diluant échantillon : 2 flacons de 50 mL, prêt à l'emploi. Contient du Proclin et de la BSA.
- STD** Standard PAI-1: 3 flacons de 2 mL de Standard PAI-1, lyophilisés. Contient du plasma humain et BSA.
- CI PAI-1** Contrôle Plasma PAI-1 I haut : 1 flacon de 1 mL, lyophilisé. Contient du plasma humain et du PAI-1 humain.
- CII PAI-1** Contrôle Plasma PAI-1 II bas : 1 flacon de 1 mL, lyophilisé. Contient du plasma humain et du PAI-1 humain.
- IC** Immunoconjugué (Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugué) : 3 flacons de 4 mL d'anticorps monoclonal de souris, spécifique du PAI-1:Ag et couplé à l'HRP, lyophilisé. Contient de la BSA.
- CD ELISA** Diluant pour immunoconjugué : 1 flacon de 25 mL, prêt à l'emploi. Contient du Proclin et de la BSA.
- WS ELISA** Solution de lavage : 1 flacon de 50 mL, [20x] 20 fois concentrée. Contient du Proclin.
- TMB** 3,3',5,5'-Tetraméthylbenzidine : 1 flacon de 25 mL, prêt à l'emploi. Contient de l'eau oxygénée.
- Stop** Acide sulfurique 0,45M : 1 flacon de 6 mL, prêt à l'emploi.

Les concentrations du standard et des contrôles peuvent légèrement varier de lot à lot. Pour le dosage, se référer aux valeurs exactes fournies sur le papillon du coffret utilisé.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-VHC, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

Laisser stabiliser les barrettes et réactifs pour le dosage au moins 30 min à température ambiante avant utilisation. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

COAT Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage. Les barrettes doivent être utilisées dans les 30 minutes.

Reconstituer chaque flacon avec exactement :

STD → 2 mL de **SD FIBRINOLYSIS** afin d'obtenir une solution contenant environ 10 ng/mL de PAI-1:Ag. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

CI PAI-1 → 1 mL d'eau distillée. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

CII PAI-1 → 1 mL d'eau distillée. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

IC → 4 mL de **CD ELISA** au moins 15 minutes avant utilisation. Agiter délicatement jusqu'à dissolution complète.

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

Réactif prêt à l'emploi.

WS ELISA 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).

Incuber, si nécessaire, le flacon dans un bain-marie à 37°C jusqu'à dissolution totale des cristaux.

Si le substrat **TMB** devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

COAT Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à 4 semaines à 2-8°C dans leur emballage d'origine en aluminium (hermétiquement refermé, en présence du déshydratant) placé dans le sachet en plastique pour microplaque fourni (minigrip) à l'abri de l'humidité.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

STD → 8 heures à température ambiante (18-25°C).

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

→ 24 heures à 2-8°C.

8 heures à température ambiante (18-25°C).

2 mois congelé à -20°C ou moins*

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

IC → 4 semaines à 2-8°C.

24 heures à température ambiante (18-25°C).

La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

SD FIBRINOLYSIS

→ 4 semaines à 2-8°C.

WS ELISA → 4 semaines à 2-8°C.

7 jours à 2-8°C pour la solution diluée.

Stop **CD ELISA** **TMB**

→ 8 semaines à 2-8°C.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée.

Matériels:

- 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.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0.109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé. L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur EDTA est possible.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI GP44-A47 (et CLSI H21-A59) pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{7,8}.

PROCEDURE:

Méthode de dosage en 1 temps :

1. Les échantillons et les contrôles sont dilués dans du tampon **[SD FIBRINOLYSIS]** comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Dilution
Contrôles	1/5
Echantillons	1/5

Pour des concentrations de PAI-1:Ag > 50 ng/mL, les échantillons peuvent être testés à des dilutions plus élevées, **1/10, ou 1/20, ou plus.**

2. En utilisant le standard **[STD]** avec une concentration en ng/mL de « C », préparer la gamme d'étalonnage selon le tableau ci-dessous :

Concentration de PAI-1 (ng/mL)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de [STD]	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,1 mL	0,05 mL	0 mL
Vol. de [SD FIBRINOLYSIS]	0 mL	0,5 mL	0,75 mL	0,9 mL	0,95 mL	1 mL

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les stables **6 heures** à température ambiante (18-25°C).

3. Placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des micro-barrettes ELISA **[COAT]** et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
[IC]	100 µL	Répartir l' [IC] dans les puits.
[STD] ou [CI PAI-1] ou [CII PAI-1] ou échantillons à tester ou [SD FIBRINOLYSIS] (blanc)	100 µL	Introduire immédiatement : [STD] ou [CI PAI-1] ou [CII PAI-1] ou Echantillons à tester ou [SD FIBRINOLYSIS] dans les puits de la plaque
Mélanger délicatement soit manuellement, soit sur un agitateur de microplaques. Incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C) (a)		
[WS ELISA]	300 µL	Effectuer une série de 5 lavages (a)
[TMB]	200 µL	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits. Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément et avec le même intervalle de temps. (b,c)
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température ambiante (18-25°C) (c)		
[Stop]	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,c)
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire l'absorbance obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs (d)		

- (a) 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 microplaque ELISA est possible.
- (b) 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 immobilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque, qui pourrait endommager les protéines immobilisées et réduire la réactivité 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.
- (c) Lors de la distribution du substrat **[TMB]**, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision.
- (d) Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620 nm ou à 690 nm.

Variante : méthode 2 temps :

Le dosage du PAI-1 :Ag 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 **[STD]** doit être repris par **2 mL** de **[SD FIBRINOLYSIS]**. L'**[IC]** doit être reconstitué par **7,5 mL** de **[CD ELISA]**.

Le plasma à tester est analysé dilué **5 fois** en **[SD FIBRINOLYSIS]**, ou davantage si des taux supérieurs à 50 ng/mL sont attendus.

Dans chaque puits de la plaque ELISA, introduire **100µL** de **[SD FIBRINOLYSIS]**, puis immédiatement ensuite **100 µL** de la gamme d'étalonnage (réalisée comme pour la méthode 1 temps) ou **100 µL** de plasma à tester (échantillon ou contrôle) dilué **1/5** (ou plus si nécessaire). Après **1 heure** d'incubation à température du laboratoire (18-25°C) et une étape de lavage, **200 µL** d'**[IC]** par puits sont introduits. 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 **50 µL** de la **[Stop]** 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.

CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie pour chaque série d'essai.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Tracer la droite de calibration en portant en ordonnées la DO à 450 nm et en abscisses la concentration de PAI-1:Ag (ng/mL), en choisissant le mode d'interpolation « best fit » (se reporter au papillon contenu dans le coffret).
- Les résultats sont exprimés à l'aide des DO450 obtenues pour les échantillons et les contrôles en utilisant la courbe de calibration.
- Pour la mesure des taux de PAI-1:Ag, seule la droite de calibration effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée. Sur la courbe obtenue, déduire directement la concentration de PAI-1:Ag dans le plasma testé. Pour obtenir le taux de 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 la papillon).
- Pour les **[CI PAI-1]** et **[CII PAI-1]** la concentration mesurée doit être multipliée par 5.
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Si les étapes de lavage ne sont pas réalisées correctement, cela peut induire un "bruit de fond" élevé et une valeur trop forte du contrôle négatif. Afin d'éviter tout développement de coloration non spécifique, vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué.

VALEURS ATTENDUES:

- La concentration en PAI-1 Ag dans les plasmas normaux, mesurée avec le coffret Zymustest 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.

PERFORMANCES:

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

SYMBOLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

[CD ELISA] **[SD FIBRINOLYSIS]** **[WS ELISA]** H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

Changements par rapport à la précédente version.