



ZYMUTEST PAI-1 Activity

Réf RK019A

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

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.
NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision: 17/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST PAI-1 Activity est une méthode ELISA, destinée à la mesure de l'activité PAI-1 dans le plasma humain, ou tout autre milieu biologique où le PAI-1 actif est présent. **Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.**

PRINCIPE :

Le plasma dilué ou l'échantillon à tester sont introduits dans les puits d'une plaque ELISA, coatée avec du tPA recombinant et stabilisée. Quant il est présent, le PAI-1 actif réagit avec le tPA immobilisé. Seules les formes actives de PAI-1 sont retenues sur la phase solide. Après une étape de lavages, l'immunoconjugué, anticorps monoclonal de souris spécifique du PAI-1 humain et couplé à la peroxydase, est introduit et réagit avec le PAI-1 immobilisé. Après une étape de lavage, le substrat de la peroxydase, 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine (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 actif présente dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

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

REACTIFS :

1. **COAT : Microplaque ELISA** (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par du tPA recombinant et stabilisée, puis 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. **Cal :** 3 flacons de **calibrateur PAI-1** (PAI-1 Activity Calibrator), lyophilisé. Reconstitué avec 2 ml de F-Sample Diluent, la solution contient une concentration « C » (environ 10 ng/ml) de PAI-1 humain recombinant actif. Le titre du calibrateur 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 actif et l'intervalle de confiance des contrôles sont indiqués sur le papillon fourni dans le Kit.
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 :** 1 flacon de 50 ml de solution de lavage (Wash Solution), 20 fois concentrée.
 9. **TMB :** 1 flacon de substrat : **3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine**, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
 10. **SA :** 1 flacon de 6 ml 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 minigrp 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 Activity Calibrator :** reconstitué par **2 ml** de F-Sample Diluent. Cette solution est stable au moins **8 heures** à température du laboratoire, ou **24 heures à 2-8°C**.
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 (4 & 5) sont stables **8 heures** à température du laboratoire, **24 heures à 2-8°C** ou **2 mois** congelés à **-20°C** ou plus.

Précautions : Les plasmas contrôles 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 **7,5 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.

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.

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) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 4 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 peut être relargué des plaquettes après activation ou lyse. Pour éviter toute surestimation de l'activité PAI-1, les plaquettes doivent être correctement éliminées. L'utilisation de tubes CTAD, prévenant l'activation plaquettaire est alors recommandée. Toutefois le PAI-1 plaquettaire est essentiellement latent ou inactif.

Afin d'éviter toute variation nyctémérale, le PAI-1 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.

Echantillons et contrôles :

Les échantillons doivent être testés dilués 2 fois (1/2) en F-Sample Diluent. Pour des concentrations de PAI-1 > 20 ng/ml, le plasma ou les échantillons peuvent être testés à des dilutions plus élevées, 1/5, ou 1/10, ou plus.

Les contrôles I et II doivent être testés dilués 2 fois (1/2), en F-Sample Diluent.

Calibration :

En utilisant le standard PAI-1 ayant un taux "C" de PAI-1 activité, indiqué pour chaque lot de réactifs, sur le papillon inclus dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration d'activité PAI-1 (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0 ng/ml
Vol. de PAI-1 Activity Calibrator	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 4 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
Gamme d'étalonnage ou plasma à tester ou diluant échantillon (blanc)	200 µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma à tester ou le diluant échantillon dans les puits de la microplaque ELISA.
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).
Conjugué anti-(h)-PAI-1-HRP (reconstitué avec 7,5 ml de Conjugate Diluent, CD)	200 µl	Introduire l'immunoconjugué anti-(h)-PAI-1-HRP dans les puits de la plaque ELISA.
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). <i>Nota</i> : 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. Bien respecter la température d'incubation (18-25°C). Si la température est trop forte (>25°C) ou trop faible (<18°C), les résultats sont affectés et les DO mesurées à 450 nm sont trop fortes ou trop faibles. En tenir compte pour l'analyse des résultats. De même, si un agitateur de plaques est utilisé, n'agiter qu'au début de chaque étape (dépôt échantillon, dépôt conjugué, solution d'arrêt), pendant 1 à 2 minutes, afin d'obtenir une bonne homogénéité. L'utilisation continue d'un agitateur augmente sensiblement les DO 450 obtenues dans le test.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

RESULTATS :

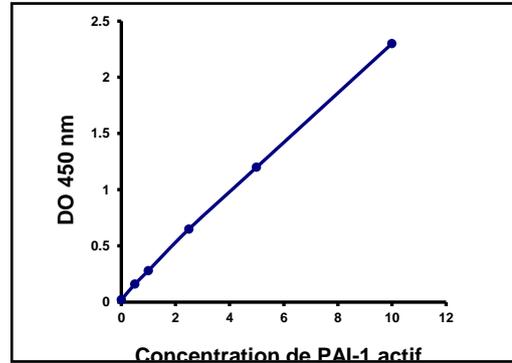
Sur papier millimétré, porter les **taux de PAI-1 actif** sur l'axe des abscisses et les DO correspondantes en ordonnées.

Sur la courbe ainsi obtenue, en déduire directement le taux d'activité PAI-1 de l'échantillon testé. Pour obtenir le taux d'activité PAI-1 dans l'échantillon, la valeur lue sur la courbe de calibration doit être multipliée par le facteur de dilution (ex : 2, 5, 10).

Pour les contrôles I et II, la concentration mesurée doit être multipliée par 2.

Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.



EXEMPLE DE COURBE DE CALIBRATION :

La courbe de calibration ci-dessous est montrée uniquement à titre d'exemple. Les utilisateurs doivent systématiquement tracer la courbe correspondante aux dosages qu'ils ont effectués en utilisant leurs propres solutions standards.

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 forme latente. Le PAI-1 régule la fibrinolyse en inhibant le tPA et l'urokinase.
- Le taux d'activité PAI-1 dans un plasma normal est habituellement faible (< 5 ng/ml). L'essentiel du PAI-1 est sous forme inactive, latente ou complexée au tPA.

CARACTERISTIQUES :

La trousse de dosage utilise le tPA pour fixer le PAI-1 actif et un anticorps monoclonal de souris spécifique du PAI-1 et couplé à la peroxydase, pour la révélation. Cet anticorps n'est pas inhibiteur et reconnaît les complexes tPA-PAI-1. Le dosage mesure de façon spécifique le PAI-1 actif.

Le calibrateur, titré à 10 ng de PAI-1 actif, peut contenir des taux variables de PAI-1:Ag. Le PAI-1 recombinant étant actif à environ 50%, le taux de PAI-1 antigène est environ 2 fois plus élevé.

REFERENCES :

- Declerck P.J., Alessi M.C., Verstreken M., Kruihof 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.

Changement par rapport à la précédente version.