

Návod k použití

ELISA souprava BPI IgG

Kvantitativní /kvalitativní test pro protein zvyšující baktericidní propustnost protilátek IgG

ELISA souprava BPI IgA

Semikvantitativní/kvalitativní test pro protein zvyšující baktericidní propustnost protilátek IgA

Katalogové číslo GD05 & GD11, 96 testů

Pouze pro použití *in vitro*



100108

1. Použití soupravy

Souprava BPI IgG a IgA je rychlá ELISA metoda pro detekci IgG a IgA protilátek proti proteinu zvyšujícímu baktericidní propustnost neutrofilní cytoplazmy (BPI). Souprava je určena pouze pro použití *in vitro*.

2. Popis testu

BPI je složka azurofilních granulí neutrofilů. Jedná se o vysoce kationaktivní, 55 kD cytotoxický protein vázaný na membráně nacházející se pouze v buňkách myeloidní řady. Potentní toxicita BPI je směřována výhradně na gramnegativní bakterie.

Značný počet vzorků séra poskytuje pozitivní c-ANCA nebo p-ANCA barvení metodou nepřímé imunofluorescence, ale jsou negativní při testování na činnost MPO a PR-3 protilátek. Tyto vzorky mohou často vykazovat aktivitu proti BPI. BPI je důležitý antigen u vaskulitidy a může odrážet zapojení gramnegativní bakterie v etiologii tohoto onemocnění. BPI IgG a IgA hladiny jsou zvýšeny při bakteriální infekci plic, jako např. u cystické fibrózy. U těchto pacientů úzce korelují BPI hladiny IgA s plicní funkcí.

3. Princip testu

Zředěné vzorky séra se inkubují s purifikovaným BPI imobilizovaným na mikrotitrační jamce. Po vymytí nenavázaných složek séra jsou do jamky přidány králičí anti-lidské IgG nebo IgA konjugované s křenovou peroxidázou, které se vážou na povrch protilátky vázané na povrchu jamky v průběhu druhé inkubace. Nenavázaný konjugát se odstraní promytím, přidá se roztok obsahující 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) a enzymatický substrát k dohledání specifických protilátek. Reakce končí přidáním stop roztoku, což poskytuje vhodné pH pro zabarvení. Optická hustota standardů, pozitivní kontroly a vzorku se měří pomocí readeru při 450 nm. Optická hustota je přímo úměrná aktivitě protilátek ve vzorku.

4. Materiál obsažený v soupravě

- **Mikrotitrační destička:** 96 jamek, lomitelné stripy (12x8 jamek), potažené purifikovaným BPI, se stojánkem ve fólii s vysoušedlem.
- **Reagencie 1: ředící roztok:** 10mM tris-pufr, pH 7,2 s antimikrobiální agens, 100 ml, modré barvy, připraveno k přímému použití
- **Reagencie 2: promývací roztok:** 100mM tris-pufr s detergentem, pH 7,2, 100 ml, **koncentrovaný** (10x)
- **Reagencie 3: konjugát:** králičí anti-lidské IgG (červené) nebo IgA (žluté) konjugované s křenovou peroxidasou v roztoku stabilizujícím proteiny a s antimikrobiálními agens, 12 ml, připraveno k přímému použití
- **Reagencie 4: TMB Substrát:** vodný roztok TMB a hydrogenperoxidu, 12 ml, připraveno k přímému použití
- **Reagencie 5: stop roztok** 0,25M kyselina sírová, 12 ml, připraveno k přímému použití
- **Standardy: IgG** – 3,1, 6,2, 12,5, 25, 50 & 100 U/ml; **IgA** 0 & 10 U/ml, 1 ml 10 mM tris-pufuru obsahujícího lidské sérum IgG/IgA protilátky proti BPI, připraveno k přímému použití
- **Pozitivní kontrola:** 1 ml 10 mM tris-pufuru obsahující lidské sérové protilátky proti BPI, připraveno k přímému použití (IgG), lyofilizováno (IgA)
- **Návod k použití**

5. Další potřebné vybavení

- Zkumavky na ředění • odměrný válec pro přípravu promývacího pufru • přesné pipety a jednorázové špičky o objemu 10 ul, 100 ul, 1 ml • EIA promývačka mikrotitračních destiček nebo multikanálové pipety nebo promývací láhev • destilovaná nebo deionizovaná voda • savý papír • EIA reader se čtením při 450nm a referenčním filtrem 620nm. Alternativně může být použit vhodný automatizovaný systém.
- Přístrojové vybavení, ať už manuální nebo automatické, by mělo splňovat následující kritéria: pipety s lepší než 3% nepřesností bez mezikroků pipetování; promývačka mikrotitračních destiček by měla odstranit 99%

tekutiny; automaty by měly minimalizovat čas mezi prací a přidáním dalších reagensů.

6. Bezpečnostní a technické opatření

6.1 Bezpečnostní opatření

- Všechny reagensie v tomto kitu jsou určeny pro diagnostiku in vitro.
- Tento test by měl používat pouze zkušený laboratorní personál. Musí být přesně dodrženy postup testu.
- Všechny lidský výchozí materiál používaný při přípravě standard a kontrol pro tento výrobek byl testován a sledován negativní na přítomnost protilátek proti HIV, HbsAg a HCV. Žádná zkušební metoda však může nabídnout kompletní záruku, že infekční agens není přítomna. Proto by měly být se všemi reagensiemi, obsahujícími lidský materiál, zacházeno jako s potenciálně infekčními. Při manipulaci s každým patientským sérem nebo na séru založených produktech by měli pracovníci nosit rukavice a ochranný oděv.
- Reagensie tohoto kitu obsahují antimikrobiální látky a roztok substrátu obsahuje 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Vyhněte se kontaktu s kůží a očima. V případě jakéhokoliv kontaktu okamžitě postižené místo důkladně vypláchněte vodou.
- Stop roztok obsahuje 0,25 M kyselinu sírovou. Vyhněte se kontaktu s kůží a očima. V případě kontaktu okamžitě postižené místo důkladně vypláchněte vodou.
- Jakákoli kapalina, která byla v kontaktu s potenciálně infekčním materiálem, musí být zlikvidována v kontejneru s dezinfekčním prostředkem. Likvidace musí být provedena v souladu s místními předpisy.

6.2 Technická opatření

- Stripy a roztoky by se neměly používat v případě, kdy fólie je poškozená nebo došlo k úniku kapaliny.
- Před použitím nechte všechny reagensie a mikrotitrační destičku vytemperovat na pokojovou teplotu. Ujistěte se, že mikrotitrační fólie obsahující všechny nepoužité proužky je dobře utěsněna a obsahuje vysoušecí prostředek, aby se zabránilo vlhkosti. Po použití uchovávejte při teplotě 2 – 8°C.
- V každém běhu testu použijte pozitivní a negativní kontrolu ke sledování stability činidla a správnému stanovení výsledku.
- Striktně dodržujte uvedené inkubační doby a teploty.
- Při automatizaci zvažte objemy potřebné pro nastavení přístroje a mrtvý objem automatické pipety
- Zajistěte, aby nedošlo ke cross-kontaminaci mezi jamkami. Ukládejte všechny pipety a další

zařízení použité pro enzymový konjugát odděleně od TMB substrátu.

- Při pipetování konjugátu nebo TMB substrátu by měl být zajištěn alikvotní počet jamek pro zamezení vícenásobného vstupu špičky pipety do reagenční láhve. Nikdy nevracejte nepoužité reagensie zpět do původní láhve.
- Nedovolte, aby jamky mezi inkubacemi vyschly.
- Striktně dodržujte popsané promývací kroky. Nedostatečné promytí může způsobit vysokou hodnotu signálu pozadí.
- Během všech inkubačních kroků se vyhněte kontaktu s přímým sluncem a vystavení zdrojům tepla.
- Nezaměňujte barevně kódované uzávěry jednotlivých lahvíček, aby se zabránilo křížové kontaminaci.
- Je důležité se dávkovat všechny vzorky a kontroly do jamek bez prodlevy. Zajistěte proto, aby všechny vzorky byly připraveny k okamžitému použití.

7. Doba použitelnosti a podmínky skladování

Soupravu skladujte po dodání při 2 - 8 °C. Po otevření je souprava stabilní po dobu 3 měsíců (nebo do vypršení doby expirace, pokud je kratší než 3 měsíce). Nepoužívejte soupravy po uplynutí jejich doby expirace. Všechny komponenty chraňte před mrazem. Ředěný promývací pufr (viz technická opatření) má trvanlivost 3 měsíce, pokud je uložen v uzavřené láhvi při teplotě 2 – 8°C.

8. Odběr vzorků a jejich skladování

Vzorky séra nebo plazmy mohou být použity při dlouhodobém skladování při -20°C. Po rozmrazení a před testováním musí být zmrazené vzorky dobře promíchány. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky. Přidání konzervačních látek do vzorku séra může nepříznivě ovlivnit výsledky. Neměly by být používány mikrobiálně kontaminované a tepelně ošetřené vzorky nebo vzorky obsahující částice. Vyhněte se použití hrubě hemolyzovaných, ikterických nebo lipemických vzorků.

9. Příprava reagensů

- Naředte promývací pufr (**Reagensie 2**) 1: 9 v destilované vodě tak, aby bylo vytvořeno dostatečné množství pufru pro analýzu, např. přidejte 50 ml promývacího pufru do 450 ml vody.
- Rozpusťte pozitivní kontroly v 1 ml destilované vody (pouze při stanovení IgA)

10. Postup testu

1. Naředte vzorky patientského séra 1:50 ředicím roztokem (např. 20 ul séra + 1ml ředicího roztoku).
2. Připravte potřebný počet stripů pro stanovení.

3. Pro kvantitativní analýzu (pouze IgG) dávkujte 100ul ředícího roztoku jako standardu 0 U/ml. Dávkujte všechny standardy, pozitivní kontrolu a ředěná patientská séra do odpovídajících jamek.

Pro semikvantitativní stanovení (pouze IgA) dávkujte standardy 0 a 10 U/ml, pozitivní kontrolu a zředěné vzorky pacientů.

Pro kvalitativní testy dávkujte pouze standardu 3,1 U/ml (IgG testy), nebo standardu 10 U/ml (IgA testy), pozitivní kontrolu a zředěné vzorky.

4. Inkubujte **60 minut** při pokojové teplotě.

5. Po 60 minutách odsajte obsah jamek a opatrně 3krát promyjte pomocí promývačky nebo manuálně (viz níže). Opatrné promývání je klíčem ke správným výsledkům. **Nenechte jamky vyschnout.**

Postup při manuálním promývání:

Vyprázdněte jamky převrácením. Použitím multikanálové pipety nebo promývací láhve naplňte jamky promývacím roztokem. Vyprázdněte převrácením na filtrační papír. Opakujte tento postup promytí ještě 2krát.

6. Do každé jamky dávkujte 100ul konjugátu (**Reagencie 3**). Inkubujte jamky po dobu **30 minut** při pokojové teplotě.

7. Po 30 minutách odstraňte obsah jamek a opatrně 4krát promyjte promývacím puřem. Ujistěte se, že jamky jsou prázdne, ale nenechte je vyschnout.

8. Do každé jamky přidejte pomocí dávkovače 100ul TMB substrátu (**Reagencie 4**). Inkubujte desku po dobu **10 minut**.

9. Do každé jamky přidejte 100ul Stop roztoku (**Reagencie 5**). Chcete-li dodržet stejné doby reakce, měl by být Stop roztok přidán do jamek ve stejném pořadí jako TMB substrát.

10. Do 10 minut odečtěte optické hustoty (OD) každé jamky při 450nm pomocí readeru. Jako referenční vlnovou délku použijte filtr 620nm.

11. Kontrola kvality

Očekávané hodnoty OD a přijatelné rozsahy standardů a pozitivních kontrol jsou uvedeny v certifikátu, který je součástí soupravy.

Kontrola je určena pro monitorování výrazného selhání reagensů.

Jakákoliv jamka pozitivní při čtení spektrofotometrem, ale bez viditelného zbarvení, by měla být očištěna a odečtena opakovaně. Pokud

jsou pozorovány hodnoty OD nižší než nula, ověřte vlnovou délku, znova nastavte blank a opakujte měření.

12. Interpretace výsledků

Kvantitativní výsledky (IgG)

Naneste hodnotu OD každé standardy oproti její koncentraci a zakreslete nejlépe pasující křivku mezi body. Odečtěte z křivky neznámé. Hodnoty okolo 4 U/ml jsou podstatně zvýšené.

Semi-quantitativní výsledky (IgA)

Naneste hodnotu OD standard 0 a 10 U/ml oproti jejich odpovídající koncentraci a zakreslete mezi jednotlivými body přímku. Odečtěte z této přímky neznámé. Vzorky s OD vyšší než 10 U/ml jsou pozitivní na anti-BPI IgA.

Kvalitativní výsledky

IgG – vzorky s OD vyšší než 3,1 U/ml jsou pozitivní na anti-BPI IgG.

IgA – vzorky s OD vyšší než 10 U/ml jsou pozitivní na anti-BPI IgA.

13. Limitace testu

Výsledky ELISA testu BPI IgA a IgG by měly být použity ve spojení s dalšími výsledky testů a v návaznosti na klinický stav.

14. Opakovatelnost

Variační koeficient v rámci jednoho stanovení: < 12%

Variační koeficient mezi jednotlivými stanoveními: < 12%

Shrnutí postupu testu

- Nařeďte séra 1:50 ředícím roztokem (**Reagencie 1**)
- Dávkujte standardy, pozitivní kontrolu a ředěný vzorek do odpovídajících jamek mikrotitrační destičky
- Inkubujte **60 minut** při pokojové teplotě
- 3x promyjte jamky
- Přidejte do každé jamky 100 ul konjugátu (**Reagencie 3**)
- Inkubujte **30 minut** při pokojové teplotě
- 4x promyjte jamky
- Do každé jamky přidejte 100ul TMB substrátu (**Reagencie 4**)
- Inkubujte **10 minut** při pokojové teplotě
- Do každé jamky přidejte 100 ul stop roztoku (**Reagencie 5**)
- Odečtěte optické hustoty při 450nm nebo při 450/620nm

Literatura:

- Zhao, M H, et al Clin Exp Immunol 1995; 99, 49-56
Zhao, M H, et al Qtrly J Medicine 1996; 89,259-265
Stoffel M P, et al Clin Exp Immunol 1996; 104, 54-59
Weiss, J et al, Blood 1987; 69,652-659
Savage, C O S et al, Lancet 1987 I:1389-1393
Ooi, C I et al, J Exp Med 1991; 174, 649-655
Jeanette J C et al, Arthritis Rheum 1994, 37, 187-192
Guillevin F., et al J Rheumatol 1993, 20(8) 1345-1349
Ronda N, et al Clin Exp Immunol 1994, 95 49-55
Mulder A H, et al Arthritis Rheumatol 1993,36(8) 1054-1060
Wiik, A et al, Manual of Biological Markers of Disease 1993; A9: 1-14
Mulder A H, et al Clin Exp Immunol 1994, 95(3) 490-497
Broekroelofs J, et al. Dig Dis Sci 1994, 39(3) 545-549
Pokorny C S, et al J Gastroenterol Hepatol 1994, 9(1) 40-44
Robinson A J, *Nephro Dial Transplant* 1994 9, 119-126
Gross W L, et al *Clin Exp Immunol* 1993, 93 (Suppl 1) 7 - 11
Sediva A. et al (1996) Sarcoidosis Vasculitis and diffuse lung diseases. (7th International ANCA Workshop) 13,(3) 275

16. Kontakty:

Výrobce:

Genesis Diagnostics Ltd.

Eden Research Park, Henry Crabb Road, Littleport,
Cambridgeshire, CB61SE, UK
T: +44 0135 3862220, F:+44 0135 3863330

Distributor:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 532/78b, 612 00 Brno, CZ
T: +420 541243113, F: +420 541243114
E: laboserv@laboserv.cz, objednavky@laboserv.cz
<http://www.laboserv.cz>