

CPA IgM

ELISA test na kvantitativní stanovení IgM protilátek
proti citrulinovanému proteinu

Katalogové číslo GD120 (96 testů)

Reagenty této soupravy jsou určeny pouze pro výzkumné účely.

020304

1. Úvod

CPA kit je ELISA test, který je určen pro detekci IgM protilátek proti citrulinovanému krysímu filagrinu. Komponenty kitu jsou určeny pouze pro výzkumné účely.

2. Význam testu

Rheumatoidní artritida (RA) je primárně diagnostikována na základě klinických příznaků, přičemž serologický průkaz byl v poslední době omezen pouze na určení rheumatoidního faktoru. Avšak tyto protilátky se vyskytují u spousty zánětlivých onemocnění i u zdravých starších jedinců.

V poslední době byla identifikována nová autoprotilátka, která je téměř 100 % specifická pro RA (1,2). Antigenní determinantou, kterou rozpoznávají s RA asociované protilátky je protein obsahující modifikovanou formu argininu zvanou citrulin (1,2). Enzym zodpovědný za citrulinaci se nazývá peptidylarginin deimináza (3). V současnosti je v savčích buňkách známo pouze několik citrulinovaných proteinů, včetně základních myelinových proteinů, filagrinu a trychohyalinu. Poslední dobou se však ukazuje, že velmi pravděpodobně existuje mnohem více citrulinovaných proteinů, např. v synoviu (4). Jednou z možností je, že některé proteiny mohou být citrulinovány za patologických podmínek, jako je to v případě fibrinu v synoviu (4).

3. Princip testu

Naředěné sérum je inkubováno s rekombinantním citrulinovaným proteinem fixovaným v jamkách mikrotitrační destičky. Poté co se promytím odstraní nenavázané složky, přidají se do jamek králičí protilátky proti lidským imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidázou a tyto se naváží na již navázané protilátky proti citrulinovanému proteinu ve druhé inkubaci. Nenavázaný konjugát se odstraní promytím a přidá se roztok obsahující 3,3',5,5'- tetramethylbenzidin (TMB) a enzymový substrát k vysledování vazby specifických protilátek. Přidání Stop roztoku zastaví reakci a vytvoří vhodné pH pro vývoj barevné změny. Optická densita standardů, kontrol a vzorků je měřena pomocí readeru při 450 nm. Optická densita je přímo úměrná koncentraci protilátek proti citrulinovanému proteinu ve vzorku.

4. Materiál obsažený v soupravě

- **Mikrotitrační destička:** (96 jamek): 12 x 8 lomitelných stripů, jamky jsou předem potaženy rekombinantním citrulinovaným proteinem, s držákem v alobalovém sáčku s desikantem.

- **Reagencie 1: Ředící roztok pro vzorky** – 150mM Tris pufr , pH 7,2 , s antimikrobní složkou, 15 ml, (modrý), koncentrovaný (15x)
- **Reagencie 2: Promývací pufr** - 150mM Tris pufr s detergentem, pH 7,2, 75ml, koncentrovaný (15x)
- **Reagencie 3: Konjugát** - králičí protilátky proti lidským IgM protilátkám konjugované s křenovou peroxidázou v roztoku stabilizujícím proteiny, s antimikrobní složkou, 12ml, (červený), k přímému použití
- **Reagencie 4: TMB substrát** - vodný roztok TMB a hydrogen peroxidu, 12ml, k přímému použití
- **Reagencie 5: Stop roztok** - 0,25M kyselina sírová, 12ml, k přímému použití
- **Standardy:** 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 U/ml, 1ml 10mM Tris pufr obsahující sérové lidské IgM protilátky proti citrulinovanému proteinu, k přímému použití
- **Pozitivní kontrola:** 1ml 10mM Tris pufr obsahující sérové lidské IgM protilátky proti citrulinovanému proteinu, k přímému použití
- **Negativní kontrola:** 1 ml 10mM Tris pufr obsahující normální lidské sérum, k přímému použití
- **Návod k použití**

5. Ostatní potřebné vybavení:

1. Zkumavky na ředění vzorků , odměrný válec pro přípravu promývacího pufru, přesné pipety a dostatek špiček pro objemy 10 µl, 100 µl, 1 µl., EIA promývačka mikrotitračních destiček nebo multikanálová pipeta nebo promývací láhev, destilovaná nebo deionizovaná voda, savý papír, EIA reader s filtrem 450 nm a případně 620 nm. Případně lze použít vhodný automatický systém.
2. vybavení nástroji, ať už při manuální práci nebo při použití automatického systému, by mělo vyhovovat následujícím kritériím: pipety s min. 3% přesností, promývačka by měla odstranit 99% tekutin, automat by měl minimalizovat čas mezi promýváním a přidáním dalších reagentů.

6. Opatření**6.1 Bezpečnostní opatření**

1. Všechny reagencie v tomto kitu jsou určeny pouze k výzkumu.
2. S testem by měl pracovat pouze zkušený laboratorní personál. Postup testu musí být přesně dodržen.
3. Všechny původem lidské materiály použité pro přípravu standardů a kontrol byly testovány a zjištěny negativní na přítomnost protilátek proti HIV, HbsAg a HCV. Avšak žádný test nemůže poskytnout naprostou jistotu, že tato infekční agens přítomna

nejdou. Proto všechny reagenty obsahující lidské sérum jsou potenciálně infekční a tedy se tak s nimi musí zacházet. Obsluha by měla používat rukavice a ochranný oděv vždy, když zachází se sérem pacientů a s produkty na bázi séra.

4. Reagenty v tomto kitu obsahují antimikrobní přísadu a roztok TMB/substrát obsahuje 3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. V případě kontaktu ihned opláchněte postižené místo velkým množstvím vody.
5. Stop roztok obsahuje 0,25M kys. sírovou. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. V případě kontaktu ihned opláchněte postižené místo velkým množstvím vody.
6. Všechny tekutiny, které přišly do kontaktu s potenciálně infekčním materiálem musejí být uloženy v nádobě s desinfekčním roztokem a jejich odstranění se řídí podle platné legislativy.

6.2 Technická opatření

1. Stripy a roztoky by se neměly používat, je-li plastový sáček poškozen nebo jsou-li tekutiny vytekly.
2. Před použitím nechte reagenty a mikrotitrační destičku vytemperovat na pokojovou teplotu. Nepoužité stripy musí být skladovány v plastovém sáčku s desikantem, který zabraňuje zvlhnutí a to při teplotě 2-8°C.
3. Ředící roztok vzorků je 15x koncentrovaný a obsahuje 0,09% azid sodný jako konzervans. Připravte si pracovní koncentraci ředidla v množství dostačujícím pro vyšetření. Pokud skladujete pracovní koncentraci ředidla déle než 1 týden, přidejte azid sodný (0,9 g/l). Nepoužitý koncentrát ředidla i pracovní koncentraci ředidla skladujte při 2-8°C.
4. Positivní a negativní kontrolu začleňte do testu pro kontrolu stability reagentů a správného provedení testu pokaždé, když test provádíte.
5. Přísně dodržujte doporučenou teplotu a dobu inkubace.
6. Pokud pracujete s automatickým systémem, vezměte v úvahu nadbytek objemu potřebný k nastavení přístroje a mrtvý objem v hadičkách.
7. Zabraňte křížové kontaminaci mezi jamkami. Udržujte všechny pipety a ostatní vybavení používané pro konjugát úplně oddělené od TMB / substrátu.
8. Při dávkování konjugátu nebo TMB substrátu pipetou by mělo být nabráno takové množství reagentu, aby nebylo nutno špičku pipety opakovaně nořit do ampule s reagentem. Nepoužité reagenty nikdy nelijte zpět do originálních lahviček.
9. Nenechte jamky mikrotitrační destičky mezi inkubacemi vyschnout.
10. Přesně dodržujte popsaný postup promývání. Nesprávně provedené promytí může silně ovlivnit získané výsledky.
11. Zabraňte působení přímého slunečního záření na destičku a jejímu vystavení zdrojům tepla během inkubace.
12. Barevně kódované uzávěry vraťte na správné lahvičky, aby nedošlo ke zkrřížené kontaminaci.

13. Je důležité dávkovat všechny vzorky a kontroly do jamek bez prodlevy. Proto se před započítáním práce ujistěte, že všechny reagenty jsou připraveny k okamžitému použití. Zajistěte, aby byly všechny vzorky připraveny k pipetování.

7. Životnost soupravy a skladovací podmínky

Skladujte soupravu při 2-8°C. Jednou otevřená souprava je stabilní po dobu 3 měsíců (nebo do data expirace, je-li kratší než 3 měsíce). Nepoužívejte soupravu po uplynutí expirační doby. Nezmrazujte soupravu ani její komponenty. Ředěný promývací roztok a ředící roztok pro vzorky (viz. technická opatření) mají životnost 3 měsíce, pokud jsou skladovány v uzavřené láhvi při 2-8 °C.

8. Odběr vzorků a uchovávání

Jako vzorek může být použito krevní sérum nebo plazma, které by měly být při dlouhodobém skladování uchovávány při -20°C. Zmrazené vzorky musí být před testem po roztátí dobře promíchány. Opakované zmrazování a rozmrazování může poškodit výsledky. Mikrobiálně kontaminované, tepelně ošetřené vzorky nebo vzorky obsahující pevné částice by neměly být použity. Vzorky ikterické, lipemické nebo silně hemolyzované by rovněž neměly být použity.

9. Příprava reagentů

1. Ředte ředící roztok pro vzorky (**reagent 1**) 1:14 s destilovanou vodou. Vytvořte dostatečné množství ředícího roztoku pro provedení testu.
2. Ředte promývací roztok (**reagent 2**) 1:14 s destilovanou vodou. Připravte dostatečné množství promývacího roztoku pro provedení testu.

10. Pracovní postup

1. Nařeďte vzorky 1:100 v naředěném ředícím roztoku vzorků (10 µl séra plus 1 ml ředícího roztoku)
2. Připravte počet stripů potřebný pro provedení testu.
3. Napipetujte 100 µl každého standardu, negativních a pozitivních kontrol a ředěných vzorků do příslušných jamek.
4. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě.
5. Po 30 minutách slijte nebo odsajte obsah jamek a promyjte jamky třikrát za použití automatického systému promývání nebo ručním promýváním (viz. postup při ručním promývání) Pečlivé promývání je klíčem k dosažení správných výsledků.

Nenechte jamky vyschnout !

Postup při ručním promývání

Vyprázdněte jamky otočením destičky. Použijte multikanálovou pipetu nebo promývací láhev, naplňte jamky promývacím roztokem. Vyprázdněte jamky otočením destičky a vysajte obsah jamky savým papírem. Tento promývací postup zopakujte ještě dvakrát.

6. Napipetujte 100 µl konjugátu (**reagent 3**) do každé jamky. Nechejte inkubovat 30 minut při pokojové teplotě.
7. Po 30 minutách, odstraňte obsah jamek a pečlivě promyjte jamky čtyřikrát promývacím roztokem. Zajistěte, aby jamky byly prázdné, ale nenechte je vyschnout.

8. Napipetujte 100 µl TMB/substrátu (**reagencie 4**) do každé jamky. Nechejte inkubovat destičku po dobu **10** minut.
9. Přidejte 100 µl Stop roztoku (**reagencie 5**) do každé jamky. K zachování stejnoměrného reakčního času, přidávejte Stop roztok do jamek ve stejném pořadí jako u TMB/substrátu.
10. Odečtěte optickou densitu (OD) každé jamky při 450 nm do uplynutí 10 minut. Filtr 620 nm může být použit jako referenční vlnová délka.

11. Kontrola kvality

Data kontroly kvality soupravy pro příslušnou výrobní šarži, jsou uvedena na certifikátu, který je přiložen k soupravě.

Účelem zařazení pozitivní kontroly do stanovení je sledování, zda nedošlo k vážnému selhání reagentů.

Každá jamka, která je podle spektrofotometru pozitivní, ale nemá viditelné zbarvení, by se měla z rubu vyčistit, a měla by být znovu změřena. Pokud by byly zjištěny hodnoty nižší než nula, měly by být zkontrolovány použité vlnové délky, reader by měl být znovu nastaven na základní hodnoty a měření by se mělo zopakovat.

12. Interpretace výsledků

Kvantitativní výsledky

Vyneste do grafu hodnotu optické density každého standardu proti jeho koncentraci a sestrojte kalibrační křivku. Z této křivky zjistíte hodnoty neznámých vzorků. Podle vlastních dat je koncentrace anti-citrulinových IgM protilátek vyšší než 15 U/ml charakteristická pro RA. Vzorky s hodnotami mezi 13-15 U/ml jsou dubiozní. U vzorků s hodnotami vyššími než 100 U/ml by měl být test zopakován s použitím většího ředění např. 1:600.

13. Limitace procedury

Kit je použitelný pouze pro výzkumné účely.

14. Reprodukovatelnost

	nepřesnost
Intra assay	méně než 7%
Inter assay	méně než 12%

Shrnutí postupu

- Nařed'te séra 1:100 pomocí ředícího roztoku pro vzorky (**Reagencie 1**).
- Dávkujte 100 µl Standardů, pozitivní a negativní kontroly a ředěných vzorků do jamek.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30** minut.
- *Promyjte třikrát.*
- Umístěte 100 µl konjugátu (**Reagencie 3**) do každé jamky.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30** minut.
- *Promyjte čtyřikrát.*
- Přidejte 100 µl TMB substrátu (**Reagencie 4**) do každé jamky.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **10** minut.
- Přidejte 100 µl Stop roztoku (**Reagencie 5**) do každé jamky.
- Změřte optickou densitu při 450 nm, nebo při 450/620 nm.

15. Literatura

1. Schellekens, GA et al: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998, 101:23-281
2. Schellekens, GA et al: The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognising a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 155-163
3. Tarcsa, E et al: Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. *J Biol Chem* 1996, 271: 30709 - 30716
4. Masson-Bessiere et al: Synovial target antigens of antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of fibrin alpha and beta chains. *Rev Rheum* 1999, 66: 754
5. Slack S L, Mannik M and Dale B A. Diagnostic value of antibodies to filaggrin in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 25 (5): 847-851 (1998).
Vincent C., et al: Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by ELISA. A highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis *Arthritis and Rheumatism* Vol 46 Nr 8 2051 – 2058

16. Kontakty:

Výrobce: **Genesis Diagnostics Ltd.**
Eden Research Park, Henry Crabb Road, Littleport, Cambridgeshire, CB6 1SE, United Kingdom
Tel: 01353 862220 Fax: 01353 863330

Distributor: **LABOSERV s.r.o.**
Hudcova 78b, 612 00 Brno
Tel: +420 541 243 113, Fax: +420 541 243 114
e-mail: laboserv@laboserv.cz
<http://www.laboserv.cz>