

Souprava Cardioliplin IgG ELISA (GD26)

Kvantitativní a semi-quantitativní test na kardioliplin IgG, 96 testů

Souprava Cardioliplin IgM ELISA (GD27)

Kvantitativní a semi-quantitativní test na kardioliplin IgM, 96 testů

Souprava Total Anti-Cardioliplin Screen ELISA (GD28)

Kvantitativní a semi-quantitativní test na celkový obsah protilátek proti kardioliplinu, 96 testů

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

2001-10-29

1. Použití

Soupravy Cardioliplin IgG, Cardioliplin IgM a Total Anti-Cardioliplin Screen představují rychlou metodu detekce protilátek vytvořených proti kardioliplinu. Slouží jako podpora při diagnostikování trombotických onemocnění spojených s primárním antifosfolipidovým syndromem (APS), a při diagnostikování APS spojeným s systémovým lupus erythematos (SLE) a s podobnými vředovými onemocněními.

2. Vysvětlení principu testu

APS je nejčastější příčinou získané trombofilie. Pacienti s tímto onemocněním mají často v krvi protilátky vytvořené proti kardioliplinu (aCL) a mají predispozice k žilní a arteriální trombóze, trombocytopenie a, u žen, k opakovaným samovolným potratům. Přestože aCL byly poprvé popsány u pacientů s SLE, netýká se pouze pacientů onemocnělých lupusem, ale vyskytuje se běžně i u pacientů s primární APS.

V porovnání s aCL vyvolaným infekcí, autoimunitní aCL vyžaduje pro optimální vazbu přítomnost dalšího faktoru, kterým je β 2-glykoprotein (β 2-GP1). Proto se připravené antigeny použité v testech aCL ELISA firmy Genesis skládají z pročištěného kardioliplinu v konfiguraci s β 2-GP1. Analýzy, které tento faktor opomíjí, považujeme za testy, které detekují aCL spojené s neautoimunitními onemocněními např.: syfilis, malomocenství a infekční mononukleóza.

3. Princip testu

Rozředěné vzorky krevního séra se v jamkách na mikrotitrační destičce inkubují s imobilizovaným kardioliplinem. Po smytí nenavázaných složek séra se do jamek přidá konjugát králičího, s lidskými antigeny silně reagujícího IgG, IgM, nebo IgAGM konjugovaného v peroxidáze. Ten se během druhé inkubace naváže na protilátky na povrchu jamek. Po inkubaci se nenavázaný konjugát odstraní promytím. Přidá se roztok 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) a enzymatického substrátu. Přidání stop roztoku reakci ukončí a zabezpečí pH potřebné pro vznik zabarvení. Optická hustota standardů, pozitivního kontrolního vzorku, a testovaných vzorků se měří pomocí readeru Elisa při filtru 450 nm. Optická hustota je přímo úměrná aktivitě revmatoidního faktoru ve vzorku.

4. Materiály dodávané v sadě

- **Mikrotitrační destička:** 96 jamek na oddělitelných prouzcích 12 X 8, pokrytých kardioliplinem a β 2-GP1, s držákem, zabalená v plastovém sáčku s vysoušečem.
- **Reagens 1: Roztok pro ředění vzorků:** 62,5 mM; Pufrovací proteinový roztok; pH 7,2; s antimikrobiálním činidlem; obsah 16 ml, (barva modrá), koncentrát (x 6,25).
- **Reagens 2: Promývací puf:** 150mM; pufrovací solný roztok s detergentem; pH 7,2; obsah 75 ml; koncentrát (x15).
- **Reagens 3: Konjugát:** králíci s lidskými antigeny silně reagující IgG (barva červená), IgM (barva zelená) nebo IgAGM (barva hnědá) konjugovaný v peroxidáze v roztoku stabilizujícím proteiny s antimikrobiálním činidlem; obsah 12 ml, připraven k použití.
- **Reagens 4: TMB Substrát** vodný roztok TMB a peroxidu vodíku; obsah 12 ml; připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 5: Stop-roztok** 0,25M kyselina sírová; obsah 12 ml, připraven k okamžitému použití.
- **Standardy:** (viz tabulka) 1 ml 10mM pufrovaného solného roztoku obsahujícího protilátky vytvořené proti kardioliplinu, připraveno k okamžitému použití

kardioliplin IgG GPLU/ml ¹	kardioliplin IgM U/ml ²	kardioliplin celk. U/ml ²
0	0	0
20	8	20
50	25	50
100	50	100
200	100	200

¹ Kalibrováno pomocí „UK Reference Preparation 97/656“ ² absolutní jednotky

- **Standard pro kvalitativní test:** 11 U/ml (pouze pro test celkového množství), obsah 1 ml, 10mM pufrovací solný roztok obsahující protilátky vytvořené proti kardioliplinu připraveno k okamžitému použití
- **Pozitivní kontrolní vzorek:** obsah 1 ml; 10mM pufrovací solný roztok obsahující protilátky vytvořené proti kardioliplinu připraveno k okamžitému použití
- **Návod k použití**

5. Další zařízení potřebné k provedení testu

- zkumavky na roztoky • kalibrovány odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku • přesné pipety a jednorázové špičky pro dávkování 10 μ l, 100 μ l, 1 ml • promývačka mikrotitračních destiček EIA nebo vícekanálová pipeta nebo promývací láhev • destilovaná nebo deionizovaná voda • savý papír • reader EIA s filtrem 450 nm, případně s referenčním filtrem 620 nm

6. Upozornění**6.1 Bezpečnost**

1. Všechny reagenty této soupravy jsou pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
2. Tento test by měl provádět pouze zkušený laboratorní personál. Je nutné striktně dodržovat protokol testu.
3. Veškerý materiál lidského původu použitý pro přípravu standardů a kontrolních vzorků, které jsou součástí tohoto výrobku byl otestován na obsah protilátek proti HIV, HbsAg a HCV, a byl shledán negativní. Žádná testovací metoda však nemůže poskytnout úplnou jistotu, že v materiálu není přítomen infekční agens. Proto by se mělo s veškerými reagenty obsahujícími materiál lidského původu zacházet jako s materiály potenciálně infekčními. Pracovníci by měli mít při práci se sérem pacienta, nebo s produkty ze séra vyrobenými, rukavice a ochranný oděv.
4. Reagenty této sady obsahují antimikrobiální látky a roztok substrátu obsahuje 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Zabraňte kontaktu s pokožkou a očima. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
5. Stop-roztok obsahuje 0,25molární kyselinu sírovou. Zabraňte kontaktu s pokožkou nebo jeho vniknutí do očí. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
6. Jakákoli kapalina, která přijde do kontaktu s potenciálně infekčním materiálem, musí být zlikvidována v kontejneru s dezinfekčním prostředkem. Likvidace musí být provedena v souladu s místní legislativou.

6.2 Technické poznámky

1. Proužky (stripy) a roztoky by se neměly používat pokud jsou sáčky, ve kterých byly uloženy, porušeny, anebo pokud prosakují.
2. Před použitím nechejte všechny reagenty a mikrotitrační destičku zahřát na pokojovou teplotu. Zabezpečte, aby byl plastový sáček obsahující nepoužité proužky mikrotitrační destičky dobře uzavřen, a aby v něm bylo vloženo vysoušedlo. Skladujte je při teplotě 2 – 8 °C.
3. Při každém testu použijte i pozitivní a negativní kontrolní vzorky, abyste mohli monitorovat stabilitu reagentů a správné provedení testu.
4. Přesně dodržujte uvedené doby a teploty inkubace.
5. Zajistěte, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi jamkami. Všechny pipety a další zařízení použité pro enzymatický konjugát ukládejte zcela odděleně od reagentu substrátu.
6. 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. Nepoužitý reagens nikdy nevracujte zpět do původních nádob.
7. Mezi inkubačními kroky nenechávejte mikrotitrační jamky vyschnout.
8. Přesně dodržujte popsany promývací postup. Nedostatečné promytí může způsobit silný falešný signál.
9. Během všech inkubačních kroků zabraňte osvětlení destičky přímým slunečním světlem nebo jejím vystavení zdroji tepla.
10. Barevné uzávěry nasadte zpět na správné ampule. Zabráňte tím křížovou kontaminaci.
11. Je důležité dávkovat do jamek všechny vzorky pacienta i všechny kontrolní vzorky bez prodlevy. Proto se před započítáním práce ujistěte, že všechny reagenty jsou připraveny k okamžitému použití.

7. Trvanlivost a skladovací podmínky

Po převzetí soupravu skladujte při teplotě 2 – 8 °C. Po otevření jsou látky soupravy stabilní po dobu tří měsíců (nebo do konce expirační doby, pokud je tato kratší než tři měsíce). Nepoužívejte soupravy s prošlou lhůtou expirace. Žádnou část soupravy nezmrazujte. Zředěný promývací roztok uložený v uzavřené láhvi při teplotě 2 - 8 °C má trvanlivost 3 měsíce.

8. Odběr a skladování vzorků

Při dlouhodobém používání a skladování by vzorky séra měly být uloženy při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se vzorky musí před testem dobře rozmíchat. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testu. Nepříznivý vliv na výsledky může mít i přidání konzervačních látek. Neměly by se používat vzorky mikrobiálně kontaminované, tepelně ošetřené nebo vzorky obsahující pevné částice. Vyhněte se používání silně hemolyzovaných nebo lipemických vzorků.

9. Příprava reagentů

- Rozředte roztok pro ředění vzorků (**Reagens 1**) destilovanou vodou na objem 100 ml.
- Rozředte promývací roztok (**Reagens 2**) v poměru 1:14 destilovanou vodou, abyste měli dost pufru pro provedení celého testu.
- Rozředte vzorky odebrané pacientovi v poměru 1:100 naředěným roztokem pro ředění vzorků (např.: 10 µl séra plus 1ml roztoku).

10. Pracovní postup

- Vyberte počet proužků potřebný pro test.
- Pro kvantitativní rozbor dávkujte 100 µl každého standardu, pozitivního kontrolního vzorku a rozředěného vzorku pacienta do příslušných jamek.
Pro semi-kvalitativní rozbor IgG, dávkujte jen Standard 20 U/ml, pozitivní kontrolní vzorek a vzorek pacienta.
Pro kvalitativní rozbor, dávkujte Standard 8 U/ml pro rozbor IgM, nebo Standard 11 U/ml pro rozbor celkového množství, a pozitivní kontrolní vzorek a vzorek pacienta.
- Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek a třikrát je promyjte v automatické promývače mikrotitračních destiček nebo ručním promytím (viz níže). Pečlivé promytí je klíčem k dobrým výsledkům. Před dalším krokem osušte jamky savým papírem. **Nenechávejte jamky vyschnout.**

Postup pro ruční promývání:

Jamky vyprázdněte tak, že destičku obrátíte. Pomocí vícenásobné pipety nebo promývací láhve jamky naplňte promývacím pufrem. Opět jamky vyprázdněte obrácením destičky, a osušte je savým papírem. Tento proces opakujte ještě dvakrát.

- Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**). Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek, a pečlivě je čtyřikrát promyjte promývacím pufrem. Oklepejte destičku na savý papír, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.
- Pomocí složené dávkovací pipety rychle do každé jamky dávkujte 100 µl TMB Substrátu (**Reagens 4**). Inkubujte destičku po dobu **15 minut**.
- Do každé jamky přidejte 100 µl Stop-roztoku (**Reagens 5**). Aby byly dodrženy stejné doby reakce, měl by být stop-roztok dávkován do jamek ve stejném sledu jako do nich byl dávkován TMB substrát.
- Do limitu 10 minut odečtěte optickou hustotu (OD) každé jamky readerem s filtrem 450 nm. Jako referenční prostředek lze použít i filtr 620 nm.

11. Zabezpečení kvality

Data pro zabezpečení kvality jsou uvedena na certifikátu šarže, který je přiložen k sadě. Účelem pozitivního kontrolního vzorku je sledování, zda nedošlo k vážnému selhání reagentů.

Každá jamka, která je podle spektrofotometru pozitivní, ale nemá viditelné zabarvení, 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**

Pomocí souřadného systému vyneste do grafu hodnoty optické hustoty každého ze standardů ve vztahu k jejich koncentraci a spojte je křivkou. Z této křivky zjistíte hodnoty neznámých.

Následující tabulka je založena na interních studiích skupin nemocných i zdravých pacientů.

rozsah	kardioliipin IgG (GPLU/ml)	kardioliipin IgM (U/ml) ²	kardioliipin celk. (U/ml) ³
normální	<8	<8	<11
hraniční	8 – 11	8 – 10	11 – 13
pozitivní	>11	>10	>13

¹ Vzorky s hodnotami vyššími než 200 GPLU/ml (IgG anti-IgG phospholipid units/ml) by měly být testovány znovu s větším ředěním např.: 1:200.

² Vzorky s hodnotami vyššími než 100 U/ml by měly být testovány znovu s větším ředěním např.: 1:200.

³ Vzorky s hodnotami vyššími než 200 U/ml by měly být testovány znovu s větším ředěním např.: 1:200.

Semi-quantitativní výsledky (pouze kardioliipin IgG)

Pro výpočet semikvantitativních výsledků použijte následující vzorec:

$$\frac{\text{OD vzorku} \times 20}{\text{OD Standardu } 20 \text{ U/ml}} = \text{hodnota vzorku v GPLU/ml}$$

Kvalitativní výsledky

Kardioliipin IgM ELISA: Vzorky s vyšší optickou hustotou než Standard 8 U/ml jsou pozitivní

Kardioliipin Total Screen ELISA: Vzorky s optickou hustotou vyšší než Standard 11 U/ml jsou pozitivní.

13. Limity postupu

- Pokud je náleze protilátek vytvořených proti kardioliipinu negativní a současně jsou přítomny klinické příznaky, je indikován lupus anticoagulant nebo by měly proběhnout další testy.
- Diagnózu nelze stanovit pouze na základě přítomnosti protilátek vytvořených proti kardioliipinu. Výsledky musí být interpretovány v souvislosti s klinickými nálezy.

14. Charakteristiky testu

	citlivost rozboru	CV% v rámci sady	CV% mezi sadami
IgG	0.6 GPLU/ml	5	12
IgM	0.2 U/ml	3.5	7
celkem	1.9 U/ml	5	9

Klinické vyhodnocení

	ACA-IgG	ACA-IgM
citlivost	86%	72%
přesnost	96%	99%
PPV	92%	96%
NPV	93%	92%

Shrnutí postupu

- Zředte sérum roztokem na ředění vzorků (**Reagens 1**) v poměru 1 : 100.
- Do jamek mikrotitrační destičky dávkujte Standardy, pozitivní kontrolní vzorek, a zředěný testovaný vzorek.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Jamky promyjte třikrát.**
- Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Jamky promyjte čtyřikrát.**
- Do každé jamky přidejte 100 µl TMB substrátu (**Reagens 4**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **10 minut**.
- Do každé jamky přidejte 100 µl stop-roztoku (**Reagens 5**).
- Sledujte optickou hustotu s filtrem 450 nm (jediná vlnová délka) nebo 450 nm a 620 nm (dvoji vlnová délka).

Literatura

- Clinical and Experimental Immunology, 1987, **68**: 222.
American Journal of Medicine, 1995, **98**: 559-565.
Clinical Endocrinology, 1994, **40**: 329-333.
Annals of the Rheumatic Diseases, 1987, **46**: 1-6.
Annals of the Rheumatic Diseases, 1987, **46**: 605-611.
The Journal of Rheumatology, 1988, **15**: 795-798.
The American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1990, **163**: 575-584.
Lancet, 1983: 1211-1214
Clin Rev Allergy, 1994, **12**: 287-296.
Springer Semin. Immunopathol., 1994, **16**: 223-245.
Immunol. Allergy Clin. N. Am., 1994, **14**: 821-834.

**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. 05/41243113, Fax 05/ 41243114
e-mail laboserv@laboserv.cz