

# ELISA souprava Intrinsic faktor IgG

Kvalitativní/semikvantitativní test ke stanovení IgG protilátek k Intrinsic faktoru

Katalogové číslo GD35 (96 testů)

Pouze pro použití *in vitro*



## 1. Použití soupravy

Souprava intrinsic faktor IgG je rychlá ELISA metoda pro detekci protilátek proti intrinsic faktoru, proteinu podílejícímu se na přepravě vitamínu B12. Souprava je určena pouze pro použití *in vitro*.

## 2. Popis testu

Intrinsic faktor (IF) je základním glykoproteinem, podílejícím se na přepravě vitamínu B12 přes střevní sliznici. Tento protein se váže na vitamin B12 za tvorby komplexu, který umožňuje vstřebávání B12 do krevního oběhu. Vitamin B12 je nezbytný pro zrání erytrocytů a jeho nedostatek vede ke vzniku anémie.

Chyba v produkci nebo využití IF vede k perniciózní anémii. Auto protilátky k IF buď blokují tvorbu komplexu IF-B12 nebo se vážou na jiné místo na komplexu, čímž brání vstřebávání.

Stanovení sérové hladiny anti-IF protilátky nabízí způsob, jak rozlišit mezi autoimunitní perniciózní anémií, neautoimunitní perniciózní anémií (např. atrofické gastritidy a pankreatické exokrinní insuficience) a dalšími formami anémie spojenými s vitamínem B12.

## 3. Princip testu

Zředěné vzorky séra se inkubují s purifikovaným (>99%) intrinsic faktorem 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 intrinsic faktorem, 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) 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:** 0 & 10 U/ml, 2 ml 10 mM tris-pufru obsahujícího lidské sérum IgG/IgA protilátky proti intrinsic faktoru, připraveno k přímému použití
  - **Pozitivní kontrola:** 2 ml 10 mM tris-pufru obsahující lidské sérové protilátky proti IF, připraveno k přímému použití
  - **Negativní kontrola:** 2ml 10mM tris-pufr obsahující normální lidské sérum, připraveno k přímému použití
  - **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 reagentů.

## 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 dodržen postup testu.
- Všechny lidský výchozí materiál používaný při přípravě standard a kontrol pro tento výrobek byl testován a shledán 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 vyhýbejte 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 reagensií

- 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.

### 10. Postup testu

1. Naředte vzorky patientského séra 1:100 ředícím roztokem (např. 10 ul séra + 1ml ředícího roztoku).
2. Připravte potřebný počet stripů pro stanovení.
3. Pro kvantitativní analýzu dávkujte 100ul standardy 0 U/ml a 10 U/ml, dále pozitivní kontrolu a ředěná patientská séra do odpovídajících jamek.

4. Inkubujte **30 minut** při pokojové teplotě.

5. Po 30 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 reagentů.

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**

Pacienti s perniciózní anémií vykazují hodnoty nad 10 U/ml.

Každá laboratoř by si měla ideálně stanovit vlastní rozsah dat.

#### Kvalitativní výsledky

Vzorky s OD > OD standardy 10 U/ml +12% jsou pozitivní

Vzorky s OD < OD standardy 10 U/ml -12% jsou negativní.

Vzorky v rozmezí ±12% OD standardy 10 U/ml jsou hraniční.

#### Semikvantitativní výsledky

Semikvantitativní výsledky mohou být stanoveny pomocí následující rovnice.

$$\text{Výsledek pacienta} = \frac{\text{OD vzorku} - \text{OD 0 U/ml}}{10 \text{ U/ml standard OD} - 0 \text{ U/ml OD}} \times 10$$

Vzorky v rozmezí 8,5 – 11,5 U/ml jsou hodnoceny jako hraniční.

#### Kvantitativní výsledky

Pro umožnění kvantitativního stanovení protilátek proti IF lze zakoupit samostatnou sadu standard pro intrinsic faktor. Pokud používáte tuto volitelnou sadu, naneste optickou hustotu každé standardy oproti její odpovídající koncentraci a jednotlivé body spojte nejlépe pasující křivkou. Z této křivky odečtěte neznámé.

#### **13. Limitace testu**

- Pozitivní výsledky by neměly být používány jako jediné diagnostické kritérium pro Biermerovu anémii. Výsledky musí být v korelaci s hematologickými nálezy.
- Pozitivní výsledky by měly být vydány ve spojení s dalšími autoimunitními testy proti intrinsic faktoru a mohou být spojeny s jinými autoimunitními chorobami. Můžete použít např. soupravu Genesis Protilátky proti žaludečním parietálním buňkám (GD36).

#### **14. Opakovatelnost**

Variační koeficient v rámci jednoho stanovení: < 6%  
Variační koeficient mezi jednotlivými stanoveními: < 12%

### Shrnutí postupu testu

- Naředte séra 1:100 ředícím roztokem (**Reagencie 1**)
- Dávkujte 100ul standard, pozitivní a negativní kontrolu a řaděný vzorek do odpovídajících jamek mikrotitrační destičky
- Inkubujte **30 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

### 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>

### Literatura:

Chanarin, J. (1979) The Megaloblastic Anaemias, 2<sup>nd</sup> ed. P 362

Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Conn, D.A. (1986) Detection of type I and type II antibodies to Intrinsic factor. *Medical Laboratory Sciences*, 43, 148-151.

Garrido-Pinson, G.C. Turner, M.D., Crookston, J.H., Samloff, I.M.,

Miller, L.L. & Segal, H.L. (1966) Studies of human intrinsic factor auto-antibodies. *Journal of Immunology*, 97, 897-912.

Goldberg, L.S. & Bluestone, R. (1970) Hidden gastric autoantibodies to intrinsic factor in pernicious anemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 75, 449-456.

Marcoullis, G., Parmentier, Y. & Nicholas, J.P. (1979) Blocking and binding type antibodies against all major vitamin B12-binders in pernicious anaemia serum. *British Journal of Haematology*, 43, 15-26