

β2-glykoprotein 1 IgA ELISA kit

Semikvantitativní test na přítomnost protilátek IgA proti β2-glykoproteinu 1
katalogové číslo: GD 30
96 testů

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

2006-03-08

Použití

Souprava β2- glykoprotein 1 IgA představuje rychlou ELISA metodu semikvantitativní detekce protilátek třídy IgA vytvořených proti β2- glykoprotein 1 (β2-GP1). Slouží jako podpora při diagnostikování trombotických onemocnění.

Komponenty této soupravy jsou určeny pouze pro *in vitro* diagnostiku.

Úvod

Anti – phospholipid syndrome (APS) je spojován s predispozicemi k trombóze, trombocytopenii, k opakovaným samovolným potratům a k zvýšené hladině aPL. Některé aPL, zejména anti - kardiolipinové proteiny rozeznávají skrytý epitop β2 – GP1, který se objevuje pouze když je β2 – GP1 vázán na složky lipidové membrány. Detekce protilátek proti β2 – GP1 v krevním séru pacienta je důležitá při diagnostice APS, protože protilátky proti β2 – GP1 jsou dominantním typem protilátek v PL-positivním séru pacienta s APS.

Diagnosticky zvýšené hladiny protilátek proti kardiolipinu u pacientů s APS jsou limitovány, protože léčba nebo některé infekce mohou ve svém důsledku zvyšovat hladinu aPL. Zvýšení může být dočasné a nemusí korespondovat s APS. Naproti tomu protilátky proti β2 – GP1 jsou hlavním znakem u APS.

ELISA kit od firmy Genesis umožňuje semikvantitativní stanovení protilátek IgA proti β2 – GP1. Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy purifikovaným β2 – GP1 a stabilizovány, aby jejich životnost byla 15 měsíců od data výroby.

Princip testu

Souprava ELISA využívá mikrotitrační destičku s 96 jamkami. Vzorky (ředěné v poměru 1:50) jsou napipetovány do jamek, kde se po 30 minutách inkubace protilátky váží na antigen β2 - GP1, kterým jsou potaženy stěny jamek mikrotitrační destičky. Nenavázané protilátky a složky vzorku jsou odstraněny promytím. Poté je do jamek přidán enzymový konjugát králičí anti – lidský IgA značený křenovou peroxidázou. Během 30 minutové inkubace se konjugát váže na specificky vázané protilátky. Následným promytím se odstraní nenavázaný konjugát. Přidáním substrátu TMB je zviditelněn navázaný konjugát za vzniku modrého zabarvení, jestliže je vzorek pozitivní. Po 10 minutách inkubace se přidá stop roztok, kterým se reakce zastaví. Tímto ukončením vznikne žluté zabarvení, jehož intenzita je úměrná množství IgA protilátek proti β2 – GP1. Optická denzita standardů, kontrol a testovaných vzorků se měří pomocí readeru.

Materiály dodávané v soupravě

- **Mikrotitrační destička:** 96 jamek lomitelných stripů 12 X 8, potažených lidským β2-GP1
- **Reagencie 1: Roztok pro ředění vzorků:** 16 ml, před použitím naředit na objem 100 ml
- **Reagencie 2: Promývací pufr:** koncentrát (x15), 75 ml, před použitím naředit
- **Reagencie 3: Enzymový konjugát:** králičí protilátka proti lidskému IgA (žlutá) značená křenovou peroxidázou, 12 ml, připraven k použití
- **Reagencie 4: TMB Substrát,** 12 ml; připraven k použití
- **Reagencie 5: Stop-roztok,** 12 ml, připraven k použití
- **Nulový standard,** 1 ml, připraven k okamžitému použití
- **Cut – off standard** (5U/ml), 1 ml, připraven k použití
- **Positivní kontrola,** 1 ml, připraven k použití
- **Negativní kontrola,** 1 ml, připraven k použití
- **Inkubační sáček**
- **Návod k použití**

Další potřebné zařízení

- kalibrované pipety pro dávkování 10 μl, 100 μl, 1000 μl
- promývací láhev, multikanálová pipeta nebo promývačka mikrotitračních destiček
- reader s filtry 450 /620 nm
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- obecné laboratorní přístroje

Trvanlivost a skladovací podmínky

Po převzetí soupravu skladujte při teplotě 2 – 8 °C. Po otevření soupravy jsou reagencie stabilní po dobu tří měsíců (nebo do konce expirační doby, pokud je tato doba kratší než tři měsíce). Je důležité chránit nepoužité jamky před zvýšenou vlhkostí. Nepoužívejte soupravy s prošlou dobou expirace.

Cut – off kalibrátor a kontroly jsou vyrobeny z neinfekčního lidského séra a stejně jako roztok pro ředění vzorku obsahují 0,1% azidu sodného.

Vždy je nutno dodržovat bezpečnostní postupy určené pro práci v klinické laboratoři. Při manipulaci se sérem pacienta nebo s výrobky vyrobenými z krevního séra používejte vždy pracovní rukavice a ochranný oděv. Stop roztok obsahuje 0,16 molární kyselinu sírovou, **pozor žravina!**

Vzorky

Používejte vždy čerstvě odebrané vzorky. Pokud je to nezbytné, mohou být vzorky skladovány při teplotě –20°C. Opakované zmrazování ovlivňuje výsledky testů.

Metodika

Než začnete pracovat, ujistěte se, že všechny materiály mají pokojovou teplotu. Doporučujeme testovat standardy a kontroly v duplikátu. Vzorky mohou být testovány jednotlivě nebo v duplikátu.

1. Připravte dostatečný počet stripů pro test. Připravte pracovní ředění ředícího roztoku (**Reagencie1**) doplněním destilovanou vodou do objemu 100 ml.
2. Naředte vzorky v poměru 1:50 (např. 20μl séra + 1 ml ředícího roztoku). Použijte vždy čerstvý ředící roztok. Je to důležité pro dobrou kalibraci a přesné výsledky. Je velmi důležité dávkovat vzorky i standardy do jamek bez časové prodlevy. Je důležité mít všechny vzorky připraveny pro pipetování. Pomalé pipetování nebo přestávky mohou způsobit zkreslení výsledků testu. Jestliže je nezbytné přesušit pipetování, doporučujeme použít ještě jednu řadu standardů.
3. Pipetujte 100 μl standardu , cut – off standardu, kontrol a zředěných vzorků do jamek. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě v inkubačním sáčku. Během všech inkubací se vyhněte vystavení mikrotitrační destičky přímému slunečnímu záření a blízkosti zdroje tepla.
4. Naředte promývací pufr (**Reagencie 2**) 1:15 v destilované vodou, vyrobíte tak pracovní ředění. Uchovávejte při teplotě 2 – 8 °C po dobu 2 měsíců.
5. Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek a promyjte v automatické promývačce mikrotitračních destiček nebo ručním promytím (viz. níže). Pečlivé promytí je klíčem k dobrým výsledkům. Před dalším krokem osušte povrch jamek savým papírem. Nenechávejte jamky vyschnout!

Postup pro ruční promývání:

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

- Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagencie 3**). tato reagencie je kódována žlutě. Všechny pipety a další zařízení používané pro enzymový konjugát ukládejte odděleně od substrátu. Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu 30 minut v inkubačním sáčku.
- Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek, třikrát promyjte standardní procedurou. Nenechávejte jamky vyschnout!
- Pomocí dávkovací pipety rychle do každé jamky dávkujte 100 µl TMB Substrátu (**Reagencie 4**). Inkubujte destičku po dobu 10 minut.
- Do každé jamky přidejte 100 µl Stop-roztoku (**Reagencie 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 10 minut odečtěte optickou denzitu (OD) každé jamky readerem s filtrem 450 nm (nebo 450/630 nm).

Interpretace výsledků

Výsledky tohoto testu se musí interpretovat v souvislostech s dalšími klinickými informacemi zjištěnými o každém z testovaných pacientů. Stanovení diagnózy nesmí být založeno pouze na výsledku tohoto testu.

Kalkulace výsledků

Semikvantitativní výsledek může být spočítán z optické denzity s následujícími hodnotami:

Výsledek = $\frac{\text{optická hustota pacienta} - \text{pozadí}}{\text{optická hustota 5 U/ml cut-off standard} - \text{pozadí}} \times 5 \text{ U/ml}$

Pacient A $\frac{0,547 - 0,040}{0,224 - 0,04} \times 5 = 13,7 \text{ U/ml}$

V naší laboratoři jsme stanovili, že 95% krevních dárců má hladinu protilátky proti β2-GP1 nižší než 5 U/ml.

Negativní hodnoty

Vzorky s hodnotou optické denzity nižší než cut – off standard (5U/ml) jsou negativní.

Pozitivní hodnoty

Vzorky s hodnotou optické denzity vyšší než pozitivní kontrola (10 U/ml) jsou pozitivní. Pozitivní kontrola obsažená v setu má obvykle hodnotu kolem 10 U/ml (uvedeno na lahvičce).

Kontrola kvality

Příložený QC certifikát ukazuje očekávané absorbance a očekávané hodnoty kontrol testu.

Nepřesnost

5 U/ml typicky 6 – 10%
20 U/ml typicky 3 – 6%

Doporučená literatura

McNally, T, Mackie, IJ, Machin, SJ & Isenberg, DA , Elevated levels of β2-glycoprotein I(β2-GPI) in antiphospholipid antibody syndrome are due to increased amounts of β2GP1 in association with other plasma constituents. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1995, 6, 411-416

Viard, J-P, Amoura, Z & Bach, J-F, Association of anti-β2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *American Journal of Medicine*, 1992, 93, 181-186

McNally, T, Mackie, IJ, Machin, SJ & Isenberg, DA Increased levels of β2 glycoprotein-I antigen and β2 glycoprotein-I binding antibodies are associated with a history of thromboembolic complications in patients with SLE and primary antiphospholipid syndrome *British Journal of Rheum.* 1995, 34, 1031-1036

Martunuzzo, ME, Forastiero, RR & Carreras, LO, Anti-β2 glycoprotein-I antibodies detection and association with thrombosis. *British Journal of Rheum.* 1995, 89, 397-402

McNally, T, Purdy, G, Mackie, IJ & Isenberg, DA, The use of an anti-β2 glycoprotein-I assay for discrimination between

anticardiolipin antibodies associated with infection and increased risk of thrombosis, *British Journal of Haematology* , 1995, 91, 471-473

Shrnutí postupu

- Zředte sérum roztokem na ředění vzorků (**Reagens 1**) v poměru 1 : 50
- Do jamek mikrotitrační destičky dávkujte standardy, pozitivní kontrolní vzorek a zředěný testovaný vzorek v objemu 100 µl
- Inkubujte při pokojové teplotě v inkubačním sáčku 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 denzitu s filtrem 450 nm po dobu 10 minut

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