



Zymutest Anti-β₂GP I IgG

RK014A

Stanovení autoprotilátky proti β₂
glykoproteinu, izotyp IgG



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

IVD

Pouze pro použití „In Vitro“ (IVD)

Poslední revize:

Revize:11/2022

POUŽITÍ:

ELISA souprava ZYMUTEST anti β₂-GPI, IgG je standardizovaná a optimalizovaná enzymo-immuno assay vytvořená pro měření autoprotilátek proti β₂-GPI typu IgG v lidské plazmě, séru nebo jakékoliv jiné biologické tekutině, kde by tyto protilátky měly být stanovovány.

INFO:

Souprava ZYMUTEST anti β₂-GPI specificky měří lidské autoprotilátky a alloprotilátky na β₂-GPI typu IgG které reagují se znehynbným β₂-GPI. IgM nebo IgA isotopy nejsou měřeny. Tento test je vytvořen s nativním, neshtěpeným, nezměněným, vysoce purifikovaným lidským β₂-GPI, který si zachoval strukturu. Tento test umožňuje dobrou reprodukovatelnost, vysokou citlivost a specifitu.

PRINCIP TESTU:

β₂-GPI protilátky se měří na ELISA prouzcích opatřených nativním lidským stabilizovaným β₂-GPI.

Ředěný vzorek plazmy nebo jiné biologické tekutiny se pipetuje do jamky mikrotitrační destičky, na jejíž stěněch je navázan β₂-GPI. Pokud jsou přítomny protilátky proti β₂-GPI, vážou se na β₂-GPI navázaný na stěně jamky. Poté se destička promyje. Navázaná PL proti β₂-GPI jsou pak detekovány prostřednictvím kozího anti-humánního IgG (Fcγ specifického) s navázanou peroxidázou. Následuje další promytí a potom je do jamky pipetován peroxidázový substrát – tetramethylbenzidin (TMB), který v přítomnosti peroxidu vodíku vytvoří modré zbarvení. Po zastavení reakce kyselinou sírovou se barva změní na žlutou. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství anti- β₂-GPI autoprotilátky typu IgG ve vzorku.

Testovaný vzorek:

- Lidská citrátová plazma, lidská Na₂EDTA plazma, lidské sérum
- Jakákoliv biologická tekutina lidského původu, ve které má být testována přítomnost anti-β₂-GPI IgG typu.

REAGENCE:

1. COAT: Mikro ELISA destička: Obsahuje 12 proučků po 8 jamkách, s navázaným vysoce čištěným lidským β₂-GPI, který je stabilizovaný. Destička je uložena v aluminiovém pouzdru a hermeticky uzavřena za přítomnosti desikantu.

2. SD: Autoimunní diluent vzorku: 2 lahvičky obsahující 50 ml diluentu vzorku pro autoimunitu, připraven k použití.

3. CAL: Anti β₂-GPI IgG kalibrátor: 3 lahvičky anti- β₂-GPI IgG kalibrátoru, lyofilizované. Po naředění 1 ml diluentu vzorku pro autoimunitu je připraven k použití (již ředěný 1:100)

4. C: Negativní kontrola: 3 lahvičky negativní kontroly, lyofilizované (ředěná normální lidská plazma). Po rozpuštění 1 ml diluentu vzorku pro autoimunitu se získá negativní kontrola již připravená k použití (již ředěná 1:100)

5. IC: Anti-IgG-peroxidáza: 3 lahvičky imunokonjugátu (anti-IgG (Fcγ)-HRP imunokonjugát), s obsahem čištěné kozí protilátky specifické proti lidskému IgG-Fcγ s navázanou HRP, lyofilizované.

6. CD: Diluent konjugátu: 1 lahvička s obsahem 25 ml diluentu konjugátu, připraven k použití.

7. WS: Promývací roztok: 1 lahvička s obsahem 50 ml 20x koncentrovaného promývacího roztoku.

8. TMB: Tetramethylbenzidine: 1 lahvička s obsahem 25 ml peroxidázového substrátu: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) s obsahem peroxidu vodíku, připraven k použití.

9. SA: Zastavovací roztok: 1 lahvička s obsahem 6 ml 0,45M kyseliny sírové (zastavovací roztok), připraven k použití.

Přesné koncentrace kalibrátoru a přijatelné meze pro kontrolní plazmy jsou uvedeny na přiloženém letáku. Koncentrace anti β₂-GPI pro kalibrátory, vyjádřeny v AU (Arbitrary Unit), mohou kolísat mezi šaržemi. Pro testování se odkažte na leták přiložený se soupravou.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Jedná se o produkt biologického původu, proto s ním musí být zacházeno s opatrností jako s potenciálně infekčním.
- V případě kontaminace substrát změni barvu na žlutou. V tomto případě musí být znehodnocen a musí se použít nová lahvička.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Užívejte komponenty pouze z kity stejné šarže. Nezaměňujte komponenty z kity o různých šaržích v jednou testu.
- S reagentie zacházejte opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci během používání. Pokud je možné, snižte odpar reagentie zmenšením plochy kontaktu reagentie se vzduchem. Odpařování snižuje stabilitu reagentie v analyzátoru.
- Pro zajištění dostatečné stability uzavírejte lahvičky jejich vlastními zátkami.
- Studie stability trvající 3 týdny při 30°C prokázaly, že reagentie může být přepravována za pokojové teploty po krátký čas bez jejího poškození.
- Pouze pro použití In Vitro.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ, SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Zahřejte soupravu na pokojovou teplotu alespoň 30 minut před použitím. Nepoužité reagentie skladujte při 2 – 8°C. Lahvičky jsou plněné pod vakuem. Abyste zabránili ztrátě lyofilizátů, otevřete lahvičky opatrně.

Distributor: Diagnostica s.r.o, Za Trati 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz



1. COAT: Otevřete pouzdro a vyjměte požadovaný počet proučků. Po vyjmutí z pouzdra musí být proučky použity do 30 minut. Zbylé proučky mohou být skladovány v uzavřeném originálním pouzdru při teplotě 2-8°C po dobu 4 týdnů, v přítomnosti desikantu a hermeticky uzavřené, chráněné před vlhkostí a uzavřené v přiloženém skladovacím sáčku (minigríp).

2. SD: Je připraven k použití. Stabilita reagentie v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:

- 4 týdny při 2-8°C

3. CAL: Rozpusťte každou lahvičku s 1 ml diluentu vzorku pro autoimunitu a promíchejte do úplného rozpuštění. Získáte tak 1 ml kalibrátoru připraveného k použití. Kalibrátor odpovídá plazmě obsahující IgG autoprotilátku proti β₂-GPI, již naředěné 1:100.

Stabilita rozpuštěné reagentie v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:

- 5 dní při 2-8°C

4. C-: Rozpusťte každou lahvičku 1 ml diluentu vzorku pro autoimunitu a míchejte, dokud se obsah zcela nerozpusťte. Získáte tak 1 ml negativní kontroly připravené k použití. Odpovídá normální lidské plazmě, již naředěné 1:100.

Stabilita rozpuštěné reagentie v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:

- 2 týdny při 2-8°C

5. IC: Každá lahvička musí být rozpuštěna v 7,5 ml diluentu konjugátu alespoň 15 minut před použitím. Lyofilizát musí být před použitím kompletně rozpuštěn. Lahvičku před použitím promíchejte.

Stabilita rozpuštěné reagentie v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:

- 4 týdny při 2-8°C
- 24 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)

6. CD: Je připraven k použití. Obsahuje 0,05% Kathon CG. Stabilita reagentie v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:

- 4 týdny při 2-8°C

7. WS: Podle potřeby inkubujte lahvičku 15 – 30 minut ve vodní lázni při 37°C, dokud se kompletně nerozpusťte pevné částice. Lahvičku promíchejte a naředte na požadovaný objem v poměru 1:20 s destilovanou vodou (50 ml obsahu lahvičky postačí k přípravě 1 litru roztoku). Stabilita reagentie v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:

- Nerozpuštěné: 4 týdny při 2-8°C
- Rozpuštěné: 7 dní při 2-8°C

Reagentie obsahuje 0,05% Kathon CG.

8. TMB: Připraven k použití. Stabilita reagentie v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:

- 4 týdny při 2-8°C

9. SA: Připraven k použití. Obsahuje 0,45M kyseliny sírové.

SKLADOVACÍ PODMÍNKY:

Nepoužité reagentie skladujte při 2 – 8 °C v originálním balení. V doporučených skladovacích podmínkách je souprava použitelná do data spotřeby, uvedeného na obalu.

REAGENCIA A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE NEDODANÝ:

Reagentie:

Destilovaná voda.

Materiál:

8-kanálová nebo dávkovací pipeta umožňující pipetování v rozmezí 50 - 300µl.

1-kanálová pipeta s nastavitelným objemem od 0 do 20µl, 20 až 200µl a 200 až 1000µl.

Promývačka mikrotitračních destiček a třepačka.

ELISA reader s vlnovou délkou 450 nm.

ODBĚR VZORKU:

Během přípravy a skladování vzorků dodržujte lokální předpisy (pro USA viz CLSI doc GP44-A4)³.

Vzorek:

Lidská plazma odebraná z citrátového antikoagulantu nebo EDTA lidská plazma. Skladovací podmínky jsou stejné jako s citrátovanou plazmou.

Odběr

Krev (9 objemů) musí být odebrána do citrátu sodného (1 objem, 0,109M) přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Centrifugace

Do 2 hodin po odběru použijte metodu ve vaší laboratoři validovanou pro získání plazmy chudé na destičky, např. 15 minut při 2 500 g a v pokojové teplotě 18-25°C.

Plazma musí být stočena do plastové zkumavky.

Skladování plazmy:

- 8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- 48 hodin při 2 – 8°C
- 1 měsíc při -20°C

Vzorek plazmy rozmrazujte rychle při 37°C, promíchejte a testujte. Zamíchejte po rozmražení a před testováním.

PROVEDENÍ:

Provedení testu:

1. Kalibrátory a negativní kontroly jsou připraveny k použití (**už naředěné 1:100**).

2. Vzorky by měly být ředěny v SD (Autoimunní diluent vzorku), viz níže:

Vzorky	Ředění
Plasma	1:100
Sérum	1:100
Biologická tekutina	1:100

Pokud očekáváte vysoký počet autoprotištěk proti β_2 -GPI, ředte vzorek **1:200** nebo **1:400**. Výsledky pak musí být násobeny **2x** nebo **4x**.

3. Vymějte požadovaný počet proužků z hliníkového pouzdra a vložte je do rámu. Do jamek mikrodostičky potom pipetujte reagenty dle následující tabulky:

Reagent	Objem	Procedura
Anti- β_2 -GPI IgG kalibrátor nebo negativní kontrola nebo vzorky ředěné 1:100 nebo diluent vzorku (blank)	200 μ l	Pipetujete: kalibrátor nebo negativní kontrolu nebo ředěné vzorky nebo diluent vzorku do jamek
Inkubace 30 minut za pokojové teploty (18-25°C) (a) (b)		
Promývací roztok (20x ředěný v destilované vodě)	300 μ l	Proveďte 5 promytí za použití promývačky (b)
Konjugát anti-IgG (FCy) – HRP imunokonjugát, rozpuštěný se 7,5 ml diluentu konjugátu	200 μ l	Ihned po promytí pipetujte anti-IgG (FCy)-HRP imunokonjugát do jamek
Inkubace 30 minut za pokojové teploty 18-25°C (a)		
Promývací roztok (20x ředěný v destilované vodě)	300 μ l	Proveďte 5 promytí za použití promývačky (b)
TMB/H ₂ O ₂ substrát	200 μ l	Ihned po promytí pipetujte substrát do jamek. Pozn.: pipetování substrátu, řádek po řádku, musí být v přesných časových intervalech (c)
Rozvoj zbarvení po dobu 5 minut za pokojové teploty (18-25°C) (a)		
0,45M kyselina sírová	50 μ l	Pipetujte 0,45M k. sírovou ve stejných intervalech, jako byl pipetován substrát. Zastaví se vývoj zbarvení (c)
Počkejte 10 minut, aby se zbarvení stabilizovalo, poté měřte při 450 nm (A450). Odečtěte hodnotu blank (d).		
Poznámka:		
a)	Vyvarujte se ponechání destičky na slunečním světle během inkubace a během rozvoje zbarvení. Může být použita třepačka mikroELISA destiček.	
b)	Nikdy nenechejte destičku prázdnou mezi pipetováním reagentů nebo po promytí. Následující reagentie musí být přidána do 3 minut, aby se předešlo vyschnutí destičky – mohlo by poškodit vázané komponenty. Pokud je nezbytné, ponechte destičku naplněnou promývacím roztokem a vyprázdněte ji těsně před přidáním další reagentie. Promývačka musí být nastavena tak, aby promývala destičku jemně. Příliš drastické odsávání by mohlo snížit reaktivitu destičky.	
c)	Pro pipetování TMB substrátu – časový interval při pipetování každého řádku musí být přesně dodržován. Ten samý interval musí být i při pipetování zastavovacího roztoku.	
d)	Pro bichromatický odečet může být jako druhá vlnová délka použita 690 nm nebo 620 nm.	

VALIDACE:

Kalibrátor a kontrola v soupravě umožňují ověřit správné provedení testu. Očekávané absorbance při vlnové délce 450 nm pro neředěný kalibrátor a negativní kontrolu mohou kolísat od šarže k šarži, ale pokud je test prováděn za pokojové teploty, vždy jsou:

OD₄₅₀ pro 1:1 kalibrátor : $\geq 1,5$

OD₄₅₀ pro negativní kontrolu : $\leq 0,25$

Získané koncentrace pro kalibrátor a kontrolu jsou uvedeny na letáku šarže.

KONTROLA KVALITY:

Užití kontrolních plazem umožňuje ověření kalibrační křivky stejně tak jako homogenity reaktivity testu mezi sériemi při použití stejné šarže reagentů.

Začněte kontrolu kvality do každé série testů dle doporučení správné odborné laboratorní práce. Nová kalibrace musí být provedena nejméně pro každou novou šarži reagentie, po každé významné opravě či údržbě přístroje, nebo když výsledek kontrol je mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř by si měla definovat přijatelné rozmezí pro vlastní analytický systém.

VÝSLEDEK:

- Výsledky jsou vyjádřeny jako OD₄₅₀ hodnoty získány ze vzorků a kontrol odečtením z kalibrační křivky.
- Pro manuální metodu, vykreslete kalibrační křivku na bi-logaritmickém grafickém papíře, s koncentrací anti β_2 -GPI (AU) na ose X a odpovídající OD₄₅₀ na ose Y. Koncentrace protilátek anti β_2 -GPI typu IgG, pro daný vzorek, testovaný při standardním ředění 1:100 a vyjádřený v AU, je přímo odečtena z kalibrační křivky.
- Pokud byly použity vyšší ředící poměry (D), pak musí být naměřené koncentrace vynásobeny použitým ředícím poměrem (tedy D:100; např.: 2x pro 1:200 nebo 4x pro 1:400).

Distributor: Diagnostica s.r.o, Za Trati 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz

– Alternativně může být použit ELISA software (např. Dynex, Biolise ...) pro odečet koncentrací.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ:

Kalibrační křivka je vytvořena sérií sendvičových ředění. To zajišťuje vyšší spolehlivost testu, vyšší přesnost a reprodukovatelnost mezi šaržemi a mezi sériemi pro cut-off.

Negativní rozmezí:

Pro hodnotu kalibrátoru vyjádřenou v AU je definováno jako horní limit pro normální rozmezí, což odpovídá průměrné hodnotě získané pro normální populaci plus 2 standardní odchylky (2SD). To odpovídá **10 AU**.

Tedy:

Negativní rozmezí: < 10AU/ml.

Šedá zóna:

Šedá zóna je definována protože některé patologické vzorky (záněty, infekční choroby, autoimunita, gamapatie, staří jedinci...) mohou mít vyšší background v autoimunitních testech než zdraví jedinci aniž by měli anti- β_2 GPI protilátky. To může imitovat nebo maskovat nízkou reaktivitu. Pokud je pacient v šedé zóně, měl by být testován později další vzorek, aby bylo možné sledovat případnou dynamiku.

Šedá zóna ≥ 10 AU/ml až < 20 AU/ml

Pozitivní rozmezí:

Pozitivní výsledek je při následujících koncentracích:

Pozitivní rozmezí ≥ 20 AU/ml

Pozitivní rozmezí pak může být dále klasifikováno jako:

Slabě pozitivní ≥ 20 AU/ml až < 50 AU/ml
Středně pozitivní ≥ 50 AU/ml až < 100 AU/ml
Silně pozitivní ≥ 100 AU/ml

LIMITY:

- Aby byl zajištěn optimální výkon testu, technické instrukce musí být striktně dodrženy.
- Jakákoliv reagentie vykazující známky kontaminace nebo jiné podezřelé znaky musí být znehodnocena.
- Jakákoliv plazma s koagulem nebo vykazující známky kontaminace musí být znehodnocena.
- Pokud není správně proveden promývací krok, může mít negativní kontrola vyšší absorbance. Abychom se toho vyvarovali, je potřeba zkontrolovat správné nastavení promývačky a ověřit, že promytí je dostatečné.
- Stejně tak jako u jiných autoimunitních testů, klinické situace jako záněty, infekční choroby, autoimunitní onemocnění, imunitní komplexy, vysoké koncentrace IgM ve vzorku mohou indukovat vysoký background, díky kterému je pak výsledek v šedé zóně nebo slabě pozitivní. V tom případě je potřeba provést kontrolní stanovení novým vzorkem v časovém odstupu.

PATOLOGIE:

- Autoprotiátky proti β_2 -GPI se obvykle u zdravé populace nevyskytují.
- Jejich přítomnost at ve střední nebo vysoké koncentraci může být spojena recidivujícím potraty, s antifosfolipidovým syndromem (APS) s trombotickými chorobami.

Patologický vliv autoprotiátek proti β_2 -GPI je stále diskutován. Mohou přispívat ke spuštění hyperkoagulace. Patogenita různých izotypů ještě není plně prozkoumána. Závažnost klinické manifestace spojená s přítomností protilátek proti β_2 -GPI stoupá v přítomnosti izotypu IgG, při vysokých koncentracích protilátky a době expozice. Izotyp IgG je nejvíce patogenní.

APLIKACE:

Test protilátek proti β_2 -GPI IgG typu je vhodný při následujících klinických situacích:

- Rekurentní nevysvětlené potraty.
- Nevysvětlitelný lupus antikoagulant, s nebo bez trombózy.
- Antifosfolipidový syndrom.

Jiné klinické stavy, při kterých bývá indikováno testování protilátek proti β_2 -GPI bývají většinou spojeny s izotypem IgM.

CHARAKTERISTIKA:

Dolní limit detekce je: ≤ 5 AU/ml.
Inter assay: $\leq 10\%$.
Intra assay: $\leq 10\%$.

REFERENCE:

1. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
2. Arvieux J., et al. Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using β_2 -Glycoprotein I as antigen. J. Immunol. Meth. 1991.
3. Viard J.P., et al. Association of Anti- β_2 -Glycoprotein I Antibodies with Lupus Type Circulating Anticoagulant and Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus. Am. J. Med. 1992.
4. Martinuzzo M.E., et al. Anti- β_2 -Glycoprotein I antibodies : detection and association with Thrombosis. Brit. J. haemat. 1995.
5. Sanmarco M. and Soler C. Heterogeneity of β_2 -Glycoprotein I antibodies. Nouv. Rev. Fr. Haemat. 1995.
6. Amengual O., et al. Clinical significance of anti- β_2 -Glycoprotein I antibodies. Am. Med. Interne. 1997.

SYMBOLY:

Použité symboly jsou uvedeny v seznamu ISO standard 15223-1, viz dokument definice symbolů.

