



Zymutest Anti-β₂GP I IgM

RK014A

Stanovení autoprotilátky proti β₂ glykoproteinu I (β₂GPI), izotyp IgM

Pouze pro použití „In Vitro“



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

Poslední revize: 27/06/2014

POUŽITÍ:

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

PRINCIP TESTU:

Ředěný vzorek plazmy nebo jiné biologické tekutiny se pipetuje do jamky mikrotitrační destičky, na jejichž stěnách je navázán 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 Igm (μ specifického) s navázanou peroxidázou. Následuje další promytí a potom je do jamek 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 Igm ve vzorku.

TESTOVANÝ VZOREK:

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

REAGENCIE:

- COAT: Destička:** Mikro ELISA destička, obsahující 12 proužků po 8 jamkách, s navázaným vysoce čistěným lidským β₂-GPI, který je stabilizovaný. Destička je uložena v aluminiovém pouzdru a hermeticky uzavřena za přítomnosti desikantu.
- SD:** 2 lahvičky obsahující 50 ml diluentu vzorku pro autoimunitu, připraven k použití. Obsahuje Azid sodný.
- CAL:** 3 lahvičky anti- β₂-GPI IgM kalibrátoru, lyofilizovaný. Po naředění 1 ml diluentu vzorku pro autoimunitu je připraven kalibrátor (již ředěný 1:100)

Pozn.: Tento kalibrátor má definovanou anti- β₂-GPI koncentraci, vyjádřenou v arbitrárních jednotkách (AU) a tato koncentrace je uvedena na přiloženém certifikátu.

Pozn.: Používejte komponenty pouze z jedné šarže soupravy. Nemíchejte při testování komponenty z více šarží soupravy.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ:

- 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.
- Destilovaná voda.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ, SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Ve svém originálním obalu, před použitím, pokud byly skladovány při teplotě 2-8°C, jsou neotevřené reagenty stabilní do data expirace, uvedeného na krabici.

1. Mikrotitrační destička: otevřete pouzdro a vyjměte požadovaný počet stripů. Po vyjmutí z pouzdra musí být stripy použity do 30 minut. Zbylé stripy 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.

2. Diluent vzorku pro autoimunitu: Je připraven k použití. Po otevření je možné jej používat **po 4 týdny**, pokud je skladován **při teplotě 2-8°C** a ochráněn před bakteriální kontaminací během používání. Tento reagent obsahuje Azid sodný.

Upozornění: Diluent vzorku pro autoimunitu obsahuje Azid sodný, který může reagovat s olovným a měděným potrubím za vzniku vysoce explozivních azidů kovů. Spláchněte velkým objemem vody, pokud vyléváte do odpadu.

3. Kalibrátor: rozpustěte každou lahvičku 1 ml diluentu vzorku pro autoimunitu. Získáte tak 1 ml kalibrátoru připraveného k použití. Kalibrátor odpovídá plazmě obsahující Igm autoprotilátku proti β₂-GPI, **již naředěné 1:100**. Po naředění je kalibrátor **stabilní 5 dní při teplotě 2-8°C**, pokud bylo zabráněno jeho kontaminaci během používání.

4. Negativní kontrola: rozpustěte každou lahvičku 1 ml diluentu vzorku pro autoimunitu. Získáte tak 1 ml negativní kontroly připravené k použití. Odpovídá normální lidské plazmě, **již naředěné 1:100**. Po rozpuštění je negativní kontrola **stabilní 2 týdny při teplotě 2-8°C**, pokud bylo zabráněno kontaminaci během používání.

Upozornění: β₂-GPI použitý pro navázání na destičku je extrahován z lidské plazmy. Negativní kontrola je také připravena z lidské plazmy. Každá lidská plazma, použitá v kitu, byla testována registrovanou metodou a sledována negativní pro anti HIV protilátky, HBsAg a anti HCV protilátky. Nicméně, žádný test nemůže zaručit naprostou nepřítomnost infekčních agens. S každým produktem lidského původu musí být zacházeno jako s potenciálně infekčním.

5. Anti-IgM (μ)-HRP imunokonjugát: každá lahvička musí být naředěna **7,5 ml diluentu konjugátu**. Lyofilizát musí být před použitím kompletně rozpouštěn. Lahvičku před použitím promíchejte. Rozpuštěný konjugát je **stabilní 24 hodin za pokojové teploty nebo 4 týdny při 2-8°C**

6. Diluent konjugátu: Je připraven k použití. Po otevření by měl být použit **do 4 týdnů**, pokud je skladován **při 2-8°C** a je zabráněno bakteriální kontaminaci během používání. Tento reagent obsahuje 0,05% Kathon CG.

7. Promývací roztok: Inkubujte lahvičku 15 – 30 minut ve vodní lázni při 37°C, dokud se kompletně nerozpustí pevné částice, pokud jsou přítomné. Lahvičku promíchejte a naředěte na požadovaný objem v poměru 1:20 s destilovanou vodou (50 ml obsahu lahvičky postačí k přípravě 1 litru roztoku). Promývací roztok po otevření musí být skladován **při 2-8°C** po dobu originální lahvičky a použit **do 4 týdnů** po otevření. Již naředěný promývací roztok musí být použit **do 7 dnů** za podmínky, že je zabráněno jakékoliv kontaminaci. Tento reagent obsahuje 0,05% Kathon CG.

8. TMB substrát: je připraven k použití. Po otevření by měl být použit **do 4 týdnů**, pokud je skladován **při 2-8°C** a je zabráněno bakteriální kontaminaci při použití.

9. Zastavovací roztok: připraven k použití.

Upozornění: Kyselina sírová, přesto že je ředěná na 0,45M, je žíravá. Zacházejte s ní, stejně jako s jinými chemikáliemi, s velkou opatností. Vvraťte se kontaktu s pokožkou a s očima. Noste ochranný oděv a rukavice při práci s chemikálií.

Pozn.: Přeneste kit do pokojové teploty nejméně 30 minut před použitím. Nepoužitá reagentie skladujte při 2-8°C. Stabilitní studie při 30°C ukázaly, že souprava může být přepravována při pokojové teplotě bez poškození.

PROVEDENÍ:

Odběr vzorku:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109M citrátu sodného (1 díl). Plazmu získáme centrifugací 20 min. při 2500 g. Plazma by měla být testována do 24 hodin, nebo skladována zmrazená při teplotě -20°C a nižší maximálně 6 měsíců. Před testováním plazmu rozmrazte při 37°C po dobu 15 minut. Rozmražený vzorek by měl být testován do 12 hodin po rozmrazení. EDTA lidská plazma může být též použita. Autoprotilátku β₂-GPI můžeme též testovat v séru.

Testované vzorky, kontroly:

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



Plazma nebo sérum jsou testovány v ředění 1:100 v Diluentu vzorku pro autoimunitu. Pokud je očekávána vysoká hladina autoprotilátky anti-β₂-GPI, měl by být vzorek testován v ředění 1:200 nebo 1:400. Výsledek pak musí být násoben 2x nebo 4x.

Kalibrátor a negativní kontrola jsou připraveny k použití – již ředěné 1:100.

Provedení testu:

Kalibrační křivka:

Test by měl být kalibrován pomocí kalibrátoru, který je součástí soupravy a jehož koncentrace v arbitrárních jednotkách (AU) je uvedena v příloženém certifikátu. Připravte kalibrační roztoky seriovým ředěním kalibrátoru v Diluentu vzorku pro autoimunitu od 1:1 do 1:32. Tak se získá koncentrační rozmezí od C:1 do C:32.

Z aluminiového pouzdra vyjměte potřebný počet stripů. Stripy vložte do rámečku. Do jamek mikrodestičky potom pipetujte reagencie dle následující tabulky:

Reagent	Objem	Procedura
Anti-β ₂ -GPI IgM kalibrátor nebo negativní kontrola nebo vzorky ředěné 1:100 nebo diluent vzorku (blank)	200 μl	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 μl	Proveďte 5 promytí za použití promývačky (b)
Konjugát anti-IgM (μ) – HRP imunokonjugát, rozpuštěný se 7,5 ml diluentu konjugátu	200 μl	lhned po promytí pipetujte anti-IgM (μ)-HRP imunokonjugát do jamek
Inkubace 30 minut za pokojové teploty 18-25°C (a)		
Promývací roztok (20x ředěný v destilované vodě)	300 μl	Proveďte 5 promytí za použití promývačky (b)
TMB/H ₂ O ₂ substrát	200 μl	lhned 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 μl	Pipetujte 0,45M kys. 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 (A ₄₅₀) (d). Odečtete hodnotu blank.		

Poznámka:

- Vyvarujte se ponechání destičky na slunečním světle během inkubace a během rozvoje zbarvení. Může být použita třepačka mikroELISA destiček.
- 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.
- Pro pipetování TMB substrátu – časový interval při pipetování každého řádku musí být přesně dodržován. Ten samý interval musí být i při pipetování zastavovacího roztoku.
- Pro bichromatický odečet může být jako druhá vlnová délka použita 690 nm nebo 620 nm.

KONTROLA KVALITY:

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 vždy jsou:

P = A₄₅₀ pro kalibrátor 1:1 : ≥1,5 N = A₄₅₀ pro negativní kontrolu: ≤ 0,25

Navíc musí být koncentrace negativní kontroly v akceptabilním rozmezí uvedeném na certifikátu příloženému k soupravě. Pokud je negativní kontrola mimo rozmezí, zkontrolujte pečlivě provedení testu a ev. Opakujte.

VÝSLEDEK:

- Výsledky jsou odečteny jako hodnoty absorbance při 450 nm (A₄₅₀) pro vzorky, kalibrátor a kontrolu. Hodnoty jsou pak odečteny z kalibrační křivky.
- Kalibrační křivku získáme vynesením koncentrace anti - β₂-GPI vyjádřené v AU na jednu osu a odpovídající A₄₅₀ na osu druhou (viz příklad). Koncentrace anti-β₂-GPI vzorku testovaných v ředění 1:100 jsou přímo odečteny z křivky.

- Pokud bylo použito vyšší ředění (např. D), musí být naměřená koncentrace vynásobena doplňkovým dilučním faktorem (např. x2 při ředění 1:200 nebo x4 při ředění 1:400)

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

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ:

Pro kalibraci je použit jeden standardizovaný kalibrátor a kalibrační řada je získána jeho seriovým ředěním. To zajišťuje vyšší spolehlivost testu a vyšší reprodukovatelnost a přesnost cut-off mezi šaržemi.

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 < 10 AU/ml

Šedá zóna: Šedá zóna je definována protože některé patologické vzorky (záněty, infekční choroby, autoimunita, gamapatie, staří jedinci...) mohou mít vyšší background v autoimunních testech než zdraví jedinci. 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:

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, autoimunní 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.

PATOLOGICKÉ VARIACE:

- Autoprotilátky proti β₂-GPI se obvykle u zdravé populace nevyskytují.
- Jejich přítomnost ať ve střední nebo vysoké koncentraci může být spojena recidivujícím potraty, s antifosfolipidovým syndromem (APS) s trombotickými chorobami.

Patologický vliv autoprotilátek proti β₂-GPI je stále diskutován. Mohou přispívat ke spuštění hyperkoagulace. Patogenita různých izotypů ještě není plně prozkoumána. Žávažnost klinické manifestace spojená s přítomností protilátek proti β₂-GPI stoupá v přítomnosti izotypu IgM, při vysokých koncentracích protilátky a době expozice. Izotyp IgG je nejvíce patogenní.

APLIKACE:

Test protilátek proti β₂-GPI IgM 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 β₂-GPI bývají většinou spojeny s izotypem IgG.

SPECIFITA A CHARAKTERISTIKA:

Zymutest anti - β₂-GPI specificky měří lidské autoprotilátky proti β₂-GPI typu IgM, reagující s imobilizovaným β₂-GPI. IgG nebo IgA typy nejsou zachyceny.

Tento test byl vyvinut s přirozeným neštěpeným a nepoškozeným vysoce čištěným lidským β₂-GPI, který má uchovanou strukturu. Tato metoda dává vysokou reprodukovatelnost, senzitivitu a specifitu.

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

