



ZYMUTEST ACA-APA

IgG - Izotop

Ref RK029A (96 testů)

Stanovení autoprotilátky proti kardiolipinu a fosfolipidům ELISA metodou



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: 11_2022

POUŽITÍ:

ELISA souprava ZYMUTEST ACA-APA, IgG je standardizovaný a optimalizovaný enzymo-immuno test vytvořený pro měření autoprotilátek proti kardiolipinu a fosfolipidům typu IgG v lidské plazmě, séru nebo jakékoliv jiné biologické tekutině, kde by tyto protilátky měly být stanovovány.

INFO:

ZYMUTEST ACA-APA IgG souprava specificky měří lidské autoprotilátky proti kardiolipinům a fosfolipidům typu IgG, které reagují se znehyněným a saturovaným kardiolipinem. IgA a IgM izotopy nejsou měřeny. Tyto izotopy mohou být měřeny pomocí soupravy ZYMUTEST ACA-APA IgM nebo ZYMUTEST ACA-APA IgA.

Tento test je optimalizován a navržen s vysoce reaktivním kardiolipinem, který má dobře ovladatelnou prezentaci, stabilitu a saturaci. Tato spolehlivá metoda poskytuje vysokou reprodukovatelnost, citlivost a specifitu a nabízí optimalizované rozlišování mezi normálním a patologickým vzorkem s přítomností protilátek proti kardiolipinům a fosfolipidům.

PRINCIP TESTU:

Ředěný vzorek plazmy nebo jiné biologické tekutiny se pipetuje do jamky mikrotitrační destičky, na jejichž stěnách je navázán kardiolipin. Pokud jsou přítomny protilátky proti kardiolipinu a fosfolipidům, vážou se na kardiolipin navázaný na stěně jamky. Poté se destička promyje. Navázané PL jsou pak detekovány prostřednictvím koziho 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-kardiolipin/fosfolipid autoprotilátky typu IgG ve vzorku.

REAGENCIE:

- COAT:** Mikro ELISA destička, obsahující 12 proužků po 8 jamkách, s navázaným anionickým fosfolipidem, který je stabilizovaný a saturovaný. 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.
- CAL:** 3 lahvičky **anti-kardiolipin IgG kalibrátoru**, lyofilizovaný. Po naředění 1 ml **diluentu vzorku pro autoimunitu** je připraven kalibrátor (již ředěný 1:100).
- C-:** 3 lahvičky **negativní kontroly**, lyofilizované (ředěná normální lidská plazma). Po naředění 1 ml **diluentu vzorku pro autoimunitu** se získá negativní kontrola již připravená k použití (již ředěná 1:100).
- IC:** 3 lahvičky **imunokonjugátu (anti-IgG (Fcγ)-HRP imunokonjugát)**, s obsahem čištěné kozi protilátky specifické proti lidskému IgG-Fcγ s navázanou HRP, lyofilizovaný.
- CD:** 1 lahvička s obsahem 25 ml **diluentu konjugátu**, připraven k použití.
- WS:** 1 lahvička s obsahem 50 ml 20x koncentrovaného **promývacího roztoku**.
- TMB:** 1 lahvička s obsahem 25 ml peroxidázového substrátu: 3,3',5,5'-**tetramethylbenzidine** (TMB) s obsahem peroxidu vodíku, připraven k použití.
- SA:** 1 lahvička s obsahem 6 ml **0,45M kyseliny sírové (zastavovací roztok)**, připraven k použití.

Přesné koncentrace (vyjádřené v GPL jednotkách, KAPS standard) kontrol jsou uvedeny na letáku přiloženém s balením. Koncentrace se mohou lišit mezi šaržemi. Pro testování se odkažte na hodnoty uvedené na letáku.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Jedná se o produkt biologického původu, proto s ním musí být zacházeno s opatrností jako s potenciálně infekčním.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Užívejte komponenty pouze z kitu stejné šarže. Nezaměňujte komponenty z kitu o různých šaržích v jednom testu.
- S reagenty 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.

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



- 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 A STABILITA REAGENCIE:

Alespoň 30 minut před použitím zahřejte reagentie na pokojovou teplotu. Uchovávejte neotevřené reagentie při teplotě 2-8°C.

Lahvičky jsou plněny pod vakuem, abyste předešli ztrátě produktu, otevřete lahvičky opatrně.

Pokud jsou reagentie správně použity a skladovány podle protokolu a bezpečnostních doporučení, souprava může být použita během 1 měsíce postupně, podle potřeby.

COAT (Mikrotitrační destička): Otevřete hliníkové pouzdro a vyjměte požadovaný počet proužků. Po vyjmutí z pouzdra musí být proužky použity do 30 minut. Zbylé proužky mohou být skladovány v uzavřeném originálním hliníkovém 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.

SD (Diluent vzorku pro autoimunitu): Je připraven k použití.

Stabilita reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:

- 4 týdny při 2-8°C

CAL (Kalibrátor): Rozpusťte každou lahvičku 1 ml **diluentu vzorku pro autoimunitu** a promíchejte do úplného rozpuštění. Získáte tak kalibrátor připravený k použití a odpovídá plazmě obsahující IgG protilátku proti kardiolipinu, **již naředěné 1:100**.

Stabilita naředěné reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:

- 5 dní při 2-8°C

C- (Negativní kontrola): Rozpusťte každou lahvičku 1 ml **diluentu vzorku pro autoimunitu** a promíchejte do úplného rozpuštění. Získáte tak negativní kontroly připravené k použití. Odpovídá normální lidské plazmě, **již naředěné 1:100**.

Stabilita naředěné reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:

- 2 týdny při 2-8°C

IC (Anti-IgG(Fcγ)-HRP imunokonjugát): Rozpusťte každou lahvičku s 7,5 ml **diluentu konjugátu**, do úplného rozpuštění lyofilizátu alespoň 15 minut před použitím.

Stabilita naředěné reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:

- 4 týdny při 2-8°C
- 24 hodin za pokojové teploty (18-25°C)

CD (Diluent konjugátu): Je připraven k použití. Obsahuje 0,05% Kathon CG.

Stabilita reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:

- 4 týdny při 2-8°C

WS (Promývací roztok): Podle potřeby inkubujte lahvičku 15 – 30 minut ve vodní lázni při 37°C, dokud se kompletně nerozpustí pevné částice. Lahvičku promíchejte a naředěte na požadovaný objem v poměru 1:20 s destilovanou vodou (50 ml obsahu lahvičky postačí k přípravě 1 litru roztoku). Obsahuje 0,05% Kathon CG. Stabilita reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:

- Neředěné - 8 týdnů při 2-8°C
- Ředěné - 7 dní při 2-8°C

TMB: Připraven k použití. Stabilita reagentie v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:

- 4 týdny při 2-8°C

SA (Zastavovací roztok): Obsahuje 0,45M kyseliny sírové, připraven k použití.

SKLADOVACÍ PODMÍNKY:

Neotevřené reagentie skladované při 2 – 8°C v jejich originálních balení jsou použitelné až do data expirace uvedeného na obalu.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ:

Reagentie:

Destilovaná voda.

Materiál:

8-kanálová nebo dávkovací pipeta umožňující pipetování v rozmezí 50 - 300 µl.
1-kanálová pipeta s nastavitelným objemem od 0 do 20 µl, 20 až 200 µl a 200 až 1000 µl.

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).

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:

- 4 hodiny 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 ihned testujte. Zamíchejte po rozmražení a před testováním.

PROVEDENÍ TESTU:

Provedení testu:

1. Kalibrátor a negativní kontrola jsou připraveny k použití (již ředěny 1:100).

2. Vzorky by měly být ředěny v Diluentu vzorku pro autoimunitu (SD) podle následující tabulky:

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

Pokud předpokládáte vysokou hladinu Anti-kardiolipinů / anti-fosfolipidů, ředte vzorek 1:200 nebo 1:400. Výsledky pak musí být násobeny 2krát nebo 4krát.

3. Odeberte požadovaný počet proužků z hliníkového pouzdra a vložte je do rámečku. Do jamek destičky pak pipetujte reagentie následovně:

Reagent	Objem	Procedura
Anti-kardiolipin IgG kalibrátor nebo negativní kontrola nebo 1:100 ředěné vzorky nebo diluent vzorku (blank)	200 µl	Pipetujte: kalibrátor nebo negativní kontrolu nebo ředěné vzorky nebo diluent vzorku do jamek (a)
Inkubace 30 minut za pokojové teploty (18-25°C) (b) (c)		
Promývací roztok (20x ředěný v destilované vodě)	300 µl	Provedte 5 promytí za použití promývačky (c)
Konjugát (anti-IgG (FCγ) – HRP imunokonjugát), rozpuštěný se 7,5 ml diluentu konjugátu.	200 µl	Okamžitě po promytí pipetujte anti-IgG (FCγ)-HRP imunokonjugát do jamek.
Inkubace 30 minut za pokojové teploty 18-25°C (b)		
Promývací roztok (20x ředěný v destilované vodě)	300 µl	Provedte 5 promytí za použití promývačky (c)
TMB/H ₂ O ₂ substrát	200 µl	Okamžitě po promytí pipetujte substrát do jamek. Pozn.: pipetování substrátu, řádek po řádku, musí být v přesných časových intervalech (d)
Rozvoj zbarvení po dobu 5 minut za pokojové teploty (18-25°C) (b)		
0,45M kyselina sírová	50 µl	Pipetujte 0,45M k. sírovou ve stejných intervalech, jako byl pipetován substrát. Zastaví se vývoj zbarvení (d)

Počkejte 10 minut, aby se zbarvení stabilizovalo, poté měřte při 450 nm (A450), odečtěte blank (e). Odečtěte hodnotu blank.

Poznámka:

- a) Pipetujte kalibrátory, kontroly a vzorky co nejrychleji (během 10 minut), aby byla získána homogenní imunologická kinetika pro vazbu protilátek. Příliš velké prodloužení během pipetování první a poslední jamky může vést ke špatnému výsledku.
- b) Vyvarujte se ponechání destičky na slunečním světle během inkubace a během rozvoje zbarvení. Může být použita třepačka mikroELISA destiček.
- c) 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.

d) Pro pipetování TMB substrátu – časový interval při pipetování každého řádku musí být přesně dodržován. Ten samý interval musí být i při pipetování zastavovacího roztoku.

e) Pro bichromatický odečet může být jako druhá vlnová délka použita 690 nm nebo 620 nm.

VALIDACE:

– Kalibrátor a kontroly dodané v soupravě umožňují validaci správného výkonu testu.

– Předpokládané A450 hodnoty pro neřaděný kalibrátor a negativní kontrolu se mohou lišit podle šarže, ale pokud je test proveden za pokojové teploty (18-25°C), vždy jsou:

P = A450 pro kalibrátor 1:1 : ≥ 1,5

N = A450 pro negativní kontrolu: ≤ 0,25

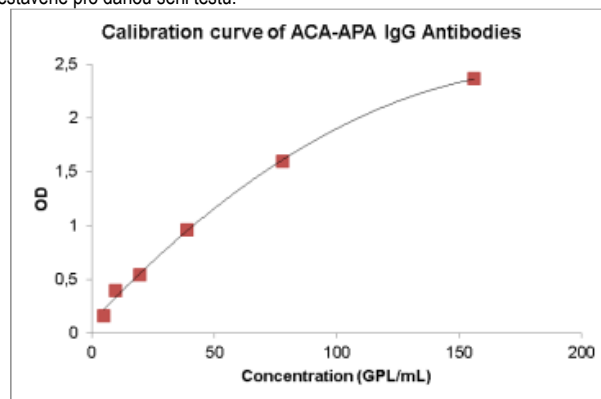
Navíc musí být koncentrace negativní kontroly v přijatelném rozmezí uvedeném na letáku přiloženému k soupravě. Pokud je negativní kontrola mimo rozmezí, zkontrolujte pečlivě provedení testu a eventuálně opakujte.

KALIBRACE:

Test může být kalibrován pomocí kalibrátoru v soupravě o koncentraci (C) v GPL jednotkách, viz leták přiložený k soupravě. Připravte standardní roztoky pro kalibraci sérii dvou-krokových ředění kalibrátoru v Diluentu vzorku pro autoimunitu (SD) od 1:1 do 1:32. Získáte tak rozmezí koncentrace od C:1 do C:32.

- Obvyklé dynamické rozmezí je od 0 do kolem 80 GPL jednotek.

Kalibrační křivka uvedená níže byla získána s přiloženým kalibrátorem a je uvedena pouze jako příklad. Pro hodnocení výsledků se musí použít kalibrační křivka sestavená pro danou sérii testů.



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

VÝSLEDEK:

- Výsledky jsou vyjádřeny podle A450 hodnot získaných pro vzorky a kontroly a koncentrace anti-kardiolipinu/anti-fosfolipidu jsou odečítány z kalibrační křivky.
- Kalibrační křivka se získá vykreslením koncentrací anti-kardiolipinu a anti-fosfolipidu vyjádřených v GLP na ose X a odpovídající A450 na ose Y. Koncentrace protilátek proti kardiolipinu typu IgG, pro měřený vzorek při standardním ředění 1:100, vyjádřen v GLP jednotkách, se získá odečtem z kalibrační křivky.
- Pokud je použito vyšší ředění (D), naměřené koncentrace se musí násobit použitým ředicím faktorem (tedy D:100, např.: **x2 pro 1:200** nebo **4x pro 1:400**).
- Alternativně se může použít pro výpočet koncentrací protilátek ELISA software (Dynex, Biolise, atd.).

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ:

Pro kalibraci je použit jeden standardizovaný kalibrátor a rozmezí kalibrace je získán jeho sériovým, dvojnásobným ředěním. To zajišťuje vyšší spolehlivost testu a vyšší reprodukovatelnost a přesnost cutt-off mezi šaržemi.

Negativní rozmezí: Pro hodnotu kalibrátoru vyjádřenou v GPL je definováno za použití KAPS standardního přípravku pro anti-kardiolipinové protilátky IgG/IgM (N.Harris). Horní limit pro normální rozmezí odpovídá průměrné hodnotě získané pro normální populaci plus 2 standardní odchylky (2SD). To odpovídá **5 GPL**.

Negativní rozmezí < 5 GPL/ml

Šedá zóna: Šedá zóna je definována protože některé patologické vzorky (záněty, infekční choroby, autoimunita, gammapatie, staří jedinci...) mohou mít vyšší background v autoimunitních testech než zdraví jedinci. To může imitovat nebo maskovat nízkou reaktivitu. Hodnota v tomto rozmezí může znamenat tvorbu protilátek pro kardiolipinu a fosfolipidu. Pokud je pacient v šedé zóně, měl by být testován později další vzorek, aby bylo možné sledovat případnou dynamiku.

Šedá zóna ≥ 5 GPL/ml až < 10 GPL/ml

Pozitivní rozmezí: pozitivní výsledek je při následujících koncentracích:

Pozitivní rozmezí ≥ 10 GPL/ml

Pozitivní rozmezí pak může být dále klasifikováno jako:

Slabě pozitivní	≥ 10 GPL/ml až < 35 GPL/ml
Středně pozitivní	≥ 35 GPL/ml až < 80 GPL/ml
Silně pozitivní	≥ 80 GPL/ml

Pozn: pokud je pacient pozitivní poprvé pro anti-kardiolipinové/anti-fosfolipidové protilátky, je potřeba provést opakovaný test z dalšího vzorku, odebraného za 3 až 6 měsíců po prvním vzorku.

LIMITY:

- Pro optimální výkon testu musí být striktně následovány technické instrukce.
- Pokud reagentie má neobvyklý vzhled nebo vykazuje známky kontaminace, musí být znehodnocena.
- Pokud plazma vykazuje známky koagula nebo 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 IgG 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 odebraným v časovém odstupu.

PATOLOGICKÉ VARIACE:

Anti-kardiolipin/anti-fosfolipidové protilátky se obvykle u zdravé populace nevyskytují.

Jejich přítomnost, ať ve střední nebo vysoké koncentraci, je pozorována u nemocných s antifosfolipidovým syndromem (APS), někdy je spojena s trombotickými chorobami, opakovanými potraty, s livedo reticularis, trombocytopenií nebo neurologickými chorobami.

Patologický vliv Anti-kardiolipin/anti-fosfolipidových protilátek je stále zkoumán. Mohou přispívat ke spuštění různých manifestací APS. Patogenita různých izotypů ještě není plně prozkoumána, zejména u IgM a IgA typů. Závažnost klinické manifestace spojená s přítomností anti-kardiolipin/anti-fosfolipidové protilátky stoupá v přítomnosti izotypu IgG, při vysokých koncentracích protilátek a době expozice. Izotyp IgG je nejvíce patogenní.

APLIKACE:

Test protilátek proti kardiolipinu/fosfolipidu typu IgG je vhodný při následujících klinických situacích:

- Anti-fosfolipidový syndrom (APS).
- Rekurentní potraty.
- Nevysvětlené trombozy.
- Jiné klinické stavy, při kterých bývá indikováno testování anti-kardiolipin/anti-fosfolipidové protilátky potřeba.

CHARAKTERISTIKA:

- Nízký limit detekce je ≤ 2 GPL/ml.
- Inter assay: <10%
- Intra assay: <10%

REFERENCE:

1. Koike T, Matsuura E. β -glycoprotein I and antiphospholipid syndrome. Isr J Med Sci 1997; 33: 225-238.
2. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid syndrome: antibodies, antigens, and autoimmune response. Thromb Haemostasis 1999; 82(2) 656-661.
3. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T, Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J Immunol 1992; 148: 3885-3891.
4. Rupin A, Reber G, Bardos P, de Moerloose Ph. Preferential use of dilutions of single sera than mixture of sera to standardize the quantitation of anticardiolipin antibodies. Thromb Res 1994; 75: 465-471.
5. Harris NE, Pierangeli S, Birch D. Anticardiolipin wet workshop report. Am J Clin Pathol 1994; 101: 616-624.
6. Harris NE, Gharavi AE, Tincani A, Chan JKH, Englert H, Mantelli P, Allegro F, Ballestrieri G, Hugues GRV. Affinity purified anti-cardiolipin and anti-DNA antibodies. J Clin Lab Immunol 1985; 17: 155-162.
7. Karmochkine M, Bérard M, Piette JC, Cacoub P, Godeau P, Boffa MC. The effect of sera with antiphospholipid antibodies on endothelial cell procoagulant activity is dependent upon the charge of the phospholipids against which they are directed. Thromb Res 1994; 74(4): 435-440.
8. Ames PRJ, Pyke S, Iannaccone L, Brancaccio V. Antiphospholipid antibodies, haemostatic variables and thrombosis – A survey of 144 patients. Thromb Haemostasis 1995; 73(5): 768-773.
9. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".

SYMBOLY:

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