



ANTI – β 2-GLYKOPROTEÍNOVÉ PROTILÁTKY IgG/IgM (β 2 -GP1)



Kód 44868	96 testov	ANTI – β2-GLYKOPROTEÍNOVÉ PROTILÁTKY ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie anti - β 2-glykoproteínových protilátok Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

PRINCÍP METÓDY

Anti – β 2-glykoproteínové protilátky zo séra sa viažu na antigény naviazané na povrchu mikrotitračných doštičiek. V priebehu druhej inkubácie sa viaže konjugát (polyklonálny králičí imunoglobulín proti ľudskému IgG alebo IgM značený chrenovou peroxidázou) s protilátkami na povrchu jamky. Nakoniec sa pridá do každej jamky 3,3',5,5' – tetrametylbenzidín (TMB) s H_2O_2 ako enzymový substrát. Dochádza k enzymatickej farebnej reakcii, ktorá je zastavená kyselinou. Absorbancia vzniknutého žltého komplexu sa meria pri 450 nm, pričom hodnota absorbancie je úmerná koncentrácii protilátok vo vzorke. ¹

OBSAH A ZLOŽENIE

- A. Koncentrovaný premývací roztok.** 50 ml. Koncentrovaný fosfátový pufer, azid sodný 15mmol/l.
- B. Riediaci roztok.** 100ml. Tris, azid sodný 15mmol/l
- C+. IgG/IgM pozitívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum s IgG a IgM anti – β 2-glykoproteínovými protilátkami, azid sodný 15mmol/l.
- C-. Negatívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum bez anti – β 2-glykoproteínových protilátok, azid sodný 15mmol/l.
- DG. IgG konjugát.** 15ml. Polyklonálny králičí imunoglobulín proti ľudskému IgG, značený chrenovou peroxidázou
- DM. IgM konjugát.** 15ml. Polyklonálny králičí imunoglobulín proti ľudskému IgM, značený chrenovou peroxidázou
- E. Substrát.** 15ml. 3,3',5,5' – tetrametylbenzidín (TMB)
- F. Zastavovací roztok.** 15ml. Kyselina fosforečná 4,5%
- Výstraha :
H314 – Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.
Upozornenie :
P280 – Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/štit na tvár
P303 + P361+ P353 - Pri styku s kožou (alebo vlasami) : Všetky kontaminované časti odevu okamžite vyzlečte. Kožu opláchnite vodou/osprchujte.
- M. Mikrotitračné doštičky.** 12 modulov po 8 odlamovateľných jamkách s naviazaným β 2 – glykoproteínom 1.
- S1 – S6. APLA IgG/IgM štandardy.** Každý po 1,5 ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum s IgG a IgM anti – β 2-glykoproteínovými protilátkami, azid sodný 15mmol/l. Koncentrácie anti – β 2 -GP1 IgG sú 0, 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 U/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky. Koncentrácie anti – β 2 -GP1 IgM sú 0, 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 U/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky. Kalibrované proti medzinárodne doporučenému referenčnému séru od E.N.Haris, Louisville.

Pre ďalšie výstrahy a opatrenia – viď bezpečnostný list.

Ľudské séra použité pri príprave pozitívnej a negatívnej kontroly boli testované s negatívnym výsledkom na anti-HIV a anti-HCV a rovnako na HBs antigen. I napriek tomu zaobchádzajte s kontrolami ako s potencionálne infekčným materiálom.

SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 8°C.

Reagenty sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu ich používania.

Príznaky zhoršenia kvality :

- Kvapalná reagenty : Prítomnosť zrazeniny, zákalu,
- Mikrotitračné doštičky : natrhnutie sáčku, makroskopické defekty, ako je poškrabanie dna jamiek.

PRÍPRAVA REAGENCIÍ

Premývací pufer : Zriedte koncentrovaný premývací pufer (A) destilovanou vodou v pomere 1/20. Riadne premiešajte. Pre 1 strip sa spotrebuje približne 50 ml premývacieho reagentu. Roztok je stabilný 30 dní pri 2 – 8°C.

Ostatné činidlá sú pripravené k priamemu použitiu.

PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- zvlhčovacia komôrka
- premývacie zariadenie pre mikrotitračné doštičky
- reader mikrotitračných doštičiek alebo fotometer s mikrokyvetou a filtrom 450 \pm 10nm.

VZORKY

Sérum alebo plazma odobraná štandardným spôsobom.

Vzorku pred testovaním zriedte v pomere 1/100 riediacim puferom (B). Pre stanovenie používajte vždy čerstvo nariadené vzorky.

POSTUP

1. Vytemperujte všetky činidlá na izbovú teplotu. (Poznámka 1)
2. Otvorte balíček s mikrotitračnými doštičkami (M) a vyberte množstvo potrebné pre stanovenie. (Poznámka 2).
3. **Postup práce :**
 - **Kvantitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100 μ l každého IgG/IgM štandardu (S1-S6), IgG/IgM pozitívnej kontroly (C+), negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek.
 - **Kvalitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100 μ l štandardu IgG/IgM S3, pozitívnej kontroly IgG/IgM (C+), negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek. Ako blank použite 100 μ l riediaceho roztoku.
4. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote.
5. Odsajte obsahy jamiek a premyte ich premývacím puferom 3x po 300 μ l. Doba premývania – minimálne 10 sekúnd. (Poznámka 3 a 4).
6. Do všetkých jamiek pipetujte 100 μ l IgG konjugátu (DG), alebo IgM konjugátu (DM)
7. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
8. Jamky premyte podľa bodu 5.
9. Do všetkých jamiek pipetujte 100 μ l substrátu (E).
10. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
11. Do všetkých jamiek pipetujte 100 μ l zastavovacieho roztoku (F) a inkubujte 5 minút pri izbovej teplote. (Poznámka 5).
12. Odčítajte hodnotu absorbancie jednotlivých jamiek pri



ANTI – β 2-GLYKOPROTEÍNOVÉ PROTILÁTKY IgG/IgM (β 2 -GP1)



Kód 44868	96 testov	ANTI – β2-GLYKOPROTEÍNOVÉ PROTILÁTKY ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie anti - β 2-glykoproteínových protilátok Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

450 nm pri použití štandardu S1 , alebo jamky s blankom pre vynulovanie prístroja. Farba je stabilná najmenej 30minút.

VÝPOČET

• **Kvantitatívne stanovenie** : Na kalibračnú krivku vyznačte hodnoty absorbancie každého štandardu oproti koncentrácii anti - β 2-glykoproteínových protilátok (IgG alebo IgM, jednotky : U/ml). Koncentrácia protilátok prítomných vo vzorke sa vypočíta interpoláciou absorbancie na kalibračnej krivke (odporúča sa použiť 4-parametrickú, logistickú).

• **Kvalitatívne stanovenie** : absorbanciu cut-off vypočítajte nasledovne :

$$A_{450nm} \text{ Cut-off} = A_{450nm} S3 \times 0,6 \text{ (IgG)}$$

$$A_{450nm} \text{ Cut-off} = A_{450nm} S3 \times 0,6 \text{ (IgM)}$$

Vypočítajte absorbančný pomer :

$$\text{absorbančný pomer} = \frac{A_{\text{vzorky}} 450nm}{A_{\text{cut-off}} 450nm}$$

Ak sú hodnoty absorbancií vyššie ako horný limit merania readeru , nariadte vzorky reagentom (B) a stanovenie opakujte.

REFERENČNÉ HODNOTY

Za pozitívne sú považované vzorky s koncentráciou vyššou ako 8 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer pre IgG a IgM vyšší ako 1,0.

Za negatívne sú považované vzorky s koncentráciou nižšou ako 5 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer pre IgG a IgM nižší ako 1,0.

Tie vzorky, ktorých koncentrácia je v rozmedzí 5 – 8 U/ml by sa mali považovať za hraničné a odporúča sa test opakovať. Vykonajte aj iné testy kvôli diferenciálnej diagnostike.

Uvedené hodnoty sú orientačné, preto by si malo každé laboratórium stanoviť svoje vlastné rozmedzia.

KONTROLA KVALITY

Absorbancia štandardu S6 pre IgG i IgM by mala byť vyššia ako 1,300.

Koncentrácia pozitívnej kontroly (C+) by mala byť v rozmedzí medzi 30 – 50 U/ml IgG i IgM.

Koncentrácia negatívnej kontroly (C-) by mala byť nižšia ako 5 U/ml pre IgG i IgM.

Absorbančný pomer negatívnej kontroly pre IgG i IgM (C-) by mal byť nižší ako 1,0.

Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre nápravu pre prípad, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- opakovateľnosť (jednej vzorky) :

anti - β 2 - GP1 (IgG)			anti - β 2 - GP1 (IgM)		
U/ml	CV%	n	U/ml	CV%	n
13,4	5,0	24	14,7	3,8	24
24,3	2,1	24	30,0	2,1	24
88,0	2,8	24	67,9	2,1	24

- reprodukovateľnosť (run to run) :

anti - β 2 - GP1 (IgG)			anti - β 2 - GP1 (IgM)		
U/ml	CV%	n	U/ml	CV%	n
13,4	7,4	30	14,7	6,3	30
24,3	7,9	30	30,0	4,1	30
88,0	2,6	30	67,9	4,3	30

- detekčný limit : 0,5 U/ml pre IgG i IgM
- test anti - β 2 - GP1 IgG/IgM detekuje iba autoprotilátky špecifické ku β 2 – GP1.
Žiadne skrížené reakcie proti iným autoprotilátkam neboli pozorované.
- interferencie : hemoglobín do 1000mg/dl, bilirubín do 40mg/dl, triglyceridy do 3000mg/dl neinterferujú. Niektoré druhy liekov a ďalších látok môžu interferovať.
Rozsah merania : 0,5 – 100 U/ml pre IgG i IgM. Ak získate výsledky s vyššou hodnotou, zriedte vzorku riediacim pufrum (B) a stanovenie opakujte.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

β 2 – GP1 sa viaže na záporne nabitý fosfolipid ako kardiopolipín a stáva sa primárnym antigénom pre anti-kardiopolipínové protilátky.³ To znamená, že prítomnosť anti- β 2 – GP1 protilátok v ľudskej plazme alebo séru je indikáciou fosfolipidového syndrómu (APS) a zvýšeného rizika trombózy, trombocytopenie a potratu u pacientov s autoimunitným ochorením, ako je SLE a inými neautoimunitnými chorobami.⁴

Anti- β 2 – GP1 protilátky sú prítomné v izotypoch IgG, IgM alebo IgA. IgG anti- β 2 – GP1 protilátky sú špecifickejšie ako IgM a vyskytujú sa v progresívnom štádiu autoimunitnej poruchy.

IgM anti- β 2 – GP1 protilátky sa využívajú v diagnostike počiatočných štádií autoimunitných porúch. IgA anti- β 2 – GP1 majú patogénnu úlohu pri vzniku trombóz a APS.⁵

Stanovenie anti- β 2 – GP1 protilátok sa vykonáva pri diagnostike SLE, trombózy, trombocytopenie, pri opakujúcich sa potratoch a odumretí plodu v maternici.⁵

Senzitivita BioSystems anti- β 2 – GP1 protilátok bola pri antifosfolipidovom syndróme 84,9% a špecificita 98,7%.

Štúdia bola vykonaná s 163 klinickými vzorkami.

V tej istej štúdií v prípade izotypu IgM bola senzitivita 42,5% a špecificita 98,0%.

Detaily štúdie sú k dispozícii na vyžiadanie.

Klinická diagnóza by nemala byť stanovená len na základe



ANTI – β 2-GLYKOPROTEÍNOVÉ PROTILÁTKY IgG/IgM (β 2 -GP1)



Kód 44868	96 testov	ANTI – β2-GLYKOPROTEÍNOVÉ PROTILÁTKY ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie anti - β 2-glykoproteínových protilátok Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

výsledku jediného testu, je potrebné zhodnotiť klinické i ďalšie laboratórne údaje.

POZNÁMKY

1. Nezamieňajte jednotlivé reagenty z rôznych súprav.
2. Nepoužité jamky skladujte v plastickom sáčku s exsikátorom.
3. Nepoškodte vnútorný povrch mikrotitračných doštičiek.
4. Premývací roztok z jamiek by mal byť celkom odstránený.
5. Zastavovací roztok enzýmovej reakcie(F) musí byť pipetovaný do jamiek približne v rovnakom časovom odstupe ako substrát (E) v bode 9 Postupu práce.

LITERATÚRA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
3. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta2- glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:4120-4124.
4. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. Lancet 1993; 342:341-344.
5. Matsuura E, Dier KJ, Lopez LR. β 2-Glycoprotein I autoantibodies. In: Autoantibodies, Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL., eds, 2nd edition, Elsevier, Amsterdam, 2007.

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 18.6.2018.
Vzhľadom k novej inovácii výrobku sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese www.biosystems.es.
Slovenský návod je k dispozícii na www.jktrading.cz.

Výhradný distribútor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5,
tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava,
tel.: + 421 264 774 591

V prípade mimoriadnych udalostí:

ČR : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika
pracovního lékařství VFN a . LF UK,
tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02

SK : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05,
Limbová 5, tel.: +421 254 774 166