



Zymutest ACA-APA IgG

RK029A

Stanovení autoprotilátky proti kardiolipinu a fosfolipidům ELISA metodou

Pouze pro použití „In Vitro“ (IVD)



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: 25.8.2005

Použití:

ELISA souprava ZYMUTEST ACA-APA, IgG je standardizovaný a optimalizovaný enzymo-immuno assay 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.

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 protikardiolipinu a fosfolipidům, vážou se na kardiolipin navázaný na stěně jamky. Poté se destička promyje. Navázané PL jsou pak detekovány prostřednictvím kozího anti-humánního IgG (Fc γ 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-kardiolipin/fosfolipid 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- β_2 -GPI IgG typu.

Reagencie:

1. Destička: Mikro ELISA destička, obsahující 12 proužků po 8 jamkách, s navázaným manickým fosfolipidem, který je stabilizovaný. Destička je uložena v aluminiovém pouzdru a hermeticky uzavřena za přítomnosti desikantu.

2. SD: 2 lahvičky obsahující 50 ml diluentu vzorku pro autoimunitu, připraven k použití. Obsahuje Azid sodný.

3. CAL: 3 lahvičky anti-kardiolipin IgG kalibrátoru, lyofilizovaný. Po naředění 1 ml diluentu vzorku pro autoimunitu je připraven kalibrátor (již ředěný 1:100)

Pozn.: Tento kalibrátor má definovanou anti-kardiolipinovou koncentraci, vyjádřenou v GPL jednotkách (ve shodě s KAPS standardy) a tato koncentrace je uvedena na přiloženém certifikátu.

4. 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)

5. IC: 3 lahvičky imunokonjugátu (anti-IgG (Fc γ)-HRP imunokonjugát), s obsahem čistěné kozí protilátky specifické proti lidskému IgG-Fc γ s navázanou HRP, lyofilizovaný.

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

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

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

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

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 - 300 μ l
- 1-kanálová pipeta s nastavitelným objemem od 0 do 20 μ l, 20 až 200 μ l a 200 až 1000 μ l
- Promývačka mikrotitračních destiček a třepačka
- ELISA reader s vlnovou délkou 450 nm
- Destilovaná voda

Distributor: Diagnostica a.s., Za Trati 686, Praha 9, Česká republika, tel. 283 109 137, Fax. 283 109 132, e-mail: info@diagnostica.cz

Příprava reagií, skladování a stabilita:

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

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 olověným 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 IgG protilátku proti kardiolipinu, **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: β_2 -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-IgG (Fc γ)-HRP imunokonjugát: každá lahvička musí být naředěna **7,5 ml diluentu konjugátu**. Lyofilizát musí být před použitím kompletně rozpuštěn. 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 nařeďte 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** ve své originální lahvičce 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 opatrností. Vvarujte se kontaktu s pokožkou a s očima. Noste ochranný oděv a rukavice při práci s chemikálii.

Pozn.: Přeneste kit do pokojové teploty nejméně 30 minut před použitím. Nepoužitá reagencie 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, nrebo skladována zmrazená při teplotě -20°C a nižší maximálně 6 měsíců. Před testováním plazmu rozmrazte při 37°C po dobu 15 minut. Rozmrazený vzorek by měl být testován do 12 hodin po romrazení. EDTA lidská plazma může být též použita. Anti kardiolipinovou protilátku můžeme též testovat v séru.

Testované vzorky, kontroly:

Plazma nebo sérum jsou testovány v ředění 1:100 v Diluentu vzorku pro autoimunitu. Pokud je očekávána vysoká hladina protilátky anti kardiolipin/ fosfolipidy, 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 (C) v GPL jednotkách (GPL) 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. Obvyklé dynamické rozmezí je od 0 do 80 GPL.

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

Reagent	Objem	Procedura
Anti-kardiolipin IgG kalibrátor nebo negativní kontrola nebo 1:100 ředěné vzorky nebo diluent vzorku (blank)	200 µl	Pipetujete: 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 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) (e). Odečtěte hodnotu blank.		

Poznámka:

- 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.
- Vyvarujte se ponechání destičky na slunečním světle během inkubace a během rozvoje zbarvení. Může být použita třepačka mikroELISA destiček.
- Nikdy nenechte destičku prázdnou mezi pipetováním reagentů nebo po promytí. Následující reagenty 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 reagenty. 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:

$$P = A450 \text{ pro kalibrátor } 1:1 : \geq 1,5 \quad N = A450 \text{ pro negativní kontrolu: } \leq 0,25$$

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-kardiolipinové protilátky vyjádřené v GPL na jednu osu a odpovídající A450 na osu druhou. Koncentrace anti-kardiolipinové protilátky vzorků testovaných v ředění 1:100 a vyjádřených v GPL 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 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. Tedy

Negativní rozmezí < 5 GPL/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. 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 ≥ 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 testu:

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 aborty, s livoled reticularis, trombocytopenií nebo neurologickými chorobami.

Patologický vliv Anti-kardiolipin/anti-fosfolipidových protilátek je stále zkoumána. 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 protilátky a době expozice. Izotyp IgG je nejvíce patogenní.

Aplikace:

Test je vhodný při následujících klinických situacích:

Rekurentní aborty,

Antifosfolipidový syndrom.

Nevysvětlené trombozy

Jiné klinické stavy, při kterých bývá indikováno testování anti-kardiolipin/anti-fosfolipidové protilátky potřeba.

Specifita a charakteristika:

Zymutest ACA-APA IgG specificky měří anti-kardiolipin/anti-fosfolipidové protilátky typu IgG, reagující s imobilizovaným kardiolipinem. IgM nebo IgA typy nejsou zachyceny. Tyto typy protilátek mohou být stanoveny kity Zymutest ACA-APA IgM a Zymutest ACA-APA IgA

Tento test byl vyvinut s vysoce reaktivním kardiolipinem, který má vysokou a dobře kontrolovanou prezentaci stabilizovaným a saturovaným. Tato spolehlivá metoda má tak vysokou reprodukovatelnost, vysokou senzitivitu a specifitu a nabízí optimalizovaní diskriminační rozhraní mezi normálními a patologickými vzorky, obsahujícími anti-kardiolipin/anti-fosfolipidové protilátky.

Literatura:

1. Koike T, Matsuura E. β 2-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.