



ANTI – KARDIOLIPÍNOVÉ PROTILÁTKY (ACA – IgG/IgM)



Kód 44780	96 testov	ANTI – KARDIOLIPÍNOVÉ PROTILÁTKY ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagencie pre stanovenie anti kardiopolipínových protilátok (ACA) Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

PRINCÍP METÓDY

Anti-kardiopolipínové 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 H₂O₂ ako enzýmový substrát. Dochádza k enzymatickej farebnej reakcii, ktorá je zastavená kyselinou. Absorbancia vzniknutého žltého komplexu sa meria pri 450nm, pričom hodnota absorbancie je úmerná koncentracii 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 -kardiopolipínovými protilátkami, azid sodný 15mmol/l.
- C-. Negatívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum bez anti kardiopolipínových 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 kardiopolipínom a β₂-glykoproteínom 1.
- S1 – S6. ACA IgG/IgM štandardy.** Každý po 1,5 ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum s anti -kardiopolipínovými protilátkami, azid sodný 15mmol/l. Koncentrácie ACA IgG sú 0, 7,5, 15, 30, 60 a 120 GPL a sú uvedené na štítku fľaštičky. Koncentrácie ACA IgM sú 0, 5, 10, 20, 40 a 80 MPL a sú uvedené na štítku fľaštičky. Kalibrované za použitia medzinárodného referenčného antikardiopolipínového štandardu (GPL alebo MPL jednotky) proti medzinárodne doporučovanému referenčnému séru od E.N.Haris, Louisville a IgG špecifickému referenčnému materiálu IRP 97/656.

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 potenciálne infekčným materiálom.

SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 8°C.
Reagencie sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu ich používania.

Príznačky zhoršenia kvality :

- Kvapalné 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 roztoku. 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 ±10nm.

VZORKY

Sérum alebo plazma odobraná štandardným spôsobom. Vzorku pred testovaním zriedte v pomere 1/100 riediacim pufrom (B). Pre stanovenie používajte vždy čerstvo nariadené vzorky.

POSTUP

1. Vytemperujte všetky činidlá na izbovú teplotu. (Poznámka 1)
2. Otvorte balíček s mikrotitračnými doštičkami a vyberte množstvo potrebné pre stanovenie. (Poznámka 2).
3. **Postup práce :**
 - **Kvantitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100µl 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 µl štandardu IgG/IgM S3, pozitívnej kontroly IgG/IgM (C+), negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek. Ako blank použite 100µl riediaceho roztoku (B).
4. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote.
5. Odsajte obsahy jamiek a premyte ich premývacím pufrom 3x po 300 µl . Doba premývania – minimálne 10 sekúnd. (Poznámka 3 a 4).
6. Do všetkých jamiek pipetujte 100µl 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 100µl substrátu (E).
10. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
11. Do všetkých jamiek pipetujte 100µl zastavovacieho roztoku (F) a inkubujte 5 minút pri izbovej teplote. (Poznámka 5).



ANTI – KARDIOLIPÍNOVÉ PROTILÁTKY (ACA – IgG/IgM)



Kód 44780	96 testov	ANTI – KARDIOLIPÍNOVÉ PROTILÁTKY ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagencie pre stanovenie anti kardiopolipínových protilátok (ACA) Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

12. Odčítajte hodnotu absorbcie jednotlivých jamiek pri 450nm pri použití štandardu S1 , alebo jamky s blankom pre vynulovanie prístroja. Farba je stabilná najmenej 30minút.

VÝPOČET

• **Kvantitatívne stanovenie** : Na kalibračnú krivku vyznačte hodnoty absorbcie každého štandardu oproti koncentrácii anti-kardiopolipínu. (GPL/alebo MPL jednotky). Koncentrácia protilátok prítomných vo vzorke sa vypočíta interpoláciou absorbcie na kalibračnej krivke (odporúča sa použiť 4-parametrickú, logistickú).

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

$$A_{450nm} \text{ Cut-off} = A_{450nm} \text{ S3} \times 0,70 \text{ (IgG)}$$

$$A_{450nm} \text{ Cut-off} = A_{450nm} \text{ S3} \times 0,70 \text{ (IgM)}$$

Vypočítajte absorbančný pomer :

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

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

REFERENČNÉ HODNOTY

Za pozitívne sú považované vzorky s koncentráciou vyššou ako 10 GPL alebo 7 MPL, alebo ak je ich absorbančný pomer vyšší ako 1,2.

Za negatívne sú považované vzorky s koncentráciou nižšou ako 10 GPL alebo 7 MPL, alebo ak je ich absorbančný pomer nižší ako 1,0

Vzorky, ktorých absorbančný pomer pre IgG a IgM je medzi 1,0 a 1,2 by mali byť považované za hraničné a odporúča sa testovanie vykonať znova. Zvážte ešte iné skúšky pre diferenciálnu diagnostiku.

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 40 až 60 GPL, alebo 20 – 40 MPL.

Koncentrácia negatívnej kontroly (C-) by mala byť nižšia ako 10 GPL alebo 7 MPL.

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) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
29,1 GPL	5,4%	30
62,5 GPL	5,8%	30
109,4 GPL	4,1%	30

Priemerná koncentrácia	CV	n
8,4 MPL	3,7%	30
40,1 MPL	4,5%	30
58,6 MPL	5,3%	30

• reprodukovateľnosť (run to run) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
29,1 GPL	3,8%	30
62,5 GPL	2,5%	30
109,4 GPL	2,7%	30

Priemerná koncentrácia	CV	n
8,4 MPL	3,4%	30
40,1 MPL	3,3%	30
58,6 MPL	2,5%	30

- detekčný limit : 1,0 GPL a 0,5 MPL
- test ACA IgG/IgM detekuje iba autoprotilátky špecifické ku kardiopolipínu alebo ku komplexu kardiopolipín a β_2 -glykoprotein1. Žiadne skřížené reakcie proti anti - DNA a protilátkam vyskytujúcim sa pri syfilise 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 : 1,0 – 120 GPL a 0,5 - 80 MPL. Ak získate výsledky s vyššou hodnotou, zriedte vzorku riediacim purom (B) a stanovenie opakujte.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

ACA boli prvýkrát popísané u pacientov so systematickým lupusom erythematosus, ale sú prítomné i u pacientov s antifosfolipidovým syndrómom. Anti-fosfolipidové protilátky reagujú s negatívne nabitými fosfolipidmi vrátane kardiopolipínu.³ Vysoké hladiny anti-kardiopolipínových IgG/IgM protilátok sú prítomné v sére alebo plazme sú spojené so zvýšeným rizikom trombózy a pľúcnej embólie⁴ a sú dôležitým rizikovým faktorom mŕtvice⁵ a opakujúceho sa potratu.⁶ Titer anti-kardiopolipínových protilátok môže byť znížený počas liečby kortikosteroidmi. Sensitivita testu BioSystems Anti-kardiopolipínové protilátky pre antifosfolipidový syndróm bola 86,3% (IgG) a 41,1% (IgM) a špecifita bola 96,0% (IgG) a 98,0% (IgM). Štúdia bola vykonaná s 223 klinickými vzorkami. Detaily štúdie sú k dispozícii na vyžiadanie.



ANTI – KARDIOLIPÍNOVÉ PROTILÁTKY (ACA – IgG/IgM)



Kód 44780	96 testov	ANTI – KARDIOLIPÍNOVÉ PROTILÁTKY ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagencie pre stanovenie anti kardiolipínových protilátok (ACA) Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

Klinická diagnóza by nemala byť stanovená len na základe výsledku jediného testu, je potrebné zhodnotiť klinické i ďalšie laboratórne údaje.

POZNÁMKY

1. Nezamieňajte jednotlivé reagencie z rôznych súprav.
2. Nepoužitú jamku 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. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Anti-phospholipid antibodies. Clin Rheum Dis 1985;11(3):591-609.
4. Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. Ann Intern Med 1992; 117(12): 997-1002.
5. Montalban J, Codina A, Ordi J, Vilardell M, Khamashta MA, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies in cerebral ischemia. Stroke 1991; 22(6):750-3.
6. Lynch A, Marlar R, Murphy J, Davila G, Santos M, Rutledge J, Emlen W. Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome. A prospective study. Ann Intern Med 1994;120(6):470-475.
7. Asherson RA, Cervera R. The Antiphospholipid Syndrome. In: Lahita RG, editor. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2000.

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 18.6.2018.

Vzhľadom k novej inovácie 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 Praha 5,
tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Dlhá 43, 900 31, Stupava
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