



# ANTI-FOSFOLIPIDOVÉ IgG/IgM PROTILÁTKY (APLA)



Kód 44867	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagencie pro stanovení anti fosfolipidových protilátek . Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

## ANTI-FOSFOLIPIDOVÉ IgG/IgM PROTILÁTKY (APLA)

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

#### PRINCIP METODY

Anti – fosfolipidové protilátky (APLA) ze séra se váží na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (křenovou peroxidázou značené imunoglobuliny proti lidskému IgG/IgM) s protilátkami navázanými na povrchu jamky. Nakonec se přidává 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do každé jamky jako enzymový substrát. Vzniklá enzymatická barevná reakce je zastavena kyselinou. Žluté zabarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci protilátek ve vzorku<sup>1</sup>.

#### OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok. 50 mL. Koncentrovaný fosfátový pufr, azid sodný 15 mmol/L.
- B. Ředící roztok 100 mL. Tris, azid sodný 15 mmol/L.
- C+. Pozitivní kontrola IgG/IgM 1,5 mL. Ready to use. Sérum s protilátkami proti APLA IgG/IgM, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola. 1,5 mL. Lidské sérum bez protilátek proti APLA, azid sodný 15 mmol/L.
- DG. Konjugát IgG 15 mL. Křenovou peroxidázou značené králičí polyklonální imunoglobuliny proti lidskému IgG.
- DM. Konjugát IgM 15 mL. Křenovou peroxidázou značené králičí polyklonální imunoglobuliny proti lidskému IgM.
- E. Substrát. 15 mL. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).
- F. Zastavovací roztok. 15 mL. Kyselina fosforečná 4,5%.  
H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.  
P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.  
P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy):  
Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte.  
Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- M. Mikrotitrační destičky: 12 modulů po 8 rozlamovatelných jamkách s navázaným vysoce purifikovaným kardiolipinem, fosfátovým inositem, serinem, fosforečnou kyselinou a b2-glykoproteinem 1.
- S1-S6. Standardy APLA IgG/IgM, Každý po 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum s protilátkami IgG/IgM proti fosfolipidům. Azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace fosfolipidových protilátek IgG/IgM jsou: 0, 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 U/mL, jak je uvedeno na štítku lahviček. Kalibrováno proti mezinárodně uznávanému referenčnímu seru z E.N.Harris, Louisville.

*Pro další varování a doporučení – viz Karta bezpečnostních údajů (SDS).*

*Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a sledána negativní na přítomnost protilátek anti-HIV a anti-HCV, a stejně tak na HBs antigen. Nicméně zacházejte s kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.*

#### SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-8°C. Reagencie jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

Známky zhoršení kvality:

- Kapalně komponenty: Přítomnost částic, zákal
- Mikrotitrační destičky: natržení sáčku, makroskopické defekty jako je poškrábání dna jamek.

#### PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Promývací pufr: Zředte koncentrovaný promývací pufr A destilovanou vodou v poměru 1/20. Pořádně promíchejte. Roztok je stabilní 30 dnů při 2-8°C. Pro 1 strip se spotřebuje přibližně 50 mL promývací reagentie. Ostatní činidla jsou připravena k přímému použití - ready to use.

#### PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- zvlhčovací komůrka
- promývací zařízení pro mikrotitrační destičky
- reader nebo fotometr s mikrokvetou a filtrem 450±10 nm.

#### VZORKY

Sérum nebo plazma odebraná standardním způsobem. Vzorek před testováním zředte 1/100 ředícím pufr (B). K testování vždy používejte čerstvě naředěné vzorky.

#### PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu (Pozn.: 1).
2. Otevřete balíček s mikrotitračními destičkami a vyjměte požadované množství pro stanovení (Poznámka 2).
3. Postup práce:
  - Kvantitativní stanovení: Pipetujte po 100 µL každého standardu IgG/IgM (S1-S6), Pozitivní kontroly IgG/IgM (C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek.
  - Kvalitativní stanovení: Pipetujte 100 µL standardu S3 IgG/IgM, Pozitivní kontroly IgG/IgM(C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek. Pipetujte 100 µL ředícího roztoku (B) jako blank.
4. Stripy umístěte do zvlhčovací komůrky a inkubujte je při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
5. Odsajte obsah jamek a jamky promyjte 3-krát po 300 µL promývacího pufru vždy po dobu nejméně 10 sekund (Poznámka 3 a 4).
6. Pipetujte do všech jamek 100 µL konjugátu DG nebo DM.
7. Stripy inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
8. Promyjte jamky podle odstavce č. 5.
9. Pipetujte 100 µL substrátu (E) do všech jamek.
10. Stripy inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
11. Pipetujte 100 µL zastavovacího roztoku (F) do všech jamek a inkubujte 5 minut při pokojové teplotě. (Poznámka 5).
12. Odečtěte absorbanci jednotlivých jamek při 450 nm za použití S1 standardu nebo jamky blanku pro vynulování přístroje. Zbarvení je stabilní po dobu nejméně 30 minut.

#### VÝPOČET

**Kvantitativní stanovení:** Vyneste do grafu hodnoty absorbance pro každý standard proti koncentraci anti – fosfolipidových protilátek IgG/IgM (U/mL). Koncentrace protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce. (doporučená křivka: 4-parametrická logistická).

**Kvalitativní stanovení:** Vypočtete absorbanci Cut-off následovně:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} S3 \times 0,8 \text{ (IgG)}$$

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} S3 \times 0,8 \text{ (IgM)}$$

Vypočtete absorbanční poměr:

$$\text{Absorbanční poměr} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ Vzorku}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off}}$$

Jestliže jsou hodnoty absorbancí vyšší než je horní měřicí limit readeru, naředte vzorky reagentem (B) a stanovení opakujte.

#### REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, s koncentrací větší jak 10 U/mL, nebo které mají absorbanční poměr vyšší jak 1,0 jsou považovány za pozitivní pro IgG/IgM.



# ANTI-FOSFOLIPIDOVÉ IgG/IgM PROTILÁTKY (APLA)



Kód 44867	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagencie pro stanovení anti fosfolipidových protilátek . Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

## ANTI-FOSFOLIPIDOVÉ IgG/IgM PROTILÁTKY (APLA)

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

Vzorky, s koncentrací nižší jak 10 U/mL, nebo které mají absorbanční poměr nižší jak 1,0 jsou považovány za negativní pro IgG/IgM. Uvedené hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí.

#### KONTROLA KVALITY

Absorbance blanku by měla být nižší jak 0,150 pro IgG/IgM. Absorbance standardu S6 by měla být vyšší než 1,300 U/mL pro IgG/IgM.

Koncentrace IgG, IgM Pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí od 28 do 48 U/mL a u Negativní kontroly (C-) by měla být nižší jak 10 U/mL pro IgG/IgM.

Absorbanční poměr pro Negativní kontrolu (C-) by měl být nižší než 1,0.

Každá laboratoř by si měla stanovit svojí vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

#### METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

anti-fosfolipid (IgG)			anti-fosfolipid (IgM)		
U/mL	CV %	n	U/mL	CV %	n
13,5	6.4	24	15,0	4.2	24
30,1	4.8	24	27,7	5.8	24
70,5	3.1	24	72,4	6.3	24

- Reprodukovatelnost (run to run):

anti-fosfolipid (IgG)			anti-fosfolipid (IgM)		
U/mL	CV %	n	U/mL	CV %	n
13,5	2.8	30	15,0	4.6	30
30,1	4.5	30	27,7	3.2	30
70,5	5.1	30	72,4	3.1	30

- Detekční limit: pro IgG/IgM je 0,5 U/mL
- Souprava pro stanovení anti fosfolipidových protilátek IgG/IgM detekuje jen tyto protilátky. Žádné zkřížené reakce k dsDNA a nebo k protilátkám při onemocnění syfilis nebyly pozorovány.
- Interference: Hemoglobin(1000 mg/dL), bilirubin (40mg/dL) a triglyceridy(3000 mg/dL) neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat<sup>2</sup>.
- Rozsah měření: 0,5 – 100 U/mL pro IgG/IgM. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím puřem (B) a opakujte stanovení.

#### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovení antifosfolipidových protilátek je určeno pro diagnostiku antifosfolipidového syndromu (APS)<sup>3</sup>, který je klinicko-laboratorní jednotkou charakterizovanou klinickými projevy ve formě trombóz či reprodukčních ztrát a současně přítomností antifosfolipidových protilátek (APLA). APS je nejčastěji se vyskytující autoimunitní onemocnění, jehož stanovení může unikat pozornosti, vzhledem k pestré klinické manifestaci. Může být postižen jakýkoliv orgánový systém a cévy jakékoliv velikosti – široké spektrum klinických příznaků. Tyto příznaky jsou asociovány u autoimunitních onemocnění jako je systémový lupus erythematosus (SLE) a ostatní neautoimunitní onemocnění<sup>4</sup>.

Senzitivita pro stanovení antifosfolipidového syndromu při stanovení IgG protilátek soupravou BioSystems byla stanovena na 91,8% a specifita na 97,3% v klinické studii s 223 klinickými vzorky. Pro isotyp IgM byla zjištěna senzitivita 53,4% a specifita 96,7% v té samé studii. Detaily studie jsou dostupné na vyžádání.

Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

#### POZNÁMKA

1. Nezaměňujte reagenty ze souprav různých šarží.
2. Skladujte nepoužité jamky v plastickém sáčku a uzavřete je společně s vysoušecím sáčkem.
3. Nepoškodte vnitřní povrch mikrotitračních destiček.
4. Promývací roztok by měl být kompletně odstraněn z jamek.
5. Zastavovací roztok (F) enzymové reakce musí být pipetován do jamek přibližně ve stejném časovém odstupu jako substrát (E) v odstavci č.9.

#### LITERATURA

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. Riley RS, Friedline J, Rogers JS 2nd. Antiphospholipid antibodies: standardization and testing. Clin Lab Med 1997; 17: 395-430.
4. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. Lancet 1993; 342:341-344.

#### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu : 3.1.2022.

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí.

Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese:

[www.biosystems.es](http://www.biosystems.es).

Český návod je k dispozici na: [www.iktrading.cz](http://www.iktrading.cz)

Výhradní distributor:

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 případě mimořádných událostí:

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