



**ELISA** ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

**Microwell Method**

# Anti - Cardiolipin IgG/IgM

**Cat. No. R97413**

*For in vitro Diagnostic Use*

P ř í b a l o v ý l e t á k

Souprava ELISA pro kvantitativní stanovení IgG a IgM  
protilátek ke kardioplipinu v lidském séru nebo plazmě



---

Microwell Method - 96 wells  
(12 x 8-well potažených antigenem)

Odlamovací

---

## ZÁKLADNÍ INFORMACE

- **Vlnová délka**  
Měřicí filtr: 450 nm  
Volitelný referenční filtr: 600 - 690 nm
- **Doba inkubace**  
60 minut při LT (30/15/15)
- **Enzyme Conjugate**  
HRP (Křenuv peroxidáza)
- **Substrate**  
TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin)
- **Vzorek**  
Sérum nebo plazma
- **Stabilita vzorků**  
neředn: 5 dn ve 2-8C; a 6 měsíců v - 20 C
- **Kalibrační rozmezí**  
0 - 120 GPL U/ml / 0 - 80 MPL U/ml
- **Sensitivita**  
1 GPL U/ml / 0.5 MPL U/ml

### Indikace

- Trombocytopenie
- Cerebrovaskulární Insuficience

**SLOŽENÍ SOUPRAVY**

<b>Microwell plate</b> Mikrotitrační destička	12	<b>8 jamkové stripy</b> potažené vysoce čistým hovějším kardioliipinem a satureované lidským $\beta$ 2-glykoproteinem I, <b>k přímému použití.</b>
<b>Positive Control</b> Pozitivní kontrola	1	lahvička, 1.5 ml, <b>(červené víčko), k přímému použití.</b> Hodnoty a rozmezí viz Quality Control Certificate (PBS, NaN <sub>3</sub> <0,1% (w/w))
<b>Negative Control</b> Negativní kontrola	1	lahvička, 1.5 ml <b>(modré víčko), k přímému použití.</b> Hodnoty a rozmezí viz Quality Control Certificate (PBS, NaN <sub>3</sub> <0,1% (w/w))
<b>Calibrators combined</b> for IgG and IgM class Ab Kombinované kalibrátory pro IgG IgM Ab	6	lahvičky, each 1.5 ml, <b>k přímému použití.</b> IgG: 0; 7.5; 15; 30; 60; 120 GPL U/ml IgM: 0; 5; 10; 20; 40; 80 MPL U/ml
<b>IgG-IgG Enzyme Conjugate</b> IgG-IgG Enzym konjugát	1	lahvička s králíčím polyklonálním anti-h-IgG-IgG HRP konjugátem, 15 ml, barevně odlišeno <b>růžově, k přímému použití.</b>  (PBS, PROCLIN 300<0,5% (v/v))
<b>IgM-IgG Enzyme Conjugate</b> IgM-IgG Enzym konjugát	1	lahvička s králíčím polyklonálním anti-h-IgM-IgG HRP konjugátem, 15 ml, barevně odlišeno <b>růžová, k přímému použití.</b>  (PBS, PROCLIN 300<0,5% (v/v))
<b>Substrate Solution</b> Substrát	1	lahvička TMB, 15 ml, <b>k přímému použití.</b>
<b>Stop Solution</b> Stopovací roztok	1	lahvička kyseliny fosforečné (<5%), 15 ml, <b>k přímému použití.</b>
<b>Sample Diluent</b> Ředící roztok	1	lahvička, 20 ml, <b>koncentrát (5x)</b> , barevně odlišeno <b>žlutá.</b>
<b>Wash Buffer</b> Promývací roztok	1	lahvička, 20 ml, <b>koncentrát (50x).</b>

 **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Odměrné válce a kádinky
- Makropipety** 5  $\mu$ l až 1000  $\mu$ l.
- Multikanálové mikropipety;**

- Stepper;**
- Reader mikrotitračních destiček** s možností nastavení odečítání absorbance při 450 nm. Pokud je možnost použití dvou vlnových délek, možnost nastavit referenční filtr na 600-690 nm.
- Automatická promývačka mikrotitračních destiček** s rozplňováním 300 µl.
- Fotometry a promývačky jsou v nabídce firmy DIALAB.

## SHRNUTÍ

Antifosfolipidové protilátky jsou heterogenní skupina auto protilátek proti kardiolipinu (difosfatidyl glycerol) a negativně nabitých fosfolipidů. Jsou primárně detekovány pomocí testů na anti-kardiolipin protilátky (ACA), biologicky falešně pozitivní testy na syfilis a antikoagulačními testy na lupus. Tyto tři testy detekují příbuzné, ale ne nezbytně identické protilátky. Proto je někdy nutné provést více než jeden z těchto testů k identifikaci protilátek antifosfolipidů. Předpokládá se, že anti-fosfolipidové protilátky mohou být zodpovědné za narušení normálního mechanismu srážlivosti krve. Možný mechanismus tvorby tromboembolie je:

Anti-kardiolipinové protilátky jsou navázány na fosfolipidy v endotelových buňkách cév a tkáni srdce. Úplné navázání na komplexy autoprotiátek kardiolipinu způsobí zánět a destrukci buněk endotelu. Výsledek zánětu je otok okolo cév a tvorba malých sraženin.

Sraženiny mohou také zablokovat lokální cirkulaci nebo se uvolní a zablokují cirkulaci kdekoli jinde. Tato blokáda cirkulace se nazývá infarkt.

Přítomnost  $\beta_2$ -Glykoproteinu je nutná k navázání protilátek proti kardiolipinu na kardiolipin. Současné studie ukazují na to, že protilátky proti kardiolipinu rozpoznají vlastní kardiolipin nebo komplex kardiolipinu a  $\beta_2$ GPI.

## PRINCIP STANOVENÍ

ELISA test je prováděn jako nepřímé imunostanovení sendvičového typu na pevné fázi. Na mikrotitrační destičce je vázána směs hovězího, prasečího a upraveného lidského inzulínu, k redukování nespecifických vazeb jsou některé konce zablokovány.

Step 1 Protilátky specifické ke kardiolipinu, které jsou přítomny v kontrolách, kalibrátorech a patientských se navážou na potažený antigen.

Step 2 Komplex antigen-protilátka reaguje s konjugátem (HRP-h-IgG nebo IgM) za vzniku „sendvičů mezi protilátkami v pevné fázi a konjugátem.

Step 3 Přidáním substrátu (TMB) dochází k barevné změně.

Step 4 Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci protilátek ve vzorku. Tato reakce se následně ukončí přidáním stopovacího roztoku. Optická hustota se změří při 450 nm. Výsledek je vyjádřen v jednotkách GPL U na mililitr (GPL U/ml) or MPL U na mililitr (MPL U/ml).

## OČEKÁVANÉ HODNOTY

### Normální Hodnoty

Studií vzorků krve zdravých dárců bylo stanoveno toto rozmezí:

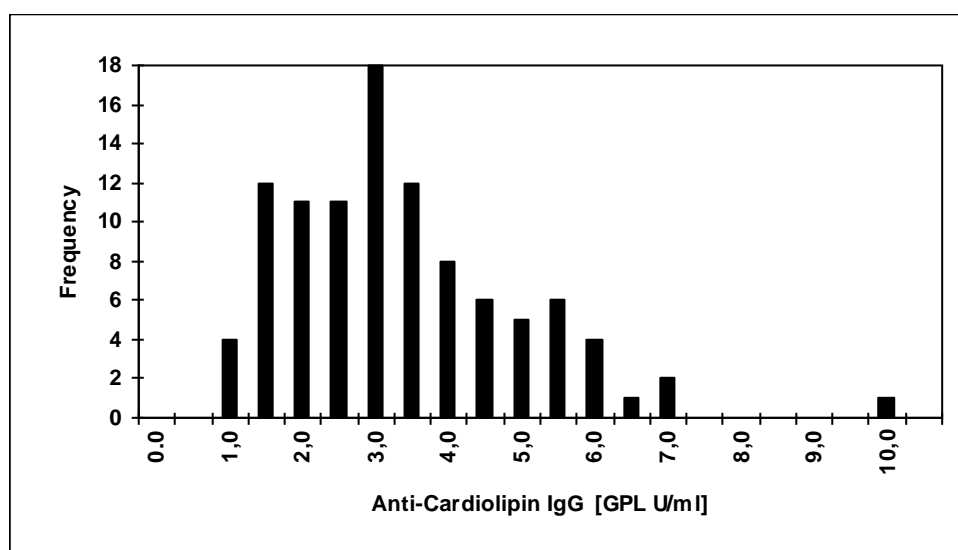
	anti-Cardiolipin-Ab	
	IgG [GPL U/ml]	IgM [MPL U/ml]
normální:	< 10	< 7
zvýšený:	> 10	> 7

Pozitivní výsledky musí být verifikovány až s posouzením celkového zdravotního stavu pacienta. Stejně tak i každé rozhodnutí o terapii by mělo být přijímáno individuálně. Doporučujeme každé laboratoři stanovit si vlastní rozmezí normálních a patologických hodnot kardiolipinu v séru.

Níže uvedené hodnoty jsou pouze orientační.

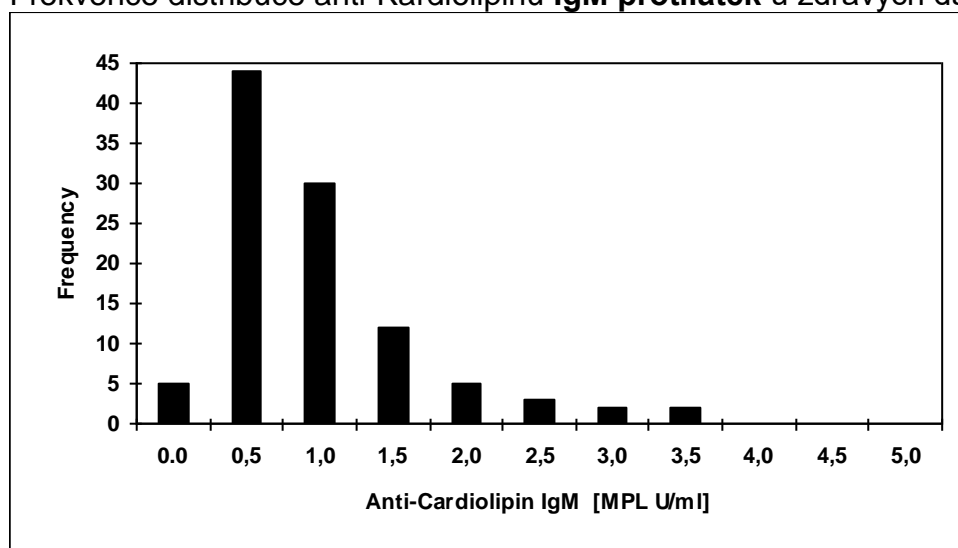
### Hodnoty anti-inzulinu u zdravých dárců krve.

Frekvence distribuce anti-Kardiolipinu **IgG protilátek** u zdravých dárců.



střední hodnota  $\pm$  2SD = 3.4  $\pm$  3.2 GPL U/ml, n = 101

Frekvence distribuce anti-Kardiolipinu **IgM protilátek** u zdravých dárců



střední hodnota  $\pm$  2SD = 0.98  $\pm$  1.42 MPL U/ml, n = 103

## ČINIDLA

### Skladování

- Všechna činidla skladujte ve 2° - 8°C. Nezamrazujte!

### Příprava

- Potažené stripy jsou použitelné pouze jednou.
- Pozitivní kontrola, negativní kontrola, kalibrátory, enzym konjugát, substrát a stopovací roztok jsou připraveny k přímému použití a nevyžadují ředění.
- Promývací a ředící roztok jsou koncentráty a je potřeba je naředit (viz str. 7)

### Upozornění

- K zajištění správných výsledků je nezbytné přesně dodržovat návod k použití.
- Nepotřísněte se **TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine)**. Pokud si potřísníte kůži, omyjte postižené místo vodou a mýdlem.
- Stopovací roztok obsahuje **kyselinu fosforečnou**. Při potřísnění omyjte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.
- Vyhněte se kontaktu pufovaného roztoku **peroxidu** a snadno oxidujících materiálů, v extrémních teplotách může dojít k samovolnému hoření.
- Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- Nepoužívejte, pokud nejsou reagentie čisté nebo obsahují usazeniny.
- Nezaměňujte složky soupravy z různých zdrojů, i když mají stejné katalogové číslo DIALAB.
- Pro minimalizaci možnosti mikrobiální nebo křížové kontaminace dodržujte pravidla SLP.
- Všechny složky lidského původu byly testovány na HBsAg, HCV, HIV-1 a 2 a HTLV-I a sledány negativními postupy doporučenými FDA. Přesto je se všemi deriváty lidské krve a se vzorky pacientů třeba zacházet jako s látkami potencionálně infekčními. Dodržujte SLP ve skladování, rozplňování, manipulaci s těmito materiály.

## ODBĚR A MANIPULACE SE VZORKEM

- Pro testování se používají vzorky lidského **séra nebo plazmy**. Při odběru není potřeba být na lačno, ani jiná forma diety.
- Silně hemolyzované, lipemické nebo mikrobiálně kontaminované vzorky mohou se stanovením interferovat, a proto by neměly být. Ani bilirubin ani hemolýza nemají na stanovení významný vliv.
- Skladujte ve **2°- 8°C** maximálně **5 dní**. Pro déletrvajícím skladování zamrazte. Nezamrazujte a nerozmrazujte opakovaně.
- Příprava vzorku** viz str. 7.

## POSTUP

### Poznámky k postupu

- Před započítím testu si pečlivě přečtěte návod.
- Před provedením testu je nutné všechny komponenty vytemperovat na laboratorní teplotu. Nepoužité vzorky a reagentie vraťte po použití neprodleně do lednice.
- Odeberte potřebné množství jamek a ihned dobře uzavřete (k zabránění kondenzace). Vraťte do lednice.
- Před stanovením proveďte potřebné ředění patientských vzorků.
- Správná promývací technika je důležitá. Při manuálním promývání naplňte všechny jamky naředěným promývacím roztokem. Odstraňte veškerou tekutinu vyklepnutím a následným vyklepáním na savém povrchu (papírový ručník) nebo odsátím. Při promývání na automatické promývače dodržujte pokyny výrobce.
- K dávkování používejte 8-kanálovou pipetu. Krokování je hladší a inkubační čas stejnoměrný.
- Ve všech krocích je důležité časování. Začátek inkubace je vždy po rozplnění do všech jamek.

### Příprava činidel

Sample diluent koncentrát  
Ředící roztok

Naředte před použitím na celkový objem 100 ml destilovanou vodou.

Wash Buffer koncentrát  
Promývací roztok (50x):

Naředte před použitím na celkový objem 1000 ml destilovanou vodou.

### Příprava ředění vzorků

Vzorky séra nebo plazmy: Ředte 1:100 ředícím roztokem. Např.:

10 µl séra nebo plazmy	+ 990 µl ředícího roztoku
------------------------	---------------------------

### Postup

- Step 1 Připravte ředící a promývací roztok.
- Step 2 Naředte vzorky.
- Step 3 Připravte si protokol s rozmístěním vzorků do jamek podle níže uvedeného schématu. **6 kalibrátorů** (standardů)(SA-SF), **2 pozitivní kontroly** (PC) a **2 negativní kontroly** (NC). Na uživateli je rozhodnutí o umístění vzorků pacienta (P) v dubletu.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

	IgG	IgM
Calibrator	Conc. GPL U/ml	Conc. MPL U/ml

<b>a</b>	SA	SE	P1										
<b>b</b>	SA	SE	P1										
<b>c</b>	SB	SF	P2										
<b>d</b>	SB	SF	P2										
<b>e</b>	SC	PC	P..										
<b>f</b>	SC	PC	P..										
<b>g</b>	SD	NC											
<b>h</b>	SD	NC											

SA	0	0
SB	7.5	5
SC	15	10
SD	30	20
SE	60	40
SF	120	80

- Step 4 Vyjměte odpovídající počet jamek ze sáčku, vraťte nepoužité a dobře uzavřené vraťte do lednice. Jamky opatrně vložte do nosiče.
- Step 5 Pipetujte **100 µl kalibrátorů, kontrol a předředených vzorků** do jamek.
- Step 6 Inkubujte **30 minut** při laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 7 Vylijte obsah jamek a promyjte **3x 300 µl** promývacího roztoku. Minimální čas namočení je 25sec. Promývací roztok dobře z jamek odstraňte, nejlépe vyklepáním na savý povrch.
- Step 8 Pipetujte do jamek **100 µl Enzym konjugátu (anti-h-IgG-IgG nebo anti-h-IgM-IgG)**
- Step 9 Inkubujte **15 minut** v laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 10 Promyjte všechny jamky **3 x** jako v kroku 7.
- Step 11 Pipetujte **100 µl Substrátu** do všech jamek ve stejném pořadí a časování jako enzym konjugát.
- Step 12 Inkubujte **15 minut** v laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 13 Přidejte **100 µl Stopovacího roztoku** do všech jamek ve stejném pořadí a časování jako substrát. Nechte 5 minut odpočívat.
- Step 14 Odečtěte absorbanci při **450 nm** nebo při **450/600-690 nm**. Vytvořené zbarvení je stabilní 30 minut. Optickou hustou odečtěte během této doby.

### Kontrola kvality

Součástí každé soupravy je pozitivní a negativní kontrola, které je třeba v dubletu použít při každém stanovení. Kontrola by měla odpovídat dané šarži.

### VYHODNOCENÍ TESTU

**Manuální vyhodnocení:** doporučujeme vynesení Lin-Log

Napřed spočítejte průměry OD pro každý kalibrátor. **Standardní křivku** vynesete do grafu jako závislost průměru OD kalibrátorů a odpovídající koncentrace. Proložte nejlépe vyhovující křivku. Neznámé koncentrace vzorků pacientů odečtete z křivky.

**Automatické vyhodnocení:** doporučujeme 4-Parameter-Fit

Naprogramujte 4-Parameter-Fit v lin-log souřadnicích, je doporučeno pro OD a koncentrace. Proložení Spline v log-log souřadnicích také vyhovuje. Vzorky se odečtou přímo z kalibrační křivky.



**OMEZENÍ TESTU**

Test nesmí být prováděn s vysoce hemolyzovanými, mikrobiálně kontaminovanými nebo lipemickými vzorky. Metoda je určena pouze pro testování vzorků lidského séra.

**HODNOCENÍ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI****Sensitivita**

Nejnižší limit detekce je pro anti-Cardiolipin IgG 1.0 GPL U/ml, pro Anti-Cardiolipin IgM je 0.5 MPL U/ml.

**Interference**

Bez interference hemolýzy (až do 1000 mg/dL), lipémie (až do 3 g/dL triacylglyceroly) nebo séra se zvýšeným Bilirubinem (až do 40 mg/dL).

**Podobnost**

Při testu ředění séra s vysokou hladinou IgG- and IgM-protilátek, bylo sérum zředěno ředícím roztokem a následně stanoveno soupravou na Kardiolipin.

Anti-Cardiolipin	Vzorek	Ředění	Naměřená hodnota [U/ml]	Očekávaná hodnota [U/ml]	N/O
IgG	1	1:200	126.7		
		1:400	63.7	63.4	100 %
		1:800	32.9	31.7	104 %
		1:1600	14.1	15.8	89 %
		1:3200	7.2	7.9	91 %
IgG	2	1:100	112.3		
		1:200	56.1	56.2	100 %
		1:400	25.0	28.1	89 %
		1:800	12.0	14.0	86 %
		1:1600	6.0	7.0	86 %
IgM	3	1:100	55.0		
		1:200	27.0	27.5	98 %
		1:400	13.0	13.8	94 %
		1:800	6.4	6.9	93 %
IgM	4	1:200	46.5		
		1:400	23.2	23.3	100 %
		1:800	10.9	11.6	94 %
		1:1600	5.2	5.8	90 %
		1:3200	2.8	2.9	97 %

**Přesnost**

Při Intra-Assay byly testovány 3 vzorky ve 24 stanoveních. Run-to-run stanovení bylo počítáno z výsledků 5 nezávislých testů se 6 stanoveními:

**anti-Cardiolipin (IgG)****Intra-Assay**

Vzorek č.	Hodnota x [GPL U/ml]	CV [%]
1	29.1	5.4
2	62.5	5.8
3	109.4	4.1

**anti-Cardiolipin (IgM)****Intra-Assay**

Vzorek č.	Hodnota x [MPL U/ml]	CV [%]
1	8.4	3.7
2	40.1	4.5
3	58.6	5.3

**Inter-Assay**

Vzorek č.	Hodnota x [GPL U/ml]	CV [%]
1	32.9	3.8
2	70.9	2.5
3	118.3	2.7

**Inter-Assay**

Vzorek č.	Hodnota x [MPL U/ml]	CV [%]
1	10.3	3.4
2	47.0	3.3
3	79.1	2.5

**LITERATURA**

- Hughes, G.R.V., Harris, E.N. and Gharavi, A.E., The Anticardiolipin Syndrome. The Journal of Rheumatology 1986; 13, 3: 486 - 489.
- Harris, E.N. et al. Evaluation of the anti-Cardiolipin antibody test: report of an International Workshop held 4 April 1986., Clinical and Experimental Immunology 1987; 68: 215 - 222.
- Domke, N. and Siegert, G., Phospholipidantikörper und ihre klinische Bedeutung., Zeitschrift für Klinische Medizin 1988; Heft 16: 1399 - 1401.
- Pengo, V. et al., Immunological Specificity and Mechanism of Action of IgG Lupus Anticoagulants., Blood 1987; Vol 70, No 1: 69 - 76.
- Triplett, D.A., Coagulation Assays for the Lupus Anticoagulant: Review and Critique of Current Methodology. Stroke 1992; Vol 23, No 2 [suppl I]: I-11 - I-14.
- Harris, E.N., Serological Detection of Antiphospholipid Antibodies., Stroke 1992; Vol 23, No 2 [suppl I]: I-3 - I-6.
- Eilat, D. et al., Evaluation of cross-reaction between anti-DNA and anti-Cardiolipin antibodies in SLE and experimental animals., Clinical and Experimental Immunology 1986; 65: 269 - 278., Matsuda, J. et al.
- Detection of Beta-2-Glycoprotein-I-Dependent Antiphospholipid Antibodies and Anti-Beta-2-Glycoprotein-I Antibody in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and in Patients with Syphilis., Int. Arch. Allergy Immunol. 1994; 103: 239 - 244.
- Kalunian, K.C. et al., Clinical Significance of a Single Test for Anti-Cardiolipin Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus., The American Journal of Medicine 1988; Vol 85: 602 - 608.
- Al-Momen, A.-K. et al., IgA Antiphospholipid and Adrenal Insufficiency: Is there a link ?, Thrombosis Research 1991; Vol 64, No 5: 571 - 578.
- Levine, S.R. and Welch, K.M.A., The Spektrum of Neurologic Disease Associated with Antiphospholipid Antibodies., Neurological Review, Arch. Neurol. 1987; Vol 44: 876 - 883.
- Khalili, A. and Cooper, R.C., A study of immune responses to Myelin and Cardiolipin in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE)., Clinical and Experimental Immunology 1991; 85: 365 - 372.
- Lockshin, M.D. et al., Antibody to Cardiolipin as a Predictor of Fetal Distress or Death in Pregnant Patients with Systemic Lupus Erythematosus., The New England Journal of Medicine 1985; 313: 152 - 156.
- Qamar, T. et al., Characteristics of high-titer IgG Antiphospholipid Antibody in Systemic Lupus Erythematosus patients with and without Fetal Death., Arthritis and Rheumatism 1990; Vol 33, No 4: 501 - 504.
- Parke, A.L. et al., The prevalence of Antiphospholipid Antibodies in woman with Recurrent Spontaneous Abortion, woman with Successful Pregnancies, and woman who have never been pregnant., Arthritis and Rheumatism 1991; Vol 34, No 10: 1231 - 1235.
- La Rosa, L. et al.,  $\beta_2$  Glycoprotein I and Placental Anticoagulant Protein I in Placentae from Patients with Antiphospholipid Syndrome., The Journal of Rheumatology 1994; 21: 1684 - 1693.
- McNeil, H.P. et al., Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta_2$ -Glycoprotein I (apolipoprotein H)., Proc. Natl. Acad. Sci USA 1990; Vol 87: 4120 - 4124.
- Koike, T., Anticardiolipin Antibodies and  $\beta_2$ -Glycoprotein I., Clinical Immunology and Immunopathology 1994; Vol 72, No 2: 187 - 192.
- Amiral, J. et al., Standardization of Immunoassays for Antiphospholipid Antibodies with  $\beta_2$ GPI and Role of Other Phospholipid Cofactors., Haemostasis 1994; 24: 191 - 203.

20. Ichikawa, K. et al.,  $\beta_2$ -Glycoprotein I Reactivity of Monoclonal Anticardiolipin Antibodies from Patients with the Antiphospholipid Syndrome., *Arthritis and Rheumatism* 1994; Vol 37, No 10: 1453 - 1461.
21. Harris, E.N. et al., Anticardiolipin Wet Workshop Report: Fifth International Symposium on Antiphospholipid Antibodies., *American Journal of Clinical Pathology* 1994; 101: 616 - 624.
22. Asherson, R.A. and Harris, E.N., Anticardiolipin antibodies - clinical associations., *Review Article Postgraduate Medical Journal* 1986; 62: 1081 - 1087.

## ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten  
und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.  
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55  
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30,  
e-mail: office@dialab.at