



ELISA ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Microwell Method

Anti- β_2 -Glycoprotein I Screen

Cat. No. R01101

For in vitro Diagnostic Use

P ř í b a l o v ý l e t á k

ELISA Souprava pro **kvantitativní** stanovení IgG, IgM a IgA
protilátek k β -2-glykoproteinu I v lidském séru nebo plazmě



Microwell Method - 96 jamek
(12 x 8-well potažené antigenem)

Odlamovací

ZÁKLADNÍ INFORMACE

- **Vlnová délka**
Měřicí filtr: 450 nm
Volitelný referenční filtr: 600 - 690 nm
- **Doba inkubace**
60 minut při LT 20-28°C (30/15/15)
- **Enzyme Conjugate**
HRP (Křenová peroxidáza)
- **Substrate**
TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin)
- **Vzorek**
Sérum nebo plazma
- **Stabilita vzorků**
neředěné: 5 dní při 2-8°C; až 6 měsíců v - 20 °C
- **Cut-off**
10 U/ml (pro IgG, IgA and IgM)
- **Životnost a stabilita komponentů soupravy**

Souprava:	12 měsíců od data výroby.
Komponenty soupravy:	Viz štítek na lahvičce
Sample Diluent Conc.:	stabilní 30 po naředění (při 2-8°C)
Wash Buffer Conc.:	stabilní 30 po naředění (při 2-8°C)
- **Indikace**
 - Systémový Lupus Erythematodes
 - Arteriální a žilní trombózy
 - žilní tromboembolie
 - Trombocytopenie
 - Ztráta plodu

SLOŽENÍ SOUPRAVY

Microwell plate Mikrotitrační destička	12 8 jamkové stripy potažené vysoce čištěným lidským β ₂ -glykoproteinem I, k přímému použití.
Negative Control Negativní kontrola	1 lahvička, 1,5ml, 3,3U/ml, (CA) k přímému použití IgA/IgG/IgM Anti-β ₂ -Glycoprotein I Ab in PBS/BSA matrix, viz Quality Control Certificate pro očekávané hodnoty a rozsah
Cut-off Control Cut-off kontrola	1 lahvička, 1,5ml, 10U/ml, (CB) k přímému použití IgA/IgG/IgM Anti-β ₂ -Glycoprotein I Ab in PBS/BSA matrix, viz Quality Control Certificate pro očekávané hodnoty a rozsah
Positive Control Pozitivní kontrola	1 lahvička, 1,5ml, 30U/ml, (CC) k přímému použití IgA/IgG/IgM Anti-β ₂ -Glycoprotein I Ab in PBS/BSA matrix, viz Quality Control Certificate pro očekávané hodnoty a rozsah
Strong positive Control Silně pozitivní kontrola	1 lahvička, 1,5ml, 90U/ml, (CD) k přímému použití IgA/IgG/IgM Anti-β ₂ -Glycoprotein I Ab in PBS/BSA matrix, viz Quality Control Certificate pro očekávané hodnoty a rozsah
Sample Diluent Ředící pufr	1 lahvička, 20ml, žlutý, koncentrát (5x).
Enzyme Conjugate Enzym konjugát	1 lahvička, 15ml, králičí polyklonální anti-h-IgG-IgG, anti-h-IgM-IgG and anti-h-IgA-IgG značený HRPO, světle červený, k přímému použití.
Substrate Solution Substrát	1 lahvička, 15 ml, obsahuje TMB, k přímému použití.
Stop Solution Stopovací roztok	1 lahvička, 15 ml kyseliny fosforečné (<5%), k přímému použití.
Wash Buffer Promývací roztok	1 lahvička, 20 ml, koncentrát (50x).

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL

- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Odměrné válce a kádinky
- tácek na odpad
- Makropipety** 5 µl až 1000 µl.
- 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

Protilátky k β-2-glykoproteinu I vznikají při onemocněních s fosfolipidovým syndromem jako je trombóza, trombocytopenie nebo potrat v kontextu se systémovým lupus erythematosus.

Beta-2-glykoprotein I (apolipoprotein H) je 50 kDa beta-2-globulin, který se vyskytuje v plazmě v koncentraci 200 µg/ml. Bylo zjištěno, že beta-2-glykoprotein I (beta-2GPI) inhibuje vnitřní koagulační dráhy, a tím ovlivňuje proces srážení krve. Beta-2GPI je in vivo spojený se záporně nabitými látkami jako jsou aniogenní fosfolipidy, heparin nebo lipoproteiny. Vazebné místo fosfolipidu je v jeho páté doméně.

V poslední době je beta-2-glykoprotein považován za kofaktor anti-cardiolipinových autoprotilátek. Některé studie prokázaly jeho nezastupitelnost při správné vazbě anti-cardiolipinových protilátek na imobilizovaný cardiolipin 1,6. Detailní studie přirozeného Cardiolipin-beta-2GPI- komplexu prokázala, že epitopy na páté doméně beta-2GPI jsou tím cílem „anti-cardiolipinových protilátek“ – a to i v nepřítomnosti anioenních fosfolipidů. Beta-2GPI není jen nezbytný pro navázání anti-cardiolipinových protilátek, ale současně byl identifikován jako primární antigen pro tyto protilátky.

Klinické vzorky pacientů s fosfolipidovým syndromem byly testovány na protilátky ke anti-cardiolipinu a anti-beta-2GPI. Zjištěná korelace hodnot anti-cardiolipinu a anti-beta-2GPI výše uvedené potvrdila.

Autoprotilátky k beta-2-glykoproteinu I jsou příčinou různých autoimunitních onemocnění. Přítomnost anti-beta-2GPI může znamenat vznik tepenné nebo žilní trombózy, žilního tromboembolismu nebo zvýšeného rizika potratu.

Protilátky k anti-beta-2-glykoproteinu najdeme mezi imunoglobuliny třídy IgG, IgM i IgA. Stanovení IgM protilátek je cenným pomocníkem při diagnóze počínajícího autoimunitního onemocnění, zatímco IgG protilátky se objevují v progresivní fázi manifestující autoimunitní poruchy. Titr anti-beta-2GPI IgG protilátek dobře koreluje s klinickým obrazem pacientů s trombózou, tromboembolismem a opakovanými potraty, zatímco anti-beta-2GPI IgM protilátky ukazují na možnost vzniku trombózy nebo trombocytopenie.

PRINCIP STANOVENÍ

ELISA test je prováděn jako nepřímé imunostanovení sendvičového typu na pevné fázi. Tento test je navržen jako přímé semi-kvantitativní stanovení množství IgG, IgM a IgA protilátek proti β₂-Glycoprotein I. Na γ-ozářené polystyrénové mikrotitrační destičce je vázán vysoce čistý lidský β₂-Glycoprotein I, následuje blokování k redukci nespecifických vazeb okovány.

Step 1 Protilátky specifické ke β₂-Glycoproteinu I, které jsou přítomny v kontrolách, kalibrátorech a patientských se navážou na potažený antigen.

Step 2 Komplex antigen-protilátka reaguje s (HRP) označeným proti lidským IgG, IgA nebo IgM konjugátem, za vzniku „sendvičů“ mezi protilátkami v pevné fázi a konjugátem. Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím s romývacím roztokem.

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 na mililitr (U/ml).

ČINIDLA

Skladování

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

Příprava

- Potažené stripy jsou použitelné pouze jednou.
- Kontroly, 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.

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 pufrovaného roztoku **peroxidu** a snadno oxidujících materiálů, v extrémních teplotách může dojít k samovolnému hoření.
- Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- Nepoužívejte, pokud nejsou reagenty 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 and 2 and

HTLV-I a shledány 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.
- Odeberte krev a separujte sérum nebo plazmu od krevních elementů centrifugací po tvorbě sraženin.
- 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 déletrvající skladování zamrazte. Nezmrazujte a nerozmrazujte opakovaně.
- Příprava vzorku** viz str. 7.

POSTUP

Poznámky k postupu

- Před započítáním testu si pečlivě přečtěte návod.
- Nepoužívejte komponenty z jiných šarží
- 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.
- Kontrolní séra nebo pooly by měly být rutinně stanoveny jako neznámé vzorky ke kontrole stanovení

Příprava činidel

Sample diluent koncentrát
Ředící roztok

Nařed'te před použitím na celkový objem 100 ml destilovanou vodou.

Wash Buffer koncentrát
Promývací roztok (50x):

Nařed'te před použitím na celkový objem 1000 ml destilovanou vodou.

Příprava ředění vzorků

Vzorky séra nebo plazmy: Řed'te 1:100 ředícím roztokem. Např.:

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

Vzorky pacientů, které obsahují vysoké koncentrace, by měly být naředěny Ředícím pufrem před samotným testováním. Ve výpočtu zohledněte ředící faktor.

Postup

- Step 1 Připravte ředící a promývací roztok.
- Step 2 Naředte vzorky 1:100 s Ředícím pufrem
- Step 3 Připravte si protokol s rozmístěním vzorků do jamek podle níže uvedeného schématu. 4 **kontroly** (standardů) (CA-CD). Kontroly jsou k přímému použití a nemusí být ředěny. Je doporučeno použít naředěné vzorky pacientů (P) a kontrol v duplikátu.
- Step 4 Vyjměte odpovídající počet jamek ze sáčku, vraťte nepoužité a dobře uzavřené vraťte do lednice. Jamky opatrně vložte do nosiče.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
a	CA	P1												kombinovaný Kalibrátor	Konc. U/ml
b	CA	P1												CA	3,3
c	CB	P2												CB	10
d	CB	P2												CC	30
e	CC	P..												CD	90
f	CC	P..													
g	CD														
h	CD														

- Step 4 Pipetujte **100 µl kontrol a předředěných vzorků** do jamek, ke stanovení protilátek (IgG, IgA, IgM).
- Step 5 Inkubujte **30 minut** při laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 6 Vylijte obsah jamek a promyjte **3x 300 µl** promývacího roztoku.
- Step 7 Pipetujte do jamek **100 µl Enzym konjugátu**
- Step 8 Inkubujte **15 minut** v laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 9 Promyjte všechny jamky **3 x** jako v kroku 6.
- Step 10 Pipetujte **100 µl Substrátu** do všech jamek ve stejném pořadí a časování jako enzym konjugát.
- Step 11 Inkubujte **15 minut** v laboratorní teplotě. Chraňte před světlem.
- Step 12 Přidejte **100 µl Stopovacího roztoku** do všech jamek ve stejném pořadí a časování jako substrát. Nechte 5 minut odstát.
- Step 13 Odečtěte absorbanci při **450 nm** nebo při **450/600-690 nm**. Vytvořené zbarvení je stabilní 30 minut. Optickou hustou odečtěte během této doby.

VYHODNOCENÍ TESTU

Vyhodnocení testu Anti- β 2-Glycoprotein I Screen je založen na přímém porovnání OD každého pacienta s OD kontrol.

Vzorky pacientů, které mají OD větší než cut-off hodnotu jsou pokládány za pozitivní.

Negativní:	OD Pacient	<	OD Cut-Off Kontrola
Pozitivní:	OD Pacient	>	OD Cut-Off Kontrola
Silně Pozitivní:	OD Pacient	\geq	OD Silně Pozitivní Kontrola

Pro semi-kvantitativní výpočet koncentrací patientských vzorků mohou být použity kontroly, které mají na štítku uvedenou koncentraci. Tyto hodnoty mohou být použity k sestrojení kalibrační křivky. Pro Anti-cardiolipin screen je doporučený 4-Parameter-Fit v lin-log souřadnicích, je doporučeno pro OD a koncentrace. Koncentrace vzorků se odečtou přímo z kalibrační křivky. Pro úplnou diferenciaci typů protilátek se musí použít souprava pro kvantitativní stanovení Anti-cardiolipin IgG, IgM a/nebo IgA .

Anti-Cardiolipin screen test rozpozná sumu IgG, IgM a IgA anti-Cardiolipin autoprottilátek. Díky vlivu aditiv, mohou patientské vzorky obsahující dva až tři typy protilátek Anti-Cardiolipinu být při testu Anti-Cardiolipin screen vyhodnoceny jako pozitivní, zatím co v jednotlivých stanoveních Cardiolipin IgG, IgM or IgA mohou být vyhodnoceny jako negativní.

KALIBRACE

Jelikož není dostupný mezinárodní referenční přípravek pro anti- β 2-Glycoprotein I autoprottilátky, stanovení je kalibrováno v relativních jednotkách.

Kalibrace je vztažena na mezinárodně uznávané referenční sérum od E.N. Harris, Louisville. Tyto séra jsou pozitivní na anti- β 2-Glycoprotein I autoprottilátky.

HODNOCENÍ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI

Specifická

Mikroplatíčko je potaženo vysoce čištěným lidským β 2-Glycoproteinem I. Souprava je specifická pouze pro autoprottilátky proti β 2-Glycoproteinu I.

Endogenní β 2-Glycoprotein I a endogenní záporně nabitě fosfolipidy jsou v (1:100)-zředěném vzorku přibližně 2 μ g/ml respektive 1 μ g/ml. Nebyl pozorován vliv na stanovení anti- β 2-Glycoprotein I-protilátek.

Přesnost

Variační koeficient (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků ze 22 stanovení pro Intra-assay, pro Inter-assay byl spočítán z 5 měření po 6 opakováních.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Vzorek č.	Hodnota [U/ml]	CV [%]	Vzorek č.	Hodnota [U/ml]	CV [%]
1	4.4	13.3	1	5.8	12.4
2	14.8	5.2	2	15.8	8.1
3	42.1	4.1	3	43.7	4.7
4	70.2	6.6	4	75.9	2.5

Podobnost

Vybraná séra obsahovala IgG, IgM a IgA-protilátky, byla zředěna ředícím pufrem a stanovena soupravou Anti-Cardiolipin screen kit.

Anti-Cardiolipin	Vzorek	Zředění	Naměřená [U/ml]	Očekávaná [U/ml]	N/O
Screen	1	1:200	47.7		
		1:400	24.0	23.9	100 %
		1:800	11.5	11.9	97 %
		1:1600	6.0	6.0	100 %
		1:3200	2.7	3.0	90 %
screen	2	1:100	138.0		
		1:200	69.7	69.0	101 %
		1:400	33.5	34.5	97 %
		1:800	15.9	17.3	92 %
		1:1600	7.8	8.6	91 %
1:3200	4.1	4.3	95 %		

LITERATURA

1. Roubey, R.A.S. Review Article: Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of Lupus Anticoagulants and other „antiphospholipid“ autoantibodies. *Blood* 1994; Vol 84, No 9: 2854 - 2867.
2. Schousboe, I. β_2 -Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985; Vol 66, No 5: 1086 - 1091.
3. Lee, N.S. et al. β_2 -Glycoprotein I Molecular properties of an unusual apolipoprotein, Apolipoprotein H. *J. Biol. Chem.* 1983; Vol 258, No 8: 4765 - 4770.
4. Kandiah, D.A. et al. Epitope mapping studies of antiphospholipid antibodies and β_2 GPI using synthetic peptides. *Lupus* 1995; Vol 4, Suppl 1: S7 - S11.
5. Matsuura, E. et al. Molecular studies on phospholipid-binding sites and cryptic epitopes appearing on β_2 -glycoprotein I structure recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1995; Vol 4, Suppl 1: S13 - S17.
6. Koike, T. Anticardiolipin Antibodies and β_2 -Glycoprotein I. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1994; Vol 72, No 2: 187 - 192.
7. Roubey, R.A.S. et al. „Anticardiolipin“ autoantibodies recognize β_2 -Glycoprotein I in the absence of phospholipid. *J. Immunology* 1995; Vol 154: 954 - 960.
8. Wang, M.-X. et al. Epitope specificity of monoclonal anti- β_2 -Glycoprotein I antibodies derived from patients with the antiphospholipid syndrome. *J. Immunology* 1995; Vol 155: 1629 - 1636.
9. Arvieux, J. et al. IgG2 subclass restriction of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in autoimmune patients. *Clin. Exp. Immunol.* 1994; Vol 95: 310 - 315.
10. Matsuda, J. et al. Prevalence of β_2 -glycoprotein I antibody in systemic lupus erythematosus patients with β_2 -glycoprotein I dependent antiphospholipid antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 1995; Vol 54: 73 - 75.
11. Martinuzzo, M.E. et al. Anti β_2 glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *Brit. J. Haematol.* 1995; Vol 89: 397 - 402.
12. Balestrieri, G. et al. Anti-beta₂-glycoprotein I antibodies: a marker of

antiphospholipid syndrome , Lupus 1995; Vol 4: 122 - 130.

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