



# ANTI – FOSFOLIPIDOVÉ PROTILÁTKY IgG/IgM (APLA)



Kód 44867	96 testov	<b>ANTI – FOSFOLIPIDOVÉ PROTILÁTKY</b> <b>ELISA</b> Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie anti fosfolipidových protilátok (APLA) Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

## PRINCÍP METÓDY

Anti-fosfolipidové protilátky (APLA) 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ako enzymový substrát. Dochádza k enzymatickej farebnej reakcii, ktorá je zastavená kyselinou. Absorbancia vzniknutého žltého komplexu sa meria pri 450nm, pričom hodnota absorbancie je úmerná koncentrácii protilátok vo vzorke. <sup>1</sup>

## 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 -fosfolipidovými protilátkami, azid sodný 15mmol/l.
- C-. Negatívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum bez anti fosfolipidových 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.  
 Ďalšie varovania a upozornenia – viď bezpečnostný list.
- M. Mikrotitračné doštičky.** 12 modulov po 8 odlamovateľných jamkách s naviazaným kardioliopinom, fosfatidylserínom, fosfatidylinozitolom kyselinou fosfatidylovou a β<sub>2</sub>-glykoproteínom1.
- S1 – S6. APLA IgG/IgM štandardy.** Každý po 1,5 ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum s IgG a IgM anti – fosfolipidovými protilátkami, azid sodný 15mmol/l. Koncentrácie APLA IgG sú 0, 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 U/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky. Koncentrácie APLA IgM sú 0, 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 U/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky. Kalibrované proti medzinárodne doporučovanému referenčnému séru od E.N.Haris, Louisville.

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 potencionálne infekčným materiálom.

## SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 8°C.

Reagenty sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu ich používania.

## Príznyky 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 reagentu. 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 (M) 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.
4. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote.
5. Odsajte obsah 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



# ANTI – FOSFOLIPIDOVÉ PROTILÁTKY IgG/IgM (APLA)



Kód 44867	96 testov	<b>ANTI – FOSFOLIPIDOVÉ PROTILÁTKY ELISA</b> Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie anti fosfolipidových protilátok (APLA) Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

(F) a inkubujte 5 minút pro izbovej teplote. (Poznámka5).  
12. Odčítajte hodnotu absorbcie jednotlivých jamiek pri 450 nm 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 APLA ( IgG alebo IgM, jednotky : U/ml). 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 :

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

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

Vypočítajte absorbančný pomer =

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

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

## REFERENČNÉ HODNOTY

Za pozitívne sú považované vzorky s koncentráciou vyššou ako 10 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer pre IgG a IgM vyšší ako 1,0.

Za negatívne sú považované vzorky s koncentráciou nižšou ako 10 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer pre IgG a IgM nižší ako 1,0.

Uvedené hodnoty sú orientačné, preto by si malo každé laboratórium stanoviť svoje vlastné rozmedzia.

## KONTROLA KVALITY

Absorbancia blanku pre IgG i IgM by mala byť nižšia ako 0,15.

Absorbancia štandardu S6 pre IgG i IgM by mala byť vyššia ako 1,300.

Koncentrácia pozitívnej kontroly (C+) by mala byť v rozmedzí medzi 28 – 48 U/ml IgG i IgM.

Koncentrácia negatívnej kontroly (C-) by mala byť nižšia ako 10 U/ml pre IgG i IgM.

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) :

APLA (IgG)			APLA (IgM)		
U/ml	CV%	n	U/ml	CV%	n
13,5	6,4	24	15,0	4,2	24
30,1	4,8	24	28,7	5,8	24
70,5	3,1	24	72,4	6,3	24

• reprodukovateľnosť ( run to run) :

APLA (IgG)			APLA (IgM)		
U/ml	CV%	n	U/ml	CV%	n
13,5	2,8	30	15,0	4,6	30
30,1	4,5	30	28,7	3,2	30
70,5	5,1	30	72,4	3,1	30

- detekčný limit : 0,5 U/ml pre IgG i IgM
- test APLA IgG/IgM detekuje iba autoprotilátky špecifické ku fosfolipidom.  
Žiadne skrížené 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 : 0,5 – 100 U/ml pre IgG i IgM. Ak získate výsledky s vyššou hodnotou, zriedte vzorku riediacim pufrom (B) a stanovenie opakujte.

## DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Prítomnosť anti-fosfolipidových protilátok (APLA) namierených proti rôznym negatívne nabitým fosfolipidom<sup>3</sup> v ľudskom sére alebo plazme sa využívajú na diagnostiku antifosfolipidového syndrómu (APS). Tento syndróm je charakterizovaný zvýšeným rizikom trombózy, trombocytopénie a potratu a niekedy je spojený s autoimunitnými ochoreniami ako je SLE a ďalšie neautoimunitné choroby.

Senzitivita BioSystems APLA IgG bola pri antifosfolipidovom syndróme 91,8% a špecificita 97,3%.

Štúdia bola vykonaná s 223 klinickými vzorkami.

V tej istej štúdii v prípade izotypu IgM bola senzitivita 53,4% a špecificita 96,7%. Detaily štúdie sú k dispozícii na vyžiadanie.

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

## POZNÁMKY

1. Nezamieňajte jednotlivé reagenty z rôznych súprav.
2. Nepoužité jamky skladujte v plastikovom sáčku s exsikatorom.
3. Nepoškodte vnútorný povrch mikrotitračných doštičiek.
4. Premývaci 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.



# ANTI – FOSFOLIPIDOVÉ PROTI LÁT KY IgG/IgM (APLA)



Kód 44867      96 testov	<b>ANTI – FOSFOLIPIDOVÉ PROTI LÁT KY</b> ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C	
Reagenty pre stanovenie anti fosfolipidových protilátok (APLA) Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

## 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. AACCPress, 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.

## UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 18.6.2018

Vzhľadom k nožnej inovácii 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](http://www.biosystems.es).

Slovenský návod je k dispozícii na [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz).

### Výhradný distribútor:

**ČR** : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5,  
tel.: +420 257 220 760

**SK** : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava,  
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