



# ANTI – ANEXIN V – IgG/IgM (ANX)



## ANTI – ANEXIN V – IgG/IgM

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

Kód 44869	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagenty pro stanovení protilátek proti anexinu V . Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

#### PRINCIP METODY

Anti-anexin V protilátky 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 zbarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci ANX 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.** 1,5 mL. Ready to use. Sérum s IgG protilátkami proti anexinu, azid sodný 15 mmol/L.

**C+. Pozitivní kontrola IgM** . 1,5 mL. Ready to use. Sérum s IgM protilátkami proti anexinu V, azid sodný 15 mmol/L.

**C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Lidské sérum bez protilátek proti anexinu V, 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 anexinem V.

**S1-S6. Standardy anti-anexin IgG/IgM,** Každý po 1,5 mL. Ready to use. Sérum s IgG/IgM protilátkami proti anexinu V, azid sodný 15mmol/l. Koncentrace protilátek IgG/IgM jsou: 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 U/ml, jak je uvedeno na štítku lahviček. Kalibrováno proti internímu referenčnímu standardu.

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

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

#### SKLADOVÁNÍ

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

#### Známky zhoršení kvality:

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

#### 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 promývacího reagentu.

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 pufrem (B). Používejte vždy čerstvá ředění vzorků.

#### 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 nebo 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 obsahy jamek a promyjte je 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 při pokojové teplotě 5 minut. (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 absorbancí pro každý standard proti koncentraci ANX protilátek (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:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ S3} \times 0,6 \text{ (IgG)}$$

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ S3} \times 0,6 \text{ (IgM)}$$

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 8 U/mL, nebo které mají absorbanční poměr vyšší jak 1,0 jsou považovány za pozitivní pro IgG/IgM.



# ANTI – ANEXIN V – IgG/IgM (ANX)



## ANTI – ANEXIN V – IgG/IgM

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

Kód 44869	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagenty pro stanovení protilátek proti anexinu V . Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

Vzorky, s koncentrací nižší jak 5 U/mL, nebo které mají absorbanční poměr nižší jak 1,0 jsou považovány za negativní pro IgG/IgM. Vzorky s koncentrací mezi 5 – 8 U/mL by měly být považované za hraniční a doporučuje se stanovení zopakovat. Zvažte další stanovení pro diferenciální diagnózu. Uvedené hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí.

#### KONTROLA KVALITY

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 20 do 40 U/mL a u Negativní kontroly (C-) by měla být nižší jak 5 U/mL .

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-annexin V (IgG)			anti-annexin V (IgM)		
U/mL	cv %	n	U/mL	cv %	n
12,7	2,5	24	14,4	2,8	24
8,5	3,2	24	25,7	3,1	24
58,7	2,9	24	48,1	3,1	24

- Reprodukovatelnost (run to run):

anti-annexin V (IgG)			anti-annexin V (IgM)		
U/mL	cv %	n	U/mL	cv %	n
12,7	5,4	30	14,4	6,4	30
8,5	4,8	30	25,7	4,9	30
58,7	5,5	30	48,1	5,8	30

- Detekční limit: pro IgG/IgM je 1,0 U/mL.

- Test Anti-Anexin V detekuje pouze protilátky k Anexinovým protilátkám V. Žádné zkřížené reakce k jiným protilátkám nebyly pozorovány.

- Interference: Hemoglobin(1000 mg/dL), bilirubin (40mg/dL), triglyceridy(3000 mg/dL) neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat<sup>2</sup>.

- Rozsah měření: 1,0 – 100 U/mL pro ANX. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředit vzorek ředícím puřem (B) a opakujte stanovení.

#### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Anti-annexin V protilátky jsou přítomny ve vysokých hladinách u pacientů s antifosfolipidovým syndromem (APS)<sup>3</sup>. Také byly detekovány – speciálně isotypy IgG protilátek u pacientů se systémovým autoimunitním onemocněním, hlavně u systémového lupus erythematosus (SLE)<sup>4</sup>, u revmatoidní artritidy (RA)<sup>5</sup>, a jsou rovněž spojovány s intrauterinním úmrtím plodu, opakujícím se potratem a preeklampsii u APS pacientů<sup>6</sup>. Protilátky proti anexinu V se nevyskytují u zdravé populace, ale mohou se v nízkých koncentracích objevit během těhotenství, nebo při jiných klinických stavech<sup>5</sup>.

Senzitivita pro stanovení ANX IgG protilátek za použití soupravy BioSystems byla ve studiu s 148 klinickými vzorky stanovena na 55,9% a specifita 96,2 %.

Pro ANX IgM protilátky byla senzitivita stanovena na 23,7% a specifita 98,3% ve studiu se 148 klinickými vzorky. Podrobnosti studie jsou dostupné na požádání.

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

#### POZNÁMKA

1. Nezaměňujte jednotlivé reagenty z různých souprav.
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. Ogawa H, Zhao D, Dlott JS, Cameron GS, Yamazaki M, Hata T, Triplett DA. Elevated anti-annexin V antibody levels in antiphospholipid syndrome and their involvement in antiphospholipid antibody specificities. Am J Clin Pathol 2000; 114: 619-628.
4. Kaburaki J, Kuwana M, Yamamoto M, Kawai S, Ikeda Y. Clinical significance of anti-annexin V antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Am J Hematol 1997; 54: 209-213.
5. Dubois T, Bisagni-Faure A, Coste J, Mavoungou E, Menkes C-J, Russo-Marie F, Rothhut B. High levels of antibodies to annexin V and VI in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1995; 22: 1230-1234.
4. Matsuda J, Gotoh M, Saitoh N, Gohchi K, Tsukamoto M, Yamamoto T. Anti-annexin V antibody in the sera of patients with habitual fetal loss or preeclampsia. Thromb Res 1994; 75: 105-106.

#### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 15.6.2018.

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 Praha5, tel.: +420 257 220 760

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