



Kód 44870	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagenty pro stanovení protilátek proti GBM. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

## ANTI-GBM PROTILÁTKY - EIA (GBM)

ELISA  
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY**PRINCIP METODY**

Prottilátky Anti-GBM (glomerulární bazální membrána) ze séra se váží na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (imunoglobulin proti lidskému IgG značený křenovou peroxidázou) s prottilátkami 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 GBM protilátek ve vzorku<sup>1</sup>.

**OBSAH A SLOŽENÍ**

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Fosfátový pufr, azid sodný 15 mmol/L.
- B. Ředící roztok** 100 mL. Tris, azid sodný 15 mmol/L.
- C+. Pozitivní kontrola.** 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-GBM prottilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Lidské sérum bez anti-GBM prottilátek, azid sodný 15 mmol/L.
- D. Konjugát.** 15 mL. Křenovou peroxidázou značené imunoglobuliny proti lidskému IgG.
- 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 navázanou lidskou rekombinantní, vysoce purifikovanou GBM.
- S1-S5. Standardy 1,5mL.** Ready to use. Sérum s anti-GBM prottilátkami, azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace GBM prottilátek jsou: 0, 10, 20, 40 a 100 U/mL, jak je uvedeno na štítku lahviček. Kalibrované proti internímu referenčnímu standardu.

*Pro další výstrahy a varování viz bezpečnostní list.*

*Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a shledána 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:**

- 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. Pro 1 strip se spotřebuje přibližně 50 ml promývacího reagentu. Roztok je stabilní 30 dnů při 2-8°C.

Ostatní činidla jsou připravena k přímému použití - ready to use.

**PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ**

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

M44870i-03  
05/2018

**VZORKY**

Sérum nebo plazma odebraná standardním způsobem. Vzorek před testováním zředte 1/100 ředícím pufrém. K testování vždy použijte 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 (S1-S5), Pozitivní kontroly (C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek.
  - **Kvalitativní stanovení:** Pipetujte 100 µL S2 Standardu, Pozitivní kontroly (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 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 (D).
7. Stripy inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
8. Promyjte jamky podle odstavce č. 5.
9. Pipetujte 100µL 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 po dobu 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 absorbanční hodnoty pro každý standard proti koncentraci GBM protilátek (U/mL). Koncentrace GBM protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce. Doporučená křivkajka 4parametrická, logistická

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

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ S2} \times 1,0$$

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

**KONTROLA KVALITY**

Absorbance standardu S5 by měla být vyšší než 1,300.



Kód 44870	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagenty pro stanovení protilátek proti GBM. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

## ANTI-GBM PROTILÁTKY - EIA (GBM)

ELISA  
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

Koncentrace Pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí od 15 do 25 U/mL a u Negativní kontroly (C-) by měla být nižší jak 10 U/mL. Absorbance 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):

U/mL	CV %	n
7,8	5,3	24
42,9	5,4	24
71,7	5,7	24

- Reprodukovatelnost (run to run):

U/mL	CV %	n
7,8	6,4	30
42,9	5,4	30
71,7	5,8	30

- Detekční limit: 0,5 U/mL
- Test Anti GBM detekuje pouze protilátky ke glomerulární bazální membráně. Žádné zkřížené reakce k jiným protilátkám nebyly pozorovány.
- Interference: Hemoglobin do 1000 mg/dL, bilirubin do 40mg/dL, triglyceridy do 3000 mg/dL neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat<sup>2</sup>.
- Rozsah měření: 0,5 – 100 U/mL. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím pufrem (B) a opakujte stanovení.

**DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA**

Protilátky proti glomerulární bazální membráně jsou přítomny u pacientů s Goodpasturovým syndromem. Onemocnění se projevuje jako progresivní glomerulonefritida s nebo bez masivní pulmonární hemorrhagie. Nález anti-GBM protilátek potvrzuje diagnózu život ohrožujícího onemocnění, které způsobuje ztrátu ledvin a indikuje její prognózu. Trojice glomerulonefritida, plicní krvácení a protilátky proti alfa-3 řetězci kolagenu typu IV GBM jsou základními elementy v diagnóze Goodpasturova syndromu. Časná detekce protilátek proti GBM umožní zahájení terapie a tím snížení stupně poškození ledvin. Tuto metodu lze použít k diagnostice nefropatií a imunitně podmíněnými typy glomerulonefritid. Senzitivita a specifita je kolem 98-99%, pokud je prováděna ELISA technikou při použití vysoce purifikovaného GBM antigenu<sup>3,4,5</sup>

Byla stanovena citlivost soupravy BioSystem 100% a přesnost 100% pro stanovení anti – GBM protilátek ve studii se 160 klinickými vzorky. Detaily klinické 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.

**POZNÁMKY**

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. Hellmark T, Segelmark M, Wieslander J. Anti-GBM antibodies in Goodpasture syndrome; anatomy of an epitope. Nephrol Dial Transplant 1997; 12: 646–648.
4. Hellmark T, Segelmark M, Bygren P, Wieslander J. Glomerular basement membrane autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
5. Kalluri R, Melendez E, Rumpf KW, Sattler K, Müller GA, Strutz F, Neilson EG. Specificity of circulating and tissue bound autoantibodies in Goodpasture syndrome Proc Assoc Am Physicians 1996;108:134-139.

**UPOZORNĚNÍ**

Překlad revidován k datu: 14.6.2018

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