

# MASTAZYME™ Cardiolipin

Enzymatická imunoesej pro detekci autoprotilátek třídy IgG a IgM proti kardiolipinu  
v séru a plasmě

## Návod k použití



Pouze pro *in vitro* diagnostiku

Test	Kód	Kit pro
MASTAZYME™ Cardiolipin IgG	734011	12 x 8 testů
MASTAZYME™ Cardiolipin IgM	734012	12 x 8 testů

**Skladujte při 2 – 8 °C**

MASTAZYME™ Cardiolipin IgG / IgM – 2013-04-24

<b>Obsah</b>	<b>Strana</b>
1. Použití	3
2. Princip testu	3
3. Součásti soupravy	3
4. Potřebný materiál, který není součástí soupravy	4
5. Upozornění a zvláštní opatření	5
6. Uchovávání a trvanlivost reagensů	5
7. Odběr vzorku a manipulace	6
8. Pracovní postup	6
9. Výsledky a interpretace	7
10. Charakteristika testu	8
11. Literatura	8

## 1. Použití

ELISA souprava MASTAZYME™ Cardioliplin je určena pro detekci a kvantifikaci specifických protilátek třídy IgG a IgM proti kardioliplinu v séru a plasmě.

Tento test je určen pouze pro použití *in vitro*.

Všechny výsledky testu musí být interpretovány v souvislosti s ostatními klinickými ukazateli. Pro správnou klinickou interpretaci musí být vzaty v úvahu i výsledky dalších laboratorních testů.

## 2. Princip testu

Princip testu může být popsán ve čtyřech fázích.

### 2.1 Inkubace séra

Specifické protilátky se váží k antigenům, které jsou na pevné fázi, a tím vzniká stabilní imunokomplex. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě jsou jamky promyty předem zředěným promývacím puřem, čímž se odstraní všechny nereaktivní komponenty v séru.

### 2.2 Inkubace s konjugátem

Anti-lidský-IgG/IgM konjugát s křenovou peroxidázou je přidán do každé jamky. Konjugát se váže k protilátkám (respektive k antigenu na pevné fázi) a vytváří se tak stabilní „sandwich“. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě je přebytečný konjugát odstraněn promytím každé jamky promývacím puřem.

### 2.3 Reakce se substrátem a její zastavení

Do každé jamky je přidán TMB substrát a v reakci mezi ním a enzymem peroxidázou vznikne stabilní modrý chromogen. Reakce s následnou tvorbou zbarvení je zastavena po 15-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě přidáním 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do jamek. Změna pH způsobí, že se modrá barva chromogenu změní na žlutou.

### 2.4 Vyhodnocení a interpretace

Intenzita zbarvení je vyhodnocena v readeru při 450 nm (doporučená referenční vlnová délka pro bichromatické měření: 600 – 690 nm). Intenzita zbarvení (OD) je přímo úměrná koncentraci specifických protilátek v séru pacienta.

Výsledky lze číst z kalibrační křivky nebo ze souboru elektronických grafů pomocí 4 parametrové sigmoidální křivky.

## 3. Součásti soupravy

Souprava se skládá z reagensů pro 12 x 8 = 96 stanovení. Mikrotitrační destičky a roztoky musí být skladovány při teplotě 2 – 8 °C. Datum expirace je uvedeno na štítku jednotlivých lahvíček.

12 stripů      Mikrotitrační stripy      jednotlivé stripy obsahují 8 odlamovatelných jamek  
s navázaným purifikovaným kardioliplinem

1 x      Držák (rámeček)

4 x 1,5 mL Kalibrátory 1 - 4

stabilizovaná lidská plazma s obsahem protilátek IgG nebo IgM proti kardiolipinu, naředěná v pufru, připravena k použití

	Koncentrace anti-kardiolipin IgG protilátek [U/mL]*	Koncentrace anti-kardiolipin IgM protilátek [U/mL]*
Kalibrátor 1	1	1
Kalibrátor 2 (Cut-off)	10	8
Kalibrátor 3	30	25
Kalibrátor 4	120	100
Pozitivní kontrola	60	50
Negativní kontrola	5	4

\* kalibrováno vůči Louisvillskému APL standardu

1 x 1,5 mL	Pozitivní kontrola	stabilizovaná lidská plazma s obsahem protilátek IgG nebo IgM, připravena k použití, může být zařazena do kalibrační křivky
1 x 1,5 mL	Negativní kontrola	stabilizovaná lidská plazma s obsahem protilátek IgG nebo IgM, připravena k použití, může být zařazena do kalibrační křivky
2 x 60 mL	Roztok k ředění vzorků	roztok PBS s obsahem konzervantu, připraven k použití
1 x 12 mL	Roztok konjugátu	roztok křenovou peroxidázou značené kozí anti-lidské IgG nebo IgM protilátky, připraven k použití
1 x 12 mL	TMB substrát	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, připraven k použití
1 x 12 mL	Stop roztok	0,5 M kyselina sírová, připraven k použití
2 x 50 mL	Promývací pufr 10x koncentrovaný	roztok PBS/Tween pufrů 10x koncentrovaný, naředit 1:10 před použitím, koncentrát může být zahřát až do 37°C po dobu 15 min. k zabránění vzniku krystalů

#### 4. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- 5 µL-, 100 µL- a 500 µL mikro- a multikanálové pipety
- ELISA reader se 450 nm filtrem (referenční filtr 600 – 690 nm)
- Promývač mikrotitračních destiček (v případě manuálního promývání: promývací lahev)
- Zkumavky na ředění sér pacientů
- Odměrný válec
- Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality

## 5. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku! Zabraňte požití či spolknutí! Při práci dodržujte laboratorní bezpečnostní opatření. V laboratoři nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Séra, plasmy a pufrы této soupravy byly testovány všeobecně uznávanými metodami a jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV. Nicméně z preventivních důvodů je nutné při práci používat ochranné latexové rukavice.
- Skvrny způsobené séry či reagensy musí být důkladně odstraněny za použití desinfekčních roztoků (např. 5% chlornan sodný).
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagensy vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24 °C).
- Před použitím je nutné reagensy důkladně, ale jemně promíchat např. krouživými pohyby. Vyhněte se třepání, které vede k následné tvorbě pěny.
- Aby byly zajištěny stejné podmínky testu ve všech jamkách mikrotitrační destičky, je nutné pipetovat reagensy ve stejných intervalech.
- Před použitím reagensů se ujistěte, zda není uzávěr či lahvička poškozena a nedošlo tím k možné kontaminaci. Vyvarujte se vzájemného smíchání reagensů. Protože jsou reagensy často citlivé k oxidaci, je nutné nechávat lahvičky s nimi otevřené pouze po krátkou dobu.
- Kvůli zabránění vzniku kontaminace je nutné používat jednorázové, vyměnitelné špičky na pipety.
- Není možné míchat či jinak používat reagensy ze stejných souprav o jiné šarži.
- Reagensy nepoužívejte po datu jejich expirace.
- V souladu se Správnou Laboratorní Praxí (SLP) a ISO 9001 by měly být veškeré laboratorní pomůcky a přístroje používané pro provedení testu prověřeny z hlediska přesnosti. Toto se týká především pipet, promývacích a čtecích zařízení (ELISA readerů).
- Vyhněte se kontaktu určitých reagensů, a to především stop roztoku a substrátu, s pokožkou, očima a sliznicemi. Hrozí zde riziko podráždění, poleptání a intoxikace.

## 6. Uchovávání a trvanlivost reagensů

Všechny reagensy skladujte při teplotě 2 – 8 °C.

Datum expirace každé reagensy je uvedeno na štítku lahvičky. Reagensy nepoužívejte po datu jejich expirace. Naředěný promývací pufr je stabilní až 4 týdny, pokud je skladován při teplotě 2– 8 °C. Před použitím se ujistěte, že je pufr vytemperován na laboratorní teplotu.

Po otevření by měla být souprava spotřebována do 3 měsíců.

## 7. Odběr vzorku a manipulace

Pro stanovení se používá sérum nebo plasma (EDTA, heparin). Vzorky séra či plasmy se skladují při teplotě 2 – 8 ° C po dobu max. 3 dnů. Po delší dobu mohou být alikvotované vzorky skladovány při teplotě -20 ° C. Po rozmražení vzorky znovu nezmrazujte. Lipemické, hemolytické, ikterické nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobit falešnou pozitivitu či falešnou negativitu výsledků.

Pacientská séra musí být před testováním předředěna sérum diluentem v poměru 1:101 (např. 5 µL séra + 500 µL sérum diluentu).

## 8. Pracovní postup

### 8.1 Příprava reagensů

**Před použitím nechte všechny součásti soupravy a také vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24 ° C), reagentie důkladně promíchejte.**

**Promývací pufr:** Rozpusťte krystalky, které se mohou v lahvičce vyskytovat, zahřátím na teplotu 37 ° C, a poté důkladně promíchejte.

Naředte koncentrovaný promývací pufr v poměru 1:10 destilovanou vodou (např. 50 mL koncentrovaného pufru + 450 mL destilované vody). Důkladně promíchejte.

- Pro správné provedení testu je nutné důsledně postupovat podle přiložených instrukcí. Veškeré změny a modifikace jsou v rámci odpovědnosti uživatele.
- Všechny reagentie a vzorky musí být před použitím při pokojové teplotě, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.
- Kalibrační křivka by měla být sestrojena při každém kvantitativním testu.
- Nepoužité mikrotitrační destičky vložte zpět do plastového obalu a uchovávejte je v suchu při teplotě 2 – 8 ° C.

### 8.2 Provedení testu

Připravte si dostatečné množství jamek v mikrotitračních destičkách pro kalibrátory, kontroly a vzorky.

**Poznámka: Je možné využít i jiné inkubační podmínky. V případě změn v doporučeném pracovním postupu (např. inkubace při teplotě 37 ° C místo pokojové teploty) musí uživatel validovat takovéto provedení testu.**

1. Pipetujte 100 µL naředěných vzorků (1:101), kalibrátorů a kontrol připravených k použití do příslušných jamek.
2. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut.
3. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamky a 3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
4. Pipetujte 100 µL roztoku HRP konjugátu do každé jamky.

MASTAZYME™ Cardiolipin IgG / IgM – 2013-04-24

5. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut.
6. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a 3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
7. Pipetujte 100 µL TMB substrátu do každé jamky.
8. Inkubujte po dobu 15 minut ve tmě při pokojové teplotě.
9. Přidejte 100 µL stop roztoku do každé jamky.
10. Po důkladném promíchání a vysušení dna mikrojamek změřte optickou hustotu při 450 nm a vypočítejte výsledky. Blank měřte proti vzduchu. Je doporučeno bichromatické měření za využití referenčních vlnových délek 600 – 690 nm. Výsledné koncentrace jednotlivých vzorků mohou být zjištěny pomocí elektronického programu nebo pomocí manuálního vynesení vůči kalibrační křivce.

**Vytvořené zbarvení je stabilní alespoň 30 minut. Mějte optické hustoty během této doby.**

## 9. Výsledky a interpretace

### Kvalitativní hodnocení

Kalibrátor 2 je použit pro kvalitativní interpretaci analýzy v závislosti na specifických požadavcích, které zahrnují nebo eliminují hraniční výsledky. Kvantitativní interpretace není možná za využití pouze samotného kalibrátoru 2.

### Kvantitativní hodnocení

Pro výpočet výsledků lze využít PC s vhodným softwarovým programem. V tomto případě jsou výsledky vypočítány za využití algoritmu zpracovávajícího 4 vstupní parametry, potřebné pro sestavení kalibrační křivky.

Volitelně: Kalibrační křivka je vytvořena zanesením středních hodnot absorbancí jednotlivých kalibrátorů na osu Y a jim odpovídající hodnoty koncentrací jsou vyneseny na osu X za využití buď log/log nebo linear/log milimetrového papíru. Hodnoty koncentrací kontrol a vzorků mohou být potom odečítány přímo z grafu.

### Doporučené normální hodnoty

Podle studií provedených na souboru vzorků sér od zdravých dárců a nemocných osob, byla stanovena rozmezí normálních a zvýšených hodnot výsledků. Je doporučeno, aby si každá laboratoř stanovila individuálně svá normální referenční rozmezí, která budou založena na výsledcích získaných ze vzorků lokální populace dárců.

#### Anti-IgG

negativní: < 10 U/mL

pozitivní: > 10 U/mL

#### Anti-IgM

negativní: < 8 U/mL

pozitivní: > 8 U/mL

## **Interpretace výsledků**

Výsledky mohou být ovlivněny několika faktory. Klinická diagnóza a prognóza onemocnění nemůže být určena pouze na základě jednoho výsledku vyšetření. Pro správné a definitivní určení diagnózy a prognózy onemocnění je třeba brát v úvahu i další laboratorní ukazatele a klinické příznaky.

Tato ELISA souprava detekuje protilátky zaměřené proti kardiolipinovým strukturám. Pro stabilizaci kardiolipinu na pevné fázi je použit  $\beta 2$  glykoprotein jako kofaktor. Vzorke obsahující protilátky proti  $\beta 2$  glykoproteinu mohou zkříženě reagovat s kardiolipinem.

## **10. Charakteristika testu**

Charakteristiky ELISA testů MASTAZYME™ Cardiolipin byly stanoveny a posouzeny v souladu s Evropskými IVD direktivami. Detailní validační data mohou být poskytnuta na zvláštní přání.

## **11. Literatura**

1. Autoantibodies, Eds. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996, Elsevier
2. Autoantikörper, K.Conrad, 1998, Pabst Science Publishers
3. Hughes, G.R.V., Harris, E.N. and Gharavi, A.E. The Anticardiolipin Syndrome. J. Rheumatol. 1986; 13,3: 486-489



## Poznámky:

### **Distributor:**

GALI spol. s.r.o.  
Ke Stadionu 179  
Semily, 513 01  
Tel: +420 481 689 050  
Fax: +420 481 689 051  
E-mail: [info@gali.cz](mailto:info@gali.cz)  
Web: [www.gali.cz](http://www.gali.cz)

### **Výrobce:**

Mast Diagnostica GmbH  
Feldstraße 20  
DE 23858 Reinfeld  
Tel.: +49 4533 2007-0  
Fax: +49 4533 2007-68  
E-mail: [mast@mast-diagnostica.de](mailto:mast@mast-diagnostica.de)  
Web: [www.mastgrp.com](http://www.mastgrp.com)