



We Apply Science



# BlueWell $\beta_2$ -Glycoprotein I IgM ELISA

Cat. No. GPM02-96



D-tek s.a.

rue René Descartes 19

BE-7000 Mons BELGIUM

Tel. +32 65 84 18 88

Fax. +32 65 84 26 63

Email: [info@d-tek.be](mailto:info@d-tek.be)

Domovská stránka [www.d-tek.be](http://www.d-tek.be)

R.C. Mons 132.050 • T.V.A. BE 454.291.184 • BNP PARIBAS FORTIS IBAN BE21 0015 0659  
4603 BIC GEBABEBB ING IBAN BE58 3701 0463 3179 BIC BBRUBEBB

## OBSAH

1	Princip testu .....	3
2	Složení soupravy .....	4
3	Další potřebné vybavení k provedení testu .....	5
4	Skladování a expirace .....	5
5	Bezpečnost práce .....	5
6	Vzorky a jejich skladování .....	6
7	Pracovní postup .....	6
8	Hodnocení výsledků .....	8
9	Charakteristiky soupravy.....	9
10	Omezení testu .....	10
11	Řešení nastalých problémů .....	11
12	Literatura .....	11
13	Vysvětlení symbolů .....	12

## Imunoenzymatická souprava ke kvantitativnímu stanovení specifických protilátek třídy IgM proti $\beta$ <sub>2</sub>-Glycoproteinu I v lidském séru.

---

### 1 Princip testu

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek třídy IgM ve vzorku metodou EIA., typ sandwich (tj. pevná fáze s navázaným specifickým antigenem – protilátka z vyšetřovaného vzorku - značená protilátka- substrát s TMB ). Jamky mikrotitrační destičky (96 odlamovatelných jamek) jsou potaženy specifickým antigenem. V průběhu testu jsou jednotlivé jamky inkubovány s vyšetřovanými vzorky (ředěné v poměru 1:51), přičemž dochází k vazbě specifických protilátek přítomných ve vzorku na antigeny v jamce destičky. Nenavázané protilátky vzorku jsou odstraněny promytím. Po promytí se přidá Konjugát, králičí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgM konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita Konjugátu se stanovuje pomocí substrátu s TMB, který zmodrá v případě positivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zbarvení na žluté. Intenzita žlutého zbarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci specifických IgM protilátek přítomných ve vzorku.

**2 Složení soupravy**

<b>Mikrotitrační destička</b>	1 ks
12 x 8 jamek s navázaným antigenem v sáčku se sušidlem Antigen: purifikovaný lidský β <sub>2</sub> -Glykoprotein I	
<b>Ředící roztok vzorků</b>	1 × 50 ml
Žlutě zbarvený roztok určený k ředění vzorků (Tris, BSA, Tween), konzervován MIT, roztok v pracovním ředění	
<b>Negativní kontrola</b>	1 × 1 ml
Zelený roztok lidského séra, konzervovaný MIT, v pracovním ředění	
<b>Kalibrátory</b>	6 × 1 ml
Kalibrátory s koncentrací protilátek 0, 25, 50, 100, 200, 400 U/ml Barevně odstupňované roztoky lidského séra, konzervovaný MIT, v pracovním ředění	
<b>Pozitivní kontrola</b>	1 × 1 ml
Modrý roztok lidského séra, konzervovaný MIT, v pracovním ředění	
<b>Konjugát</b>	1 × 20 ml
Červeně zbarvený roztok obsahující králičí imunoglobulin značený křenovou peroxidázou namířený proti lidským IgM konzervován MIT, roztok v pracovním ředění	
<b>Substrát</b>	1 × 20 ml
Bezbarvý roztok (TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), konzervován MIT, v pracovním ředění	
<b>Zastavovací roztok</b>	1 × 20 ml
2,5% roztok kyseliny sírové, v pracovním ředění	
<b>Promývací roztok</b>	1 × 50 ml
20× koncentrovaný roztok, bezbarvý, s obsahem Tris, Tween, konzervovaný MIT	
<b>Rámeček mikrotitrační destičky</b>	1 ks

### **3 Další potřebné vybavení k provedení testu**

Jedno a vícekanálové pipety

Špičky pro jednorázové použití

Promývací zařízení

Fotometr pro mikrotitrační destičky (vlnové délka 450 nm a referenční vlnová délka 650 nm)

Laboratorní sklo, zkumavky pro ředění

Absorpční nebo filtrační papír

Destilovaná voda

### **4 Skladování a expirace**

Soupravu skladujte při teplotě +2 °C až +8 °C. Po otevření skladujte roztoky při +2 °C až +8 °C, preferujte originální obal soupravy. Naředěný Promývací roztok je stabilní při teplotě +2 °C až +8 °C po dobu 4 měsíců. Při dodržení skladovacích podmínek platí expirace uvedená na obalech komponent.

### **5 Bezpečnost práce**

Souprava je určena pouze pro diagnostické účely in vitro. Souprava by měla být zpracována pouze kvalifikovaným personálem.

Při práci se vzorky sér je nutné dodržovat všechny místní předpisy týkající se bezpečnosti práce. Některé reagentie obsahují toxickou složku azid sodný. Vyvarujte se kontaktu s kůží.

Se vzorky sér je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem a likvidovat je v souladu s platnou legislativou. Komponenty soupravy a další pomůcky použité k provedení testu je nutné považovat vzhledem ke kontaktu s biologickým materiálem za potenciálně infekční. Proto je likvidujte společně s biologickým odpadem.

D-tek s.a. ani jeho autorizovaní distributoři **nesou zodpovědnost za případné škody, vzniklé v důsledku změny nebo nedodržení pracovního postupu.** Souprava musí být zpracována v souladu se všemi obecnými a individuálními podmínkami vyplývajícími ze správné laboratorní praxe.

## **6 Vzorky a jejich skladování**

Jako vzorek k vyšetření může být použito lidské sérum. Preferujte čerstvě odebrané vzorky séra. Sérum musí být odebráno do čistých, sterilních zkumavek.

Vzorky bakteriálně kontaminované, hemolytické nebo chylózní mohou ovlivnit výsledek testu. Vzorky sér mohou být interferujících části zbaveny centrifugací za pomalých otáček.

Vyšetřované vzorky séra je možno uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně tři dny. Při delším skladování vzorky zmrazte na -20 °C. Vyvarujete se opakovanému zamrazování/rozmrazování vzorků. Po rozmrazení vzorky důkladně promíchejte. Naředěné vzorky je nutno vyšetřit co nejdříve.

## **7 Pracovní postup**

### **7.1 Ředění vzorků sér**

Ředící roztok vzorků před použitím šetrně promíchejte.

Důkladně promíchané vzorky ředte 1:51 Ředícím roztokem vzorků:

např.: 10 µl vzorku + 500 µl Ředícího roztoku vzorků.

Dobře promíchejte.

### **7.2 Příprava pracovních roztoků**

Promývací roztok ředte 1:20 (1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody).

- Při manuálním promytí připravte 10 ml promývacího roztoku v pracovním ředění pro 8 jamek destičky nebo 120 ml pro stanovení 96 jamek. Např. 0,5 ml koncentrovaného Promývacího roztoku + 9,5 ml destilované vody.
- Pro automatické promytí na promývacím zařízení počítejte s objemem promývacího roztoku potřebného pro promytí požadované počtu testů a taktéž s mrtvým objemem promývacího roztoku, který zůstává v přístroji.

Kontroly (pozitivní, negativní a CUT-OFF) jsou v pracovním ředění, dále neředit!

Konjugát je v pracovním ředění, dále neředit!

Substrát je jednosložkový chromogenní substrátový roztok v pracovním ředění, dále neředit!

### **7.3 Mikrotitrační destička**

Nepoužijete-li celou destičku, zbylé testy vraťte zpět do obalu se sušidlem, hermeticky uzavřete a skladujte při +2 °C až +8 °C. Důsledně chraňte před vlhkostí!

#### **7.4 Průběh testu**

Všechny reagensie nechte vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promíchejte.

1. Dávkujte kontroly a ředěné vzorky
  - Pipetujte 100 µl Negativní kontroly do jamky.
  - Pipetujte 100 µl Kalibrátorů do 6 jamek.
  - Pipetujte 100 µl Pozitivní kontroly do 1 jamky.
  - Pipetujte 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění (viz 7.1 Ředění vzorků) do zbývajících jamek.
2. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě(+18 °C až + 24 °C).
3. Odsajte obsah jamek a 3 krát promyjte pracovním promývacím roztokem (200 µl na jedno promytí).
4. Dávkujte do všech 100 µl Konjugátu.
5. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě (+18 °C až + 24 °C).
6. Odsajte obsah jamek a 3 krát promyjte pracovním promývacím roztokem (200 µl na jedno promytí). Dávkujte do všech jamek 100 µl Substrátu.
7. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě (+18 °C až + 24 °C).
8. Zastavte reakci přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
9. Změřte na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků v jamkách ,a to do 30 minut po zastavení reakce.

#### **Poznámka**

Doporučujeme použít Blank (v duplexu) při každém běhu testů. Blank je pouze ředící roztok vzorků pipetovaný do jamky.

#### **Poznámka**

Při manuálním promývání prosím důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého papíru. Pipetujte vždy 200 µl na jedno promytí a ponechte 20 sekund v jamce destičky. Tento postup opakujte 3 krát.

## 8 Hodnocení výsledků

### 8.1 Výpočet Indexu positivity (IP)

Dělte absorbanci testovaného vzorku průměrnou absorbancí CUT-OFF naměřenou v téže sérii vyšetření:

$$IP = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Průměrná absorbance CUT-OFF}}$$

Interpretace výsledků vyšetření uvádí tabulka (Tabulka 1).

**Tabulka 1 Interpretace výsledků vyšetření**

Index positivity (IP)	Hodnocení
menší než 1	negativní
větší než 1	pozitivní

Vyšetření hraničních vzorků je zapotřebí opakovat z nového odběru s ohledem na specifika daného onemocnění.

### 8.2 Kvantitativní hodnocení

Sestrojte kalibrační křivku tak, že na osu X vynesete koncentrace kalibrátorů v U/ml a na osu Y odpovídající absorbance. Propojením jednotlivých bodů vytvořte kalibrační křivku. Hladinu protilátek ve vzorcích (U/ml) stanovte odečtením těchto hodnot z kalibrační křivky. Interpretace výsledků kvantitativního vyhodnocení testu uvádí tabulka (Tabulka 2). Normální hladina IgM protilátek je menší nebo rovno 25 U/ml.

**Tabulka 2 Kvantitativní interpretace v jednotkách (U/ml)**

Hladina protilátek (U/ml)	Hodnocení
menší než 25	negativní
větší než 25	pozitivní

Vyšetření hraničních vzorků je vhodné opakovat z nového odběru, který bude proveden s určitým časovým odstupem a s ohledem na specifika daného onemocnění.

Sérologický nálezn je možno interpretovat pouze v kontextu s výsledky ostatních laboratorních testů a s klinickým obrazem pacienta.



### 8.3 Validita testu

Test je platný, jestliže jsou dodrženy následující podmínky (Tabulka 3 ). Jestliže validační kritéria nejsou dosažena, test opakujte. Pokud problém přetrvává, kontaktujte prosím výrobce nebo distributora.

**Tabulka 3** Validací kritéria

	Absorbance	U/ml
<b>Blank</b>	méně než 0,100	-
<b>Negativní kontrola</b>	-	méně než 20
<b>Kalibrátor 25 U/ml</b>	méně než 50 % absorbance Kalibrátoru 400 U/ml	
<b>Pozitivní kontrola</b>	více než 0,800	200 až 400

## 9 Charakteristiky soupravy

### 9.1 Linearita

Vybraná séra byla testována tímto testem v lineárním ředění. Nicméně, díky heterogenní povaze lidských autoprotilátek v testovaných sérech nelze pravidlo linearity uplatnit v každém případě. Detailní data tohoto testu jsou k dispozici na vyžádání.

### 9.2 Reprodukovatelnost

Referenční kontrolní vzorky (pozitivní, hraniční a negativní) byly testovány ve statisticky významných replikacích, a to buď v jedné, nebo v několika analýzách. Získaná data byla použita pro Intra- a Inter-assay stanovení. Dosažené výsledky potvrdily, hodnoty byly ve stanoveném rozsahu a standardní odchylky byly menší než 10 % u intra-assay a méně než 20 % u inter-assay.

### 9.3 Citlivost a specifita

Citlivost byla stanovena na hladinu 99 %.

Specifita byla stanovena na hladinu 99 %

Referenční vzorky (referenční laboratoří a/nebo jinou metodou potvrzené pozitivní nebo negativní vzorky) byly analyzovány přesně podle pracovního postupu. Detailní data tohoto testu jsou k dispozici na vyžádání.

### 9.4 Očekávané hodnoty

Očekávaná hodnota pro normálního pacienta je negativní výsledek. Počet pozitivních výsledků a stupeň positivity je závislý na parametrech, jako je typ testované populace, léčby, atd. Každá laboratoř by si proto měla stanovit své vlastní očekávané hodnoty na základě typicky testovaných vzorků.

## 10 Omezení testu

1. Soupravu nechte vždy vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Nenahrazujte roztoky ani jamky destičky s odlišnými čísly šarže, mohly by tak být ovlivněny výsledky testu.
3. Používejte pinzety nebo laboratorní rukavice.
4. Při manipulaci se Substrátem dbejte opatrnosti, chraňte před sluneční zářením, aby nedošlo k jeho zmodrání.
5. Dodržujte předepsaný pracovní postup.
6. Klinická diagnóza by neměla být stanovena pouze na základě jediné diagnostické metody in vitro.
7. Podkladem pro stanovení správné diagnózy by mělo být kompletní klinické vyšetření včetně výsledků dalších laboratorních testů. Žádná diagnostická metoda použita samostatně nemůže vyloučit možnost výskytu falešně pozitivních nebo negativních výsledků.
8. **D-tek s.a.** ani jeho autorizovaní distributoři nenesou zodpovědnost za případné škody, vzniklé v důsledku změny nebo nedodržení pracovního postupu. Souprava by měla být zpracována pouze kvalifikovaným personálem.
9. V každém případě je odpovědnost D-tek omezena pouze na výměnu soupravy.

## 11 Řešení nastalých problémů

V tabulce (Tabulka 4) uvádíme přehled nejčastějších chyb, které mohou nastat v provedení testu.

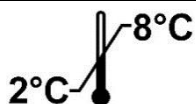
**Tabulka 4 Přehled nejčastějších problémů v provedení testu**

<b>Problém</b>	<b>Možná příčina</b>
<b>Negativní výsledek testu (nízká absorbance vzorku)</b>	použití koncentrovaného promývacího roztoku místo promývacího roztoku v pracovním ředění
	vzorek nebyl správně naředěn
	neaktivní Konjugát (kontaminovaný), použijte prosím nový
	Nevhodný typ filtru v readru (použijte 450 nm nebo 450/650 nm)
<b>Příliš pozitivní výsledek (vysoká absorbance vzorku)</b>	nedostatečné promytí jamek
	nedodržení inkubační doby testu
	příliš vysoká laboratorní teplota
	vzorek nebyl správně naředěn
	kontaminovaný vzorek
	kontaminovaný Substrát

## 12 Literatura

Aktuální literatura je k dispozici na požádání. Žádosti prosím zasílejte na adresu [info@d-tek.be](mailto:info@d-tek.be)

### 13 Vysvětlení symbolů



Skladovací teplota



Udržovat v suchu



Chránit před slunečním zářením



Použít do data



Číslo šarže



Výrobce



Čtěte návod k použití



Katalogové číslo



Počet testů



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

#### D-tek s.a.

rue René Descartes 19  
BE-7000 Mons BELGIUM  
Tel. +32 65 84 18 88  
Fax. +32 65 84 26 63  
Email: [info@d-tek.be](mailto:info@d-tek.be)  
[www.d-tek.be](http://www.d-tek.be)

Souprava je distribuována společností  
**TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.**

Křižíkova 68  
612 00 Brno, CZ  
Tel: +420 541 248 311  
Email: [info@testlinecd.cz](mailto:info@testlinecd.cz)  
[www.testlinecd.com](http://www.testlinecd.com)