

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0
Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58
Internet: www.orgentec.com

Návod k použití
2012-08



ORG 550 Anti-GBM

KRÁTKÝ POPIS

Anti-GBM je testovací systém ELISA pro kvantitativní měření IgG tříd protilátek proti glomerular basement membrane (GBM) ve vzorcích lidského séra nebo plasmy. Tento product je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

POUŽÍVANÉ SYMBOLY

	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro		Mikrotitrační
	Výrobce		Kalibrátor
	Katalogové číslo		Kalibrátor
	Dostačuje pro		Kalibrátor
	Kód šarže		Kalibrátor
	Spotřebujte do		Kalibrátor
	Teplotní omezení		Kontrola pozitivní
	Viz návod k použití		Kontrola negativní
	Chraňte před slunečním světlem		Vzorkový pufr
	Pro jednorázové použití		Enzymový konjugát
	Datum výroby		TMB substrátový roztok
			Ukončovací roztok
			Promývací pufr
			Připraven k použití

PRINCIP TESTU

Mikrotitrační destičky jsou potaženy čistěným antigenem GBM

Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: protilátky přítomné v pozitivních vzorcích se naváží na antigen nanesený na povrch reakčních jamek a vytvoří komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Následně přidání enzymatického konjugátu se naváže na imobilizovaný komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při druhém promytí odstraní nenavázaný enzymatický konjugát. Po přidání enzymatického substrátu dojde k hydrolyze a ke vzniku zbarvení v průběhu inkubace. Přidání kyseliny zastaví reakci, které tvoří žlutý finální produkt. Intenzita žlutého zbarvení odpovídá koncentraci komplexu protilátky a antigenu a lze ji fotometricky měřit při vlnové délce 450 nm.

OBSAH SOUPRAVY

ORG 550		Dostačuje pro 96 stanovení
	1	Dělitelná mikrotitrační destička obsahující 12 modulů s 8 jamkami. Připraveno k použití. Kód produktu na mikrotitrační: GBM
	1x 1.5 ml	Kalibrátor A 0 U/ml, obsahující séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml	Kalibrátor B 20 U/ml, obsahující GBM protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml	Kalibrátor C 40 U/ml, obsahující GBM protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml	Kalibrátor D 80 U/ml, obsahující GBM protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml	Kalibrátor E 200 U/ml, obsahující GBM protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml	Kontrola pozitivní, obsahující GBM protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
	1x 1.5 ml	Kontrola negativní, obsahující GBM protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
	15 ml	Vzorkový pufr P; žlutá; obsahuje PBS, BSA, saponáty, ochranný prostředek azid sodný 0.09%, 5x koncentrát.
	15 ml	Enzymový konjugát; světle červená; obsahuje protilidské protilátky IgG, označeno HRP; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek PROCLIN 0,05%
	15 ml	TMB substrátový roztok; 3,3', 5,5'- tetramethyl-benzidín. Připraveno k použití.
	15 ml	Ukončovací roztok; obsahuje kyselinu. Připraveno k použití.
	20 ml	Promývací pufr; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát.
	1	Návod k použití: ELISA Mini-CD
	1	Certifikát analýzy

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- Reader – čtečka mikrotitračních desek schopná koncových měření při 450 nm; volitelně 620 nm referenční vlnové délky
- software pro redukci dat
- vícekanálový dávkovač nebo pipeta pro opakované dávkování o obsahu 100 µl
- mixér Vortex
- mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- laboratorní stopky
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- odměrný válec na 1000 ml, 100 ml
- plastová nádoba pro skladování promývacího roztoku

Automatizace

Orgentec ELISA sety lze použít na otevřených automatických procesorech ELISA. Každý test musí být validní na příslušném automatizovaném systému. Informace jsou k dispozici na vyžádání.

ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

- Krevní vzorky odebrat podle platných směrnic a metod.
- Krev nechat sražit a sérum získat odstředěním.
- Používání hemolitičických, lipemických a ikterických sér je potřeba se vyhnout.
- Při teplotě 2 - 8 °C chlazené vzorky séra a plazmy mohou být skladovány až 5 dní. Je-li plánováno delší skladování, měly by být vzorky rozděleny na alikvotní části a při -20 °C hluboce zmrazeny.
- Vyhnout se opakovanému rozmrazení a zmrazení! To může vést k variabilní ztrátě aktivity autoprotlátek nebo protilátek.
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2-8°C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Skladujte mikrotitrační hermeticky uzavřeny a v suchu v dodaném zásobníku.
- Uchovatelnost neotevřené soupravy je 18 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální šarži.
- Rozředěný mycí roztok a vzorkový pufr jsou stabilní minimálně 30 dní, jsou-li skladovány při 2-8°C. Doporučujeme spotřebovat stejný den.

POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Složky soupravy nepoužívejte po uplynutí doby trvanlivosti.
- Nezaměňujte jednotlivé součásti souprav z různých šarží a produkty.
- Všechny složky musejí mít pokojovou teplotu (20 – 28 °C).
- Připravte si všechny složky a vzorky. Jakmile test začne, je nutné provést celý bez přerušení.
- Dvojité kontroly mohou být provedeny. Tímto způsobem chyby pipetování mohou být více zřejmé.
- Provádějte jednotlivé kroky testu výhradně v určeném pořadí.
- Vždy používejte čerstvě naředěné vzorky.
- Pipetujte veškeré složky a vzorky na dna jamek.
- Aby nedocházelo ke kontaminaci, vyměňujte špičku mezi jednotlivými vzorky a kontrolami soupravy.
- Dosažení nejlepších výsledků je podmíněno důkladným vymytím titračních jamek a důkladným odstraněním promývacího pufru.
- Všechny kroky inkubace musejí být přesně časovány.
- Mikrotitrační destičku nepoužívejte opakovaně.

UPOZORNĚNÍ A PREVENCE

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Komponenty obsahující lidské sérum byly otestovány a nebyly nalezeny HBsAg, HCV, HIV1 a HIV2 dle schválených metod FDA. Žádný test nemůže zaručit absenci HBsAg, HCV, HIV1 nebo HIV2 a je tedy nutno s každým lidským sérem, obsahujícím látku testu, manipulovat jako s infekčním materiálem.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhněte se kontaktu se substrátem TMB (3,3',5,5'-tetrametyl benzidin).
- Ukončovací roztok obsahuje kyselinu, dle klasifikace je bezpečná. Zabraňte kontaktu s pokožkou.
- Kontrola, vzorkový roztok a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace obsahuje 0.05% ProClinu 300 jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:

- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchněte důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně oplachujte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Dle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze: Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepijte, nekuřte nebo nenanášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a políty materiál řádně zlikvidujte.
- Limity vystavení / ochrana osob: Noste ochranné rukavice z nitrilové pryže nebo přirozeného latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.

- Situace, kterým je třeba předcházet: Roztok substrátu je citlivý na světlo. Skladujte na tmavém místě.
 - Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.
- Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami séry.

Příprava Složek

WASH

Naředte obsah Promývacího pufru koncentráty (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000ml (1l).

DILUENT

Vzorkový pufr P: Před použitím, naředte obsah (20 ml) lahvičky koncentrovaného vzorkového pufru 5x destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 100 ml.

Příprava Složek

Před použitím naředěňte vzorků od pacientů **1:50** se vzorku pufru:

Přidejte 980 µl předředěného vzorkového pufru ve zkumavce a přidejte 20 µl vzorku.

Dobře promíchejte. Kontrolní vzorky a kalibrátory jsou připraveny k použití a není třeba je ředit.

PŘÍPRAVA SLOŽEK

Připravte si dostatečný počet mikrotitračních modulů pro všechny kontrolních vzorky a ředěné vzorky.

1. Napipetujte do jamek po 100 µl kalibračních roztoků, kontrolních roztoků a ředěných vzorků pacientů. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě (20 – 28 °C).
Odstraňte obsah mikrojamek a promyjte je třikrát pomocí 300 µl promývacího roztoku.
2. Do každé jamky přidejte 100 µl enzymového konjugátu.
Inkubujte po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
Odstraňte obsah mikrojamek a promyjte je třikrát pomocí 300 µl promývacího roztoku.
3. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku TMB substrátu.
Inkubujte po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
4. Do každé jamky přidejte 100 µl ukončovacího roztoku
Inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
Odečtěte optickou densitu při vlnové délce 450 nm (referenční 600–690 nm) a vypočtěte výsledky.
Vzniklá barva je stabilní minimálně po dobu 30 minut. Během této doby odečtěte optickou densitu.

Příklad pro pipetovací schéma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P2										
B	B	P3										
C	C											
D	D											
E	E											
F	C+											
G	C-											
H	P1											

P1, ... Vzorky A-E Kalibrátor C+, C- Kontrola

VALIDACE

Tento test je platný, pouze pokud optická densita při vlnové délce 450 nm pro kalibrátory / kontroly a výsledky kontrol odpovídá příslušným rozsahům hodnot uvedených v osvědčení o analýze přiloženém u každé testovací soupravy. Pokud kterékoli z těchto kritérií není splněno, jsou výsledky neplatné a test je nutno opakovat.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro kvantitativní výsledky proložte optickou hustotu každého kalibrátoru versus kalibrační koncentrace a vytvořte kalibrační křivku. Koncentrace neznámých sér lze pak odhadnout interpolací kalibrační křivky.

Software pro zpracování dat se 4-parametrovou křivkou padnou a lin-log souřadnice optické density a koncentrace je nejlepší metoda.

CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

KALIBRACE

Tento analyzační systém je zkalibrován v relativních smluvených jednotkách, protože nejsou k dispozici žádné mezinárodní referenční přípravky.

Rozsah měření

Vypočet rozsahu analýzy ELISA je 0 - 200 U/ml

Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků sér dárců zdravé krve byly stanoveny následující rozsahy pomoci analýzy ELISA: Cut-off 20 U/ml

Interpretace výsledků

negativní < 20 U/ml
pozitivní ≥ 20 U/ml

Linearity

Vzorky pacientů obsahující vysokou hladinu určité protilátky byly sériově zředěny ve vzorkovém roztoku pro ukázkou dynamického rozsahu analýzy a horního / spodního konce linearity. Aktivita pro každý roztok byla spočítána z kalibrační křivky pomocí 4-Fit s parametrem-lin-log souřadnicích.

Vzorek	Ředění	Pozorovaná U/ml	Očekávaná U/ml	P/O [%]
1	1:100	175.7	175.7	100
.	1:200	89.0	87.9	101
.	1:400	43.2	43.9	98
.	1:800	21.8	22.0	99
.	1:1600	10.1	11.0	92
2	1:100	189.2	189.2	100
.	1:200	93.5	94.6	99
.	1:400	45.0	47.3	95
.	1:800	22.6	23.7	95
.	1:1600	11.0	11.8	93

Limit detekce

Funkční citlivost 1 U/ml

Technické údaje

Intraanalizační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 nálezů v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

Interanalizační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 6 nálezů při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-Assay		
Vzorek	Průměr U/ml	CV %
1	15.6	5.3
2	85.8	5.4
3	143.4	5.7

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr U/ml	CV %
1	14.2	6.4
2	90.1	5.4
3	154.4	5.8

Interference

Nebyla pozorována žádná interference se séry, která byla hemolytická (až do 1 000 mg/dl), lipemická (až do 3g/dl triglyceridů) nebo obsahovala bilirubin (až 40 mg/dl). Taktéž nebyly pozorovány žádné efekty interference s použitím antikoagulancií (EDTA, heparin, citrát).

Výsledky studie

Study population	n	n Pos	%
Goodpastures syndrome	20	20	100.0
Connective tissue disease	20	1	5.0
Autoimmune vasculitis	20	0	0.0
Normal human sera	100	0	0.0

		Klinická diagnóza		
		Pos	Neg	
ORG 550	Pos	20	1	
	Neg	0	139	
		20	140	160
	senitivita	100.0 %		
	specifita	99.3 %		
	diagnostická efektivita	99.4 %		

HRANICE METODY

Toto vyšetření je diagnostická pomůcka. Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediného testu, ale měly by být hodnoceny lékařem po všech klinických a laboratorních testech a porovnány s celkovým klinickým obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by měla být přijata individuálně.

Výše patologické a normální referenční rozmezí pro protilátke u vzorků pacientů je třeba považovat za doporučení pouze. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí podle normy ISO 15189 nebo jiné použitelné laboratorní pokyny.

REFERENCE

- Bolton, W.K. Goodpasture's syndrome. *Kidney Int.*, Vol. 50, 1753-1766, 1996
- Daly, C., Conlon, P. J., Medwar, W., Walshe, J. J. Characteristics and outcome of anti-glomerular basement membrane disease: a single centre experience. *Ren. Fail.*, Vol. 18, 105-112, 1996
- Goodpasture, E. W. The significance of certain pulmonary lesions to the etiology of influenza. *Am. J. Med. Sci.*, Vol.158, 864-870, 1919
- Hellmark, T., Segelmark, M., Bygren, P., Wieslander, J. Glomerular basement membrane autoantibodies. in: Peter, J. B., Shoenfeld, Y. (Hrsg.), *Autoantibodies*, S. 291-298, 1996
- Hudson, B.G., Reeders, S. T., Tryggvason, K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, 26033-26036, 1993
- Hudson, B. G., Wieslander, J., Wisdom, B. J., Noelken, M. E. Goodpasture syndrome: Molecular architecture and function of basement membrane antigen. *Lab. Invest.*, Vol. 61, 256-269, 1989
- Kalluri, R., Gattone, V. H., Noelken, M. E., Hudson, B. G. The alpha-3 chain of type IV collagen induces autoimmune Goodpasture syndrome. *PNAS*, Vol. 91, 6201-6205, 1994
- Kalluri, R., Melendez, E., Rumpf, K. W., Sattler, K., et al. Specificity of circulating and tissue bound autoantibodies in Goodpasture syndrome. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, Vol. 108, 134-139, 1996
- Saxena, R., Sturfelt, G., Nived, O., Wieslander, J. Significance of anti-entactin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and related disorders. *Ann. Rheum. Dis.*, Vol. 53, 659-665, 1994
- Wieslander, J., Bygren, P., Heinegard, D. Isolation of the specific glomerular basement membrane antigen involved in Goodpasture syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 81, 1544-1548, 1984a
- Wieslander, J., Barr, J.F., Butkowski, R. J., Edwards, S. J. et al. Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *PNAS*, Vol. 81, 3838-3842, 1984b
- Schultz H: From infection to autoimmunity: a new model for induction of ANCA against the bactericidal/permeability increasing protein (BPI). *Autoimmun.Rev* 2007, 6:223-227.

- 1 Pipet **100 µl** calibrator, control or patient sample
→ Incubate for **30 minutes** at room temperature
→ Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 2 Pipet **100 µl** enzyme conjugate
→ Incubate for **15 minutes** at room temperature
→ Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 3 Pipet **100 µl** substrate solution
→ Incubate for **15 minutes** at room temperature
- 4 Add **100 µl** stop solution
→ Leave untouched for **5 minutes**
→ Read at **450 nm**