



Kód 44870	96 Testů
SKLADOVAT PŘI 2-8 °C	
Reagencie 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

Protilátky proti GBM (glomerulární bazální membrána) ve vzorku se vážou na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (imunoglobulin proti lidskému IgG značený křenovou peroxidázou) s protilátkami navázanými na povrchu jamky. Nakonec se přidává 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) s H₂O₂ 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 vzorku¹.

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. Připravena k použití. Lidské sérum s anti-GBM protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Lidské sérum bez anti-GBM protilátek, 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 %.
- M. Mikrotitrační destičky:** 12 modulů po 8 rozlamovatelných jamkách s navázanou lidskou rekombinantní, vysoce purifikovanou GBM.
- S1-S5. Standardy 1,5mL.** Připraveny k použití. Sérum s anti-GBM protilátkami, azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace GBM protilátek jsou: 0, 10, 20, 40 a 100 U/mL, jak je uvedeno na štítku lahviček. Kalibrováno proti internímu referenčnímu standardu.

Další varování a bezpečnostní opatření naleznete v bezpečnostním listu produktu (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 potenciálně infekčním materiálem.

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-8 °C. Reagencie 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 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.

DOPLŇUJÍCÍ VYBAVENÍ

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

VZORKY

Sérum nebo plazma odebraná standardním způsobem. Vzorek před testováním zředte 1/50 ředícím pufr. K testování vždy použijte čerstvě naředěné vzorky.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu (Poznámka 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 obsah jamek a jamky promyjte 3krát 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 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 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 křivka je 4parametrická, logistická.

Kvalitativní stanovení: Vypočtěte absorbanci Cut-off následovně:

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

Vypočtěte 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 reagensí (B) a stanovení opakujte.



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

ANTI-GBM PROTILÁTKY – EIA (GBM)

ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

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. Kontrace 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. 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):

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 interferovat².

- Rozsah měření: 0,5 – 100 U/mL. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím puřem (B) a opakujte stanovení.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Protilátky proti glomerulární bazální membráně jsou přítomny u pacientů s Goodpastureovým syndromem. Onemocnění se projevuje jako progresivní glomerulonefritida s masivním plicním krvácením nebo bez něj. Nález anti-GBM protilátek potvrzuje diagnózu život ohrožujícího onemocnění, které způsobuje ztrátu ledvin a ukazuje na vážnou prognózu. Triáda glomerulonefritida, plicní krvácení a protilátky proti alfa-3 řetězci kolagenu typu IV GBM, jsou základními prvky v diagnóze Goodpastureova syndromu. Senzitivita a specifita je kolem 98-99 %, pokud je prováděna ELISA technikou při použití vysoce purifikovaného GBM antigenu^{3,4,5}

Senzitivita a specifita soupravy BioSystem pro stanovení Goodpastureova syndromu byla 100 % respektive 100 % 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 reagencie 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: 15.4. 2025

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme přezkontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod, LOT certifikát a bezpečnostní listy jsou k dispozici na internetové adrese: <https://einfo.bio> a na: www.jktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR: JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha 5,
tel.: +420 257 220 760, paha@jktrading.cz

SK: JK-Trading spol.s.r.o., Dlhá 43, 900 31 Stupava,
tel.: + 421 264 774 591, jk-trading@jk-trading.sk

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