

Anti-ASGPR

REF 3900

Enzymová imunoanalýza pro stanovení
IgG protilátek proti asialoglykoproteinovému
receptoru v lidském séru



GA Generic Assays GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Německo
Telefon: +49 33708 9286 0
Fax: +49 33708 4417 25
info@genericassays.com
www.genericassays.com



1 Účel použití

Anti-ASGPR je semikvantitativní imunoanalýza pro stanovení IgG protilátek proti asialoglykoproteinovému receptoru (ASGPR) v lidském séru.

Anti-ASGPR je určen jako pomůcka při diagnostice systémových autoimunitních poruch jater ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními nálezy.

Imunoanalýza je určena pro manuální profesionální diagnostické použití *in vitro*.

2 Diagnostický význam

ASGPR je jaterní membránový receptor, který hraje klíčovou roli v endocytóze glykoproteinů z krve. V průběhu zánětlivých onemocnění jater, zejména autoimunitní hepatitidy, byla pozorována indukce humorálních a buněčných imunitních mechanismů vůči ASGPR. Hladina autoprotilátek ASGPR koreluje se závažností onemocnění a při léčbě klesá.

Do skupiny primárních autoimunitních onemocnění jater (PAL) patří autoimunitní hepatitida (AIH), primární biliární cirhóza (PBC) a primární sklerotizující cholangitida (PSC).

Autoimunitní hepatitida je chronický zánět jater s dosud neznámou etiologií. Zahrnuje jak mírné klinické formy, tak závažné progresivní hepatitidy s letálním průběhem. Častěji jsou postiženy ženy. Klinické příznaky onemocnění se mohou objevit již ve dvaceti letech.

Pacienti trpící AIH vykazují řadu autoprotilátek. Vzhledem k výskytu různých protilátkových specifit se diskutuje o klasifikaci AIH do různých podskupin. Typ I je charakterizován výskytem antinukleárních protilátek (ANA) a protilátek proti hladkému svalstvu (ASMA). U typu II byl popsán vysoký výskyt protilátek proti mikrozomálním antigenům jater a ledvin (LKM). Pro hepatitidu typu II jsou specifické také protilátky proti LC1.

Pacienti s autoimunitní hepatitidou typu III vykazují protilátky proti rozpustnému jaternímu antigenu (SLA).

Autoprotilátky ASGPR lze detekovat v séru až 76 % pacientů trpících AIH. Autoprotilátky ASGPR se však mohou objevit i u pacientů s virovou hepatitidou. Virová geneze jaterního onemocnění by proto měla být vyloučena.

Stanovení autoprotilátek proti ASGPR podporuje sledování a diferenciální diagnostiku toxických a jiných chronických zánětlivých onemocnění jater.

3 Princip testu

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je imunoanalýza pro stanovení specifických protilátek. Stripy mikrotitrační destičky jsou potaženy antigeny specifickými pro test. Pokud jsou ve vzorku pacienta přítomny protilátky, vážou se na antigeny. Sekundární protilátka konjugovaná s enzymem peroxidázou detekuje vzniklý imunitní komplex. Bezbarvý substrát se přemění na barevný produkt. Intenzita signálu reakčního produktu je úměrná aktivitě protilátek ve vzorku. Po zastavení se intenzita signálu reakčního produktu měří fotometricky.

4 Komponenty testu

Komponenta	Popis
Mikrotitrační destička A Ag 96 1 kus	12 oddělitelných mikrotitračních stripů (připravených k použití), 8 jamek na jeden strip, každá jamka potažená králičím ASGPR
Negativní kontrola N CONTROL - 1 x 1 ml, zelený uzávěr	Barevné ředění lidského séra (připravené k použití; obsahuje ProClin 950) Aktivita protilátek je uvedena v certifikátu kontroly kvality.
Cut off kontrola CO CONTROL C 1 x 1 ml, bílý uzávěr	Barevné ředění lidského séra (připravené k použití; obsahuje ProClin 950) Aktivita protilátek je uvedena v certifikátu kontroly kvality.
Pozitivní kontrola P CONTROL + 1 x 1 ml, červený uzávěr	Barevné ředění lidského séra (připravené k použití; obsahuje ProClin 950) Aktivita protilátek je uvedena v certifikátu kontroly kvality.
Ředidlo pro vzorky C DIL 1 x 100 ml, černý uzávěr	Barevný roztok (připravený k použití; obsahuje ProClin 950)
Promývací pufr B BUF WASH 10x 1 x 100 ml, bílý uzávěr	Koncentrovaný roztok (10x; obsahuje ProClin 950)
Konjugát IgG D CONJ 1 x 15 ml, červený uzávěr	Barevný roztok polyklonální protilátky proti lidskému IgG konjugované s křenovou peroxidázou (připravený k použití; obsahuje ProClin 950).
Substrát E SOLN TMB 1 x 15 ml, modrý uzávěr	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (připravený k použití)
Stop roztok F H2SO4 0,25M 1 x 15 ml, žlutý uzávěr	0,25 M kyselina sírová (připravená k použití)
Lepicí fólie 2 kusy	-

Certifikát QC 1 kus	-
Návod k použití 1 kus	-

5 Požadované materiály, které nejsou poskytovány

- Běžné laboratorní vybavení
- Přesné pipety (5 - 1000 µl), vícekanálové pipety (100 - 1000 µl) a jednorázové pipetovací špičky
- Odměrné válce (100-1000 ml)
- Zkumavky na vzorky pro přípravu ředění
- Vortexový mixér nebo jiné rotátory
- Myčka mikrotitračních destiček nebo promývací hřeben
- Čtečka mikrotitračních destiček s optickými filtry pro 450 nm a 620 nm nebo 690 nm.
- Adsorpční papír nebo papírový ubrousek
- Destilovaná nebo deionizovaná voda

6 Skladování a stabilita

Po obdržení musí být všechny testovací komponenty skladovány při teplotě 2 °C až 8 °C, nejlépe v originální krabici soupravy. Při správném skladování v původních obalech jsou všechny složky stabilní až do data expirace. Při správném skladování při teplotě 2 °C až 8 °C jsou všechny složky stabilní nejméně 2 měsíce po otevření.

7 Obecné informace

Tento produkt je určen pouze pro diagnostiku *in vitro*. Před použitím je třeba si pečlivě přečíst návod k použití. Platí pouze pro tento výrobek s uvedeným složením a musí být přísně dodržován, aby byly zajištěny spolehlivé výsledky testů. Odchytky mohou vést k chybným výsledkům testu. Složky se nesmí zaměňovat za testovací činidla různých šarží nebo jiných výrobců.

Při odebrání alikvotů z lahviček je třeba zabránit kontaminaci činidel použitím aseptických technik. Po použití musí být lahvičky s činidly pevně uzavřeny příslušnými uzávěry.

Křížová kontaminace vzorků nebo činidel může vést k nekonzistentním výsledkům testů a je třeba jí zabránit používáním důsledných pipetovacích technik.

Po celou dobu testování a skladování je třeba zabránit vystavení činidel silnému světlu.

Nedostatečné promytí má za následek špatnou přesnost a zvýšené signály měření. Po každém kroku promývání je třeba zcela odstranit zbytky tekutiny.

8 Příprava

8.1 Příprava činidel

Všechny součásti včetně mikrotitrační destičky je třeba před použitím uvést na pokojovou teplotu (RT: 18 °C až 25 °C) po dobu nejméně 30 minut. Všechny tekuté složky se musí jemně promíchat, aby byla zajištěna homogenita.

8.1.1 Mikrotitrační destička

Mikrotitrační destička je uzavřena v hliníkovém sáčku. Nepoužité testovací stripy by měly být vždy skladovány v chladu a chráněny před vlhkostí pomocí vysoušedla v řádně uzavřeném hliníkovém sáčku. Pečlivě uzavřené testovací stripy lze používat 8 týdnů po otevření.

8.1.2 Kontroly

Pozitivní, cut off a negativní kontroly jsou připraveny k použití a nesmí se dále ředit. Kontroly musí být použity při každém testu. Laboratoře mohou také validovat své vlastní kontrolní vzorky a používat je alternativně.

8.1.3 Ředidlo vzorku

Ředidlo pro vzorky je připraveno k použití.

8.1.4 Promývací pufr

Promývací pufr je koncentrovaný a před použitím se musí naředit 1:10 destilovanou vodou (např. 100 ml + 900 ml). Musí být připraveno dostatečné množství promývacího roztoku. Naředěný promývací roztok lze skladovat při teplotě 2 °C až 8 °C až 30 dní.

8.1.5 Konjugát

Konjugát je připraven k použití a při skladování při teplotě 2 °C až 8 °C je stabilní až 8 týdnů po otevření.

8.1.6 Substrát

Podklad je připraven k použití. Roztok substrátu by neměl být vystaven silnému světlu.

8.1.7 Stop roztok

Zastavovací roztok je připraven k použití.

8.2 Příprava vzorků

8.2.1 Materiál vzorků

Doporučuje se použít čerstvé odebrané sérum z krve odebrané venepunkcí. Je třeba se vyhnout použití ikterických, lipemických, hemolytických nebo bakteriálně kontaminovaných vzorků. Nerozpustné látky musí být ze vzorku odstraněny odstředěním. Vzorky nesmí být tepelně inaktivovány.

8.2.2 Ředění vzorků

Vzorky je třeba naředit v poměru 1:101 (např. 10 µl + 1000 µl) ředidlem pro vzorky a důkladně promíchat. Je třeba zabránit tvorbě pěny.

8.2.3 Skladování vzorků

Vzorky lze uchovávat při teplotě 2 °C až 8 °C až tři dny. Dlouhodobé skladování vyžaduje -20 °C. Je třeba se vyhnout opakovanému zmrazování a rozmrazování. Pro opakované použití by měly být vzorky rozděleny na alikvoty a uchovávány při -20 °C.

9 Provedení testu

9.1 Schéma pipetování

Doporučuje se následující schéma pipetování:

	1	2	3	4
A	N	Vzorek 6		
B	CO	Vzorek 7		
C	P	Vzorek 8		
D	Vzorek 1	...		
E	Vzorek 2	...		
F	Vzorek 3	...		
G	Vzorek 4	...		
H	Vzorek 5	...		

9.2 Postup

Je třeba dodržovat uvedené inkubační doby a teploty a vyvarovat se výrazných časových posunů při pipetování vzorků a činidel. Mikrotitrační destička by se měla po přidání činidel krátce protřepat.

Krok	Popis
1. Přidání kontrol a zředěných vzorků	Přidejte 100 µl kontrol připravených k použití a naředěných vzorků do každé jamky.
2. Inkubace	Zakryjte destičku a inkubujte 60 minut při RT.
3. Promývací cyklus	Odsajte roztok a třikrát promyjte se 300 µl promývacího roztoku, přičemž každé promývání musí trvat alespoň 5

	sekund; osušte mikrotitrační destičku poklepáním na papírový ubrousek, abyste odstranili zbytky kapek.
4. Přidání konjugátu	Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu připraveného k použití.
5. Inkubace	Přikryjte destičku a inkubujte 30 minut při RT.
6. Promývací cyklus	Odsajte roztok a třikrát promyjte se 300 µl promývacího roztoku, přičemž každé promývání musí trvat alespoň 5 sekund; osušte mikrotitrační destičku poklepáním na papírový ubrousek, abyste odstranili zbytky kapek.
7. Přidání substrátu	Do každé jamky přidejte 100 µl substrátu připraveného k použití.
8. Inkubace	Přikryjte destičku a inkubujte 15 minut ve tmě při RT.
9. Přidání zastavovacího roztoku	Do každé jamky přidejte 100 µl stop roztoku připraveného k použití.
10. Analýza	Odečtěte optickou hustotu (OD) při 450 nm oproti 620 nebo 690 nm do 30 minut po zastavení reakce.

9.3 Automatizace

Automatizované zpracování imunoanalýz musí být provedeno obdobně jako při manuálním použití a validováno uživatelem.

10 Vyhodnocení testů

10.1 Metrologická návaznost

Imunoanalýza se kalibruje pomocí vnitřního referenčního vzorku. Výsledky jsou vyjádřeny jako vazebný index (BI).

10.2 Hodnocení

Semikvantitativní hodnocení se provádí výpočtem vazebného indexu (BI) vydělením optické hustoty (OD) vzorku pacienta optickou hustotou hraniční kontroly.

10.3 Validační kritéria

Testovací běhy jsou platné pouze tehdy, jsou-li splněna následující kritéria platnosti:

- OD negativní kontrola < cut off kontrola < pozitivní kontrola
- Negativní kontrola musí být vyhodnocena jako negativní.
- Pozitivní kontrola musí být vyhodnocena jako pozitivní.

Pokud tato kritéria nejsou splněna, test není platný a musí se opakovat.

10.4 Řešení problémů

V případě neplatného testu je třeba ověřit data použitelnosti a podmínky skladování, inkubační doby a teploty a přesnou kalibraci všech použitých přístrojů. Pokud se nepodařilo zjistit důvod neplatného provedení testu, obraťte se na dodavatele nebo výrobce výrobku.

10.5 Referenční rozsahy

Referenční rozsahy jsou uvedeny níže:

	Výklad
Vazba Index 1.0	negativní
Index vazby 0,9 - 1,1	hraniční
Vazba Index > 1.1	pozitivní

Vzhledem k rozdílné séroprevalenci v jednotlivých regionech by si každá laboratoř měla referenční rozmezí ověřit vlastní analýzou a v případě potřeby je upravit.

10.6 Interpretace výsledků testů

Pozitivní výsledek testu ukazuje na přítomnost specifických protilátek. Negativní výsledek ukazuje na nepřítomnost specifických protilátek, ale nevylučuje možnost autoimunitní reakce. V případě hraničního výsledku testu není možné spolehlivé vyhodnocení.

10.7 Omezení metody

Interpretace výsledků testů musí být vždy zvažována v kombinaci s klinickým obrazem pacienta. Diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediné diagnostické metody. Pro stanovení diagnózy je třeba vyhodnotit všechny klinické a laboratorní nálezy. Pro potvrzení by měla být provedena další vyšetření.

11 Charakteristiky provedení

11.1 Analytické charakteristiky provedení

11.1.1 Přesnost

Přesnost výsledků testu byla hodnocena stanovením variability uvnitř testu a mezi testy analýzou více vzorků s různou aktivitou protilátek.

	Přesnost v rámci testu		Přesnost mezi testy	
	BI	CV (%)	BI	CV (%)
Vzorek 1	1.5	5.0	1.7	9.1
Vzorek 2	3.5	7.4	3.9	8.1
Vzorek 3	7.2	5.5	7.9	8.4

11.2 Diagnostické charakteristiky provedení

11.2.1 Diagnostická citlivost a specifická

Citlivost a specifická byla hodnocena analýzou 45 vzorků séra od pacientů trpících autoimunitní hepatitidou a 118 vzorků séra od neselektovaných dárců krve.

	Diagnostické provedení
Citlivost	57.8 %
Specifická	> 99 %

12 Upozornění a bezpečnostní opatření

Výrobek je určen výhradně pro použití v diagnostice *in vitro* kvalifikovaným, autorizovaným a vyškoleným personálem. Se všemi složkami testu a lidskými vzorky je třeba zacházet opatrně jako s potenciálně nebezpečnými. Je třeba dodržovat správnou laboratorní praxi (SLP) a všechny příslušné předpisy.

V případě, že je výrobek poškozen nebo jsou informace o výrobku včetně označení chybné nebo nesprávné, kontaktujte výrobce nebo dodavatele.

Tento výrobek obsahuje přípravky lidského a/nebo živočišného původu. Veškerý materiál získaný z lidských tělních tekutin nebo orgánů použitých k přípravě složek byl testován a shledán negativním na HBsAg (povrchový antigen viru hepatitidy B) a anti-HIV, stejně jako na anti-HCV protilátky. Se všemi složkami a všemi vzorky pacientů je však třeba zacházet jako s potenciálně nebezpečnými v souladu s vnitrostátními právními předpisy a příslušnými pokyny pro biologickou bezpečnost.

Protože výrobek obsahuje potenciálně nebezpečné materiály, je třeba dodržovat následující bezpečnostní opatření: Při manipulaci s materiálem soupravy nebo vzorky nekuřte, nejezte a nepijte. Zabraňte přímému kontaktu s materiálem soupravy nebo vzorky tím, že budete nosit ochranné rukavice laboratorní plášť a ochranné brýle. Nikdy nepipetujte materiál ústy. Rozlitý materiál ihned setřete a zasažený povrch důkladně omyjte dekontaminačním prostředkem. Po použití si důkladně umyjte ruce.

Některá činidla obsahují jako konzervační látku ProClin (< 1,0 %) a nesmí se polykat ani přijít do styku s kůží nebo sliznicí.

Je třeba dodržovat informace uvedené v bezpečnostním listu o možných nebezpečích, opatřeních první pomoci, opatřeních při neúmyslném úniku velkého množství, manipulaci a skladování, osobních ochranných prostředcích, informacích o likvidaci a toxikologických informacích.

Jakákoli závažná událost, ke které došlo v souvislosti s prostředkem, musí být nahlášena výrobci a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém je uživatel a/nebo pacient usazen.

13 Likvidace

Při dekontaminaci a likvidaci je třeba dodržovat doporučení CDC a příslušné místní a národní environmentální směrnice a předpisy. Vzorky, potenciálně kontaminované materiály a infekční odpad musí být dekontaminovány, např. autoklávováním po dobu 20 minut při 121 °C.

14 Odkazy

- McFarlane BM, McSorley CG, Vergani D, McFarlane IG, Williams R: Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. J. Hepatol 1986, 3, 196 – 205.
- Treichel U, Poralla T., Hess G, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH: Autoantibodies to human asialoglycoprotein receptor in autoimmune-type chronic hepatitis. Hepatology 1990, 11, 606 – 12.
- Hausdorf G, Roggenbuck D, Feist E, Büttner T, Jungblut PR, Conrad K, Berg C, Klein R. Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) measured by a novel ELISA--revival of a disease-activity marker in autoimmune hepatitis. Clin Chim Acta. 2009 Oct;408(1-2):19-24.
- Villalta D, Mytilinaiou MG, Elsner M, Hentschel C, Cuccato J, Somma V, Schierack P, Roggenbuck D, Bogdanos DP. Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) in patients with autoimmune liver diseases. Clin Chim Acta. 2015 Oct 23;450:1-5.

15 Symboly

	Výrobce
	Označení shody CE
	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	Katalogové číslo

UDI

LOT



Ag 96

CONTROL -

CONTROL C

CONTROL +

DIL

CONJ

BUF WASH 10x

SOLN TMB

H2SO4 0.25M

Jedinečný identifikátor prostředku

Číslo šarže

Teplotní limit

Datum spotřeby

Přečtěte si návod k použití

Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů

Nepoužívejte opakovaně

Upozornění

Varování

Biologické riziko

Chraňte před slunečním zářením

Mikrotitrační destička

Negativní kontrola

Cut off kontrola

Pozitivní kontrola

Ředidlo pro vzorky

Konjugát

Promývací pufr

Substrát

Stop roztok

16 Změny

Změny v aktuálním návodu k použití

Aktuální verze	004/09.2022
Shrnutí změn	Redakční změny; v souladu s nařízením EU č. 1272/2008 byl přidán grafický symbol varování.