

ENA 4-PROFIL

ELISA
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

kód 44775 96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C
Reagencie pro stanovení ENA protilátek Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.

PRINCIP METODY

Specifické ENA protilátky ze vzorku se váží na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (křenovou peroxidázou značené imunoglobuliny proti lidskému IgG) 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 zbarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorpance je úměrná koncentraci protilátek ve vzorku¹.

OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Koncentrovaný fosfátový pufr, azid sodný 15 mmol/l.
- B. Ředící roztok.** 100 mL. Tris pufr, azid sodný 15 mmol/l.
- C+. Pozitivní kontrola.** 1,8 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-SSA (Ro), anti-SSB (La), anti-Sm a anti-Sm/RNP protilátkami. Azid sodný 15 mmol/l.
- C-. Negativní kontrola.** 1,8 mL. Ready to use. Lidské sérum bez anti-SSA(Ro), anti-SSB(La), anti-Sm a anti-Sm/RNP protilátek, azid sodný 15 mmol/l.
- CO1. Anti-SSA(Ro) Cut-off Standard.** 1 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-SSA(Ro) protilátkami. Kalibrováno proti ANA lidskému referenčnímu séru AF/CDC7 z centra pro kontroly onemocnění (CDC), Atlanta, USA.
- CO2. Anti-SSB(La) Cut-off Standard.** 1 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-SSB(La) protilátkami. Kalibrováno proti ANA lidskému referenčnímu séru AF/CDC2 z centra pro kontroly onemocnění (CDC), Atlanta, USA.
- CO3. Anti-Sm Cut-off Standard.** 1 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-Sm protilátkami. Kalibrováno proti ANA lidskému referenčnímu séru AF/CDC5 z centra pro kontroly onemocnění (CDC), Atlanta, USA.
- CO4. Anti-Sm/RNP Cut-off Standard.** 1 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-Sm/RNP protilátkami. Kalibrováno proti ANA lidskému referenčnímu séru AF/CDC5 z centra pro kontroly onemocnění (CDC), Atlanta, USA.
- D. Konjugát.** 15 mL. Křenovou peroxidázou značené polyklonální králičí imunoglobuliny proti lidskému IgG.
- E. Substrát.** 15 mL. 3,3,5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).
- F. Zastavovací roztok.** 15 mL. Kyselina fosforečná 4,5%
Nebezpečí: H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte..
- M. Mikrotitrační destičky:** 4x24 testů, 3 moduly po 8 jamkách nakoutovaných vysoce purifikovaným antigenem SSA(Ro)-červeně značeno, antigenem SSB(La)-modře značeno, antigenem Sm-žlutě značeno a antigenem Sm/RNP-zeleně značeno.

Pro další varování a doporučení – viz Karta bezpečnostních údajů (SDS).

Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a shledána 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. Neotevřené reagencie jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

Známky zhoršení kvality:

- Kapalně 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 promývací reagentie. Roztok je stabilní 30 dní při 2-8°C.

Ostatní činidla jsou připravena k přímému použití - ready to use.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

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

VZORKY

Sérum nebo plasma odebraná standardním způsobem. Vzorek před testováním zředte 1/100 ředícím pufr (B). Pro stanovení používejte vždy čerstvá ředění vzorku.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu. (Pozn. 1).
2. Otevřete balíček s mikrotitračními destičkami (M) a vyjměte požadované množství pro stanovení. (Poznámka 2).
3. Pipetujte po 100 µL pozitivní kontroly (C+), Negativní kontroly (C-), Cut-off standardu (CO) a naředěných vzorků do odlišných jamek.
4. Stripy umístěte do zvlhčovací komůrky a inkubujte je při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
5. Odsajte obsahy jamek a jamky promyjte 3-krát po 300 µl promývacího pufru vždy po dobu nejméně 10 sekund (Poznámka 3 a 4).
6. Pipetujte do všech jamek po 100 µl konjugátu (D).
7. Stripy umístěte do zvlhčovací komůrky a inkubujte je 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 5 minut při pokojové teplotě. (Poznámka 5).
12. Odečtěte absorbanční hodnoty jednotlivých jamek při 450 nm. Zbarvení je stabilní po dobu nejméně 30 minut.

VÝPOČET

Vypočtete absorbanční poměr:

$$\text{Absorbanční poměr} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ Vzorku}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off}}$$

Jestliže jsou hodnoty absorbanční vyšší než je horní měřicí limit readeru, nařeďte vzorky reagentií (B) a stanovení opakujte.

REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, které mají vyšší absorbanční poměr jak 1,2 jsou považovány za pozitivní.

Vzorky, které mají nižší absorbanční poměr jak 1,0 jsou považovány za negativní.

Vzorky, které mají absorbanční poměr mezi 1,0 až 1,2 jsou považovány za nejasné a doporučuje se opakování analýzy. Uvedené hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí.

kód 44775 96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C
Reagencie pro stanovení ENA protilátek Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.

KONTROLA KVALITY

Absorbanční poměr pro Pozitivní kontrolu (C+) by měl být vyšší než 1,2 a pro Negativní kontrolu (C-) by měl být nižší než 1,0. Každá laboratoř by si měla stanovit svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

CHARAKTERISTIKA ZKOUŠKY

-Souprava na ENA 4 profil rozpoznává pouze specifické protilátky k SSA(Ro), SSB(La), Sm, nebo Sm/RNP. S jinými antigeny nebyly pozorovány žádné zkřížené reakce.
-Interference: Hemoglobin (1000 mg/dl), bilirubin (40 mg/dl) a triglyceridy (3000 mg/dl) neinterferují. Nebyl pozorován ani žádný interferující efekt při použití antikoagulantů. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat².

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Přítomnost vysokých hladin protilátek specifických k SSA(Ro) indikuje primární Sjögrenův syndrom a Systémový Lupus Erythematosus (SLE). Tyto protilátky lze nalézt přibližně u 60-70% pacientů se Sjögrenovým syndromem a u 40-50% pacientů s diagnózou SLE^{3,4}.

Přítomnost vysokých hladin protilátek specifických k SSB (La) indikuje na primární Sjögrenův syndrom a Systémový Lupus Erythematosus. Tyto protilátky lze nalézt přibližně u 10-40% pacientů se Sjögrenovým syndromem a u 6-15% pacientů s diagnózou SLE^{5,6}.

Přítomnost vysokých hladin protilátek specifických k Sm silně indikuje Systémový Lupus Erythematosus. Tyto protilátky lze nalézt přibližně u 20-30% pacientů s diagnózou SLE^{7,8}.

Přítomnost vysokých hladin protilátek specifických k Sm/RNP indikuje Systémový Lupus Erythematosus a různorodá onemocnění pojivových tkání (MCTD). Tyto protilátky lze nalézt přibližně u 30-40% pacientů s diagnózou SLE a u 100% pacientů s různorodým onemocněním pojivových tkání^{7,9}.

Senzitivita a specifita pro Sjögrenův syndrom při použití Biosystems soupravy ENA 4-profil byla 72,9% a 96,7% pro anti-SSA(Ro) a 61,4% a 95,8% pro anti-SSB(La) protilátky ve studii se 190 klinickými vzorky.

Pro SLE, byla senzitivita 51,4% a specifita 95,8% pro anti-Sm a 52,9% a 95,8% pro anti-Sm/RNP protilátky ve studii se 190 klinickými vzorky.

Pro MCTD byla senzitivita 96,7% a specifita 95,8% pro anti-Sm/RNP protilátky ve studii se 220 klinickými vzorky. Detailní zpráva ze studie je k dispozici na vyžádání.

Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKA

- Nepoužívejte reagenty z odlišných souprav.
- Nepoužité jamky skladujte v plastickém sáčku a uzavřete je společně s vysoušecím sáčkem.
- Nepoškoďte vnitřní povrch mikrotitračních destiček během manipulace.
- Promývací roztok by měl být kompletně odstraněn z jamek.
- Zastavovací roztok (F) enzymové reakce musí být pipetován do jamek přibližně ve stejném časovém odstupu jako substrát (E) v odstavci č.9.

LITERATURA

- Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000
- Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, Aidinis V, Gualis A and Moutsopoulos HM. Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. British Journal of Rheumatology 1993; 32: 449-455
- Reichlin M and Scofield RH. SSA(Ro) autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
- Tzioufas AG and Moutsopoulos HM. Clinical significance of autoantibodies to Ro/SSA and La/SSB. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- Wahren M, Téngner P, Gunnarsson I, Lundberg I, Hedfors E, Ringertz NR and Pettersson I. Ro/SS-A and La/SS-B antibody level variation in patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. J Autoimmun. 1998 Feb;11(1):29-38.
- Peng SL and Craft JE. Spliceosomal snRNPs autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
- Bernstein R. Autoantibodies to histones, Sm and ubiquitins. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996
- Van Venrooij WJ and Sillekens PTG. Small nuclear RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. Clinical and Experimental Rheumatology 1989; 7: 635-645

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 24.8.2016.

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese:

www.biosystems.es.

Český návod je k dispozici na: www.iktrading.cz

Výhradní distributor:

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

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

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