



# ANTI - NUKLEOSOMÁLNÍ - PROTILÁTKY (NCL)



|  |          |
|--|----------|
| Kód 44861  | 96 Testů |
| SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C   |          |
| Reagencie pro stanovení nukleosomálních protilátek. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích. |          |

## ANTI-NUKLEOSOMÁLNÍ – PROTILÁTKY (NCL)

### ELISA MIKROTIČAČNÍ DESTIČKY

#### PRINCIP METODY

Anti-nukleosomální protilátky ze séra 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do každé jamky jako enzymový substrát. Vzniklá enzymatická barevná reakce je zastavena kyselinou. Žluté zbarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci NCL protilátek ve vzorku<sup>1</sup>.

#### OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Koncentrovaný fosfátem pufovaný fyziologický roztok, azid sodný 15 mmol/L.
- B. Ředící roztok** 100 mL. Tris pufr, azid sodný 15 mmol/L.
- C+. Pozitivní kontrola.** 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-nukleosomálními protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Lidské sérum bez anti-nukleosomálních protilátek, azid sodný 15 mmol/L.
- D. Konjugát** 15 mL. Křenovou peroxidázou značené králičí polyklonální imunoglobuliny proti lidskému IgG.
- E. Substrát.** 15 mL. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).
- F. Zastavovací roztok .** 15 mL. Kyselina fosforečná 4,5%.  
**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:** 12 modulů po 8 rozlamovatelných jamkách s navázaným rekombinacním lidským nukleosomem.
- S1-S6. Standardy.** Každý po 1,5 mL. Ready to use. Sérum s anti – nukleosomálními protilátkami, azid sodný 15mmol/L. Koncentrace protilátek jsou: 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 U/mL, jak je uvedeno na štítku lahviček. Kalibrováno proti internímu referenčnímu standardu.

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

*Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a sledována negativními na přítomnost protilátek anti-HIV a anti-HCV, a stejně tak na HBs antigen. Nicméně zacházejte s kontrolami jako s potencionálně 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:

- 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. Důkladně promíchejte. Pro 1 strip se spotřebuje přibližně 50 ml promývací reagentie. Rostok je stabilní 30 dnů 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 plazma odebraná standardním způsobem. Vzorek před testováním zředte 1/100 ředícím pufr (B). Používejte vždy čerstvě naředěné vzorky.

#### PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu (Pozn. 1).
2. Otevřete balíček s mikrotitračními destičkami a vyjměte požadované množství pro stanovení (Pozn. 2).
3. Postup práce:
  - **Kvantitativní stanovení:** Pipetujte po 100 µL každého standardu (S1-S6), Pozitivní kontroly (C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek.
  - **Kvalitativní stanovení:** Pipetujte 100 µL standardu S3, 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 3-krát po 300 µL promývacího pufru vždy po dobu nejméně 10 sekund (Pozn. 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 po dobu 5 minut při pokojové teplotě. (Pozn. 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 hodnoty absorbancí pro každý standard proti koncentraci anti-nukleosomálních protilátek (U/mL). Koncentrace protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce (doporučená křivka: 4-parametrická logistická).

#### Kvalitativní stanovení:

Vypočtete absorbanci Cut-off následovně:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ S3} \times 0,8$$

Vypočtete 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 ředícím roztokem (B) a stanovení opakujte.

#### REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, s koncentrací vyšší 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, 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.



# ANTI - NUKLEOSOMÁLNÍ - PROTILÁTKY (NCL)



|   |          |
|---|----------|
| Kód 44861   | 96 Testů |
| SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C  |          |
| Reagencie pro stanovení nukleosomálních protilátek.<br>Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích. |          |

## ANTI-NUKLEOSOMÁLNÍ – PROTILÁTKY (NCL)

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

#### KONTROLA KVALITY

Absorbance standardu S6 by měla být vyšší než 1,300.  
Koncentrace pozitivní kontroly (C+) by měla být mezi 20 U / ml a 35 U / ml a negativní kontrola (C-) by měla být nižší než 10 U / ml.

Absorbanční poměr pro negativní kontrolu (C-) by měl být nižší než 1,0.

Každá laboratoř by měla zavést vlastní vnitřní systém kontroly jakosti a postupy pro nápravná opatření, pokud kontroly nesplňují přípustné odchylky.

#### METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

| Koncentrace (střední) | CV    | n  |
|-----------------------|-------|----|
| 14,5 U/mL             | 4,5 % | 24 |
| 34,0 U/mL             | 3,1 % | 24 |
| 69,0 U/mL             | 6,4%  | 24 |

- Reprodukovatelnost (run to run):

| Koncentrace (střední) | CV     | n  |
|-----------------------|--------|----|
| 14,5 U/mL             | 12,4 % | 30 |
| 34,0 U/mL             | 7,3 %  | 30 |
| 69,0 U/mL             | 5,2%   | 30 |

- Detekční limit: 0,25 U/mL.

- Anti nukleosomální souprava BioSystems rozpoznává pouze protilátky specifické k nukleosomům.

- Interference: Hemoglobin do 1000 mg/dL, bilirubin do 40mg/dL, triglyceridy do 3000 mg/dL neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat<sup>2</sup>.

- Rozsah měření: 1,5 – 100 U/mL. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím puřem (B) a opakujte stanovení.

#### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Detekce anti-nukleosomálních protilátek je dnes považována za první krok v diagnostice SLE. Tyto protilátky jsou považovány za nejspecifičtější (84-88%) a nejčasněji se vyskytující protilátky u tohoto onemocnění. Jsou také průkazným laboratorním znakem lupósní nefritidy, kde anti-nukleosomální komplexy vytvářejí deposity v glomerulární basální membráně. Jako takové jsou anti-nukleosomální IgG protilátky mnohem specifičtějším znakem lupósní nefritidy než anti-dsDNA a anti-histonové protilátky. 16–30% pacientů s lupósní nefritidou má pozitivní jenom NCL protilátky. Tyto protilátky jsou také přítomny jako sekundární protilátky u pacientů s jinými autoimunními chorobami pojivové tkáně a revmatoidní artritidy<sup>3,4,5</sup>.

Senzitivita pro stanovení SLE soupravou Biosystems byla ve studiu s 330 klinickými vzorky stanovena na 89,1% a specifita 96,8%. Podrobnosti 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.

#### POZNÁMKA

- Nepoužívejte reagenty z různých souprav.
- Skloďte nepoužité jamky v plastickém sáčku a uzavřete je společně s vysoušecím sáčkem.
- Nepoškodte vnitřní povrch mikrotitračních destiček.
- 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.
- Burlingame RW. The clinical utility of antihistone antibodies. Autoantibodies reactive with chromatin in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus. Clin Lab Med 1997; 17(3): 367-378.
- Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, Bach JF, Piette JC. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2000; 43(1): 76-84.
- Chabre H, Amoura Z, Piette JC, Godeau P, Bach JF, Koutouzov S. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1995; 38(10): 1485-1491.

#### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 21.2.2019.

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](http://www.biosystems.es).

Český návod je k dispozici na: [www.iktrading.cz](http://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