



Kód 44863	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagencie pro stanovení anti-Scl70 protilátek . Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

## ANTI-Scl70 PROTILÁTKY

ELISA  
MIKROTIČAČNÍ DESTIČKY

## PRINCIP METODY

Anti – Scl70 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/IgM) 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 protilátek ve vzorku<sup>1</sup>.

## OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok. 50 mL. Koncentrovaný fosfátový pufr, azid sodný 15 mmol/l.
- B. Ředící roztok 100 mL. Tris, azid sodný 15 mmol/l.
- C+. Pozitivní kontrola. 1,5 mL. Ready to use. Sérum s protilátkami proti Scl70, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola. 1,5 mL. Lidské sérum bez protilátek proti Scl70, azid sodný 15 mmol/L.
- D. Konjugát. 15 mL. Křenovou peroxidázou značené králíčí 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 vysoce purifikovaným kardiolipinem, fosfátovým inositem, serinem, fosforečnou kyselinou a b2-glykoproteinem 1.
- S1-S6. Standardy. Každý po 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum s protilátkami proti Scl70. Azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace protilátek jsou: 0, 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 U/ml, jak je uvedeno na štítku lahviček. Kalibrováno proti ANAQ Lidskému referenčnímu séru AF/CDC9 z Centra pro kontrolu nemocí (CDC), Atlanta, USA.

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

Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a sledována negativně 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:

- 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. Roztok je stabilní 30 dnů při 2-8°C. Pro 1 strip se spotřebuje přibližně 50 ml promývací reagensie.

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). K testování vždy používejte čerstvě naředěné vzorky.

## PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechny 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 IgG/IgM (S1-S6), Pozitivní kontroly IgG/IgM (C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek.
  - Kvalitativní stanovení: Pipetujte 100 µl standardu S3 IgG/IgM, Pozitivní kontroly IgG/IgM(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 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 100 µl konjugátu DG nebo DM.
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 5 minut při pokojové teplotě. (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 anti – Scl70 protilátek (U/mL). Koncentrace protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce. (doporučená křivka : 4-parametrická logistická, cubic spline, jednostranná hyperbola).

**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, nařeďte vzorky reagentem (B) a stanovení opakujte.

## REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, s koncentrací větší jak 12,5 U/mL, nebo které mají absorbanční poměr vyšší jak 1,0 jsou považovány za pozitivní. Vzorky, s koncentrací nižší jak 7,5 U/mL, nebo které mají



# ANTI- Scl70 PROTILÁTKY



Kód 44863	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagencie pro stanovení anti-Scl70 protilátek . Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

## ANTI-Scl70 PROTILÁTKY

## ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

absorbanční poměr nižší jak 1,0 jsou považovány za negativní. Vzorky, které vykazují hodnotu koncentrace protilátek mezi 7,5 a 12,5 U/ml považujte za hraniční a doporučuje se testování opakovat. Zvažte jiné testování pro diferenciatní diagnózu. Uvedené hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí.

### KONTROLA KVALITY

Absorbance standardu S6 by měla být vyšší než 1,300 U/mL. Koncentrace pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí od 23 do 33 U/mL a u negativní kontroly (C-) by měla být nižší jak 7,0 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
22,9	4,0	24
45,2	3,2	24
92,1	3,4	24

- Reprodukovatelnost (run to run):

U/ml	CV %	n
22,9	2,8	30
45,2	2,8	30
92,1	2,4	30

- Detekční limit: 0,5 U/mL .
- Souprava pro stanovení anti Scl70 protilátek detekuje jen tyto protilátky. Žádné zkřížené reakce s jinými ENA protilátkami nebyly pozorovány.
- Interference: Hemoglobin(1000 mg/dL), bilirubin (40mg/dL) a triglyceridy(3000 mg/dL) neinterferují. Nebyly zjištěny interference s antikoagulanty. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat<sup>2</sup>.
- Rozsah měření: 0,5 – 100 U/mL. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím pufrem (B) a opakujte stanovení.

### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Přítomnost vysokých hladin protilátek specifických na Scl70 indikuje onemocnění sklerodermou. Protilátky proti Scl70 se nachází přibližně u 20-40% pacientů s tímto onemocněním<sup>3,4</sup>. Ve studii se 125 klinickými vzorky byla senzitivita soupravy BioSystems Anti Scl70 76,0% a specifita na 98,7%. Detaily studie jsou dostupné na vyžádání. Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

### POZNÁMKA

1. Nezaměňujte reagencie ze souprav různých šarží.
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. Vázquez-Abad D, Rothfield NF. Topoisomerase-I (Scl-70) autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. Kuwana M, Medsger TA, Wright TM. Detection of anti-DNA Topoisomerase I antibody by an enzyme-linked immunosorbent assay using overlapping recombinant peptides Clin Immunol Immunopathol 1995;76 (3): 266-278.

### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu : 26.8.2016.

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](http://www.biosystems.es). Český návod je k dispozici na: [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.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