



Kód 44865	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagencie pro stanovení protilátek proti centromeru B. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

## PROTILÁTKY PROTI CENTROMEROVÉMU PROTEINU B

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

#### PRINCIP METODY

Protilátky proti centromerovému proteinu B 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 protilátek ve vzorku<sup>1</sup>.

#### OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Fosfátový pufr, 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. Sérum s protilátkou proti centromerovému proteinu B, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Lidské sérum bez protilátek, azid sodný 15 mmol/L.
- 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:** 12 modulů po 8 rozlamovatelných jamkách s navázaným rekombinantním centromerovým proteinem B.
- S1-S5. Standardy každý po 1,5mL.** Ready to use. Sérum s protilátkami proti centromeru B, azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace protilátek jsou: 0, 3, 10, 30 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 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

Składujte 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. Pro 1 strip se spotřebuje přibližně 50 mL promývací reagentie. Roztok 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 pufrém. K testování vždy používejte čerstvě naředěný vzorek.

#### 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. 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 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 (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 je 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 hodnoty absorbancí pro každý standard proti koncentraci anti-centromery B v 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:

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

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 reagentem (B) a stanovení opakujte.



Kód 44865	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagencie pro stanovení protilátek proti centromeru B. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

## PROTILÁTKY PROTI CENTROMEROVÉMU PROTEINU B

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

#### REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, s koncentrací větší jak 3 U/mL, nebo které mají absorbanční poměr vyšší jak 1,0 jsou považovány za pozitivní. Vzorky, s koncentrací nižší jak 3 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.

#### KONTROLA KVALITY

Absorbance standardu S5 by měla být vyšší než 1,300. Koncentrace Pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí od 8 do 15 U/mL a u Negativní kontroly (C-) by měla být nižší jak 3 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
5,4	5,4	24
41,8	4,4	24
75,1	4,7	24

– Reprodukovatelnost (run to run):

U/mL	CV %	n
5,4	5,4	30
41,8	5,0	30
75,1	4,2	30

- Detekční limit: 0,3 U/mL
- Souprava pro testování protilátek proti centromerám je specifická k centromerovému proteinu B. Nebyla pozorována žádná cross reaktivita mezi jinými druhy protilátek.
- Interference: Hemoglobin (1000 mg/dL), bilirubin (40 mg/dL) a triglyceridy (3000 mg/dL) neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat<sup>2</sup>.
- Rozsah měření: 1,0–100 U/mL. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím pufrům (B) a opakujte stanovení.

#### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Protilátky proti centromerovému proteinu B jsou se vyskytují u pacientů se systémovou sklerózou (SSc), zvláště u pacientů s formou kožního onemocnění. Tyto protilátky jsou často pozorovány u pacientů s Raynaudovým fenoménem a u CREST syndromu (kalcinóza, Raynaudův fenomén, poruchy motility ezofagu, sklerodaktylie, teleangiectazie) a u podskupin SSc. Je dokázáno, že protilátky proti centromerovému proteinu B se vyskytují převážně u žen. Stanovení centromerového proteinu B je velmi specifické u pacientů s prokázaným onemocněním SSc, ale negativní výsledek nevylučuje diagnózu SSc<sup>3,4,5</sup>.

Ve studii se 152 klinickými vzorky testy Elisa společnosti Biosystems vykazovaly senzitivitu pro CREST syndrom u protilátek proti centromerám typu B přibližně 96,9% a specifitu 94,2%. 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.

#### POZNÁMKA

1. Nepoužívejte reagencie z různých souprav.
2. Skladujte nepoužité jamky v plastickém sáčku a uzavřete je společně s vysoušecím sáčkem.
3. Nepoškoďte 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. McHugh NJ. Centromere autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996, 161 – 167.
4. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. Arthritis Res Ther 2003, 5(2): 80 – 93.
5. Spencer – Green G, Alter D, Welch HG. Test Performance in systemic sclerosis: anti – centromere and anti-Scl-70 antibodies. Am J Med 1997, 103(3): 242-248.

#### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 14.6.2018  
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