



PROTILÁTKY PROTI LYSOZYMU



| | |
|--|----------|
| Kód 44909 | 96 Testů |
| SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C | |
| Reagencie pro stanovení anti lysozymových protilátek. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích. | |

PROTILÁTKY PROTI LYSOZYMU

ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

PRINCIP METODY

Protilátky proti anti- lysozymu 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 H₂O₂ do každé jamky jako enzymový substrát. Vzniklá enzymatická barevná reakce je zastavena kyselinou. Žluté zabarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci protilátek ve vzorku¹.

OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Koncentrovaný Tris pufr, detergent, azid sodný 15 mmol/l.
- B. Ředící roztok** 100 mL. Fosfátový pufr, albumin z hovězího séra, detergent, azid sodný 15 mmol/l.
- C+. Pozitivní kontrola.** 1,5 mL. Ready to use. Sérum s anti-lysozymovými protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum bez anti-lysozymových 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%.**
H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.
P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KÚŽÍ (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 lysozymem.
- S1-S6. Standardy.** Každý po 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-lysozymovými protilátkami. 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 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

Skladujte při 2-8°C. Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

Známky zhoršení kvality:

- Kapalné 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 pufr (B). K testování vždy používejte čerstvě naředěný vzorek.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu (Pozn.: 1).
2. Otevřete balíček s mikrotitračními destičkami a vyjměte požadované množství pro stanovení (Poznámka 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 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 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 při pokojové teplotě po dobu 5 minut. (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-lysozym (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:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ S3} \times 0,80$$

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 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.



PROTILÁTKY PROTI LYSOZYMU



| | |
|--|----------|
| Kód 44909 | 96 Testů |
| SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C | |
| Reagencie pro stanovení anti lysozymových protilátek. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích. | |

PROTILÁTKY PROTI LYSOZYMU

ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

KONTROLA KVALITY

Absorbance standardu S6 by měla být vyšší než 1,300 U/mL. Koncentrace Pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí od 20 do 40 U/mL a Negativní kontroly (C-) by měla být nižší jak 10 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 |
|------|-----|----|
| 11,3 | 3,9 | 24 |
| 22,8 | 2,6 | 24 |
| 62,4 | 5,1 | 24 |

– Reprodukovatelnost (run to run):

| U/ml | CV% | n |
|------|-----|----|
| 11,3 | 4,2 | 30 |
| 22,8 | 3,1 | 30 |
| 62,4 | 5,8 | 30 |

- Detekční limit: pro je 0,5 U/mL .
- Interference: Hemoglobin do 1000 mg/dL, bilirubin do 40 mg/dL a triglyceridy do 3000 mg/dL neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat².
- Rozsah měření: 0,5 –100 U/mL. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím pufrům (B) a opakujte stanovení.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Anti- lysozymové protilátky spolu s protilátkami anti- elastáza, anti- laktoferin, anti-BPI, nebo anti- katepsin G jsou minoritní autoprotiilátky a při imunofluorescenčních technikách stanovení můžeme dostat ve výsledku C-ANCA nebo P-ANCA obraz.

Při C-ANCA testech je v 80-90% případů cílovým antigenem proteináza3 (PR3), ve zbývajících 10-20% jsou to jiné proteiny. Baktericidní permeabilitu zvyšující protein (BPI), protilátky anti-elastáza, anti-laktoferin, anti-lysozym a anti-katepsin G byly zjištěny u různých nereumatických onemocnění³.

P-ANCA protilátky u ulcerózní kolitidy a Cronovy nemoci jsou běžně namířené proti lysozymu, ale I proti katepsinu G, elastáze a laktoferinu. U pacientů s chronickou reaktivní artritidou jsou protilátky proti lysozymu zastoupené ve významném množství^{4,5}.

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

POZNÁMKA

1. Nezaměňujte reagenty 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. Talor MV, Stone JH, Stebbing J, Barin J, Rose NR, Burek CL. Antibodies to selected minor target antigens in patients with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). Clinical and Experimental Immunology 2007; 150: 42–48
4. Kossa K, Coulthart A, Ives CT, Pusey CD, Hodgson HJ. Antigen specificity of circulating anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995;7(8):783-9.
5. Loch H, Skogh T, Wiik A. Characterisation of autoantibodies to neutrophil granule constituents among patients with reactive arthritis, rheumatoid arthritis, and ulcerative colitis. Ann Rheum Dis 2000; 59:898–903

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 13.6.2018.

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.

Český návod je k dispozici na: 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