IMTEC-ENA PROFILE

Profil ENA

ELISA pro detekci anti-ENA protilátek (IgG)

Velikost balení

[REF]	ITC60033	8× 12 testů	Kompletní souprava

[IVD]

Před testováním si prosím pečlivě přečtěte instrukce.

Procedurální připomínky:

Nepoužívejte reagencie po datu jejich spotřeby.

Roztoky [DIL] DB14, [WASH][20×] WB03, [SUB] TMB ELISA a [STOP] STOP ELISA mohou být používány v rámci jiných testovacích souprav nebo šarží, pokud reagencie v nich sdílejí stejné označení.

Všechny ostatní reagencie jsou specifické pro jednotlivé šarže souprav a nesmí být použity v jiných soupravách ani v jiných šaržích stejného typu soupravy.

Skladujte reagencie při 2–8 °C.

Použití

IMTEC-ENA Profile je nepřímý enzymatický imunologický test s antigenem zachyceným na pevné fázi, který slouží ke kvalitativnímu stanovení IgG autoprotilátek proti extrahovatelným jaderným antigenům v lidském séru. Test je určen pouze pro *in vitro* diagnostiku a slouží k diagnóze chorob pojivových tkání.

Protilátky proti extrahovatelným jaderným antigenům jsou typické pro některá revmatická onemocnění a mohou přispět k diagnóze a prognóze těchto chorob: systémový lupus erythematodes (SLE), Sjögrenův syndrom, smíšené onemocnění pojiva (Sharpův syndrom, MCTD), sklerodermie, poly- a dermatomyositidy a CREST syndrom.

IMTEC-ENA Profile umožňuje současnou detekci specifických autoprotilátek proti SS-A/Ro, SS-B/La, SmD1, U1-snRNP, Scl70, Jo1, histonům a centromernímu B proteinu (CENP-B).

SS-A/Ro	Antigeny: SS-A 60, SS-A 52 Sjögrenův syndrom (~90 %), SLE (50 %)
SS-B/La	Antigen: SS-B Sjögrenův syndrom (85 %)
SmD1	Antigen: SmD1 peptid SLE (70 %)
U1-snRNP	Antigeny: RNP-A, RNP-C, RNP 68 kD smíšené onemocnění pojiva (MCTD) (100 %)
Scl70	Antigen: Topoisomeráza I Systémová sklerodermie (70 %)
Jo1	Antigen: Histidyl-tRNA-syntetáza Polymyozitida/Dermatomyozitida(25–30 %)
Histon	Antigeny: Histony H2A, H2B, H3, H4 SLE způsobený léčivy (DILE) (95 %), SLE (20–50 %)
CENP-B	Antigen: CENP-B (80 kD) CREST syndrom (kalcinóza, Raynodova nemoc, poruchy motility jícnu, sklerodaktylie a teleangiectázie)

Princip

Test je založen na adsorpční imobilizaci extrahovatelných jaderných antigenů (nativních, rekombinantních nebo peptidů) na mikrotitrační proužky a následném navázání ENA protilátek. Navázané protilátky jsou pak detekovány pomocí konjugátu peroxidázy (HRP) se sekundární protilátkou proti lidskému IgG. Po přidání roztoku substrátu se objeví zabarvení, jehož intenzita je úměrná koncentracím a/nebo aviditám detekovaných protilátek. Po přidání [STOP] roztoku se barva přemění z modré na žlutou.

Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
Telefon +49 6122-9988-0 · Telefax +49 6122-9988-100 · e-Mail human@human.de

Reagencie a obsah soupravy

[MTP]	12	**Mikrotitrační proužky (Microtiter Strips)** (ve stojánku) 8jamkové separátní proužky připravené k použití s následujícími navázanými antigeny (každý antigen je celkem ve 12 jamkách): SS-A/Ro (A_{1-12}), SS-B/La (B_{1-12}), SmD1 (C_{1-12}), U1-snRNP (D_{1-12}), Histon (E_{1-12}), CENP-B (F_{1-12}), Scl70 (G_{1-12}) a Jo1 (H_{1-12})
[CAL]	3 ml	**Kalibrační kontrola (Calibration Control)** (bílé víčko),
[NC]	3 ml	**Negativní kontrolní lidské sérum (Negative Control Serum)** (zelené víčko), připravené k použití
[WASH] [20×] WB03	50 ml	**Promývací pufr (Washing Buffer)** (černé víčko) Koncentrát (20×) na 1 l TRIS pufr pH 6,9 ±0,2
[DIL] DB14	100 ml	**Ředicí roztok (Dilution Buffer)** (modré víčko), připraven k použití fosfátový pufr pH 7,3 ±0,2
[CON]	15 ml	**Roztok konjugátu anti IgG-HRP (Conjugate Solution)** (bílé víčko), připraven k použití
[SUB] TMB ELISA	15 ml	**TMB roztok (TMB Solution)** (černé víčko), připraven k použití pH 3,7 ±0,2 bezbarvý až namodralý 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin 1,2 mmol/l peroxid vodíku 3 mmol/l
[STOP] STOP ELISA	15 ml	**Zastavovací roztok (Stop Solution)** (červené víčko) Kyselina sírová, připravená k použití 0,5 mol/l
	1	**Adhesivní proužek (Adhesive Strip)**

Bezpečnostní pokyny
Nepolykejte reagencie. Předcházejte kontaktu s očima, kůží a sliznicemi. Se všemi vzorky, jak od pacientů, tak i kontrolami, se musí zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Kontroly měly negativní výsledky testů na přítomnost HCV a HIV 1/2 protilátek a HBsAg. Noste laboratorní oblečení a jednorázové rukavice v souladu se správnou laboratorní praxí.

Veškerý materiál kontaminovaný vzorky pacientů nebo kontrolami musí být inaktivován schválenými standardními postupy (autoklávováním nebo chemicky) podle příslušných předpisů.

Stabilita
Všechny reagencie jsou stabilní do data spotřeby vyznačeného na štítcích, pokud jsou skladovány při 2–8 °C.

Příprava reagencií
Pozor!
Testovací souprava a všechny její součásti se před použitím musí nechat zahřát na pokojovou teplotu!
Použité lahvičky se musí pečlivě uzavřít a skladovat při 2–8 °C. Chraňte roztok [SUB] před světlem.
Nepoužívejte polystyrenové nádoby při manipulaci s roztokem [CON].
Nepoužité reagencie by se nikdy neměly vracet do původních vialek, aby se zabránilo mikrobiální a/nebo chemické kontaminaci.

Promývací roztok [WASH]
Případné krystalky soli musí být před použitím roztoku zcela rozpuštěny. Rozřeďte 1 díl [WASH][20×] pomocí 19 dílů destilované vody. [WASH] je stabilní po dobu 6 týdnů, je-li skladován při 2–8 °C.

Vzorky
Sérum pacientů
Používejte pouze čerstvě získané vzorky nebo vzorky, které byly zmražené na –20 °C. **Zmrazit a rozmrazit vzorky lze pouze jednou.** Nepoužívejte vzorky séra, které bylo inaktivováno zahřátím na 56 °C.
Vzorky nechte zahřát na pokojovou teplotu (30 min)
Sérum rozřeďte 1 : 101 pomocí [DIL] (přidejte 10 µl séra do 1 ml [DIL]

Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
Telefon +49 6122-9988-0 · Telefax +49 6122-9988-100 · e-Mail human@human.de

Postup

- **Napipetujte 8× 100 µl** naředěného vzorku, [CAL] a popř. [NC] do [MTP]. Jako blank použijte samotný [DIL] místo naředěného vzorku. Uzavřete [MTP] pomocí adhesivních proužků.
- doporučené schéma pipetování:

	1	2	3	...	12	
A	[NC]	[CAL]	pat. 1		pac. 10	SS-A/Ro
B	[NC]	[CAL]	pat. 1		pac. 10	SS-B/La
C	[NC]	[CAL]	pat. 1		pac. 10	SmD1
D	[NC]	[CAL]	pat. 1		pac. 10	U1-snRNP
E	[NC]	[CAL]	pat. 1		pac. 10	Histon
F	[NC]	[CAL]	pat. 1		pac. 10	CENP-B
G	[NC]	[CAL]	pat. 1		pac. 10	Scl70
H	[NC]	[CAL]	pat. 1		pac. 10	Jo1

- Inkubovat **1 h** při pokojové teplotě.
- **Odstraňte roztoky** z [MTP]. **Promyjte** [MTP] 3× pomocí 300 µl [WASH] na jamku.
- **Odstraňte** [WASH] a vyklepněte zbytky roztoku na savý papír nebo plátno.
- **Napipetujte 100 µl** [CON] a uzavřete [MTP] pomocí adhesivních proužků.
- Inkubujte **30 min** při pokojové teplotě.
- **Odstraňte roztoky** z [MTP]. Promyjte [MTP] 3× pomocí 300 µl [WASH] na jamku.
- **Odstraňte** [WASH] a vyklepněte zbytky roztoku na savý papír nebo plátno.
- **Napipetujte 100 µl** [SUB] a nechte inkubovat **10 minut**. Pokud pokojová teplota přesahuje 25 °C, lze inkubaci zkrátit, ale nikdy ne na méně než 5 minut.
- **Přidejte 100 µl** [STOP] do každé jamky.
- **Změřte hodnoty absorbance při 450 nm** během 10 minut po přidání [STOP] roztoku. Doporučuje se bichromatické měření s referenční vlnovou délkou 620–690 nm.

Automatizace

IMTEC-ENA Profile ELISA lze provést na vhodném automatickém ELISA analyzéru. Před použitím pro diagnostiku musí být aplikace nejprve validována.

Validace testu

Výsledky testu jsou validní za podmínky, že budou dodržena následující kritéria:

- [CAL] hodnota absorbance není nižší než 0,3.
- [CAL] hodnota absorbance nepřekročí hodnotu 3,2.
- pokud byla použita [NC]: [CAL] > [NC]

Interpretace výsledků

Výsledky mohou být interpretovány porovnáním přepočítaných absorbancí [CAL] a vzorků. Pro každý antigen by se měla spočítat *cut-off* absorbance podle následující rovnice:

$OD_{cut\text{-}off} = OD_{[CAL]}$ × specifický faktor (viz Certifikát analýzy)

- Absorbance > 1,1 × $OD_{cut\text{-}off}$ lze považovat za pozitivní.
- Absorbance < 0,9 × $OD_{cut\text{-}off}$ lze považovat za negativní.
- Absorbance ≥ 0,9 × $OD_{cut\text{-}off}$ a ≤ 1,1 × $OD_{cut\text{-}off}$ musí být považovány za neprůkazné.

Příklad výpočtu

řada	antigen	$OD_{[CAL]}$	faktor	$OD_{cut\text{-}off}$	OD_{sample}	výsledek
A	SS-A/Ro	1,393	0,21	0,293	1,379	Poz
B	SS-B/La	0,562	0,55	0,309	2,442	Poz
C	SmD1	0,843	0,58	0,489	0,056	Neg
D	U1-snRNP	1,069	0,33	0,353	0,060	Neg
E	Histon	1,009	0,38	0,383	0,100	Neg
F	CENP-B	1,089	0,30	0,327	0,044	Neg
G	Scl70	1,025	0,44	0,451	0,096	Neg
H	Jo1	0,870	0,43	0,374	0,055	Neg

Omezení

Pozitivní výsledek musí být použit ve spojení s klinickým hodnocením a diagnostickou procedurou. Výsledky mohou sloužit pouze jako pomoc při diagnóze.

Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
Telefon +49 6122-9988-0 · Telefax +49 6122-9988-100 · e-Mail human@human.de

Zvýšené hodnoty protilátek proti nukleárním antigenům se mohou objevit i u zdravých jedinců.

Jestliže pacientovo sérum obsahuje zvýšené hladiny imunitních komplexů nebo jiných imunoglobulinových agregátů, nelze vyloučit falešně pozitivní výsledek vzniklý jejich nespecifickými interakcemi.

Funkční charakteristiky tohoto testu nebyly ověřeny pro vzorky plazmy.

Funkční charakteristiky
Ukázky typických dat lze nalézt v ověřovací zprávě (Verification Report) dostupné na stránkách:
www.human.de/data/gb/vr/el-60033.pdf nebo
www.human-de.com/data/gb/vr/el-60033.pdf.

V případě, že data nejsou dostupná po internetu, lze je zdarma obdržet od vašeho lokálního distributora.

Bezpečnostní pokyny
Roztok [STOP] – **Varování!**
·**Standardní věty o nebezpečnosti**
H315 Dráždí kůži.
H319 Způsobuje vážné podráždění očí.
·**Pokyny pro bezpečné zacházení**
P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.
P305+P351+P338 Při zasažení očí: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny a je možné je vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
P321 Odborné ošetření (viz štítek).
P362 Kontaminovaný oděv svlékněte.
P332+P313 Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.

Reference
1. Damoiseaux J. G., Tervaert J. W., Autoimmun Rev. **5**, 10–17 (2006)
2. Egner W., J. Clin. Pathol. **53**, 424–432 (2000)
3. Conrad K. et al., Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases – A Diagnostic Reference; Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Riga, Rom, Viernheim, Wien, Zagreb, 2002

EL-60033 INF ITC60033 GB 06-2015-05M

Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
Telefon +49 6122-9988-0 · Telefax +49 6122-9988-100 · e-Mail human@human.de