

## ENA 4-PROFIL

ELISA  
MIKROTITRAČNÉ DOŠTIČKY

kód 44775 96 Testov
SKLADOVANIE PRI 2-8°C
Reagenty na stanovenie ENA protilátok Výhradne na <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratóriách.

**PRINCÍP METÓDY**

Špecifické ENA protilátky prítomné vo vzorke sa viažu na antigén, ktorý je imobilizovaný na povrchu mikrotitračných doštičiek. V priebehu druhej inkubácie sa viaže konjugát (chrenovou peroxidázou značené imunoglobulíny proti ľudskému IgG) s protilátkami naviazanými na povrchu jamky. Nakoniec sa pridáva ako enzýmový substrát 3,3',5,5'-tetramethylbenzidín (TMB) s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do každej jamky. Dôjde k enzymatickej farebnej reakcii, ktorá je zastavená kyselinou. Žlté zafarbenie sa meria pri 450 nm a intenzita absorpcie je úmerná koncentrácii protilátok vo vzorke<sup>1</sup>.

**OBSAH A ZLOŽENIE**

- A. Koncentrovaný premývací roztok.** 50 mL. Koncentrovaný fosfátový pufer, azid sodný 15 mmol/l.
- B. Riediaci roztok.** 100 mL. Tris pufer, azid sodný 15 mmol/l.
- C+. Pozitívna kontrola.** 1,8 mL. Ready to use. Ľudské sérum s anti-SSA (Ro), anti-SSB (La), anti-Sm a anti-Sm/RNP protilátkami. Azid sodný 15 mmol/l.
- C-. Negatívna kontrola.** 1,8 mL. Ready to use. Ľudské sérum bez anti-SSA(Ro), anti-SSB(La), anti-Sm a anti-Sm/RNP protilátok, azid sodný 15 mmol/L.
- CO1. Anti-SSA(Ro) Cut-off Štandard.** 1 mL. Ready to use. Ľudské sérum s anti-SSA(Ro) protilátkami. Kalibrované oproti ANA ľudskému referenčnému séru AF/CDC7 z centra pre kontroly ochorení (CDC), Atlanta, USA.
- CO2. Anti-SSB(La) Cut-off Štandard.** 1 mL. Ready to use. Ľudské sérum s anti-SSB(La) protilátkami. Kalibrované oproti ANA ľudskému referenčnému séru AF/CDC2 z centra pre kontroly ochorení (CDC), Atlanta, USA.
- CO3. Anti-Sm Cut-off Štandard.** 1 mL. Ready to use. Ľudské sérum s anti-Sm protilátkami. Kalibrované oproti ANA ľudskému referenčnému séru AF/CDC5 z centra pre kontroly ochorení (CDC), Atlanta, USA.
- CO4. Anti-Sm/RNP Cut-off Štandard.** 1 mL. Ready to use. Ľudské sérum s anti-Sm/RNP protilátkami. Kalibrované oproti ANA ľudskému referenčnému séru AF/CDC5 z centra pre kontroly ochorení (CDC), Atlanta, USA.
- D. Konjugát.** 15 mL. Chrenovou peroxidázou značené polyklonálne králičie imunoglobulíny proti ľudskému IgG.
- E. Substrát.** 15 mL. 3,3,5,5'-tetramethylbenzidín (TMB).
- F. Zastavovací roztok.** 15 mL. Kyselina fosforečná 4,5%  
**Nebezpečie :** H314 – Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí. P280 – Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/štit na tvár. P303 + P361 + P353 – PRI STYKU S KOŽOU (alebo s vlasami): Všetky kontaminované časti odevu okamžite vyzlečte. Opláchnite kožu vodou/ osprchujte.
- M. Mikrotitračné doštičky :** 4x24 testov, 3 moduly po 8 jamkách nakutovaných vysoko purifikovaným antigénom SSA(Ro)-červeno značené, antigénom SSB(La)-modro značené, antigénom Sm-žlté značené a antigénom Sm/RNP-zeleno značené.

Pre ďalšie varovania a odporúčania – vid' Karta bezpečnostných údajov (SDS).

Ľudské séra použité pri príprave pozitívnej a negatívnej kontroly boli testované s negatívnym výsledkom na prítomnosť protilátok anti-HIV a anti-HCV, a rovnako tak aj na HBs antigén. Aj napriek tomu zaobchádzajte s kontrolami ako s potenciónálne infekčným materiálom.

**SKLADOVANIE**

Skladujte pri 2-8°C. Neotvorené reagenty sú stabilné do dátumu expirácie uvedeného na štítku, ak sú skladované uzavreté a je zabránené kontaminácii v priebehu ich používania.

**Známky zhoršenia kvality:**

- Kvapalné komponenty: Prítomnosť častíc, zákal
- Mikrotitračné doštičky: natrhnutie sáčku, makroskopické defekty, ako je poškrabanie dna jamiek.

**PRÍPRAVA REAGENCIÍ**

**Premývací pufer:** Zriedte koncentrovaný premývací pufer (A) destilovanou vodou v pomere 1/20. Poriadne premiešajte. Na 1 strip sa spotrebuje približne 50 ml premývacieho reagentu. Roztok je stabilný 30 dní pri 2-8°C. Ostatné činidlá sú pripravené k priamemu použitiu - ready to use.

**PRÍDAVNÉ ZARIADENIA**

- zvlhčovacia komôrka
- premývacie zariadenie na mikrotitračné doštičky
- reader alebo fotometer s mikrokyvetou a filtrom 450 ± 10 nm.

**VZORKY**

Sérum alebo plazma odobraná štandardným spôsobom. Vzorku pred testovaním zriedte 1/100 riediacim puferom (B). Na stanovenie používajte vždy čerstvo nariadenú vzorku.

**PRACOVNÝ POSTUP**

1. Vytemperujte všetky činidlá na izbovú teplotu. ( Pozn.: 1).
2. Otvorte balíček s mikrotitračnými doštičkami (M) a vyberte množstvo potrebné na stanovenie. ( Poznámka 2).
3. Pipetujte po 100 µL pozitívnej kontroly (C+), Negatívnej kontroly (C-), Cut-off štandardu (CO) a nariadených vzoriek do jednotlivých jamiek.
4. Stripy vložte do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote.
5. Odsajte obsahy jamiek a jamky premývajte minimálne 10sekúnd 3-krát s 300 µl premývacieho pufru. (Poznámka 3 a 4).
6. Pipetujte do všetkých jamiek po 100 µl konjugátu (D).
7. Stripy vložte do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
8. Jamky premývajte ako v dode 5.
9. Pipetujte 100 µl substrátu (E) do všetkých jamiek.
10. Stripy vložte do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
11. Pipetujte 100 µl zastavovacieho roztoku (F) do všetkých jamiek a inkubujte 5 minút pri izbovej teplote. (Poznámka 5).
12. Odčítajte absorbančiu jednotlivých jamiek pri 450 nm. Sfarbenie je stabilné najmenej 30 minút.

**VÝPOČET**

Vypočítajte absorbančný pomer :

$$\text{Absorbančný pomer} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ Vzorky}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off}}$$

Ak sú hodnoty absorbančii vyššie ako horný merací limit readeru, nariďte vzorky reagentom (B) a stanovenie opakujte.

**REFERENČNÉ HODNOTY**

Vzorky, ktoré majú vyšší absorbančný pomer ako 1,2 sú považované za pozitívne.

Vzorky, ktoré majú nižší absorbančný pomer ako 1,0 sú považované za negatívne.

Vzorky, ktoré majú absorbančný pomer medzi 1,0 až 1,2 sú považované za nejasné a odporúča sa opakovanie analýzy. Uvedené hodnoty sú orientačné. Každé laboratórium by si malo stanoviť svoje vlastné rozmedzia.

kód 44775 96 Testov
SKLADOVANIE PRI 2-8°C
Reagenty na stanovenie ENA protilátok Výhradne na <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratóriách.

### KONTROLA KVALITY

Absorbančný pomer pre Pozitívnu kontrolu (C+) by mal byť vyšší ako 1,2 a pre Negatívnu kontrolu (C-) by mal byť nižší ako 1,0. Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre nápravné konanie, ak kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

### CHARAKTERISTIKA SKÚŠKY

-Súprava na ENA 4 profil rozoznáva iba špecifické protilátky proti SSA(Ro), SSB(La), Sm, alebo Sm/RNP. S inými antigénami neboli pozorované žiadne skřížené reakcie.

-Interferencie: Hemoglobín (1000 mg/dl), bilirubín (40 mg/dl) a triglyceridy (3000 mg/dl) neinterferujú. Nebol pozorovaný ani žiaden interferujúci efekt pri použití antikoagulantov. Niektoré druhy liekov a ďalších látok môžu interferovať<sup>2</sup>.

### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Prítomnosť vysokých hladín protilátok špecifických pre SSA(Ro) indikuje primárny Sjögrenov syndróm a Systémový Lupus Erythematosus (SLE). Tieto protilátky je možné nájsť približne u 60-70% pacientov s Sjögrenovým syndrómom a u 40-50% pacientov s diagnózou SLE<sup>3,4</sup>.

Prítomnosť vysokých hladín protilátok špecifických pre SSB (La) indikuje primárny Sjögrenov syndróm a Systémový Lupus Erythematosus. Tieto protilátky je možné nájsť približne u 10-40% pacientov s Sjögrenovým syndrómom a u 6-15% pacientov s diagnózou SLE<sup>5,6</sup>.

Prítomnosť vysokých hladín protilátok špecifických pre Sm silne indikuje Systémový Lupus Erythematosus. Tieto protilátky je možné nájsť približne u 20-30% pacientov s diagnózou SLE<sup>7,8</sup>.

Prítomnosť vysokých hladín protilátok špecifických pre Sm/RNP indikuje Systémový Lupus Erythematosus a rôznorodé ochorenia spojivových tkanív (MCTD). Tieto protilátky je možné nájsť približne u 30-40% pacientov s diagnózou SLE a u 100% pacientov s rôznorodým ochorením spojivových tkanív<sup>7,9</sup>.

Senzitivita a špecifita pre Sjögrenov syndróm pri použití Biosystems súpravy ENA 4-profil bola 72,8% a 93,0% pre anti-SSA(Ro) a 61,4% a 96,6% pre anti-SSB(La) protilátky v štúdií so 190 klinickými vzorkami.

V štúdií so 190 klinickými vzorkami bola pre SLE senzitivita k anti-Sm 51,4% a špecifita 95,8%, pre anti-Sm/RNP protilátky bola 52,9% a 95,8%.

V štúdií s 220 klinickými vzorkami bola pre MCTD senzitivita k anti-Sm/RNP protilátkam 96,7% a špecifita 95,8%. Detailná správa zo štúdie je k dispozícii na vyžiadanie.

Klinická diagnóza by nemala byť stanovená len na základe výsledku jedného testu, ale mali by byť prepojené klinické a laboratórne údaje.

### POZNÁMKA

- Nepoužívajte reagenty z odlišných súprav.
- Nepoužitú jamku skladujte v uzavretom plastickom sáčku spoločne s vysušiacim sáčkom.
- Pri manipulácii nepoškodte vnútorný povrch mikrotitračných doštičiek.
- Premývací roztok by mal byť z jamiek kompletne odstránený.
- Zastavovací roztok (F) enzýmovej reakcie musí byť pipetovaný do jamiek približne v rovnakom časovom odstupe ako substrát (E) v odstavci č.9.

### LITERATÚRA

- 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
- Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, Aidinis V, Guialis A and Moutsopoulos HM. Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. British Journal of Rheumatology 1993; 32: 449-455
- Reichlin M and Scofield RH. SSA(Ro) autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
- Tzioufas AG and Moutsopoulos HM. Clinical significance of autoantibodies to Ro/SSA and La/SSB. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- Wahren M, Téngner P, Gunnarsson I, Lundberg I, Hedfors E, Ringertz NR and Pettersson I. Ro/SS-A and La/SS-B antibody level variation in patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. J Autoimmun. 1998 Feb;11(1):29-38.
- Peng SL and Craft JE. Spliceosomal snRNPs autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
- Bernstein R. Autoantibodies to histones, Sm and ubiquitins. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996
- Van Venrooij WJ and Sillekens PTG. Small nuclear RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. Clinical and Experimental Rheumatology 1989; 7: 635-645

### UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 31.01.2017.

Vzhľadom k novej inovácii výrobku sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese [www.biosystems-sa.com](http://www.biosystems-sa.com). Slovenský návod je k dispozícii na [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz).

### Výhradný distribútor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5, tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava, tel.: +421 264 774 591

V prípade mimoriadnych udalostí:

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