



ANTI -CITRULINOVÝ PROTEIN – PROTILÁTKY (ACPA)



Kód 44860	96 testov	ANTI – CITRULINOVÝ PROTEIN protilátky ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie protilátok proti citrulinovému proteínu. Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

PRINCÍP METÓDY

Protilátky proti anti-citrulinovému proteínu (ACPA) zo séra sa viažu na antigén naviazaný na povrchu mikrotitračných doštičiek. V priebehu druhej inkubácie sa viaže konjugát (polyklonálny králičí imunoglobulín proti ľudskému IgG značený chrenovou peroxidázou) s protilátkami na povrchu jamky. Nakoniec sa pridá do každej jamky 3,3',5,5' – tetrametylbenzidín (TMB) s H₂O₂ ako enzymový substrát. Dochádza k enzymatickej farebnej reakcii, ktorá je zastavená kyselinou. Absorbancia vzniknutého žltého komplexu sa meria pri 450 nm, pričom hodnota absorbancie je úmerná koncentrácii protilátok vo vzorke. ¹

OBSAH A ZLOŽENIE

- A. Koncentrovaný premývací roztok.** 50 ml. Koncentrovaný fosfátový pufer, azid sodný 15mmol/l.
- B. Riediaci roztok.** 125ml. Tris 0,1mol/l, azid sodný 15mmol/l
- C+. Pozitívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu.
Ľudské sérum s anti citrulinovým proteínom, azid sodný 15mmol/l.
- C-. Negatívna kontrola.** 1,5ml. Ľudské sérum bez anti citrulinového proteínu, azid sodný 15mmol/l.
- D. Konjugát.** 15ml. Polyklonálny králičí imunoglobulín proti ľudskému IgG značený chrenovou peroxidázou.
- E. Substrát.** 12ml. 3,3',5,5' – tetrametylbenzidín (TMB)
- F. Zastavovací roztok.** 15ml. Kyselina fosforečná 4,5%
Výstraha :
H314 – Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.
Upozornenie :
P280 – Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/
ochranné okuliare/štit na tvár
P303 + P361+ P353 - Pri styku s kožou (alebo vlasami) :
Všetky kontaminované časti odevu okamžite vyzlečte.
Kožu opláchnite vodou/ospρχujte.
- M. Mikrotitračné doštičky.** 12 modulov po 8 odlamovateľných jamkách s naviazaným mutovaným citrulinovaným vimentínom.
- S1 – S6. Štandardy.** Každý po 1,5 ml. Pripravené k priamemu použitiu. Sérum s anti - citrulinovým proteínom, azid sodný 15mmol/l. Koncentrácie protilátok sú 0, 5, 10, 25, 50, 150 a 500 U/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky.
Kalibrované proti internému referenčnému štandardu.

Pre ďalšie výstrahy a opatrenia – vid' bezpečnostný list.
Ľudské séra použité pri príprave pozitívnej a negatívnej kontroly boli testované s negatívnym výsledkom na anti-HIV a anti-HCV a rovnako na HBs antigen. I napriek tomu zaobchádzajte s kontrolami ako s potenciónálne infekčným materiálom.

SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 8°C.
Reagenty sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu ich používania.

Príznačky zhoršenia kvality :

- Kvapalné reagenty : Prítomnosť zrazeniny, zákalu,
- 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. Riadne premiešajte. Pre 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.

PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- zvlhčovacia komôrka
- premývacie zariadenie pre mikrotitračné doštičky
- reader mikrotitračných doštičiek alebo fotometer s mikrokvetou a filtrom 450 ±10nm.

VZORKY

Sérum alebo plazma odobraná štandardným spôsobom. Vzorku pred testovaním zriedte v pomere 1/100 riediacim pufrom (B). Pre stanovenie používajte vždy čerstvo nariadené vzorky.

POSTUP

1. Vytemperujte všetky činidlá na izbovú teplotu. (Poznámka 1)
2. Otvorte balíček s mikrotitračnými doštičkami a vyberte množstvo potrebné pre stanovenie. (Poznámka 2).
3. **Postup práce :**
 - **Kvantitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100µl každého štandardu (S1-S6), pozitívnej kontroly (C+), negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek.
 - **Kvalitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100 µl štandardu S3, pozitívnej kontroly (C+), negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek. Ako blank použite 100µl riediaceho roztoku.
4. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote.
5. Odsajte obsahy jamiek a premyte ich premývacím pufrom 3x po 300 µl . Doba premývania – minimálne 10 sekúnd. (Poznámka 3 a 4).
6. Do všetkých jamiek pipetujte 100µl konjugátu (D).
7. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
8. Jamky premyte podľa bodu 5.
9. Do všetkých jamiek pipetujte 100µl substrátu (E).
10. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
11. Do všetkých jamiek pipetujte 100µl zastavovacieho roztoku (F) a inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.(Poznámka5).
12. Odčítajte hodnotu absorbancie jednotlivých jamiek pri 450 nm pri použití štandardu S1 , alebo jamky s blankom pre vynulovanie prístroja. Farba je stabilná najmenej 30minút.

VÝPOČET

• **Kvantitatívne stanovenie :** Na kalibračnú krivku vyznačte hodnoty absorbancie každého štandardu oproti koncentrácii anticitrulinového proteínu (U/ml). Koncentrácia ACPA protilátok prítomných vo vzorke sa vypočíta interpoláciou absorbancie na



ANTI -CITRULINOVÝ PROTEIN – PROTILÁTKY (ACPA)



Kód 44860	96 testov	ANTI – CITRULINOVÝ PROTEIN protilátky ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie protilátok proti citrulínovému proteínu. Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

kalibračnej krivke (odporúča sa použiť 4-parametrickú, logistickú).

• **Kvalitatívne stanovenie** : absorbančiu cut-off vypočítajte nasledovne :

$$A_{450nm} \text{ Cut-off} = A_{450nm} S3 \times 0,5$$

Vypočítajte absorbančný pomer :

$$\text{absorbančný pomer} = \frac{A \text{ vzorky } 450nm}{A \text{ cut-off } 450nm}$$

Ak sú hodnoty absorbancií vyššie ako horný limit merania readeru , nariedte vzorky reagentom (B) a stanovenie opakujte.

REFERENČNÉ HODNOTY

Za pozitívne sú považované vzorky s koncentráciou vyššou ako 10 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer vyšší ako 1,0. Za negatívne sú považované vzorky s koncentráciou nižšou ako 10 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer nižší ako 1,0. Uvedené hodnoty sú orientačné, preto by si malo každé laboratórium stanoviť svoje vlastné rozmedzia.

KONTROLA KVALITY

Absorbancia štandardu S6 by mala byť vyššia ako 1,300. Koncentrácia pozitívnej kontroly (C+) by mala byť v rozmedzí medzi 60 až 145 U/ml. Koncentrácia negatívnej kontroly (C-) by mala byť nižšia ako 10 U/ml. Absorbančný pomer 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 nápravu pre prípad, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

• opakovateľnosť (jednej vzorky) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
11,4 U/ml	6,2%	24
59,4 U/ml	6,4%	24
292,1 U/ml	4,6%	24

• reprodukovateľnosť (run to run) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
11,4 U/ml	5,3%	30
59,4 U/ml	9,2%	30
292,1 U/ml	7,7%	30

- detekčný limit : 1,0 U/ml
- test ACPA detekuje pouze protilátky proti anti-citrulínovému proteínu. Žiadne skřížené reakcie proti iným protilátkam neboli pozorované.

- interferencie : hemoglobín do 1000mg/dl, bilirubín do 40mg/dl, triglyceridy do 3000mg/dl neinterferujú. Niektoré druhy liekov a ďalších látok môžu interferovať.
Rozsah merania : 1,0 – 500 U/ml. Ak získate výsledky s vyššou hodnotou, zrieďte vzorku riediacim pufrom (B) a stanovenie opakujte.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Senzitivita stanovenia protilátok špecifických pre citrulínový proteín, pri použití ELISA techniky a vysoko purifikovaného cyklického citrulínového peptidu (CCP) je približne 80% a špecificita je okolo 98%. Z porovnania stanovenia filagrinových protilátok s inými technikami je zrejme, že stanovenie protilátok proti citrulínovaným proteínom je najcitlivejším a najšpecifickejším diagnostickým markerom pre reumatoidnú artritídu. ELISA test na anti-citrulínové protilátky má prognostickú úlohu, pretože tieto protilátky sa vytvárajú už na začiatku artritídy a sú dobrými prediktormi pretrvávania choroby a rádiologického poškodenia kĺbov. Súprava ACPA BioSystems má pre diagnózu reumatickej artritídy senzitivitu 81,2% a špecificitu 98,0%. Štúdia bola vykonaná s 1246 klinickými vzorkami. Detaily štúdie sú k dispozícii na vyžiadanie.

Klinická diagnóza by nemala byť stanovená len na základe výsledku jediného testu, je potrebné zhodnotiť klinické i ďalšie laboratórne údaje.

POZNÁMKY

1. Nezamieňajte jednotlivé reagenty z rôznych súprav.
2. Nepoužívané jamky skladujte v plastikovom sáčku s exsíkátorm.
3. Nepoškodte vnútorný povrch mikrotitračných doštičiek.
4. Premývacie roztoky z jamiek by mal byť celkom odstránený.
5. Zastavovací roztok enzýmovej reakcie (F) musí byť pipetovaný do jamiek približne v rovnakom časovom odstupe ako substrát (E) v bode 9 Postupu práce.

LITERATÚRA

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. Van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. Neth J Med 2002; 60(10):383-388.
4. Grootenboer-Mignot S, Nicaise-Roland P, Delaunay C, Meyer O, Chollet-Martin S, Labarre C. Second generation anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP2) antibodies can replace other anti-filaggrin antibodies and improve rheumatoid arthritis diagnosis. Scand J Rheumatol 2004;33(4):218-220.
5. Erre GL, Tocco A, Faedda R, Cossu A, Carcassi A. Diagnostic and prognostic value of antibodies to cyclic citrullinated peptide (Anti-CCP) in rheumatoid arthritis. Reumatismo 2004;56(2):118-123.

CE ANTI -CITRULINOVÝ PROTEIN – PROTILÁTKY
(ACPA)



Kód 44860 96 testov	ANTI – CITRULINOVÝ PROTEIN protilátky ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C	
Reagenty pre stanovenie protilátok proti citrulínovému proteínu. Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 18.6.2018.

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.es.

Slovenský návod je k dispozícii na www.jktrading.cz.

Výhradný distribútor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivaticová 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

VÝROBCA

BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona (Spain)
ISO 13485 - TÜV Rheinland - Reg.: SX 60010383 0001