



ANTI – PR3 PROTILÁTKY



Kód 44791	96 testov	ANTI – PR3 protilátky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagencie na stanovenie anti-PR3 protilátok . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		
		ELISA Mikrotitračné doštičky

PRINCÍP METÓDY

Protilátky proti proteínáze 3 (PR3) zo séra sa viažu na antigén naviazaný na povrchu mikrotitračných doštičiek. V priebehu druhej inkubácie sa viaže konjugát (polyklonálne králičie imunoglobulíny proti ľudskému IgG značené 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 450nm, pričom hodnota absorbancie je úmerná koncentrácii protilátok vo vzorke.

OBSAH A ZLOŽENIE

- A. Koncentrovaný premývací roztok.** 50 ml. Koncentrovaný fosfátový pufer, azid sodný 15mmol/l.
- B. Riediaci roztok.** 100ml. Tris pufer 0,1mo/l, azid sodný 15mmol/l
- C+. Pozitívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Sérum s anti- PR3 protilátkami, azid sodný 15mmol/l.
- C-. Negatívna kontrola.** 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Ľudské sérum bez anti -PR3 protilátok, azid sodný 15mmol/l.
- D. Konjugát.** 15ml. Polyklonálne králičie imunoglobulíny proti ľudskému IgG značené 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/osprchujte.
Ďalšie varovania a upozornenia – viď bezpečnostný list.
- M. Mikrotitračné doštičky.** 12 modulov po 8 odlamovateľných jamkách s naviazanou vysoko furifikovanou PR3.
- S1 – S6. Štandardy.** Každý po 1,5ml. Pripravené k priamemu použitiu. Sérum s anti- PR3 protilátkami, azid sodný 15mmol/l. Koncentracie protilátok sú 0, 5, 10, 20, 40 a 100, U/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky.

Pre ďalšie výstrahy a upozornenia viď 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.
Reagencie sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu ich používania.

Príznyky zhoršenia kvality :

- Kvapalné reagencie : 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 roztoku. 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 mikrokyvetou a filtrom 450 ±10nm.

VZORKY

Sérum alebo plazma odobraná štandardným spôsobom. Stabilita – 1 týždeň pri 2 – 8°C. Vzorku pred testovaním zriedte v pomere 1/100 riediacim puferom (B).

POSTUP

1. Vytemperujte všetky činidlá na izbovú teplotu. (Poznámka1)
2. Otvorte balček 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 obsah jamiek a premyte ich premývacím puferom 3 x 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 ako pri kroku 4.
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 450nm použít štandardu S1 , alebo jamky s blankom pre vynulovanie prístroja. Farba je stabilná najmenej 30minút.

VÝPOČET

- **Kvantitatívne stanovenie :** Na kalibračnú krivku vyznačte



ANTI – PR3 PROTILÁTKY



Kód 44791	96 testov	ANTI – PR3 protilátky
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagencie na stanovenie anti-PR3 protilátok . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		
		ELISA Mikrotitračné doštičky

hodnoty absorbančie každého štandardu oproti koncentrácií anti-PR3 protilátok (U/ml). Koncentrácia anti-PR3 protilátok prítomných vo vzorke sa vypočíta interpoláciou absorbančie na kalibračnej krivke (odporúča sa použiť 4-parametrickú, logistickú, kubickú spline, jednostrannú hyperbolu).

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

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

Vypočítajte absorbančný pomer :

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

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

REFERENČNÉ HODNOTY

Za pozitívne sú považované vzorky s koncentráciou vyššou ako 5 U/ml, alebo ak je ich absorbančný pomer vyšší ako 1,0. Za negatívne sú považované vzorky s koncentráciou nižšou ako 5 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

Absorbančia štandardu S6 by mala byť vyššia ako 1,300. Koncentrácia pozitívnej kontroly (C+) by mala byť v rozmedzí medzi 25 až 45 U/ml. Koncentrácia negatívnej kontroly (C-) by mala byť nižšia ako 5 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
10,9 U/ml	4,7%	24
24,6U/ml	2,8%	24
58,5 U/ml	2,8 %	24

• reprodukovateľnosť (run to run) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
10,9 U/ml	6,2%	30
24,6U/ml	8,8%	30
58,5 U/ml	3,9%	30

- detekčný limit : 0,5 U/ml
- Súprava anti-PR3 je špecifická k protilátkam PR3. Žiadne skrížené reakcie k ostatným 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.²
- Rozsah merania : 0,5 – 100 U/ml. Ak získate výsledky s vyššou hodnotou, zriedte vzorku riediacim pufrom (B) a stanovenie opakujte.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Medzi anti-PR3 protilátkami a Wegenerovou granulomatózou existuje výrazná spojitosť . Špecifita je 95-98%. Senzitivita je závislá od štádia a aktivity ochorenia a u Wegenerovej granulomatózy sa pohybuje okolo 90% , (s nekrotizujúcou glomerulonefritídou, systémovou vaskulitídou, a granulomatóznym zápalom respiračného traktu) a okolo 75% pri Wegenerovej granulomatóze bez postihnutia obličiek.^{3,4,5} Súprava BioSystems Anti-PR3 pre Wegenerovu granulomatózu vykazovala senzitivitu 82,5% a špecifitu 98,8%. Testovaných bolo 311 klinických vzoriek. Detaily štúdie sú dostupné na vyžiadanie. Klinická diagnóza by nemala byť stanovená na základe výsledkov jediného testu, je potrebné posúdiť všetky klinické i laboratórne výsledky.

POZNÁMKY

1. Nezamieňajte jednotlivé reagencie z rôznych súprav.
2. Nepoužité jamky skladujte v plastickom sáčku s exsikatorom.
3. Nepoškodte vnútorný povrch mikrotitračných doštičiek.
4. Premývací roztok by mal byť z jamiek 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. Savage J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A. International Consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 1999;111:507-513.
4. Kallenberg CGM. ANCA: their clinical relevance. In: van Venrooij WJ, Maini RN, editors, Autoantibody Manual C7.1, 1-12. Kluwer Academic Publishers 1996
5. Gross WL, Csernok E, Szymkowiak CH. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for proteinase 3. En: Peter JB and Shoenfeld Y, editores, Autoantibodies, Elsevier Science, 1996.



ANTI – PR3 PROTILÁTKY



Kód 44791 96 testov	ANTI – PR3 protilátky ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C	
Reagencie na stanovenie anti-PR3 protilátok . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 14.7. 2016.

Vzhľadom k možnej inovácii výrobku sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápäť. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese www.biosystems-sa.com.

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

Výhradný distribútor:

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 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