



# Protilátky proti CITRULINU (ACPA)



|  |          |
|--|----------|
| Kód 44860  | 96 Testů |
| SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C   |          |
| Reagencie pro stanovení protilátek proti citrulinovému proteinu (ACPA).<br>Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích |          |

## Protilátky proti CITRULINU (ACPA)

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

#### PRINCIP METODY

Protilátky proti citrulinovému proteinu 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 ACPA protilátek ve vzorku<sup>1</sup>.

#### OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Fosfátový pufr, azid sodný 15 mmol/L.
- B. Ředící roztok** 100 mL. Tris, azid sodný 15 mmol/L.
- C+. Pozitivní kontrola.** 1,5 mL. Ready to use. Sérum s anti-citrulinovými protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Lidské sérum bez anti-citrulinových 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 KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- M. Mikrotitrační destičky:** 12 modulů po 8 rozlamovatelných jamkách s mutovaným citrulinovým vimentinem.
- S1-S6. Standardy 1,5mL.** Ready to use. Sérum s anti-citrulinovým proteinem, azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace ACPA protilátek jsou: 0, 10, 20, 50, 150 a 500 U/ml, jak je uvedeno na štítku lahvíček. 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 shledána negativní 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. Reagencie jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

#### Známky zhoršení kvality:

- Kapalně 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 mikrokvyvetou a filtrem 450 ± 10 nm.

#### VZORKY

Sérum nebo plazma odebraná standardním způsobem. Vzorek před testováním zředte 1/100 ředícím pufr. K testování použijte vždy čerstvě naředěné vzorky.

#### 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 S3 Standardu, 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 300µL 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 ACPA protilátek (U/mL). Koncentrace ACPA protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce (doporučená křivka : 4-parametrická logistická).

**Kvalitativní stanovení:** Vypočtete absorbanci Cut-off následovně:

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

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, naředte vzorky reagentií (B) a stanovení opakujte.



# Protilátky proti CITRULINU (ACPA)



|  |          |
|--|----------|
| Kód 44860  | 96 Testů |
| SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C   |          |
| Reagencie pro stanovení protilátek proti citrulinovému proteinu (ACPA).<br>Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích |          |

## Protilátky proti CITRULINU (ACPA)

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

#### 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.

#### KONTROLA KVALITY

Absorbance standardu S6 by měla být vyšší než 1.300.  
Koncentrace Pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí od 60 do 145 U/mL a u 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  |
|-------|------|----|
| 11,4  | 6,2  | 24 |
| 59,4  | 6,4  | 24 |
| 292,1 | 4,6  | 24 |

- Reprodukovanost (run to run):

| U/mL  | CV % | n  |
|-------|------|----|
| 11,4  | 5,3  | 30 |
| 59,4  | 9,2  | 30 |
| 292,1 | 7,7  | 30 |

- Detekční limit: 1.0 U/mL
- Test ACPA detekuje pouze protilátky k Anti-citrulinovému proteinu. Žádné zkřížené reakce k jiným protilátkám nebyly pozorovány.
- Interference: Hemoglobin do 1000mg/dL, bilirubin do 40mg/dL, triglyceridy do 3000 mg/dL neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat<sup>2</sup>.
- Rozsah měření: 1,0–500 U/mL. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím puřem (B) a opakujte stanovení.

#### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovení protilátek specifických pro citrulinový protein za použití ELISA techniky a vysoce purifikovaného cyklického citrulinového peptidu (CCP) vykazují při revmatoidní artritidě senzitivitu kolem 80% a specifitu kolem 98%. Srovnávací studie pro stanovení bílkoviny fillarginu a stanovení cyklického peptidu měřených různými technikami jasně dokazují, že Elisa techniky proti citrulinovému peptidu jsou více senzitivnější a specifitější pro RA. Protilátky proti CCP lze sledovat ve velmi brzkém stadiu nemoci a mají vysokou předpovědní hodnotu. Tyto protilátky mají velmi dobrou predikci onemocnění zejména u pacientů s radiologickým poškozením<sup>3,4,5</sup>. Pro soupravu ACPA BioSystems byla pro revmatoidní artritidu stanovena senzitivita 81,2 % a specifita 98% ve studii s 1246 klinickými vzorky. Detaily klinické studie jsou dostupné na požádání. Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

#### POZNÁMKA

1. Nezaměňujte reagencie ze souprav různých šarží.
2. Skladujte nepoužité jamky v plastickém sáčku a uzavřete je společně s vysoušecím sáčkem.

3. Nepoškozujte 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. 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.
4. 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.

#### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu 14.6.2018

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](http://www.biosystems.es).

Český návod je k dispozici na: [www.iktrading.cz](http://www.iktrading.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 informační centrum Bratislava, 833 05,  
Limbová 5, tel.: +421 254 774 166