



Antinukleární protilátky (ANA) Protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (ENA)

Imunoenzymatické soupravy k diagnostice systémových autoimunitních onemocnění

ELISA, IMUNOBLOT a MICROBLLOT-ARRAY soupravy jsou určeny
ke stanovení specifických protilátek třídy IgG v lidském séru nebo plazmě



Diagnostické soupravy jsou určeny
pro profesionální použití v laboratoři.



Úvod

Stanovení antinukleárních protilátek má význam pro diagnostiku systémových autoimunitních onemocnění. Jde o skupinu autoprotílátek namířených proti orgánově nespecifickým buněčným antigenům, které jsou lokalizovány v buněčném jádře, případně cytoplazmě. Jejich průkaz může znamenat přítomnost systémového imunopatologického procesu. Zejména se jedná o tato onemocnění: **Systémový lupus erythematoses (SLE), Sjögrenův syndrom (SjS), sklerodermii, dále pak smíšené onemocnění pojiva (MCTD), systémovou sklerózu, polymyozitidu a dermatomyozitidu.**

Významnou samostatnou skupinu antinukleárních protilátek představují protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům ENA (SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, RNP, Scl-70 a Jo-1), jde především o ribonukleoproteiny a jaderné enzymy.

Typizace specifických autoprotílátek je důležitým nástrojem v diferenciální diagnostice jednotlivých systémových autoimunitních onemocnění.

Protilátky proti SS-A/Ro a SS-B/La se často vyskytují u pacientů se SjS a SLE. Vysoce specifickým markerem a jedním z diagnostických kritérií pro SLE jsou protilátky proti Sm antigenu. U pacientů se SLE jsou často přítomny i protilátky proti RNP antigenu (součást komplexu Sm/RNP). Průkaz těchto protilátek je vysocí specifickým diagnostickým kritériem pro MCTD (zejména při absenci protilátek anti-Sm). Další skupinu orgánově nespecifických autoimunitních onemocnění tvoří myozitidy. V jejich diagnostice se uplatňuje průkaz protilátek proti antigenu Jo-1. Protilátky proti antigenu Scl-70 a centromere B jsou významné pro diagnostiku systémové sklerózy (zvláště jejich progresivních forem).

Antinukleární protilátky zahrnují rovněž protilátky proti nukleovým kyselinám (ssDNA, dsDNA), komplexům nukleárních proteinů (DNP, RNP) a histonům.

Protilátky proti dvouvláknové DNA (anti-dsDNA) patří do skupiny antinukleárních protilátek. Jde o heterogenní skupinu protilátek, které jsou namířeny proti různým epitopům na molekule nativní dvouvláknové DNA. Jsou považovány za vysoce specifické pro systémový lupus erythematoses (SLE).

V nižších titrech a nízkoafinitní anti-dsDNA se mohou vyskytovat u jiných systémových chorob a imunopatologických stavů (např. virové infekce), zcela výjimečně i u zdravých jedinců.

Vyšetření antinukleárních protilátek může být i součástí určení diagnózy jiných autoimunitních onemocnění, jako např. primární biliární cirhóza.

Ke zpřesnění diagnostiky autoimunitních systémových onemocnění přispívá i stanovení protilátek proti antigenu DFS70, jejichž výskyt je u zdravých jedinců běžný, ale naopak u pacientů se systémovým autoimunitním revmatickým onemocněním se vyskytují pouze ojediněle.

Výskyt autoprotilátek u jednotlivých onemocnění

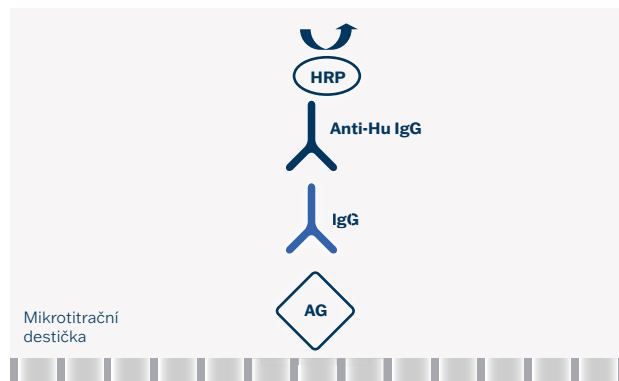
Antigen	Popis	Pravděpodobná asociace s nemocí			SLE a další nemoci pojivové tkáně
		ANA	Myositida	Sklerodermie	
Jo-1	Hystidyl tRNA synthetase	•	•		
PL-7	Threonyl tRNA synthetase	•	•		
PL-12	Alanyl tRNA synthetase	•	•		
EJ	Glycyl tRNA Synthetase	•	•		
OJ	Isoleucyl tRNA synthetase	•	•		
KS	Asparaginyl tRNA synthetase	•	•		
YARS	Tyrosyl tRNA synthetase (Ha)	•	•		
ZoA	Phenylalanyl tRNA synthetase	•	•		
ZoB	Phenylalanyl tRNA synthetase	•	•		
HMGCR	3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase	•	•		
SAE-1	Small ubiquitin-like modifier activating enzyme	•	•		
SAE-2	Small ubiquitin-like modifier activating enzyme	•	•		
SRP54	Signal recognition particle	•	•		
Mi-2	Helicase protein-nuclear transcription	•	•		
TIF1γ	Transcription Intermediary Factor 1	•	•		
MDA5	Melanoma differentiation associated protein 5 (CADM-140)	•	•		
NXP2	Nuclear matrix protein 2 (p140, MJ)	•	•		
PMScl 100	Human exosome complex	•	•	•	
PMScl 75	Human exosome complex	•	•	•	
Scl70	DNA-topoisomerase I	•		•	
CENP A	Centromere A	•		•	
CENP B	Centromere B	•		•	
POLR3A	RNA polymerase III	•		•	
NOR90	Nucleolar transcription factor 1 (Ubt1)	•		•	•
Th/To	Ribonuclease P protein subunit 25 (Rpp25)	•		•	
PDGFR-β	Platelet-derived growth factor receptor beta	•		•	
Fibrillarin	U3 RNP – fibrillarin	•		•	
Ro52	TRIM21	•	•	•	•
Ro60	Sjögren's-syndrome-related antigen A (SS-A)	•			•
La	Sjögren's-syndrome-related antigen B (SS-B)	•			•
RNP A	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	•		•	•
RNP 68/70	U1 small nuclear ribonucleoprotein 68/70 kDa	•		•	•
RNP C	U1 small nuclear ribonucleoprotein C	•		•	•
SmB	Smith antigen B	•			•
SmD	Smith antigen D	•			•
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	•			•
P0	Ribosomal protein P0	•			•
Ku	Ku (p70/p80)	•	•	•	•
Nucleolin	Nucleolin	•			•
Histons	Histone	•			•
Nucleosome	Nucleosome	•			•
dsDNA	Double-stranded DNA	•			•
M2	Mitochondrial M2 (AMA-M2)	•		•	
DFS70	Dense fine speckled 70 antigen	•			

• – doplňkové antigeny, SLE – systémový lupus erythematoses

ELISA

Princip testu

Souprava je založena na sendvičovém typu ELISA metody.



Uživatelský komfort

- Komponenty připravené k použití
- Barevně odlišené komponenty
- Barevně kódované stripky mikrotitrační destičky s odlamovacími jamkami
- CUT-OFF kontrola, semikvantitativní hodnocení (ENA screen, ENA profile)
- Kalibrátory, kvantitativní hodnocení v U/ml (jednotlivé ENA)

Výhody souprav

- Vysoká diagnostická účinnost
- Dobrá reprodukovatelnost
- Vysoká dynamika testů
- Celková doba vyšetření 1,5 hodiny
- Vhodné pro otevřené automatické systémy
- Komplexní zákaznický servis

Antigeny

EIA ENA screen plus – směs nativních a rekombinantních antigenů: Ro52/SS-A, Ro60/SS-A, La/SS-B, RNP-A, RNP-C, RNP 68, SmB, SmD, Scl 70, Jo-1 a centromera B

EIA ENA profile plus – antigeny SS-A (Ro60+Ro52), La/SS-B, Sm, U1RNP, Scl-70, Jo-1, Centromera

EIA dsDNA – purifikovaná nativní humánní dsDNA

EIA Scl-70 – směs nativního a rekombinantního antigenu Scl-70

EIA Sm – vysoce purifikovaný nativní antigen Sm

EIA SS-A – vysoce purifikovaný nativní antigen SS-A/Ro60 (60 kDa) a rekombinantní antigen SS-A/Ro52 (52 kDa)

EIA SS-B – rekombinantní antigen SS-B/La

EIA U1RNP – směs rekombinantních antigenů RNP A, RNP C a RNP 68

Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml)
	2. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl – blank = prázdná jamka
	3. Inkubace 30 min. při 37 °C
	4. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	5. Dávkování Konjugátu 100 µl – blank = prázdná jamka
	6. Inkubace 30 min. při 37 °C
	7. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	8. Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl – včetně blanku
	9. Inkubace 15 min. při 37 °C
	10. Dávkování Zastavovacího roztoku 100 µl – včetně blanku
	11. Fotometrické měření při 450 nm

Použití souprav

- Screeningový test k průkazu protilátek proti ENA u systémových onemocnění pojiva
- Testy k průkazu protilátek proti jednotlivým antigenům ENA
- Diferenciální diagnostika systémových autoimunitních onemocnění

Charakteristiky souprav

<u>ELISA</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
EIA ENA screen plus	96,2 %	97,7 %
EIA ENA profile plus	95,0 %	99,0 %
EIA dsDNA	97,8 %	98,7 %
EIA Jo-1	95,5 %	97,9 %
EIA Scl-70	97,9 %	97,9 %
EIA Sm	95,7 %	98,2 %
EIA SS-A	95,8 %	97,5 %
EIA SS-B	97,9 %	97,9 %
EIA U1RNP	97,7 %	98,2 %

Klinická data

Výsledky testování klinických vzorků – EIA ENA screen plus

Pacienti se systémovým autoimunitním onemocněním (n=143)

<u>Diagnóza</u>	<u>Testováno (n)</u>	<u>Pozitivní (n)</u>	<u>% pozitivit</u>
SLE	65	63	97 %
Sjögrenův syndrom	13	12	92 %
Sklerodermie	15	14	93 %
Dermatomyozitida	11	11	100 %
Raynaudův syndrom	6	6	100%
Nespecifikované systémové autoimunitní onemocnění	33	29	88 %

Dárci krve (n=227) – kontrolní skupina

Pozitivní	3	1 %
Negativní	224	99 %

Výsledky testování klinických vzorků – EIA ENA profile plus

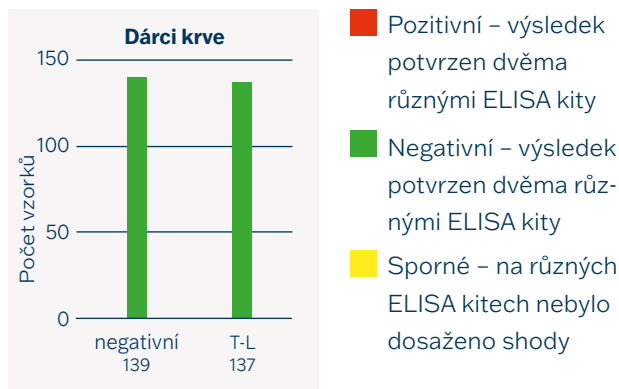
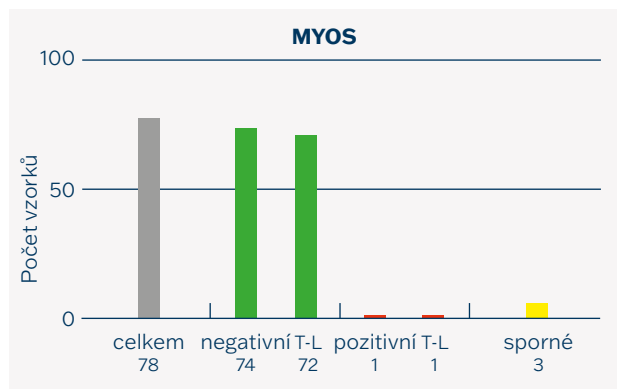
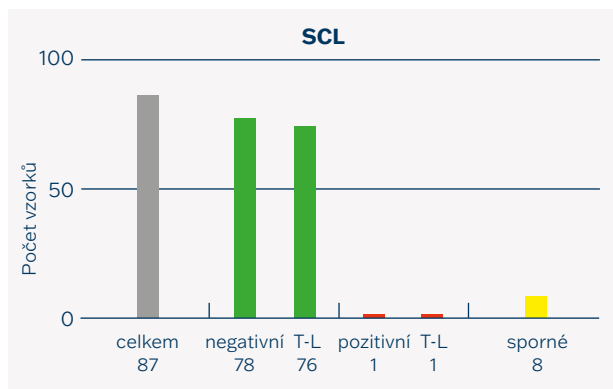
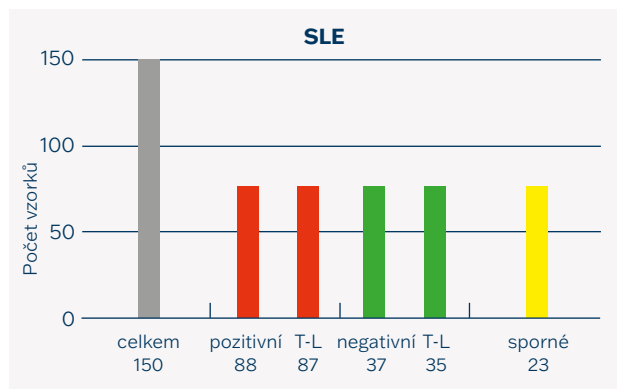
SLE – Systémový lupus erythematoses	79
SSc – Systémová sklerodermie	72
DM – Dermatomyozitida	23
Krevní dárce	50
Celkem	224

Výsledky dosažené na testovaném souboru

EIA ENA profile plus

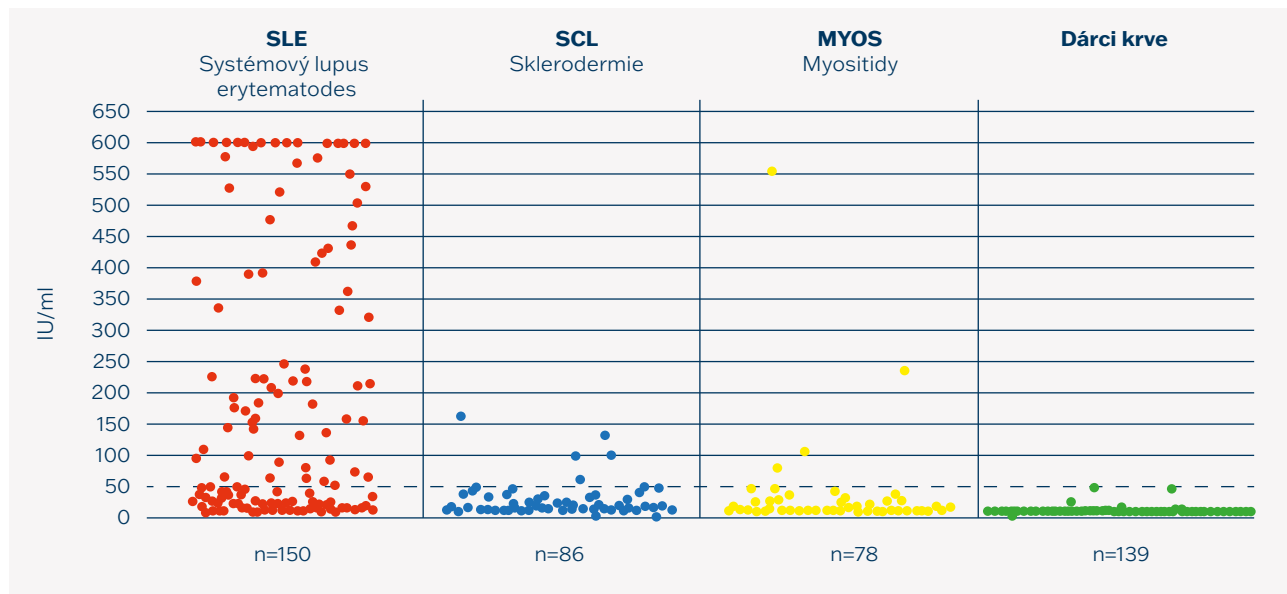
<u>Antigen</u>	<u>Citlivost</u>	<u>Specifita</u>
CENP	100 %	98 %
Jo-1	100 %	100 %
Scl-70	100 %	100 %
Sm	90 %	97 %
SS-A	97 %	99 %
SS-B	85 %	98 %
U1RNP	100 %	98 %

Výsledky testování klinických vzorků – EIA dsDNA



- Pozitivní – výsledek potvrzen dvěma různými ELISA kity
- Negativní – výsledek potvrzen dvěma různými ELISA kity
- Sporné – na různých ELISA kitech nebylo dosaženo shody

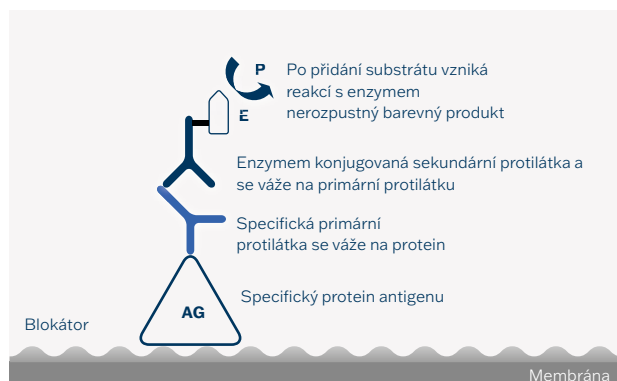
Dynamika protilátkové odpovědi – EIA dsDNA



IMUNOBLOT

Princip testu

Antigeny jsou naneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí mikrod disperzních metod.



Uživatelský komfort

- Komponenty v pracovním ředění
- Barevně odlišené reagentie
- Zaměnitelnost komponent
- Negativní a Pozitivní kontrola
- Kontrolní linie na stripu
- Možnost softwarového vyhodnocení

Výhody souprav

- Vysoká diagnostická účinnost
- Dobrá reprodukovatelnost
- Vhodné pro otevřené automatické systémy
- Jednoduchá interpretace a reprodukovatelnost výsledků, možnost SW vyhodnocení
- Komplexní zákaznický servis

Použití souprav

BLOT-LINE ANA

- Konfirmační test ELISA vyšetření
- Diferenciální diagnostika systémových autoimunitních onemocnění – typizace protilátek proti nukleárním antigenům

Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Dávkování Univerzálního roztoku 2 ml
	2. Smáčení stripů 10 min. při lab. teplotě – třepačka
	3. Odsátí
	4. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:51 (30 µl + 1,5 ml)
	5. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 1,5 ml
	6. Inkubace 30 min. při laboratorní teplotě – třepačka
	7. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 1,5 ml po 5 min. – třepačka
	8. Dávkování Konjugátu 1,5 ml
	9. Inkubace 30 min. při laboratorní teplotě – třepačka
	10. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 1,5 ml po 5 min. – třepačka
	11. Dávkování substrátového roztoku (BCIP/NBT) 1,5 ml
	12. Inkubace 15 min. při laboratorní teplotě – třepačka
	13. Odsátí a promytí v destilované vodě 2 krát 2 ml po 5 min. – třepačka
	14. Nalepení a vyhodnocení stripů

Antigeny

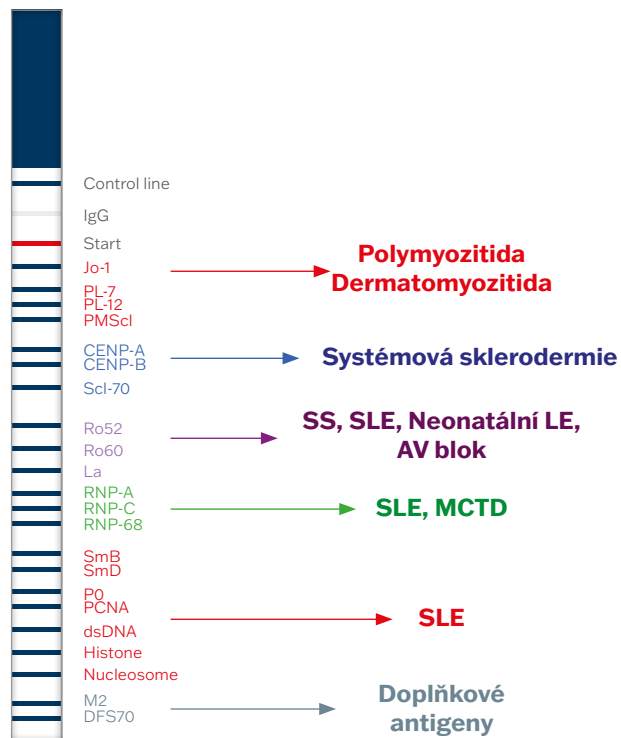
BLOT-LINE ANA

Rekombinantní antigeny:

Ro52/SS-A, Ro60/SS-A, La/SS-B, RNP-A, RNP-C, RNP 68, SmB, SmD, Scl 70, Jo-1, centromera B, centromera A, PMScl, PL-7, PL-12, ribozomální protein P0, PCNA, dsDNA, Histones, M2, DFS70 a histony

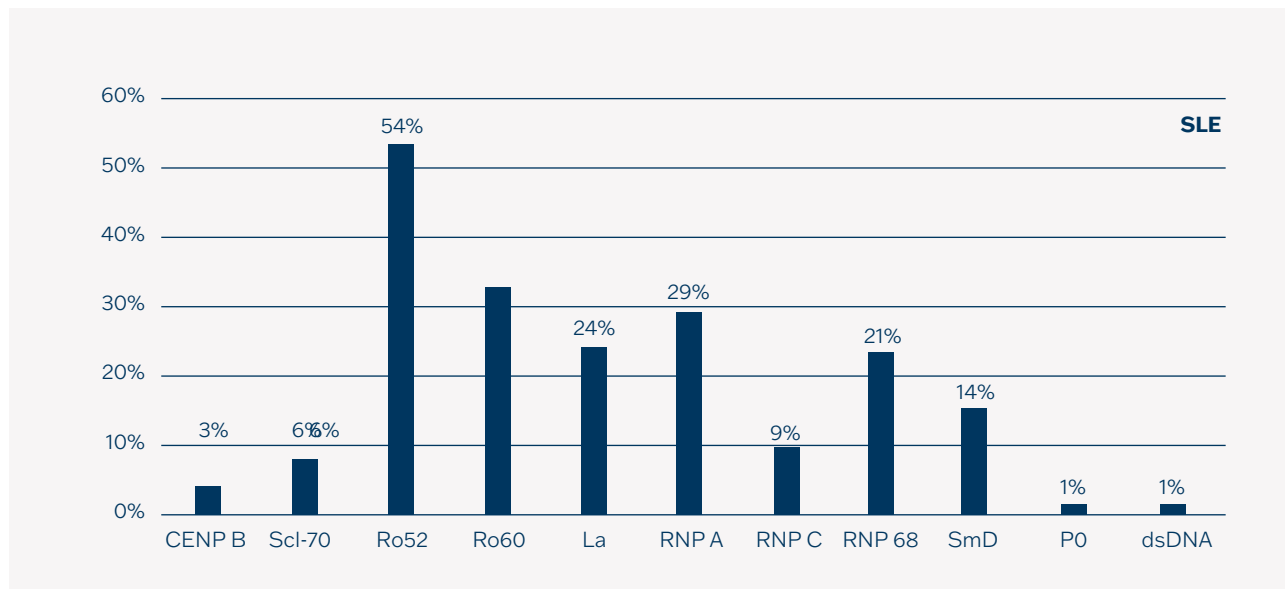
Charakteristiky souprav

<u>Imunoblot</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
BLOT-LINE ANA	96,6 %	97,4 %



Klinická data

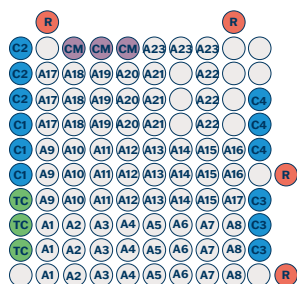
Detekce protilátek proti jednotlivým antigenům ve skupině pacientů s SLE – BLOT-LINE ANA



MICROBLOT-ARRAY

Specifické rekombinantní proteiny (antigeny) jsou nanесeny na nitrocelulózovou membránu, která je upravena do formátu jamky mikrotitrační destičky, formou spotů. Princip aplikace antigenů je obdobný jako u souprav BLOT-LINE. Nová multiplexní technologie přináší díky možnosti zpracování pomocí ELISA přístrojů významné zefektivnění ve zpracování těchto konfirmačních testů.

Rozložení antigenů a kontrolních spotů



Popis kontrolních spotů

- **R** – Reference
- **TC** – Test control
- **CM** – Conjugate control IgM
- **CG** – Conjugate control IgG
- **C1** – Calibration 1
- **C2** – Calibration 2
- **C3** – Calibration 3
- **C4** – Calibration 4
- **A1-A23** – Antigeny

Uživatelský komfort

- Nízká spotřeba vzorku
- Komponenty v pracovním ředění
- Antigeny spotovány v tripletu – minimalizace chyby provedení
- Plně automatické zpracování a vyhodnocení výsledků pomocí intenzity spotů (AU), pomocí IP a kvantitativní (U/ml)
- Paralelní vyšetření více markerů současně
- Vysoká citlivost
- Vyhodnocení výsledků pomocí sofistikovaného software
- Posouzení validity testu prostřednictvím kontrolních spotů

Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Dávkování Univerzálního roztoku 150 µl
	2. Smáčení 10 min při laboratorní teplotě
	3. Odsátí
	4. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:51 (10 µl + 500 µl)
	5. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl
	6. Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
	7. Rychlé promytí Univerzálním roztokem*
	8. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
	9. Dávkování Konjugátu 100 µl
	10. Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
	11. Rychlé promytí Univerzálním roztokem*
	12. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
	13. Dávkování Substrátového roztoku (BCIP/NBT) 100 µl
	14. Inkubace 15 min při laboratorní teplotě
	15. Rychlé promytí destilovanou vodou*
	16. Odsátí a promytí v destilované vodě 2 krát 200 µl po 5 min
	17. Vysušení a vyhodnocení

* v případě použití promývačky naplňte jamky po okraj a po naplnění poslední jamky ihned odsajte

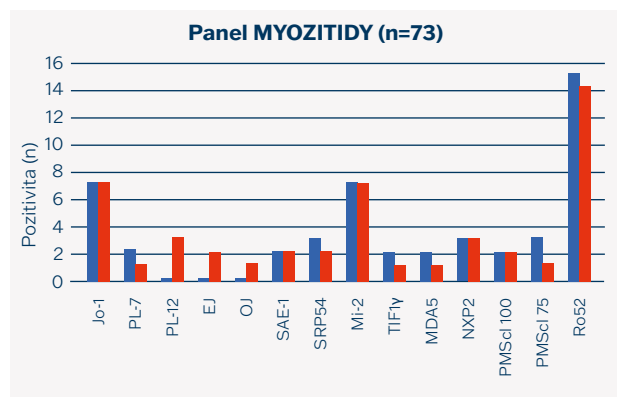
Zpracování výsledků

- Celkové hodnocení testu – ANA Pozitivní/ Hraniční/ Negativní
- Hodnocení jednotlivých antigenů a jejich asociace s typem AIO
- Možnost volby vyhodnocení jednotlivých testů
- Myopatie/ SLE/ Sclerodermie/ Překryvné syndromy
- Kvantitativní vyhodnocení testu
- Výsledkový report - zjednodušený/ kumulovaný/ detailní

Jednotlivé antigeny jsou pro účely hodnocení rozděleny do skupin dle jejich asociace s daným typem onemocnění

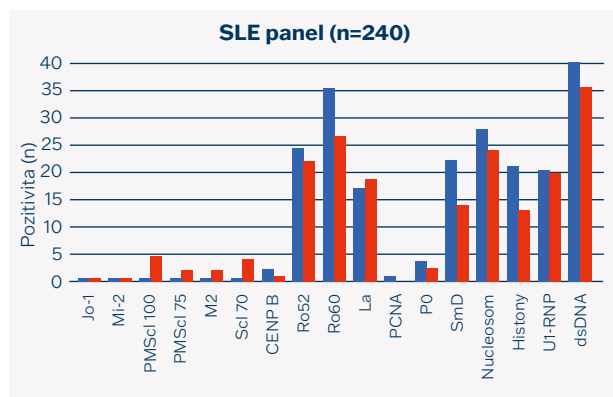
<u>Parametry sady ANA</u>	<u>Antigeny</u>
ANA	Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, KS, YARS, ZoA, ZoB, SAE-1, SAE-2, SRP54, Mi-2, TIF1γ, MDA5, NXP2, PMScI 75, PMScI 100, CENP A, CENP B, Scl70, POLR3A, NOR90, PDGFR-β, Fibrillarin, Th/To, Ro52, Ro60, La, SmB, SmD, RNP A, RNP C, RNP 68/70, P0, Ku, Nucleolin, dsDNA, Histon, Nukleozom, PCNA Doplnkové antigeny: M2, DFS70.
Myozitidy	Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, KS, YARS, ZoA, ZoB, SAE-1, SAE-2, SRP54, Mi-2, TIF1γ, MDA5, NXP2 Doplnkové antigeny: Ro52, PMScI 75, PMScI 100, Ku
Sklerodermie	CENP A, CENP B, Scl70, POLR3A, NOR90, PDGFR-β, Fibrillarin, Th/To, PMScI 75, PMScI 100, RNP A, RNP C, RNP 68/70 Doplnkové antigeny: Ro52, Ku, M2.
SLE a další onemocnění pojiva	dsDNA, Histon, Nukleozom, PCNA, SmB, SmD, RNP A, RNP C, RNP 68/70, P0, Ku, Nucleolin, Ro52, Ro60, La, NOR90

Srovnávací studie



■ Konfirmační test

■ Microblot-Array



Objednací údaje

ELISA

<u>Kód</u>	<u>Název soupravy</u>	<u>Počet testů</u>
ENA096	EIA ENA screen plus	96
ENAp12	EIA ENA profile plus	12
DNA096	EIA dsDNA	96
Jo1096	EIA Jo-1	96
ScI096	EIA ScI-70	96
Sm0096	EIA Sm	96
SSA096	EIA SS-A	96
SSB096	EIA SS-B	96
RNP096	EIA U1RNP	96
SK-ENA096	SmartEIA ENA screen plus	96
SK-ENAp12	SmartEIA ENA profile plus	12
SK-DNA096	SmartEIA dsDNA	96
SK-Jo1096	SmartEIA Jo-1	96
SK-ScI096	SmartEIA ScI-70	96
SK-Sm0096	SmartEIA Sm	96
SK-SSA096	SmartEIA SS-A	96
SK-SSB096	SmartEIA SS-B	96
SK-RNP096	SmartEIA U1RNP	96

Soupravy SmartEIA jsou navrženy pro automatizované zpracování pomocí analyzátoru Agility®.

IMUNOBLOT

<u>Kód</u>	<u>Název soupravy</u>	<u>Počet testů</u>
ANAL20	BLOT-LINE ANA	20

MICROBLOT-ARRAY

<u>Kód</u>	<u>Název soupravy</u>	<u>Počet testů</u>
ANApMA96	Microblot-Array ANA plus	96



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Křižíkova 188/68, 612 00 Brno, Česká republika
+420 549 121 205 (209, 238)
trade@testlinecd.com
www.testlinecd.cz



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
je držitelem certifikátů
ISO 9001 a ISO 13485