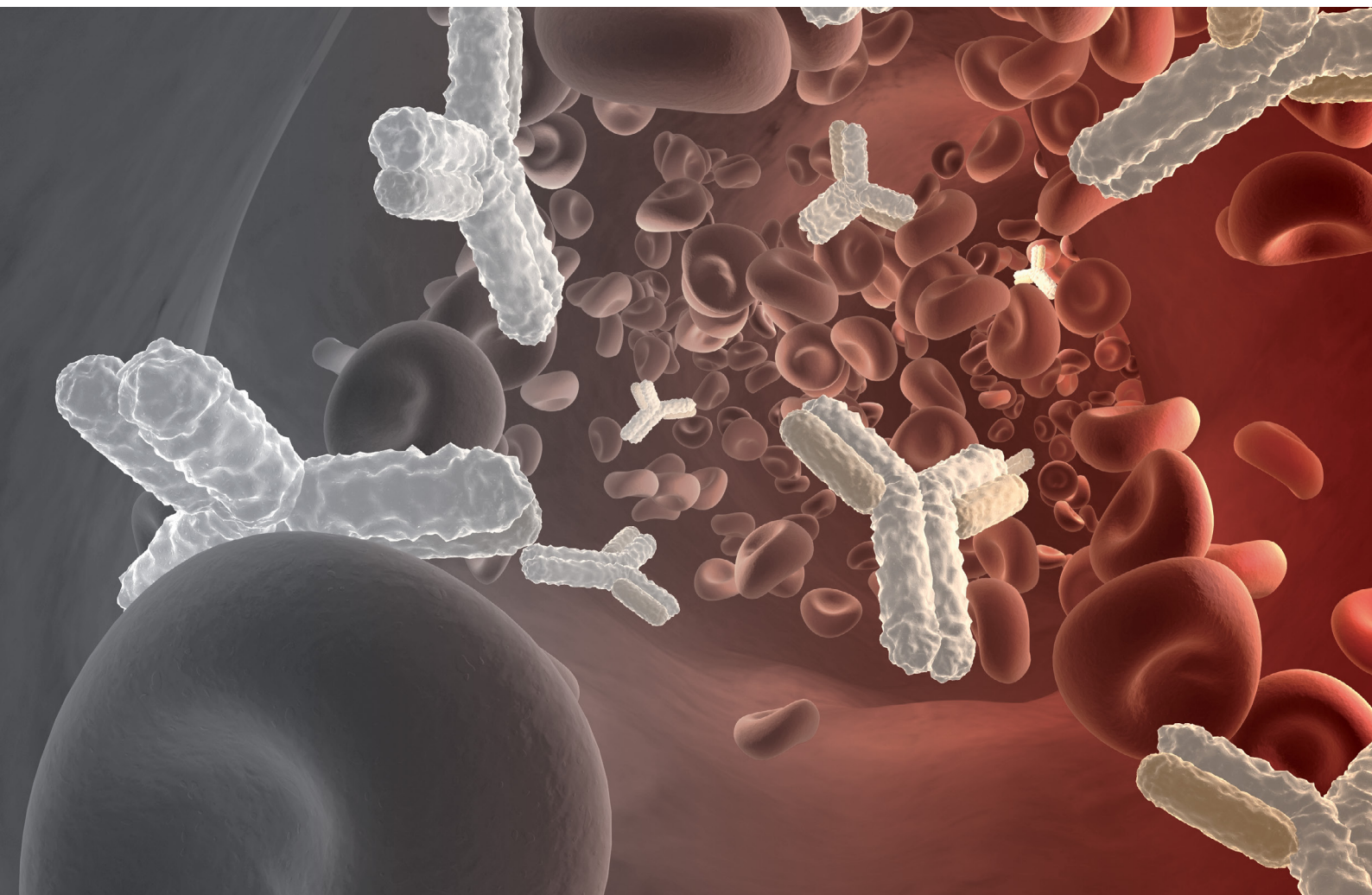


Antinukleární protilátky (ANA) Protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (ENA)



Imunoenzymatické soupravy k diagnostice
systemových autoimunitních onemocnění

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

ÚVOD

Stanovení antinukleárních protilátek má význam pro diagnostiku systémových autoimunitních onemocnění. Jde o skupinu autoprotilátek 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 autoprotilátek 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 vysoce 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 centromeře 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).

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 NEMOCÍ

	Antigen	Původ antigenu	Pravděpodobná asociace s onemocněním
Jo-1	Hystidyl tRNA synthetase	Rekombinantní	ASS, PM, DM
PL-7	Threonyl tRNA synthetase	Rekombinantní	ASS, PM, DM, Raynaudův fenomén
PL-12	Alanyl tRNA synthetase	Rekombinantní	ASS, PM, DM, Raynaudův fenomén
EJ	Glycyl-tRNA Synthetase	Rekombinantní	ASS
OJ	Isoleucyl tRNA synthetase	Rekombinantní	ASS, ILD
KS	Asparaginylní tRNA synthetase	Rekombinantní	ILD, PM, DM, ASS
YARS	Tyrosyl tRNA synthetase (Ha)	Rekombinantní	ASS
ZoA	Phenylalanyl tRNA synthetase	Rekombinantní	ASS
ZoB		Rekombinantní	ASS
HMGCR	3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzym A reductase	Rekombinantní	IMNM, Statinu indukovaná NM
SAE-1	Small ubiquitin-like modifier activating enzyme	Rekombinantní	ASS, CDM
SAE-2		Rekombinantní	ASS, CDM
SRP54	Signal recognition particle	Rekombinantní	IMNM, PM, DM, ASS
Mi-2	Helicase protein—nuclear transcription	Rekombinantní	Juvenilní DM, DM
TIF1γ	Transcription intermediary factor 1	Rekombinantní	DM, CDM, Juvenilní DM
MDA5	Melanoma differentiation associated protein 5 (CADM-140)	Rekombinantní	Amyopatická DM s progresí ILD
NXP2	Nuclear matrix protein 2 (p140, MJ)	Rekombinantní	Juvenilní DM
PmScl 100	Human exosome complex	Rekombinantní	Difuzní SSc, PM/SSc,
PmScl 75		Rekombinantní	Difuzní SSc, PM/SSc,

	Antigen	Původ antigenu	Pravděpodobná asociace s onemocněním
Scl70	DNA-topoisomerase I	Rekombinantní	Difuzní SSc, SSc s rizikem rozvoje pulmonální fibrózy
CENP A	Centromere A	Rekombinantní	SSc, CREST syndrom
CENP B	Centromere B	Rekombinantní	SSc, CREST syndrom
POLR3A	RNA polymerase III	Rekombinantní	Difuzní SSc
NOR90	Nucleolar transcription factor 1 (Ubtf1)	Rekombinantní	SSc, Raynaudův fenomén, SLE, SjS
Th/To	Ribonuclease P protein subunit 25 (Rpp25)	Rekombinantní	SSc s rizikem rozvoje pulmonální fibrózy
PDGFR-β	Platelet-derived growth factor receptor beta	Rekombinantní	SSc s rizikem rozvoje pulmonální fibrózy, svalové dystrofie a svalové fibrózy
Fibrillarin	U3 RNP - fibrillarin	Rekombinantní	SSc s rizikem rozvoje pulmonální hypertenze
Ro52	TRIM21	Rekombinantní	DM s progresí ILD, Raynaudův fenomén, SLE, neonatální LE, SSc
Ro60	Sjögren's-syndrome-related antigen A (SS-A)	Rekombinantní	SjS, neonatální LE, SLE
La	Sjögren's-syndrome-related antigen B (SS-B)	Rekombinantní	SjS, neonatální LE, SLE
RNP A	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	Rekombinantní	SLE, MCTD, Raynaudův fenomén
RNP 68/70	U1 small nuclear ribonucleoprotein 68/70 kDa	Rekombinantní	SLE, MCTD, Raynaudův fenomén
RNP C	U1 small nuclear ribonucleoprotein C	Rekombinantní	SLE, MCTD, Raynaudův fenomén
SmB	Smith antigen B	Rekombinantní	SLE
SmD	Smith antigen D	Rekombinantní	SLE
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Rekombinantní	SLE
P0	Ribosomal protein P0	Rekombinantní	SLE
Ku	Ku (p70/p80)	Rekombinantní	SLE, MCTD, PM/SSc
Nucleolin	Nucleolin	Rekombinantní	SLE
Histony	Histone	Purifikovaný nativní	Polékový LE, SLE
Nukleozom	Nucleosome	Purifikovaný nativní	SLE s rizikem rozvoje lupusové nefritidy
dsDNA	Double-stranded DNA	Purifikovaný nativní lidský	SLE
M2	Mitochondrial M2 (AMA-M2)	Rekombinantní	Primární biliární cirhóza, SSc s progresí PBC
DFS70	Dense fine speckled 70 antigen	Rekombinantní	Atopická dermatitida, SjS, osamoceně - biomarker pro vyloučení SARD

ASS	Antisyntetázový syndrom (Antisynthetase syndrome)
PM	Polymyozitida (Polymyositis)
DM	Dermatomyozitida (Dermatomyositis)
ILD	Intersticiální plicní onemocnění (Interstitial lung disease)
IMNM	Imunitně zprostředkovaná nekrotizující myopatie (Immune-mediated necrotizing myopathy)
NM	Nekrotizující myopatie (Necrotizing myopathy)
CDM	S nádorem asociovaná myozitida (Cancer-associated myositis)
IBM	Myozitida s inkluzními tělísky (Inclusion body myositis)
SLE	Systémový lupus erythematosus (Systemic lupus erythematosus)

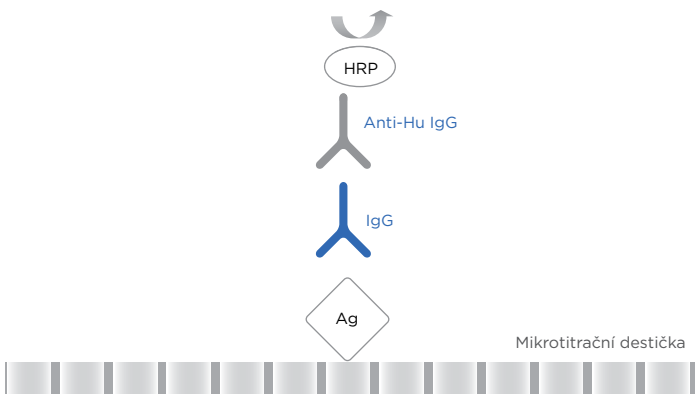
MCTD	Smíšené onemocnění pojiva (Mixed connective tissue disease)
SSc	Systémová sklerodermie (Systemic sclerosis)
SjS	Sjögrenův syndrom (Sjögren's syndrome)
PBC	Primární biliární cirhóza (Primary biliary cirrhosis)
SARD	Systémové autoimunitní revmatologické onemocnění (Systemic autoimmune rheumatoid disease)
IIM	Idiopatická zánětlivá myopatie (Idiopathic inflammatory myopathy)

ELISA

PRINCIP TESTU

Souprava je založena na sendvičovém typu ELISA metody.

Sandwich ELISA



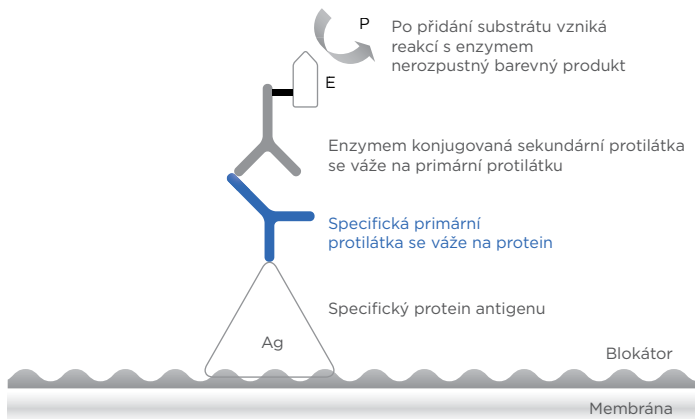
PRACOVNÍ POSTUP

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

IMUNOBLOT

PRINCIP TESTU

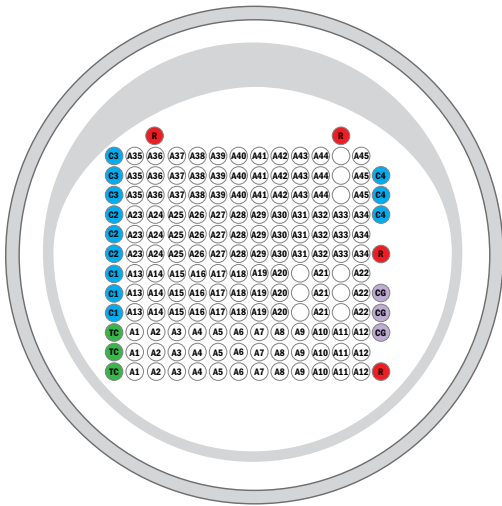
Antigeny jsou přeneseny na nitrocelulóзовou membránu pomocí mikrodispensních metod.



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

ROZLOŽENÍ ANTIGENŮ A KONTROLNÍCH SPOTŮ



Popis antigenů

A1 - Jo-1	A17 - NXP2	A33 - La (SS-B)
A2 - PL-7	A19 - PmScl 100	A34 - PCNA
A3 - PL-12	A20 - PmScl 75	A35 - PO
A4 - EJ	A21 - M2	A36 - SmB
A5 - OJ	A22 - DFS70	A37 - SmD
A6 - KS	A23 - Scl70	A38 - Nucleolin
A7 - YARS (Ha)	A24 - CENP A	A39 - Nucleosome
A8 - ZoA	A25 - CENP B	A40 - Histone
A9 - ZoB	A26 - POLR3A	A41 - RNP A
A10 - HMGCRC	A27 - NOR90	A42 - RNP 68/70
A11 - SAE-1	A28 - Th/To (RPP25)	A43 - RNP C
A12 - SAE-2	A29 - PDGFRβ	A44 - Ku
A13 - SRP54	A30 - Fibrillarin	A45 - dsDNA
A14 - Mi-2	A31 - Ro52	
A15 - TIF1γ	A32 - Ro60 (SS-A)	
A16 - MDA5		

PRACOVNÍ POSTUP

Krok	Kroky testu
1	➊ 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	➊ Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 μl
6	⌚ Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
7	🌀 Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 μl po 5 min
8	➊ Dávkování Konjugátu 100 μl
9	⌚ Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
10	🌀 Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 μl po 5 min
11	➊ Dávkování Substrátového roztoku (BCIP/NBT) 100 μl
12	⌚ Inkubace 15 min při laboratorní teplotě
13	🌀 Odsátí a promytí v destilované vodě 2 krát 200 μl po 5 min
14	⏴ Vysušení a vyhodnocení

Popis kontrolních spotů

■	R - Reference
■	TC - Test control
■	CG - Conjugate control IgG
■	C1 - Calibration 1
■	C2 - Calibration 2
■	C3 - Calibration 3
■	C4 - Calibration 4

OBJEDNACÍ ÚDAJE

ELISA

Kód	Název soupravy	Počet testů
ENA096	EIA ENA screen plus	96
ENA012	EIA ENA profile	12
ENAp12	EIA ENA profile plus	12
SSA096	EIA SS-A	96
Ro5296	EIA SS-A/Ro52	96
Ro6096	EIA SS-A/Ro60	96
SSB096	EIA SS-B	96
Sm0096	EIA Sm	96
RNP096	EIA U1RNP	96
Scl096	EIA Scl-70	96
CEN096	EIA Centromere	96
Jo1096	EIA Jo-1	96
DNA096	EIA dsDNA	96
SK-ENA096	SmartEIA ENA screen plus	96
SK-ENA012	SmartEIA ENA profile	12
SK-ENAp12	SmartEIA ENA profile plus	12
SK-SSA096	SmartEIA SS-A	96
SK-Ro5296	SmartEIA SS-A/Ro52	96
SK-Ro6096	SmartEIA SS-A/Ro60	96
SK-SSB096	SmartEIA SS-B	96
SK-Sm0096	SmartEIA Sm	96
SK-RNP096	SmartEIA U1RNP	96
SK-Scl096	SmartSmartEIA Scl-70	96
SK-CEN096	SmartEIA Centromere	96
SK-Jo1096	SmartEIA Jo-1	96
SK-DNA096	SmartEIA dsDNA	96

Soupravy SmartEIA jsou koncipovány pro automatické zpracování na přístroji Agility.

IMUNOBLOT

Kód	Název soupravy	Počet testů
ENAL20	BLOT-LINE ENA plus	20
ANAL20	BLOT-LINE ANA	20

MICROBLOT-ARRAY

Kód	Název soupravy	Počet testů
ANA45MA96	Microblot-Array ANA 45	96

KONTAKT

TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Křižíkova 68, 612 00 Brno, Česká republika

Tel.: +420 549 121 205 (209, 238)

Fax: +420 541 243 390

E-mail: trade@testlinecd.com

www.testlinecd.cz



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. je držitelem certifikátů ISO 9001:2008 a ISO 13485:2003

