

# Souprava ds-DNA IgG antibodies ELISA

## kantitativní a kvalitativní test protilátek proti dvouvláknové DNA

Product code GD10

96 testů

*For in vitro diagnostic use*

2001-10-29

**1. Použití**

Souprava ds-DNA IgG antibodies Elisa představuje rychlou metodu detekce protilátek IgG vytvořených proti dvouvláknové (ds) DNA v krevním séru. Dodává se jako pomůcka pro diagnostiku lupus erythematosus (SLE). Komponenty této soupravy jsou určeny pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

**2. Vysvětlení testu**

Obíhající protilátky vytvořené proti ds-DNA jsou výrazně spojeny s SLE. Mezi velkým množstvím kvantitativních analýz na protilátky vytvořené proti DNA jsou nejběžněji používané imunofluorescenční test na *Crithidia luciliae*, radioassay (Farrův test a PEG test) a testy pomocí readeru Elisa. Různé testovací metody nejsou vždy v důsledku rozdílů ve zdrojích DNA a prezentace protilátek porovnatelné. Souprava „ds-DNA IgG antibodies“ firmy Genesis používá lidskou DNA a unikátní patentovanou technologii pro nanášení této DNA na povrch jamek mikrotitrační destičky. Důsledkem toho je stabilní a pevně navázaní protilátek během provádění testu.

Role protilátek vytvořených proti ds-DNA během nemoci je dobře dokumentována. Je známo, že vážnost onemocnění těsně odpovídá hladinám protilátek vytvořených proti DNA a proto lze tento test používat k posouzení účinnosti terapie. Zvýšená hladina protilátek vytvořených proti ds-DNA může předznamenávat opětné zhoršení stavu, proto se doporučuje časté monitorování pacientů v celém průběhu nemoci.

**3. Princip testu**

Vzorky séra se inkubují s ds-DNA imobilizovanou v jamkách mikrotitrační destičky. Po smytí nenavázaných složek krevního séra se do jamek přidá králičí IgG silně reagující s lidskými antigeny konjugovaná v peroxidáze, a tato IgG se během druhé inkubace naváže protilátkou vázanou na povrchu. Nenavázaný konjugát se odstraní promytím a do jamek se přidá roztok obsahující 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) a enzymatický substrát, které označí navázané specifické protilátky. Přidání stop-roztoku reakci zastaví, a poskytne správné pH pro vznik zabarvení. Optická hustota standardů, pozitivního kontrolního vzorku a testovaných vzorků se měří čtečkou mikrotitračních destiček (readerem) Elisa s filtrem 450 nm. Optická hustota je přímo úměrná aktivitě protilátek ve vzorku.

**4. Materiály dodávané v soupravě**

- **Mikrotitrační destička** 96 jamek na odlamovacích proužcích formátu 12 x 8, předem pokrytých lidskou ds-DNA, s držákem, uložená v plastovém sáčku s vysoušečem.
- **Reagens 1: Roztok pro ředění vzorků**, 150 mM, pufovaný solný roztok, pH 7,2, s antimikrobiální přísadou, obsah 15 ml, (barva modrá), 15násobná koncentrace.
- **Reagens 2: Promývací pufr**, pufovaný solný roztok s detergentem, pH 7,2, obsah 15 ml, 15násobná koncentrace.
- **Reagens 3: Konjugát**, králičí IgG silně reagující s lidskými antigeny konjugovaný v peroxidáze v roztoku stabilizujícím proteiny s antimikrobiální přísadou, obsah 12 ml, barva červená, připraveno k okamžitému použití.
- **Reagens 4: TMB substrát**, vodný roztok TMB a peroxidu vodíku, obsah 12 ml, připraveno k okamžitému použití.
- **Reagens 5: Stop-roztok**, 0,25molární kyselina sírová, obsah 12 ml, připraveno k okamžitému použití.
- **Standardy**: 0, 25, 50, 100, 200 a 400 U/ml, po 1 ml 10mM pufovaný solný roztok obsahující IgG protilátky lidského séra proti ds-DNA, připraveno k okamžitému použití.
- **Pozitivní kontrolní vzorek**: 1 ml 10mM solný roztok obsahující protilátky lidského séra proti ds-DNA, připraveno k okamžitému použití.
- **Návod k použití soupravy**

**5. Další zařízení potřebné k provedení testu**

- zkumavky na roztoky • kalibrovaný odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku • přesné pipety a jednorázové špičky pro dávkování 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l a 1 ml • promývačka mikrotitračních destiček EIA nebo vícekanálová pipeta nebo promývací láhev • destilovaná nebo deionizovaná voda • savý papír • reader EIA s filtrem 450 nm, případně s referenčním filtrem 620 nm

**6. Upozornění****6.1 Bezpečnost práce**

1. Všechny reagenty této soupravy jsou pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
2. Tento test by měl provádět pouze zkušený laboratorní personál. Je nutné striktně dodržovat protokol testu.

3. Veškerý materiál lidského původu použitý pro přípravu standardů a kontrolních vzorků, které jsou součástí tohoto výrobku byl otestován na obsah protilátek proti HIV, HbsAg a HCV, a byl shledán negativní. Žádná testovací metoda však nemůže poskytnout úplnou jistotu, že v materiálu není přítomen infekční agens. Proto by se mělo s veškerými reagenty obsahujícími materiál lidského původu zacházet jako s materiály potenciálně infekčními. Pracovníci by měli mít při práci se sérem pacienta, nebo s produkty ze séra vyrobenými, rukavice a ochranný oděv.
4. Reagenty této sady obsahují antimikrobiální látky a roztok substrátu obsahuje 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Zabraňte kontaktu s pokožkou a očima. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
5. Stop-roztok obsahuje 0,25molární kyselinu sírovou. Zabraňte kontaktu s pokožkou nebo jeho vniknutí do očí. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
6. Jakákoli kapalina, která přijde do kontaktu s potenciálně infekčním materiálem, musí být zlikvidována v kontejneru s dezinfekčním prostředkem. Likvidace musí být provedena v souladu s místní legislativou.

**6.2 Technické poznámky**

1. Proužky (stripy) a roztoky by se neměly používat pokud jsou sáčky, ve kterých byly uloženy, porušené, nebo pokud prosakují.
2. Před použitím nechejte všechny reagenty a mikrotitrační destičku zahřát na pokojovou teplotu. Zabezpečte, aby byl plastový sáček obsahující nepoužité proužky mikrotitrační destičky dobře uzavřen, a aby v něm bylo vloženo vysoušedlo. Skladujte je při teplotě 2 – 8 °C.
3. Při každém testu použijte i pozitivní kontrolní vzorek, abyste mohli monitorovat stabilitu reagentů a správné provedení testu.
4. Přesně dodržujte uvedené doby a teploty inkubace.
5. Zajistěte, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi jamkami. Všechny pipety a další zařízení použité pro enzymatický konjugát ukládejte zcela odděleně od reagentu substrátu.
6. Při dávkování konjugátu nebo TMB substrátu pipetou by mělo být nabráno takové množství reagentu, aby nebylo nutno špičku pipety opakovaně nořit do ampule s reagentem. Nepoužitý reagens nikdy nevráťte zpět do původních nádob.
7. Mezi inkubačními kroky nenechávejte mikrotitrační jamky vyschnout.
8. Přesně dodržujte popsany promývací postup. Nedostatečné promytí může způsobit silný falešný signál.
9. Během všech inkubačních kroků zabraňte osvětlení destičky přímým slunečním světlem nebo jejimu vystavení zdroji tepla.
10. Barevné uzávěry nasadte zpět na správné ampule. Zabráňte tím křížové kontaminaci.
11. Je důležité dávkovat do jamek všechny vzorky pacienta i všechny kontrolní vzorky bez prodlevy. Proto se před započatím práce ujistěte, že všechny reagenty jsou připraveny k okamžitému použití.

**7. Trvanlivost a skladovací podmínky**

Po převzetí soupravu skladujte při teplotě 2 – 8 °C. Po otevření jsou látky soupravy stabilní po dobu tří měsíců (nebo do konce expirační doby, pokud je tato kratší než tři měsíce). Nepoužívejte soupravy s prošlou lhůtou expirace. Žádnou část soupravy nezmrazujte. Zředěný promývací roztok uložený v uzavřené láhvi při teplotě 2 - 8 °C má trvanlivost 3 m ěsíce.

**8. Odběr a skladování vzorků**

Při dlouhodobém používání a skladování mohou být vzorky séra uloženy při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se vzorky musí před testem dobře rozmíchat. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testu. Nepříznivý vliv na výsledky může mít i přidání konzervačních látek. Neměly by se používat vzorky mikrobiálně kontaminované, tepelně ošetřené nebo vzorky obsahující pevné částice. Vyhněte se používání silně hemolyzovaných nebo lipemických vzorků.

**9. Příprava reagentů**

1. Rozřeďte roztok pro ředění vzorků (**Reagens 1**) v poměru 1:14 destilovanou vodou, abyste měli dost pufru pro provedení celého testu.
2. Rozřeďte promývací roztok (**Reagens 2**) v poměru 1:14 destilovanou vodou, abyste měli dost pufru pro provedení celého testu.
3. Rozřeďte vzorky odebrané pacientovi v poměru 1:100 naředěným roztokem pro ředění vzorků (např.: 10 $\mu$ l séra plus 1ml roztoku).

**10. Pracovní postup**

1. Vybte počet proužků potřebný pro test.
2. Pro kvantitativní rozbor dávkujte 100 µl každého standardu, pozitivního kontrolního vzorku a rozředěného vzorku pacienta do příslušných jamek.  
Pro kvalitativní rozbor, dávkujte jen Standard 50 U/ml, pozitivní kontrolní vzorek a vzorek pacienta.
3. Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
4. Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek a třikrát je promyjte v automatické promývačce mikrotitračních destiček nebo ručním promytím (viz níže). Pečlivě promyťte je klíčem k dobrým výsledkům. Před dalším krokem osušte jamky savým papírem. **Nenechávejte jamky vyschnout.**

Postup pro ruční promývání:

Jamky vyprázdněte tak, že destičku obrátíte. Pomocí vícenásobné pipety nebo promývací láhve jamky naplňte promývacím pufrém. Opět jamky vyprázdněte obrácením destičky, a osušte je savým papírem. Tento proces opakujte ještě dvakrát.

5. Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**). Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
6. Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek, a pečlivě je čtyřikrát promyjte promývacím pufrém. Oklepejte destičku na savý papír, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.
7. Pomocí složené dávkovací pipety rychle do každé jamky dávkujte 100 µl TMB Substrátu (**Reagens 4**). Inkubujte destičku po dobu **10 minut**.
8. Do každé jamky přidejte 100 µl Stop-roztoku (**Reagens 5**). Aby byly dodrženy stejné doby reakce, měl by být stop-roztok dávkován do jamek ve stejném sledu jako do nich byl dávkován TMB substrát.
9. Do limitu 10 minut odečtete optickou hustotu (OD) každé jamky readerem s filtrem 450 nm. Jako referenční prostředek lze použít i filtr 620 nm.

**11. Zabezpečení kvality**

Data pro zabezpečení kvality jsou uvedena na certifikátu šarže, který je přiložen k sadě.

Účelem pozitivního kontrolního vzorku je sledování, zda nedošlo k vzájemnému selhání reagentů.

Každá jamka, která je podle spektrofotometru pozitivní, ale nemá viditelné zabarvení, by se měla z rubu vyčistit, a měla by být znovu změřena. Pokud by byly zjištěny hodnoty nižší než nula, měly by být zkontrolovány použité vlnové délky, reader by měl být znovu nastaven na základní hodnoty a měření by se mělo zopakovat

**12. Interpretace výsledků**Kvantitativní výsledky

Pomocí souřadného systému vyneste do grafu hodnoty optické hustoty každého ze standardů ve vztahu k jejich koncentraci a spojte je křivkou. Z této křivky zjistíte hodnoty neznámých. Standard 50 U/ml je nastaven na horní hranici normálních hodnot. Hodnoty mezi 40 a 50 U/ml se považují za hraniční. Hodnoty nad 50 U/ml znamenají zvýšenou hladinu protilátek proti ds-DNA. Vzorky pacientů s potvrzenou SLE mají hodnoty přesahující 50 U/ml.

Každá laboratoř by si měla určit svůj vlastní referenční rozsah. Vzorky s hodnotami nad 400 U/ml by měly být analyzovány znovu s vyšším ředěním.

Kvalitativní výsledky

Standard 50 U/ml je nastaven na horní hranici normálního rozpětí. Hodnoty mezi 40 – 50 U/ml se považují za hraniční. Hodnoty nad 50 U/ml znamenají zvýšenou hladinu protilátek proti ds-DNA.

**13. Limity postupu**

1. Tento test nevykazuje žádnou významnou křížovou reakci s protilátkami vytvořenými proti jednovláknové DNA.
2. Protože IgG protilátky se považují za klinicky nejvýznamnější, používá tento test IgG specifický konjugát. IgG protilátkám mohou při vázání antigenu konkurovat IgM protilátky vytvořené proti ds-DNA. Pokud existuje podezření na interferenci ze strany IgM, proveďte test znovu s vyšším zředěním. Prudký nárůst hodnoty u vzorků pacienta indikuje přítomnost konkurenčních IgM protilátek. Tato nová hodnota vypovídá o aktivitě IgG protilátek ve vzorku mnohem přesněji.
3. Negativní výsledek testu na ds-DNA IgG nevyklučuje přítomnost SLE.
4. Pozitivní výsledek testu na ds-DNA IgG indikuje pouze přítomnost daných protilátek a nemusí nutně znamenat přítomnost SLE.
5. Výsledky tohoto testu by se měly interpretovat ve světle všech ostatních dostupných klinických nálezů.

**14. Charakteristiky**Citlivost testu

Vypočtena z odchylek nulového standardu = 2.5 U/ml

Porovnání s jinými metodami používající ELISA

Testováním 45 vzorků pomocí souprav na testování protilátek proti ds-DNA vyráběných firmou Genesis a pomocí dalších souprav dostupných na trhu byl zjištěn korelační koeficient 0,92

**15. Reprodukovatelnost**Přesnost v rámci jedné soupravy

průměr U/ml	SD	n	CV%
32,03	1,42	12	4,4
178,42	10,6	12	5,9

Přesnost mezi soupravami

průměr U/ml	SD	n	CV%
14,2	2,11	10	14,7
170,3	18,48	10	10,8

Regenerace protilátek proti ds-DNA přidaných do vzorku séra

přidané U/ml	regenerované v U/ml	regenerované v %
0	27	0
25	50	96
50	79	102
100	131	103

**Shrnutí postupu**

- Zředte sérum roztokem na ředění vzorků (**Reagens 1**) v poměru 1 : 100.
- Do jamek mikrotitrační destičky dávkujte po 20µl pozitivního kontrolního vzorku a zředěného testovaného vzorku.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- **Jamky promyjte třikrát.**
- Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- **Jamky promyjte čtyřikrát.**
- Do každé jamky přidejte 100 µl TMB substrátu (**Reagens 4**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **10 minut**.
- Do každé jamky přidejte 100 µl stop-roztoku (**Reagens 5**).
- Sledujte optickou hustotu s filtrem 450 nm (jediná vlnová délka) nebo 450 nm a 620 nm (dvojitá vlnová délka).

**Literatura**

- Isenberg, D A et al: *Arthritis Rheumatol* 27 132-138 (1984)  
 Felkamp TEM et al: *Ann Rheum Dis* 47, 740-746 (1988)  
 Halbert SP et al: *J Clin Lab Med* 97, 97-111 (1981)  
 Tan EM et al: *Arthritis Rheumatol* 25, 1271-1277 (1982)  
 Tan EM et al: *Adv Immunol* 33,167-240 (1982)  
 Swaak AJG et al: *Ann Rheum Dis* 41, 388-395 (1982)

**Výrobce:****Genesis Diagnostics Ltd.**

Eden Research Park, Henry Crabb Road,  
Littleport,  
Cambridgeshire, CB6 1SE, United Kingdom  
Tel 01353 862220 Fax 01353 863330

**Distributor:****LABOSERV s.r.o.**

Hudcova 78b, 612 00 Brno  
Tel. 05/41243113, Fax 05/ 41243114  
e-mail [laboserv@laboserv.cz](mailto:laboserv@laboserv.cz)