

Souprava ss-DNA Antibodies ELISA

Kvantitativní test protilátek proti jednovláknové DNA

Kód výrobku GD12
96 testů

Reagenty této soupravy jsou určeny pouze pro diagnostické použití

051001

Použití

Souprava ss-DNA představuje rychlou metodu detekce protilátek readerem Elisa v krevním séru vytvořených proti ss-DNA. Dodává se jako pomůcka pro diagnostiku autoimunitních chorob. Komponenty této soupravy jsou určeny pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

Úvod

Návod od protilátek vytvořených proti ds-DNA, které se vyskytují specificky v SLE (systémový lupus erythematodes) protilátky vytvořené proti jednovláknové DNA se vyskytují při řadě různých onemocnění autoimunitního systému. U některých testů na protilátky vytvořené proti ds-DNA mohou vysoké hladiny ss-DNA způsobit falešné pozitivní reakce. Význam protilátek vytvořených proti ss-DNA u autoimunitních onemocnění je nejasný.

Princip testu

Souprava ss-DNA Elisa používá mikrotitrační destičku s 96 jamkami. Jednovláknová DNA se připravuje tepelnou inaktivací přirozené DNA. Tato jednovláknová DNA se pak nanese na povrch jamek mikrotitrační destičky. Vzorky séra (zředěné v poměru 1 : 100) se inkubují po dobu 20 minut, aby se protilátky vytvořené proti ss-DNA navázaly na antigen na povrchu jamek mikrotitrační destičky. Po smytí nenavázaných protilátek a složek krevního séra se konkrétní protilátky detekují pomocí reakce s anti-IgG-peroxidázou a s TMB substrátem. Žluté zbarvení, které se vytvoří po zastavení reakce, se měří readerem mikrotitračních destiček s filtrem 450 nm nebo s filtry 450 nm a 620 nm. Výsledky mohou být určeny buď kvalitativně, nebo semikvantitativně.

Materiály dodávané v soupravě

- **Mikrotitrační destička** [12X8] odlamovacích proužků s jamkami, předem pokrytých denaturalizovanou DNA.
- **Reagens 1:** Koncentrát roztoku pro ředění vzorků, 15násobná koncentrace, obsah 15 ml, barva modrá.
- **Reagens 2:** Koncentrát promývacího pufru, 15násobná koncentrace, obsah 75 ml.
- **Reagens 3:** Enzymatický konjugát (roztok POD-anti-IgG), obsah 12 ml, barva červená, připraveno k okamžitému použití.
- **Reagens 4:** TMB substrát, obsah 12 ml, připraveno k okamžitému použití.
- **Reagens 5:** Stop-roztok, obsah 12 ml, připraveno k okamžitému použití.
- **Standardy:** 0, 50, 100, 200 a 400 ml, po 1 ml, barva modrá, připraveno k okamžitému použití.
- **Pozitivní kontrolní vzorek:** 1 ml, barva zelená, připraveno k okamžitému použití.
- **Inkubační sáček**
- **Návod k použití soupravy**

Další potřebné zařízení

Zkumavky pro ředění vzorků, pipety na dávkování 10 µl a 100µl, vícekanálová pipeta na 100 µl, čtečka (reader) mikrotitračních destiček s filtry 450 nm a 620 nm, zařízení na promývání mikrotitračních destiček, destilovaná nebo deionizovaná voda, běžné laboratorní zařízení.

Skladování a bezpečnostní opatření

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Po otevření je souprava stabilní po dobu tří měsíců (nebo do vypršení data expirace, pokud k němu dojde dříve než za tři měsíce). Nepoužité proužky je nutno chránit před vlhkem. Tuto sadu nepoužívejte po vypršení expirační lhůty.

Použitá ss-DNA není infekční. Kalibrátory testu jsou vyrobeny ze zředěného neinfekčního lidského séra. Dodržujte normální laboratorní bezpečnostní opatření. Při práci s výrobky na bázi lidského séra by laboranti by měli mít rukavice a ochranný pracovní oděv.

Stop-roztok obsahuje 0,25molární kyselinu sírovou.

Vzorky

Vzorky séra nebo plasmy se mohou dlouhodobě používat pokud jsou skladovány při teplotě -20 °C. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testu.

Metoda

Před zahájením práce ponechte všechny materiály dosáhnout pokojovou teplotu.

Rozředte promývací pufr (**Reagens 2**) destilovanou vodou v poměru 1 : 15, abyste měli dost pufru na provedení celého testu. Zředěný promývací pufr je při teplotě 2 – 8 °C stabilní po dobu dvou měsíců.

Koncentrovaný promývací pufr je při skladovací teplotě 2 – 8 °C stabilní do data expirace soupravy.

Seřadte proužky v počtu potřebném pro provedení testu. Testy standardů se doporučuje provádět duplikovaně. Testování vlastních vzorků se může provádět po jednom nebo také duplikovaně.

Rozředěním roztoku pro ředění vzorku (**Reagens 1**) destilovanou vodou v poměru 1 : 15 si připravte pracovní koncentraci ředícího roztoku. Roztok pro ředění vzorků má modré značení a je stabilní po dobu dvou měsíců.

Vzorky se musí před testem rozředit pufrům v poměru 1 : 100 (např. 10 µl séra plus 1 ml ředícího roztoku).

Je důležité dávkovat do jamek všechny vzorky a standardy bez prodlev. Přesvědčte se, že všechny vzorky jsou správně připraveny k dávkování. Pomalé dávkování nebo přestávky v dávkování mohou způsobit zkeslení výsledků testu.

Dávkujte 100 µl každého standardu a každého testovaného vzorku do jamek. Proužky umístěte do inkubačního sáčku a inkubujte je při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Během inkubace nevystavujte jamky přímému slunečnímu světlu ani zdroji tepla.

Po 20 minutách odsajte obsah jamek a třikrát je promyjte. Pečlivé promytí je klíčem k dobrým výsledkům. Nechte mikrotitrační destičku okapat na savý papír, ale nenechávejte jamky vyschnout. Okamžitě přidejte konjugát.

Postup pro ruční promývání:

Jamky vyprázdněte tak, že destičku obrátíte. Pomocí vícekanálové pipety nebo promývací láhve naplňte každou

jamku 350 ml promývacího pufru. Opět jamky vyprázdněte obrácením destičky, a osušte je savým papírem. Tento proces opakujte ještě dvakrát.

Do každé jamky dávkujte 100 µl enzymatického konjugátu (**Reagens 3**).

Pipety použité pro dávkování konjugátu ukládejte odděleně od TBM substrátu

Inkubujte destičku v inkubačním sáčku při pokojové teplotě po dobu **20 minut**.

Po 20 minutách inkubace odsajte obsah jamek, a pečlivě je promyjte promývacím pufrům. Promývání opakujte ještě třikrát. Dbejte na to, aby byly všechny jamky zcela promyté. Nechejte destičku okapat na savý papír, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.

Nenechávejte jamky vyschnout. Pomocí vícekanálové pipety rychle do každé jamky dávkujte 100 µl TMB Substrátu (**Reagens 4**).

Inkubujte destičku po dobu 10 minut, pak 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.

Do limitu 10 minut odečtěte optickou hustotu (OD) každé jamky fotometrem mikrotitračních destiček s filtrem 450 nm (450/620 nm pro duální vlnovou délku). Žluté zbarvení je stabilní až jednu hodinu, pokud je destička uložena v temnu.

Výpočet výsledků

Kvalitativní výsledky

Porovnejte optickou hustotu vzorků se standardem 50 U/ml. Vzorky s hodnotami nižšími než hodnota OD tohoto standardu jsou negativní. Naopak, vzorky s hodnotou OD vyšší než hodnota OD tohoto standardu jsou pozitivní.

Kvantitativní výsledky

Nakreslete graf optické hustoty každého standardu v závislosti na jeho koncentraci. Body spojte křivkou. Podle této křivky určete neznámé hodnoty vzorků.

Referenční rozpětí

U zdravých kontrolních jedinců bylo zjištěno, že hladina koncentrace jejich protilátek vytvořených proti ss-DNA je nižší než 50 U/ml. Každá laboratoř by si však měla určit své vlastní rozpětí.

Vzorky s hodnotami nad 400 U/ml by měly být otestovány znovu s použitím vyššího ředění.

Interpretace výsledků

Výsledky je nutno interpretovat společně s dalšími klinickými informacemi o konkrétním pacientovi.

Zabezpečení jakosti

Očekávané hodnoty pozitivního kontrolního vzorku jsou uvedeny na certifikátu zabezpečení jakosti, který je přiložen k soupravě.

Parametry testu

Přesnost v rámci sady

Střední U/ml	SD	n	CV%
25,3	1,1	12	4,3
68,4	6,6	12	9,6

Citlivost testu

Vypočtena z odchylek pro nulový standard = 1,1 U/ml

Typická křivka pro Standard

Standard	Optická hustota
0,0	0,011
50,0	0,441
100,0	0,666
200,0	0,980
400,0	1,261

Tato data slouží pouze pro ilustraci a neměla by se používat pro hodnocení výsledků testu. Pro každou dávku vzorku se musí vypracovat nová standardní křivka.

Doporučená literatura

Ishenberg, 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)

Shrnutí metody

- Zředte sérum ředicím roztokem (**Reagens 1**) v poměru 1:100.
- Do jamek dávkujte po 100 µl každého standardu a zředěných vzorků.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **20 minut**.
- *Třikrát promyjte jamky.*
- Do každé jamky dávkujte 100 µl enzymatického konjugátu (**Reagens 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **20 minut**.
- *Čtyřikrát promyjte jamky.*
- Do každé jamky dávkujte 100 µl TMB Substrátu (**Reagens 4**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **10 minut**.
- Do každé jamky dávkujte 100 µl stop-roztoku (**Reagens 5**).
- Do 10 minut změřte optickou hustotu s použitím filtru 450 nm nebo s použitím filtrů 450 a 620 nm.



Výrobce:

Genesis Diagnostics Ltd.

Eden Research Park, Henry Crabb Road,
Littleport,
Cambridgeshire, CB6 1SE, United Kingdom
Tel 01353 862220 Fax 01353 863330
Email: genesis@elisa.co.uk

Distributor: LABOSERV, s.r.o.

Hudcova 78b, 612 00 Brno
Tel. 05/41243113, Fax 05/ 41243114
e-mail laboserv@laboserv.cz