



KÓD 44705	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagenty pro stanovení anti-dsDNA protilátek Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

ANTI-dsDNA PROTILÁTKY

ELISA
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

PRINCIP METODY

Anti-dsDNA protilátky ze séra se váží na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (imunoglobulin proti lidskému IgG značený křenuvou peroxidázou) s protilátkami navázanými na povrchu jamky. Nakonec se přidává 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) s H₂O₂ do každé jamky jako enzymový substrát. Vzniklá enzymatická barevná reakce je zastavena kyselinou. Žluté zbarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci protilátek ve vzorku¹.

OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Tris 1,6 mol/L, neiontový detergent 22 g/L, azid sodný 15 mmol/L, pH 7,4.
- B. Ředící roztok** 100 mL. Fosfátový pufr 0,1 mol/L, chlorid sodný 10 mmol/L, hovězí albumin 40 g/L, neiontový detergent 5 g/L, azid sodný 15 mmol/L, pH 7,4. Modře zbarvený roztok.
- C+. Pozitivní kontrola.** 1 mL. Ready to use. Sérum s anti-dsDNA protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 2 mL. Lidské sérum bez anti-dsDNA protilátek, azid sodný 15 mmol/L.
- D. Konjugát.** 12 mL. Křenuvou peroxidázou značené imunoglobuliny proti lidskému IgG. Žlutě zbarvený roztok.
- E. Substrát.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB).
- F. Zastavovací roztok.** 15 mL. Kyselina sírová 0,5 mol/L.
- 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 rozslamovatelných jamkách s dsDNA.
- S1-S6. Anti-dsDNA standardy,** kalibrované proti WHO mezinárodnímu standardu WO/80. Každý po 1 mL. Ready to use. Anti-dsDNA lidské sérum, azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace Anti-dsDNA protilátek jsou: 0, 25, 50, 100, 200 a 300 IU/mL, jak je uvedeno na štítku lahviček.
- Pro další varování a doporučení – viz Karta bezpečnostních údajů (SDS).*
Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a sledována negativně na přítomnost protilátek proti-HIV a proti-HCV, a stejně tak na HBs antigen. Nicméně zacházejte s kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-8°C.
Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

Známky zhoršení kvality:

- Kapalné 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 promývacího reagentu. Roztok je stabilní 7 dnů při 2-8°C.
Ostatní činidla jsou ready to use.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- zvlhčovací komůrka
- promývací zařízení pro mikrotitrační destičky

M44705i-18
05/2019

- reader nebo fotometr s mikrokyvetou a filtrem 450± 10 nm.

VZORKY

Sérum, plasma odebraná standardním způsobem. Stabilita 1 týden při 2-8°C.

Vzorek před testováním zředte 1/100 ředícím pufr (B).

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu.
2. Otevřete balíček s mikrotitračními destičkami a vyjměte požadované množství pro stanovení (Poznámka 2).
3. **Rozhodnutí:**
 - **Kvantitativní stanovení:** Pipetujte po 100 µL každého standardu (S1-S6), pozitivní kontroly (C+), negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do jednotlivých jamek.
 - **Kvalitativní stanovení:** Pipetujte 100 µL negativní kontroly (C-), pozitivní kontroly (C+) a zředěného vzorku do jednotlivých 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 promyjte je 4-krát s 300 µL promývacího pufru vždy po dobu nejméně 10 sekund (Poznámka 3 a 4).
6. Pipetujte do všech jamek 100 µL konjugátu (D).
7. Inkubujte stripy podle odstavce č. 4.
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. (Poznámka 4).
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 absorbanční hodnoty pro každý standard proti koncentraci anti-dsDNA protilátek (IU/mL). Koncentrace anti-dsDNA protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce (doporučená křivka: 4-parametrická logistická, cubic spline, jednostranná hyperbola).

Kvalitativní stanovení: Vypočtete absorbanci Cut-off následovně:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ Pozitivní kontrola} \times 0,58$$

Hodnota faktoru (F) je uvedena na etiketě pozitivní kontroly.

Vypočtete absorbanční poměr:

$$\text{Absorbanční poměr} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ Vzorku}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off}}$$

Když jsou hodnoty absorbance vyšší než je horní měřicí limit readeru, vzorky naředte reagentem (B) a stanovení opakujte.

REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, s koncentrací vyšší než 55 IU/mL, nebo které mají vyšší absorbanční poměr než 1,1 jsou považovány za pozitivní.
Vzorky, s koncentrací nižší než 45 IU/mL, nebo které mají nižší absorbanční poměr než 0,9 jsou považovány za negativní.
Vzorky, s koncentrací mezi 45 až 55 IU/mL, nebo které mají absorbanční poměr mezi 0,9 až 1,1 jsou považovány za nejasné a



ANTI-dsDNA PROTILÁTKY



KÓD 44705	96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C	
Reagenty pro stanovení anti-dsDNA protilátek Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.	

ANTI-dsDNA PROTILÁTKY

ELISA
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

doporučuje se opakování analýzy. Zvažte jiné testování pro diferenciální diagnózu.
Uvedené hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí.

KONTROLA KVALITY

Koncentrace pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí mezi 80 a 120 IU/mL, a pro negativní kontrolu (C-) by měla být nižší než 45 IU/mL.

Absorbanční poměr pro pozitivní kontrolu (C+) by měl být vyšší než 1,1 a pro negativní kontrolu (C-) by měl být nižší než 0,9.

Každá laboratoř by si měla stanovit svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

Koncentrace (střední)	CV	n
86 IU/mL	3,2 %	25
124 IU/mL	7,0 %	25

- Reprodukovatelnost (run to run):

Koncentrace (střední)	CV	n
86 IU/mL	4,3 %	25
124 IU/mL	14,6 %	25

- Detekční limit: 1,0 IU/mL
- Rozsah měření: 1–300 IU/mL. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředit vzorek ředícím pufrům (B) a zopakujte stanovení.
- Správnost: Výsledky získané touto soupravou nevykazovaly systematické rozdíly při porovnání s referenčními činidly. Podrobnosti o porovnávací zkoušce jsou k dispozici na vyžádání.
- Interference: Hemoglobin nad 500mg/dL, triglyceridy nad 1625mg/dL, bilirubin nad 30mg/dL a revmatoidní faktor nad 300 IU/mL neinterferuje.
- Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat³.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Imunoenzymatický test (ELISA) pro anti-dsDNA protilátky má pro Systémový Lupus Erythematosus specifitu 98-100 % a senzitivitu 40-60 %⁴. Tyto protilátky jsou zvláště důležité v průběhu onemocnění a předpokládá se, že se podílí i na přidružených onemocněních ledvin⁵.

Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKA

1. Nezaměňujte komponenty soupravy z různých šarží.
2. Skladujte nepoužité jamky v plastickém sáčku a uzavřete je společně s vysoušecím sáčkem.
3. Nepoškodte 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. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, Maini RN, Aarden LA. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. Ann Rheum Dis 1988;47:740-746
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000
4. Swaak AJG, Smeenk R.JT. Clinical aspects of antibodies to double-stranded DNA. En: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996
5. Smeenk R.JT, Berden JHM, Swaak AJG. dsDNA antibodies. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 4.6.2019

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.

Český návod je k dispozici na: www.jktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivaticová 421/5, 150 21 Praha5,

tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava,

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 informačné centrum Bratislava, 833 05,

Limbová 5, tel.: +421 254 774 166