



## ANTI – dsDNA PROTILÁTKY (Anti -dsDNA)



Kód 44705	96 test	<b>ANTI – dsDNA protilátky</b>
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie anti-dsDNA protilátok . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		
		<b>ELISA</b> Mikrotitračné doštičky

### PRINCÍP METÓDY

Protilátky proti dsDNA zo séra sa viažu na antigén naviazaný na povrchu mikrotitračných doštičiek. V priebehu druhej inkubácie sa viaže konjugát (imunoglobulín proti ľudskému IgG značený chrenovou peroxidázou) s protilátkami na povrchu jamky. Nakoniec sa pridá do každej jamky 3.3',5.5' – tetrametylbenzidín (TMB) s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ako enzymový substrát. Dochádza k enzymatickej farebnej reakcii, ktorá je zastavená kyselinou. Absorbancia vzniknutého žltého komplexu sa meria pri 450nm, pričom hodnota absorbancie je úmerná koncentrácii protilátok vo vzorke.

### OBSAH A ZLOŽENIE

- A. Koncentrovaný premývací roztok.** 50 mL. Tris 1,6mol/L, neiónový detergent, 22g/L, azid sodný 15mmol/L, pH 7,4.
- B. Riediaci roztok.** 100 mL. Fosfátový pufer 0,1mo/L, chlorid sodný 10mmol/L, hovädzí albumín 40g/L, neiónový detergent 5g/L, azid sodný 15mmol/L, pH 7,4.  
Farba roztoku : modrá.
- C+. Pozitívna kontrola.** 1mL. Pripravené k priamemu použitiu. Sérum s anti- ds DNA protilátkami, azid sodný 15mmol/L.
- C-. Negatívna kontrola.** 2mL. Ľudské sérum bez anti -dsDNA protilátok, azid sodný 15mmol/L.
- D. Konjugát.** 12mL. Imunoglobulín proti ľudskému IgG značený chrenovou peroxidázou. Žltý roztok.
- E. Substrát.** 12mL. 3.3',5.5' – tetrametylbenzidín (TMB)
- F. Zastavovací roztok.** 15mL. Kyselina sírová 0,5mmol/L.  
Výstraha :  
H314 – Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.  
Upozornenie :  
P280 – Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ ochranné okuliare/štit na tvár  
P303 + P361+ P353 - Pri styku s kožou (alebo vlasami) :  
Všetky kontaminované časti odevu okamžite vyzlečte.  
Kožu opláchnite vodou /osprchujte.
- M. Mikrotitračné doštičky.** 12 modulov po 8 odlamovateľných jamkách s naviazanou dsDNA.
- S1 – S6. Štandardy.** Kalibrované oproti WHO Medzinárodnému Štandardu Wo/80. Každý po 1 mL. Pripravené k priamemu použitiu. Sérum s anti- dsDNA protilátkami, azid sodný 15mmol/L. Koncentrácie anti -dsDNA protilátok sú 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 a 300 IU/ml a sú uvedené na štítku fľaštičky.

Pre ďalšie výstrahy a upozornenia viď bezpečnostný list. Ľudské séra použité pri príprave pozitívnej a negatívnej kontroly boli testované s negatívnym výsledkom na protilátky proti HIV a HCV a rovnako na HBs antigén. I napriek tomu zaobchádzajte s kontrolami ako s potencióálne infekčným materiálom.

### SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 8°C.  
Reagencie sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu ich používania.

### Príznačky zhoršenia kvality :

- Kvapalné reagencie : Prítomnosť zrazeniny, zákalu
- Mikrotitračné doštičky : natrhnutie sáčku, makroskopické defekty, ako je poškrabanie dna jamiek.

### PRÍPRAVA REAGENCIÍ

**Premývací pufer :** Zriedte koncentrovaný premývací pufer (A) destilovanou vodou v pomere 1/20. Riadne premiešajte. Pre 1 strip sa spotrebuje približne 50 mL premývacieho reagentu. Roztok je stabilný 7 dní pri 2 – 8°C. Ostatné činidlá sú pripravené k priamemu použitiu.

### PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- zvlhčovacia komôrka
- premývacie zariadenie pre mikrotitračné doštičky
- reader mikrotitračných doštičiek alebo fotometer s mikrokyvetou a filtrom 450 ±10nm.

### VZORKY

Sérum alebo plazma odobraná štandardným spôsobom. Štabilita – 1 týždeň pri 2 – 8°C. Vzorku pred testovaním zriedte v pomere 1/100 riediacim puferom (B).

### POSTUP

1. Vytemperujte všetky činidlá na izbovú teplotu. (Poznámka 1)
2. Otvorte balíček s mikrotitračnými doštičkami a vyberte množstvo potrebné pre stanovenie. (Poznámka 2).
3. **Postup práce :**
  - **Kvantitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100µL každého štandardu (S1-S6), pozitívnej kontroly (C+), negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek.
  - **Kvalitatívne stanovenie :** Pipetujte po 100 µL pozitívnej kontroly (C+), negatívnej kontroly (C-) a zriedenej vzorky do jednotlivých (odlišných) jamiek. Ako blank použite 100µL riediaceho roztoku(B).
4. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote.
5. Odsajte obsahy jamiek a premyte ich premývacím puferom 4 x po 300 µL . Doba premývania – minimálne 10 sekúnd. (Poznámka 3 a 4).
6. Do všetkých jamiek pipetujte 100µL konjugátu (D).
7. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote ako pri kroku 4.
8. Jamky premyte podľa bodu 5.
9. Do všetkých jamiek pipetujte 100µL substrátu (E).
10. Stripy umiestnite do zvlhčovacej komôrky a inkubujte ich 15 minút pri izbovej teplote.
11. Do všetkých jamiek pipetujte 100µL zastavovacieho roztoku (F). (Poznámka5).
12. Odčítajte hodnotu absorbancie jednotlivých jamiek pri 450 nm pri použití štandardu S1 , alebo jamky s blankom pre vynulovanie prístroja. Farba je stabilná najmenej 30minút.

### VÝPOČET

- **Kvantitatívne stanovenie :** Na kalibračnú krivku vyznačte hodnoty absorbancie každého štandardu oproti koncentrácii



## ANTI – dsDNA PROTILÁTKY (Anti -dsDNA)



Kód 44705	96 test	<b>ANTI – dsDNA protilátky</b>
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagenty pre stanovenie anti-dsDNA protilátok . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		
		<b>ELISA</b> Mikrotitračné doštičky

anti-dsDNA protilátok ( U/mL). Koncentrácia anti-dsDNA protilátok prítomných vo vzorke sa vypočíta interpoláciou absorbancie na kalibračnej krivke ( odporúča sa použiť 4-parametrickú, logistickú, kubic spline, jednostrannú hyperbolu).

• **Kvalitatívne stanovenie** : absorbanciu cut-off vypočítajte nasledovne :

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

Vypočítajte absorbančný pomer :

$$\text{absorbančný pomer} = \frac{A_{\text{vzorky } 450nm}}{A_{\text{cut-off } 450nm}}$$

Ak sú hodnoty absorbancií vyššie ako horný limit merania readeru , nariedte vzorky reagentom (B) a stanovenie opakujte.

### REFERENČNÉ HODNOTY

Za pozitívne sú považované vzorky s koncentráciou vyššou ako 55 IU/mL, alebo ak je ich absorbančný pomer vyšší ako 1,1. Za negatívne sú považované vzorky s koncentráciou nižšou ako 45 IU/mL, alebo ak je ich absorbančný pomer nižší ako 0,9. Ak je koncentrácia v rozmedzí 45 – 55 IU/mL, alebo absorbančný pomer je v rozmedzí 0,9 – 1,1 , výsledok stanovenia sa považuje za nejasný a odporúča sa opakovanie analýzy a zväzanie ďalších testov pre diferenciálnu diagnostiku. Uvedené hodnoty sú orientačné, preto by si malo každé laboratórium stanoviť svoje vlastné rozmedzia.

### KONTROLA KVALITY

Koncentrácia pozitívnej kontroly (C+) by mala byť v rozmedzí medzi 80 až 120 IU/mL.

Koncentrácia negatívnej kontroly (C-) by mala byť nižšia ako 45 IU/mL.

Absorbančný pomer pre pozitívnu kontrolu (C+) by mal byť vyšší ako 1,1 a absorbančný pomer pre negatívnu kontrolu (C-) by mal byť nižší ako 0,9.

Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre nápravu pre prípad, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

### METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

• opakovateľnosť ( jednej vzorky) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
86 IU/ml	3,2%	25
124 IU/ml	7,0%	25

• reprodukovateľnosť ( run to run) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
86 IU/ml	4,3%	25
124 IU/ml	14,6%	25

- detekčný limit : 1,0 IU/mL
- správnosť : výsledky získané touto súpravou pri porovnaní s referenčnými činidlami nevykazovali systematické rozdiely. Podrobnosti o porovnávačej skúške sú k dispozícii na vyžiadanie .
- interferencie : hemoglobín do 500mg/LI, bilirubín do 30mg/dL, triglyceridy do 1625mg/dL a RF do 300IU/mL neinterferujú. Niektoré druhy liekov a ďalších látok môžu interferovať.<sup>3</sup>  
Rozsah merania : 1 – 300 U/mL. Ak získate výsledky s vyššou hodnotou, zriedte vzorku riediacim pufrom (B) a stanovenie opakujte.

### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovenie metódou Elisa pre anti-dsDNA protilátky má pre Systémový Lupus Erythematosus špecifitu 98-100% a senzitivitu 40 – 60%. Tieto protilátky sú zvlášť dôležité v priebehu ochorenia a predpokladá sa, že sa podieľajú i na pridružených ochoreniach obličiek.<sup>5</sup> Klinická diagnóza by nemala byť stanovená len na základe výsledku jediného testu, je potrebné zhodnotiť klinické i ďalšie laboratórne údaje.

### POZNÁMKY

1. Nezamieňajte jednotlivé reagenty z rôznych súprav.
2. Nepoužité jamky skladujte v plastikovom sáčku s exsikatorom.
3. Nepoškodte vnútorný povrch mikrotitračných doštičiek.
4. Premývaci roztok by mal byť z jamiek celkom odstránený.
5. Zastavovací roztok enzýmovej reakcie (F) musí byť pipetovaný do jamiek približne v rovnakom časovom odstupe ako substrát (E) v bode 9 Postupu práce.

### LITERATÚRA

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 RJT. 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 RJT, Berden JHM, Swaak AJG. dsDNA antibodies. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996

### UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 5.6.2019.  
Vzhľadom k možnej inovácii výrobu sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej



## ANTI – dsDNA PROTILÁTKY (Anti -dsDNA)



Kód 44705      96 test	<b>ANTI – dsDNA protilátky</b>  ELISA Mikrotitračné doštičky
Skladovanie pri 2 - 8°C	
Reagenty pre stanovenie anti-dsDNA protilátok . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

adrese [www.biosystems.es](http://www.biosystems.es)

Slovenský návod je k dispozícii na [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz).

### Výhradný distribútor:

**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 prípade mimoriadnych udalostí:

**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

### VÝROBCA

**BioSystems S.A.** Costa Brava 30, Barcelona (Spain)  
ISO 13485 - TÜV Rheinland - Reg.: SX 60010383 0001