MASTAZYME™ dsDNA

Enzymatická imunoesej pro kvantitativní a kvalitativní stanovení autoprotilátek proti dvouvláknové DNA (dsDNA) v séru a plasmě

Návod k použití

Pouze pro *in vitro* diagnostiku

Test	Kód	Kit pro
MASTAZYME™ dsDNA	732020	12 x 8 testů

Skladujte při 2 – 8 ˚C

Obsah	Strana
1. Použití	3
2. Úvod	3
3. Princip testu	4
4. Součásti soupravy	5
5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy	5
6. Upozornění a zvláštní opatření	6
7. Uchovávání a trvanlivost reagencií	6
8. Odběr vzorku a manipulace	6
9. Pracovní postup	7
10. Výsledky a interpretace	8
11. Charakteristika testu	9
12. Literatura	9

1. Použití

Souprava MASTAZYME™ dsDNA je určena pro detekci specifických protilátek proti dsDNA.

Tento test je určen pouze pro použití *in vitro*.

Všechny výsledky testu musí být interpretovány v souvislosti s ostatními klinickými ukazateli. Pro správnou klinickou interpretaci musí být vzaty v úvahu i výsledky dalších laboratorních testů.

2. Úvod

Dvouvláknová DNA (dsDNA) a jednovláknová DNA (ssDNA)

Antigen

Protilátky namířené proti molekulám dvouvláknové DNA se mohou vázat i k jednovláknové DNA a RNA. Většina ANA pozitivních protilátek vedoucích k homogenním nálezům v imunofluorescenčních testech jsou protilátky dsDNA specifické. Některé z nich jsou specifické pouze pro DNA vazebné proteiny. Molekulární struktura DNA umožňuje vazbu třech skupin autoprotilátek: protilátek namířených proti fosforibosovým řetězcům, protilátek proti purinovým a/nebo pyrimidinovým bázím a protilátek specifických pro příslušné konformační epitopy molekul. Ačkoliv se molekulární komponenty DNA v prokaryotických a eukaryotických buňkách neliší, lidské anti-dsDNA protilátky se k DNA molekulám různých druhů neváží se stejnou specificitou a senzitivitou.

Afinita a avidita protilátek, namířených proti cukerným fosfátům, sloužícím jako páteřní struktury DNA, je vysoce závislá na negativně nabitých součástech fosfodiesterového řetězce. Proto se ostatní autoprotilátky, schopné rozpoznávat fosfolipidy (např. kardiolipin) a chemické vazby fosfodiesterového původu, také váží k dsDNA a ssDNA. Anti-EBV protilátky typu EBNA-1 taktéž vykazují silně zkříženou reaktivitu ve všech dsDNA a ssDNA ELISA testech. Purinové a pyrimidinové báze tvoří vnitřní část nativní DNA molekuly. Specifické autoprotilátky mají možnost přístupu a následně možnost vazby na tyto purinové a pyrimidinové báze pouze po rozložení nativní DNA na její jednovláknové molekuly. Autoprotilátky namířené proti adenosinu, guanosinu, cytosinu a tymidinu se váží pouze k ssDNA antigenům! GC (guanosin, cytosin) bohaté epitopy v ssDNA jsou rozpoznávány anti-ssDNA protilátkami s poměrně vyšší senzitivitou. Ve snaze zabránění vzniku nespecifických zkřížených reaktivit jsou dsDNA molekuly, adsorbované na pevné fázi MASTAZYME™ dsDNA testu, bez obsahu ssDNA epitopů!

V rozporu s anti-ssDNA vazebnými aktivitami, je helikální struktura dsDNA antigenu, stejně tak jako negativně nabité součásti molekuly, zásadní pro specifickou vazbu anti-dsDNA protilátek.

Klinický význam

Anti-dsDNA protilátky jsou vysoce specifické pro systémový lupus erythematodes. Protilátkové titry dobře korelují s aktivitou onemocnění např. i u případů lupus nephritis. Vzestup v titrech protilátek naznačuje progresi onemocnění. Diagnostika vysoce aviditních IgG protilátek je více prediktivní pro postup SLE onemocnění, než diagnostika IgM protilátek. Anti-dsDNA protilátky třídy IgM jsou přítomny i v populaci zdravých osob. Intenzivní monitorování anti-dsDNA pozitivních pacientů je doporučováno z důvodu včasného detekování vzestupu protilátkových titrů a následného započetí léčby v co nejkratším čase. Vzestup titru anti-dsDNA autoprotilátek může být detekován přibližně 10 týdnů před výskytem klinických příznaků.

V případech, které zjevně nesouvisejí s autoimunitní patogenezí, jsou exprimovány anti-ssDNA autoprotilátky, které dobře korelují s koincidencí aktivity onemocnění a klinickými symptomy. V rámci diagnostiky SLE se autoprotilátky anti-ssDNA vyznačují nízkou specificitou, a to asi jen u 40% pacientů. Mimoto, v případech chronických onemocnění jater, např. autoimunitní hepatitida (AIH) a chronická biliární cirhóza, jsou detekovány anti-ssDNA titry v hodnotách, které převyšují hodnoty statisticky normální. Anti-ssDNA autoprotilátky jsou přítomny v séru pacientů, kteří trpí ostatními

jaterními onemocněními, která nejsou přímo asociována s autoimunitní patogenezí. Anti-ssDNA autoprotilátky jsou také přítomny u metabolických onemocnění, která mají sklon k vývoji vaskulárních problémů.

Diagnostika anti-dsDNA a anti-ssDNA autoprotilátek je obecně doporučena

- v případech, kdy vzorky pacientů reagují homogenně v jádrech HEp-2 buněk nebo v jádrech buněk jaterních tkáňových řezů
- v případech, kdy klinické údaje poukazují na SLE symptomy
- v případech, kdy klinické údaje poukazují na léky vyvolanou formu SLE (je též doporučeno stanovení anti-histonových autoprotilátek).

3. Princip testu

Princip testu může být popsán ve čtyřech fázích.

3.1 Inkubace séra

Specifické protilátky se váží k antigenům, které jsou na pevné fázi, a tím vzniká stabilní imunokomplex. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě jsou jamky promyty předem zředěným promývacím pufrem, čímž se odstraní všechny nereaktivní komponenty v séru.

3.2 Inkubace s konjugátem

Anti-lidský–IgG konjugát s křenovou peroxidázou je přidán do každé jamky. Konjugát se váže k protilátkám IgG (respektive k antigenu na pevné fázi) a vytváří se tak stabilní „sandwich˝. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě je přebytečný konjugát odstraněn promytím každé jamky promývacím pufrem.

3.3 Reakce se substrátem a její zastavení

Do každé jamky je přidán TMB substrát a v reakci mezi ním a enzymem peroxidázou vznikne stabilní modrý chromogen. Reakce s následnou tvorbou zabarvení je zastavena po 15-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě přidáním 1 M H_2SO_4 do jamek. Změna pH způsobí, že se modrá barva chromogenu změní na žlutou.

3.4 Vyhodnocení a interpretace

Intenzita zbarvení je vyhodnocena v readeru při 450 nm (doporučená referenční vlnová délka pro bichromatické měření: 600 – 690 nm). Intenzita zbarvení (OD) je přímo úměrná koncentraci specifických protilátek v séru pacienta.

4. Součásti soupravy

Souprava se skládá z reagencií pro 12 x 8 = 96 stanovení. Mikrotitrační destičky a roztoky musí být skladovány při teplotě 2 – 8 ˚C. Datum expirace je uvedeno na štítku.

12 stripů Mikrotitrační stripy jednotlivé stripy obsahují 8 odlamovatelných jamek s navázaným purifikovaným plazminem dsDNA

1 x Držák (rámeček)

6 x 1,5 mL Kalibrátory 1 - 6 lidská plazma s obsahem protilátek proti dsDNA, naředěná v pufru, připravena k použití

	Koncentrace anti-dsDNA protilátek [IU/mL] podle WO/80
Kalibrátor 1	1
Kalibrátor 2	15
Kalibrátor 3 (Cut-off)	25
Kalibrátor 4	50
Kalibrátor 5	100
Kalibrátor 6	200

1 x 150 µL Pozitivní kontrola lidská plazma s obsahem protilátek proti dsDNA, naředit v poměru 1:101

1 x 150 µL Negativní kontrola lidská plazma bez obsahu protilátek proti dsDNA, naředit v poměru 1:101

2 x 60 mL Roztok k ředění vzorků roztok PBS s obsahem konzervantu, připraven k použití

1 x 12 mL Roztok konjugátu roztok křenovou peroxidázou značené kozí anti-lidské IgG protilátky, připraven k použití

1 x 12 mL TMB substrát 3,3´,5,5´ Tetramethylbenzidin, připraven k použití

1 x 12 mL Stop roztok 1 M kyselina sírová, připraven k použití

2 x 50 mL Promývací pufr roztok PBS/Tween pufrů 10x koncentrovaný, naředit 1:10 před použitím, koncentrát může být zahřát až do 37˚C po dobu 15 min. k zabránění vzniku krystalů

5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- 5 µL-, 100 µL- a 500 µL mikro- a multikanálové pipety
- ELISA reader se 450 nm filtrem (referenční filtr 600 – 690 nm)
- Promývač mikrotitračních destiček (v případě manuálního promývání: promývací lahev)
- Zkumavky na ředění sér pacientů
- Odměrný válec
- Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality

6. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku! Zabraňte požití či spolknutí! Při práci dodržujte laboratorní bezpečnostní opatření. V laboratoři nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Séra, plasmy a pufry této soupravy byly testovány všeobecně uznávanými metodami a jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV. Nicméně z preventivních důvodů je nutné při práci používat ochranné latexové rukavice.
- Skvrny způsobené séry či reagenciemi musí být důkladně odstraněny za použití desinfekčních roztoků (např. 5% chlornan sodný).
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagencie vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24˚C).
- Před použitím je nutné reagencie důkladně, ale jemně promíchat např. krouživými pohyby. Vyhněte se třepání, které vede k následné tvorbě pěny.
- Aby byly zajištěny stejné podmínky testu ve všech jamkách mikrotitrační destičky, je nutné pipetovat reagencie ve stejných intervalech.
- Před použitím reagencií se ujistěte, zda není uzávěr či lahvička poškozena a nedošlo tím k možné kontaminaci. Vyvarujte se vzájemného smíchání reagencií. Protože jsou reagencie často citlivé k oxidaci, je nutné nechávat lahvičky s nimi otevřené pouze po krátkou dobu.
- Kvůli zabránění vzniku kontaminace je nutné používat jednorázové, vyměnitelné špičky na pipety.
- Není možné míchat či jinak používat reagencie ze stejných souprav o jiné šarži.
- Reagencie nepoužívejte po datu jejich expirace.
- V souladu se Správnou Laboratorní Praxí (SLP) a ISO 9001 by měly být veškeré laboratorní pomůcky a přístroje používané pro provedení testu prověřeny z hlediska přesnosti. Toto se týká především pipet, promývacích a čtecích zařízení (ELISA readerů).
- Vyhněte se kontaktu určitých reagencií, a to především stop roztoku a substrátu, s pokožkou, očima a sliznicemi. Hrozí zde riziko podráždění, poleptání a intoxikace.

7. Uchovávání a trvanlivost reagencií

Všechny reagencie skladujte při teplotě 2 – 8˚C.

Datum expirace každé reagencie je uvedeno na štítku lahvičky. Reagencie nepoužívejte po datu jejich expirace. Naředěný promývací pufr je stabilní až 4 týdny, pokud je skladován při teplotě 2– 8˚C. Po otevření by měla být souprava spotřebována do 3 měsíců.

8. Odběr vzorku a manipulace

Pro stanovení se používá sérum nebo plasma (EDTA, heparin). Sérum je po vysrážení centrifugací odděleno od krve, která byla asepticky odebrána venepunkcí. Vzorky séra či plasmy se skladují při teplotě 2 – 8˚C po dobu max. 3 dnů. Po delší dobu mohou být vzorky skladovány při teplotě -20˚C.

Po rozmražení vzorky znovu nezmrazujte. Lipemické, hemolytické nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobit falešnou pozitivitu či falešnou negativitu výsledků.

Pacientská séra musí být před testováním předředěna sérum diluentem v poměru 1:101 (např. 5 µL séra + 500 µL sérum diluentu).

9. Pracovní postup

Před provedením testu nařeďte kontroly a vzorky v poměru 1:101 roztokem k ředění vzorků. Například pipetujte 10 µL vzorku do zkumavky s obsahem 1000 µL roztoku k ředění vzorků.
Kontroly nejsou předředěné a musí být před použitím naředěny v poměru 1:101!

9.1 Příprava reagencií

Před použitím nechte všechny součásti soupravy a také vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24˚C), reagencie jemně promíchejte.

Promývací pufr: Rozpusťte krystalky, které se mohou v lahvičce vyskytovat, zahřátím na teplotu 37˚C, a poté jemně promíchejte.

Nařeďte koncentrovaný promývací pufr v poměru 1:10 destilovanou vodou (např. 50 mL koncentrovaného pufru + 450 mL destilované vody). Důkladně promíchejte.

Kontroly: Nařeďte kontroly (1:101) a vzorky roztokem k ředění vzorků (Sample diluentem).

- Pro správné provedení testu je nutné důsledně postupovat podle přiložených instrukcí. Veškeré změny a modifikace jsou v rámci odpovědnosti uživatele.
- Všechny reagencie a vzorky musí být před použitím při pokojové teplotě, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.
- Kalibrační křivka by měla být sestrojena při každém testu.
- Nepoužité mikrotitrační destičky vložte zpět do plastového obalu a uchovávejte je v suchu při teplotě 2 – 8˚C.

9.2 Provedení testu

Připravte si dostatečné množství jamek v mikrotitračních destičkách pro kalibrátory, kontroly a vzorky.

Poznámka: Je možné využít i jiné inkubační podmínky. V případě změn v doporučeném pracovním postupu (např. inkubace při teplotě 37˚C místo pokojové teploty) musí uživatel validovat takovéto provedení testu.

1. Pipetujte 100 µL naředěných vzorků (1:101), kalibrátorů a naředěných (1:101) kontrol do příslušných jamek.
2. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut.
3. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a 3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.

4. Pipetujte 100 µL roztoku HRP konjugátu do každé jamky.
5. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut.
6. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a 3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
7. Pipetujte 100 µL TMB substrátu do každé jamky.
8. Inkubujte po dobu 15 minut ve tmě při pokojové teplotě.
9. Přidejte 100 µL stop roztoku do každé jamky.
10. Po důkladném promíchání a vysušení dna mikrojamek změřte optickou hustotu při 450 nm a vypočítejte výsledky. Blank měřte proti vzduchu. Je doporučeno bichromatické měření za využití referenčních vlnových délek 600 – 690 nm.

    Vytvořené zbarvení je stabilní alespoň 30 minut. Měřte optické hustoty během této doby.

10. Výsledky a interpretace

Kvalitativní hodnocení

Kalibrátor 2 nebo kalibrátor 3 může být použit pro kvalitativní interpretaci analýzy v závislosti na specifických požadavcích, které zahrnují nebo eliminují hraniční výsledky. Kvantitativní interpretace není možná za využití pouze kalibrátorů 2 a 3.

Kvantitativní hodnocení

Kalibrační křivka je vytvořena zanesením středních hodnot absorbancí jednotlivých kalibrátorů na osu Y a jim odpovídající hodnoty koncentrací jsou vyneseny na osu X za využití milimetrového papíru nebo PC. Hodnoty koncentrací kontrol a vzorků mohou být potom odečítány přímo z grafu.

Pro výpočet výsledků lze využít i PC s vhodným softwarovým programem. V tomto případě jsou výsledky vypočítány za využití algoritmu zpracovávajícího 4 vstupní parametry.

Doporučené normální hodnoty

Podle studií provedených na souboru vzorků sér od zdravých dárců a nemocných osob, byla stanovena rozmezí normálních a zvýšených hodnot výsledků.

Negativní < 15 IU/mL

Hraniční 15 – 25 IU/mL

Pozitivní > 25 IU/mL

Doporučení

Každá laboratoř by si měla stanovit svá individuální rozmezí normálních hodnot v závislosti na výsledcích, získaných analýzami vzorků sér od místní populace obyvatel.

Interpretace výsledků

Souprava MASTAZYME™ dsDNA detekuje autoprotilátky zaměřené proti dsDNA. Silně pozitivní vzorky obvykle indikují akutní fázi SLE. Zvýšené hodnoty, získané pouze z jednoho vyšetření, mají nižší diagnostický význam, než výsledky získané při opakovaných analýzách v rámci monitoringu stavu pacienta.

Vazebnost protilátek proti purinovým a pyrimidinovým bázím je potlačena díky helikální struktuře dsDNA antigenu navázaného na pevné fázi. Nicméně, biochemická struktura DNA molekul umožňuje navázání protilátek zaměřených proti fosfodiesterovým a/nebo fosforibosilovým strukturám přítomným v dsDNA antigenu. Výsledky mohou být ovlivněny více faktory. Proto by neměla být klinická diagnóza a prognóza onemocnění založena pouze na jediném výsledku testu. Pro správné určení diagnózy je třeba brát v úvahu i další laboratorní ukazatele a klinické příznaky.

11. Charakteristika testu

Charakteristiky ELISA testů MASTAZYME™ dsDNA byly stanoveny a posouzeny v souladu s Evropskými IVD direktivami. Detailní validační data mohou být poskytnuta na zvláštní přání.

12. Literatura

1. The diagnostic value of antinuclear antibodies. Lukowsky A. et al., Hautarzt 46, 388 – 393, (1995)
2. Autoantibodies, Eds. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996, Elsevier
3. Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies, Eds. K. Conrad, R. L. Humbel, M. Meurer, Y. Shoenfeld, E. M. Tan, 1998, Pabst Science Publishers
4. Autoantikörper, K. Conrad, 1998, Pabst Science Publishers
5. Guidelines for clinical use of the antinuclear antipody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists, Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA, Arch. Pathol. Lab. Med., 124 (1), 71-81 (2000)