

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG, IgM И IgA АНТИТЕЛ К ДВУСПИРАЛЬНОЙ ДНК

### ORG 604S, Anti-dsDNA Screen

Каталог. № : **ORG 604S**  
Количество : **96**  
Производитель: **ORGENTEC**  
**GmbH, (Германия)**

Методика от **08-2012**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

#### НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

Anti-dsDNA является ИФА для количественного определения аутоантител класса IgG, IgM и IgA к двухцепочечной ДНК в сыворотке или плазме человека. Этот продукт предназначен только для профессионального использования в in-Vitro диагностике.

#### ПРИНЦИП ТЕСТА

Человеческая рекомбинантная двуспиральная ДНК привита к микрочайкам. Антитела к этим антигенам, если присутствуют в разбавленной сыворотке, связываются с микрочайками. Промывание микрочайек удаляет несвязанные антитела сыворотки или плазмы. Анти-человеческие IgG, IgM, IgA конъюгированные пероксидазой хрена иммунологически связываются со связанными антителами пациента, формируя конъюгат-антитело-антиген комплекс. Промывание микрочайек удаляет несвязанный конъюгат. Энзимный субстрат при присутствии связанного конъюгата гидролизуется до формирования голубого окраса. Добавления кислоты останавливает реакцию, формируя желтый конечный продукт. Интенсивность этого желтого цвета фотометрически измеряется при 450 нм. Количество цвета прямо пропорционально концентрации IgG, IgM и IgA антител, присутствующих в образце.

#### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Аутоиммунные болезни часто ассоциируются с появлением антител против собственной антигенной структуры - аутоантител. Присутствие аутоантител к нативной Дезоксирибонуклеиновой кислоте (n-DNA, dsDNA двухспиральная DNA) типическая для клинической картины Системной Красной Волчанки (SLE).

Антитела против dsDNA принадлежат к группе антиядерных антител (ANA), которые направлены против различных структур клеточных ядер. Они появляются при разных ревматоидных заболеваниях. Кроме того, ANA антитела другой группы аутоантител, которые представляют интерес, направлены против так называемых экстрагируемых ядерных антител (ENA). Критерии ARA Американской ревматоидной Ассоциации представляют диагностическую схему для диагностики Системной Красной Волчанки (SLE). Диагноз СКВ высокодостоверный при четырех из 11 критериев.

Антитела к dsDNA найдены во время активной фазы SLE, где концентрация сыворотки показывает положительную корреляцию с остротой заболевания. Терапия может быть мониторирована с помощью определения аутоантител. Диагностическая чувствительность определения анти-dsDNA при SLE составляет около 91% с диагностической специфичностью около 96 процентов. Антитела против ДНК может дифференцироваться на две группы:

1. антитела, которые связываются только с природными двуспиральными ДНК (dsDNA)

2. антитела, распознающие также односпиральную ДНК (ssDNA). Измерения антиядерных антител (ANA, или антиядерного фактора (ANF)) непрямым иммунофлюоресценцией – это широко принятый метод скрининга SLE. На некоторых стадиях болезни или при терапии при НИФ иногда можно получить фальшивые результаты, поэтому необходим более специфичный тест. Отрицательный НИФ для ядерных антител не исключает присутствие анти-dsDNA антител, так как антигенные структуры могут маскироваться другой структурой. Кроме того, ANA титры, определенные НИФ тестом, показывают только слабую корреляцию с остротой заболевания.

Большинство антител против dsDNA направлены против фосфатных единиц ДНК. Таким образом, эти аутоантитела связываются также с односпиральными ДНК. Для количественного анализа анти-dsDNA должно быть доказано, что при приговлении антигены не были смешаны с односпиральной ДНК.

Аутоантитела против односпиральной ДНК в основном направлены против базового состава, который в природе ДНК маскируется внутри спиральной структуры. В сыворотке пациентов с SLE анти-ssDNA антитела найдены с частотой более чем 87 процентов во время острой фазы и 43 процента во время неактивной фазы. СКВ-подобные заболевания вызваны некоторыми лекарствами. Для дифференциации медикаментозной KB используется определение анти-ssDNA. При медикаментозной KB анти-ssDNA возрастает в более чем в 50 процентов случаев. Кроме того, рост анти-ssDNA концентрации в сыворотке также отмечено при мононуклеозе, гепатите и различных формах лейкемии.

#### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых рекомбинантом двуспиральной ДНК (dsDNA) – **1 планшет**.
2. Калибраторы A-F анти-dsDNA в сыворотке/буферном матрикс, содержащие 0; 12,5; 25; 50; 100 и 200 Ед/мл – **6 флаконов, 1,5 мл каждый**.
3. Контроли анти-dsDNA в сыворотке/буферном матрикс (положительный и отрицательный), для соответственной концентрации в приложении пакета внутри – **2 флакона, 1,5 мл каждый**.
4. Буфер образцов анти-dsDNA, желтый, **концентрат (5x) - 1 флакон, 15 мл**.
5. Раствор **ферментного конъюгата** (бледно красный), содержащий смесь поликлональных кроличьих анти-человеческих-IgG, анти-человеческих-IgM и анти-человеческих-IgA, меченые пероксидазой хрена - **1 флакон, 15 мл**.
6. Раствор субстрата ТМБ - **1 флакон, 15 мл**.
7. **Стоп раствор** (содержит кислоту) – **1 флакон, 15 мл**.
8. Буферный промывочный раствор, **концентрат - 1 флакон, 20 мл**.
9. Инструкция.
10. Сертификат анализа.

#### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с длиной волны измерения 450 нм;
2. Многоканальный диспенсер или пипетка для дозирования на 100 мкл;
3. Вортекс;
4. Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл;
5. Лабораторное часовое устройство;
6. Программное обеспечение.
7. Дистиллированная вода;
8. Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
9. Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора.

#### СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
2. Дайте возможность крови свернуться и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
4. Образцы должны храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20°C до шести месяцев.
5. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
6. Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

#### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8°C в темноте.
2. Содержит ячейки микроплшета, запечатанные в сухом пакете с осушителем.
3. Срок хранения невскрытых реагентов составляет 18 месяцев. Реагенты стабильны до окончания срока пригодности.
4. Не поддавайте реагенты влиянию жары, солнца или сильного света во время хранения или использования.
5. Разбавленный буфер образцов и моющий буфер стабильны 30 дней при хранении при 2-8°C.

#### ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
2. Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
3. Все материалы следует привести к комнатной температуре.
4. Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализа необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.

- Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
- Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
- Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
- Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
- Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

#### ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В, С и ВИЧ 1 и 2. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте, тем не менее, не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
- Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
- Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Продерживаться установленным правилам для проведения контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контролей и/или объединенной сыворотки. При работе со всеми реагентами, контролями и образцами сыворотки соблюдать существующие правовые нормы.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

##### Приготовление буферного промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

##### Приготовление буфера образцов

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

##### Приготовление образца

Разбавьте образцы пациентов 1:100 буфером для образцов перед анализом. Для этого добавьте до 10 мкл образца 990 мкл буфера для образца в пробирке из полистирола. Тщательно перемешайте. Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

#### МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и разбавленных проб пациентов в дублях.

- Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку. Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (18 - 28 °С). Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
- Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
- Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.

Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.

- Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.

Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Дихроматическое измерение проводите при 600-690 нм. Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

	1	2	3	4	5	6
A	SA	SE	P1	Ps		
B	SA	SE	P1	Ps		
C	SB	SF	P2	P..		
D	SB	SF	P2	P..		
E	SC	C1	P3			
F	SC	C1	P3			
G	SD	C2	P4			
H	SD	C2	P4			

SA-SF стандарты A до F  
P1, P2.. образцы пациентов 1, 2..  
C1: положительный контроль  
C2: отрицательный контроль

#### ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Данный тест пригоден, если ОП при 450 нм для положительного (1) и отрицательного контроля (2) и калибраторов A-F соответствует диапазонам, указанным в сертификате контроля качества, что поставляется вместе с набором. Если критерии не соответствуют, результаты не пригодны, и тест необходимо повторить.

#### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Калибровка

Система анализа калибруется против международного эталонного препарата ВОЗ Wo/80 для человеческих антител к anti-dsDNA IgG со значением 200 МЕд/мл.

##### Диапазон измерения

Диапазон составляет 0- 200 Ед/мл

##### Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение 25 Ед/мл

##### Интерпретация результатов

Отрицательный: < 25 Ед/мл  
Положительный: ≥ 25 Ед/мл

##### Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образца, чтобы продемонстрировать динамический диапазон анализа. Активность для каждого разведения была рассчитана из калибрационной кривой с использованием 4-параметровой системы координат.

Sample	Dilution	Observed U/ml	Expected U/ml	O/E [%]
1	1:100	101.0	101.0	100
.	1:200	49.9	50.5	99
.	1:400	24.9	25.3	99
.	1:800	11.7	12.6	93
2	1:100	137.0	137.0	100
.	1:200	69.1	68.5	101
.	1:400	33.8	34.3	99
.	1:800	16.5	17.1	96

##### Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила: 1 Ед/мл.

##### Воспроизводимость

Внутри тестовая точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов из результатов 24 определений в одном анализе. Результаты для точности в пределах анализа приведены в таблице ниже.

Межсерийная точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов по результатам 6 определений в 5 различных анализах. Результаты для выполнения к запуску точности приведены в таблице ниже.

Intra-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	26.0	3.0
2	68.0	4.1
3	159.0	6.8

Inter-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	27.0	7.7
2	72.0	8.6
3	165.0	8.1

#### Перекрестно реагирующие вещества

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

#### Результаты исследований

Study population	n	n Pos	%
SLE	202	168	83.2
Other autoimmune diseases	33	1	3.0
Normal human sera	115	2	1.7

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 604S	Pos	168	3	350
	Neg	34	145	
		202	148	
Sensitivity:		83.2 %		
Specificity:		98.0 %		
Overall agreement:		89.4 %		

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Этот анализ предназначен в качестве диагностической помощи. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах одного теста, он должен быть сделан врачом после всех оценки всех клинических и лабораторных исследований.

Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально.

Выше указанные патологические и нормальные диапазоны для антител в образцах пациента следует рассматривать только в качестве рекомендаций. Каждая лаборатория должна установить свои собственные нормы, в соответствии с ISO 15189 или другие действующие правила лаборатории.

#### СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- 1 Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей или образца пациентов
  - Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
  - Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 2 Добавить **100 мкл** ферментного конъюгата
  - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
  - Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 3 Пипетировать **100 мкл** раствора Субстрата
  - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- 4 Добавить **100 мкл** Стоп раствора
  - Выдержать **5 минут**
  - Считать результат при **450 нм**



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
 ул. Чорновола, 97  
 г. Ивано-Франковск, 76005  
 тел.: +38 (0342) 775 122  
 факс: +38 (0342) 775 123  
 e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)