

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

### ORG 605, Anti-ssDNA

Каталог. № : **ORG 605**

Методика от **08-2012**

Количество : **96**

Производитель: **Orgentec (Германия)**



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

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Anti-ssDNA является тест-системой ИФА для количественного определения аутоантител класса IgG к одноцепочечной ДНК в сыворотке или плазме человека. Предназначается только для использования in-Vitro диагностики.

#### ПРИНЦИП ТЕСТА

Рекомбинантные одноцепочечные ДНК (ssDNA) привиты в лунках. Антитела к привитым антигенам, если они присутствуют в разбавленной пробе пациента, связываются с соответствующим антигеном. Промывание лунок удаляет несвязанные неспецифические компоненты сыворотки и плазмы. Анти-человеческие антитела, конъюгированные с Пероксидазой хрена (HRP), иммунологически обнаруживают связанные антитела пациента, формируя комплекс конъюгат-антитело-антиген. Промывание лунок удаляет несвязанный конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизует с образованием синей окраски. Добавление кислоты останавливает реакцию, образуя конечный продукт желтого цвета. Интенсивность этого желтого цвета измеряется фотометрически при 450 нм. Количество окрашивания прямо пропорционально концентрации антител, присутствующих в исходном образце.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ** (См. Оригинал инструкции).

#### СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию.	1
Калибратор А 0 Ед/мл, содержащий сывороточную/буферную матрицу (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор В 12.5 Ед/мл, содержащий антитела ssDNA в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор С 25 Ед/мл, содержащий антитела ssDNA в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор D 50 Ед/мл, содержащий антитела ssDNA в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор E 100 Ед/мл, содержащий антитела ssDNA в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор F 200 Ед/мл, содержащий антитела ssDNA в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Контроли (Положительный и Отрицательный), содержащие антитела ssDNA в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтого цвета. Готовы к использованию. Концентрация указывается в сертификате анализа.	2 флакона 1.5 мл каждый
Буфер для образцов Р; содержит PBS, BSA, моющее средство, консервант азида натрия 0,09%, желтый, концентрат (5 x).	1 флакон 15 мл
Ферментный конъюгат, содержащий античеловеческие антитела IgG, меченые пероксидазой хрена; содержит PBS, BSA, детергент, консервант Проклин 0.05%, светло-красный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ, содержит 3,3', 5,5'-Тетраметилбензидин. Бесцветный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор, содержит кислоту. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, содержит Tris, детергент, консервант азид натрия 0.09%; концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

Инструкция по применению  
Сертификат контроля качества

1 шт.  
1 шт.

#### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционно: контрольный фильтр с длиной волны 620 нм
  - Программное обеспечение для ридера
  - Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объемом 100 мкл
  - Вortexный миксер
  - Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
  - Таймер
  - Дистиллированная или деионизированная вода
  - Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
  - Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора
- Наборы ORGENTEC ИФА являются подходящими для использования на открытых автоматизированных процессорах. Каждый анализ должен быть оценен на соответствующей автоматизированной системе. Подробная информация предоставляется по запросу.

#### СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

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

#### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить набор при 2 - 8 °C в темноте.
- Держать микропланшетные лунки в герметичном мешочке с осушителем.
- Реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
- Не поддавать реагенты для анализа воздействию тепла, солнца или сильного света в течении хранения и использования.
- Разбавленный буфер образца и промывочный буфер стабильны по крайней мере 30 дней при 2 - 8 °C. Рекомендуется использование в тот же день.

#### ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
- Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
- Все материалы следует привести к комнатной температуре.
- Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить беспрерывно 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.

#### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ 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 и ВИЧ. 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 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 0,09% 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.
- Придерживайтесь руководств по осуществлению контроля качества в лаборатории, используйте исследования контролей и/или пулированных сывороток. Придерживайтесь существующего законодательства при работе со всеми реагентами и образцами.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

### Приготовление промывочного раствора

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

### Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 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. Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для контролей/калибраторов и проб пациентов.

- Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку.  
Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °C).  
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. Бихроматическое измерение проводите при 600-690 нм.  
Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Пример пипетирования:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

P1 ... - образцы пациентов, A-F - калибраторы, C +, C-- контроли

## ОЦЕНКА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм для Калибраторов/Контролей и результатов контролей

совпадает с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

## РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественных результатов отложить оптическую плотность каждого калибратора согласно концентрации калибратора, чтобы построить калибровочную кривую. Концентрация образцов пациентов может быть затем оценена с калибровочной кривой с помощью интерполяции.

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

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

### Калибровка

Это система анализа откалибрована в относительных условных единицах, так как ни один международный справочный препарат не доступен для данного анализа.

### Диапазон измерения

Расчетный диапазон данного ИФА анализа 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 Cut-off 20 Ед/мл

### Интерпретация результатов

Отрицательный: < 20 Ед/мл

Положительный: ≥ 20 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 калибровочной кривой.

Образец	Разведение	Полученное значение, Ед/мл	Ожидаемое значение, Ед/мл	П/О, %
1	1:100	189.2	189.2	100
	1:200	90.3	94.6	95
	1:400	50.1	47.3	106
	1:800	21.9	23.7	92
2	1:100	163.2	163.2	100
	1:200	77.9	81.6	95
	1:400	39.2	40.8	96
	1:800	21.1	20.4	103

### 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.

Внутри анализа		
Образец	Среднее Значение Ед/мл	CV [%]
1	16.0	5.6
2	65.0	4.2
3	135.0	6.4

Между анализами		
Образец	Среднее Значение Ед/мл	CV [%]
1	15.0	6.3
2	63.0	4.4
3	132.0	6.8

### 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	79	28	35.4
Normal human sera	315	5	1.8

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 605	Pos	28	5	394
	Neg	51	310	
		79	315	

Sensitivity: 35.4 %

Specificity: 98.4 %

Overall agreement: 85.8 %

## 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. Добавить **100 мкл** калибратор, контроль или образец пациента
  - Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
  - Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
2. Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата
  - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
  - Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
3. Добавить **100 мкл** раствора субстрата
  - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
4. Добавить **100 мкл** стоп раствора
  - Выдержать **5 минут**
  - Считать при 450 нм



## ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Черновола, 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)