



Набор ИФА для определения антител класса IgG, IgM и IgA к двуспиральной ДНК

Кат. № : EIA-3566
Количество тестов : 96
Производитель : DRG (Германия)

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

Методика от **06-2008**
Версия 2.0

1. НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор anti-dsDNA Screen является непрямым твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА) для количественного измерения антител класса IgG, IgM и IgA к двуспиральной ДНК в человеческой сыворотке или плазме. Анализ предназначен только для использования *in vitro* диагностике как средство диагностики системной красной волчанки (SLE).

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Аутоиммунные болезни часто ассоциируются с местонахождением антител против собственной так называемой антигенной структуры аутоантител. Присутствие аутоантител в природной Дезоксирибонуклеиновой кислоте (p-DNA, dsDNA двуспиральная DNA) типическая для клинической картины Системной эритратматоидной Волчанки (SLE).

Антитела против dsDNA принадлежат к группе антиядерных антител (ANA), которые направлены против различных структур клеточных ядер. Они появляются при разных ревматоидных болезнях. Кроме того, ANA антитела другой группы аутоантител, которые представляют интерес, направлены против так называемых экстрагируемых ядерных антител (ENA). Критерий ARA Американской ревматоидной Ассоциации представляет диагностическую схему для диагностики Системной эритратматоидной Волчанки (SLE). SLE есть высоко прогнозируемый, поскольку четыре из 11 критериев выполняется.

Антитела к dsDNA найдены во время активной фазы SLE, где концентрация сыворотки показывает положительную корреляцию к серьезности болезни. Продолжающаяся терапия может быть проверена с помощью определения аутоантител. Диагностическая чувствительность определения анти-dsDNA при SLE составляет около 91% комбинированный с диагностикой специфика около 96 процентов.

Антитела против ДНК может дифференцироваться на две группы:

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

2. антитела, которые представляют одно-спиральную ДНК (ssDNA).

Измерения антиядерных антител (ANA, или антиядерного фактора (ANF)) – это широко принятый метод скрининга подозреваемости SLE. На некоторых стадиях болезни или при IFT терапии иногда можно получить фальшивые результаты, поэтому более специфичный тест необходим. Отрицательный IFT для ядерных антител не исключает присутствие анти-dsDNA антител, так как антигенные структуры могут маскироваться другой структурой. Кроме того, ANA титры, определены IF тестом, показывают только недельную корреляцию к серьезности болезни.

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

Аутоантитела против одно-спиральной 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 инактивной фазы.

Болезни типа SLE вызваны некоторыми лекарствами. Для дифференциации медикаментозной LE определения анти-ssDNA есть одним из инструментов диагностики. При медикаментозной LE анти-ssDNA растет в более чем 50 процентов случаев. Кроме того рост анти-

ssDNA концентрации в сыворотке также отмечено при Мононуклеозе, Гепатите и различных формах Лейкемии.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Человеческий рекомбинант двуспиральной ДНК привит к микрочайкам. Антитела к этим антигенам, если присутствуют в разбавленной сыворотке, связываются с микрочайками. Промывание микролунок удаляет несвязанные антитела сыворотки. Анти-человеческие IgG, IgM, IgA конъюгированные пероксидазой хрена иммунологически связываются с связанными антителами пациента, формируя конъюгат-антитело-антиген комплекс. Промывание микролунок 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.

4. 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 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 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.

5. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 лунок каждый, покрытых рекомбинантом двуспиральной ДНК (dsDNA) – **1 планшет**. Готовый к использованию.
2. Комбинированные стандарты с анти-dsDNA (A-F) в основе сыворотки/буфера, содержащие 0; 12,5; 25; 50; 100 и 200 Е/мл – **6 флаконов, 1,5 мл каждый**. Готовые к использованию.
3. Контроли анти-dsDNA в основе сыворотки/буфера (положительные и отрицательные), для соответственной концентрации в приложении пакета внутри – **2 флакона, 1,5 мл каждый**. Готовые к использованию.
4. Буфер образцов анти-dsDNA, желтый, **концентрат (5x) - 1 флакон, 20 мл**.
5. Раствор ферментного конъюгата (бледно красный), содержащий поликлональные анти-человеческие-IgG, анти-человеческие-IgM и анти-человеческие-IgA кроля, меченые пероксидазой хрена - **1 флакон, 15 мл**.
6. Раствор субстрата ТМБ - **1 флакон, 15 мл**.
7. Стоп раствор (1M HCl) – **1 флакон, 15 мл**.
8. Буферный промывочный раствор, **концентрат - 1 флакон, 20 мл**.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8°C.

2. Содержит лунки микропланшета запечатанные в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности.
4. Не поддавайте реагенты влиянию тепла, солнца или сильного света во время хранения или использования.
5. Разбавленный буфер образцов и моющий буфер стабилен 30 дней при хранении при 2-8°C.

7. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Микропланшетный ридер с длиной волны измерения 450 нм
- Многоканальный диспенсер или пипетка для дозирования на 100 мкл
- Вихревой смеситель
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Лабораторное часовое устройство
- Программное обеспечение

Подготовка реагентов

- Дистиллированная вода
- Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
- Пластиковый контейнер для хранения промывочного р-ра.

8. 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.

9. 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 анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
5. Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
6. Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
9. Очень важно промывать лунки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
10. Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
11. Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
12. Не используйте повторно лунки микропланшета.

Для всех контролей, на этикетках флаконов указаны соответствующие концентрации. Используя эти концентрации может быть вычислена калибровочная кривая для полуколичественного считывания результатов пациента.

10. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовка буфера образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C, по крайней мере, 30 дней или до конца срока годности.

Подготовка промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C, по крайней мере, 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

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.

11. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и разбавленных проб пациентов в дублях.
2. Добавьте **100 мкл** стандартов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую лунку.

	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

3. Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое лунок и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
5. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
6. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое лунок и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
8. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую лунку.
9. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
10. Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку и выдержите 5 минут.
11. 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.

Автоматизация

Данный набор пригоден для использования с автоматическим ИФА процессором. Тестовая процедура, описанная выше, пригодна для использования с или без автоматизации.

12. ИНТЕРПРИТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1 Контроль качества

Данный тест пригоден, если ОП при 450 нм для положительного (1) и отрицательного контроля (2) и стандартов 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.

12.2 Вычисление результатов

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации. Также возможно использование аппроксимации Smoothed Spline.

Для ручного расчета рекомендуется линейно-логарифмическая миллиметровка.

Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого калибратора. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровку и отложите среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

12.3 Пример вычисления

Пример вычисления результатов см. в таблице ниже. В этой табл. показаны типичные данные, которые даны только для иллюстрации и не могут быть использованы для вычисления результатов пациентов.

Калибраторы									
№	Лунки	ОП 1	ОП 2	Среднее	Конц. 1	Конц. 2	Среднее	Заяв. конц.	КВ %
ST1	A1/A2	0.023	0.021	0.022	0.0	0.0	0.0	0.0	9
ST2	B1/B2	0.174	0.174	0.174	13	13	13	12	0
ST3	C1/C2	0.336	0.335	0.336	25	25	25	25	0
ST4	D1/D2	0.643	0.658	0.651	49	50	50	50	2
ST5	E1/E2	1.172	1.173	1.173	101	101	101	100	0
ST6	F1/F2	1.809	1.788	1.799	201	197	199	200	1

12.4 Интерпретация результатов

При изучении нормального диапазона использовалась кровь здоровых пациентов, и был установлен следующий диапазон значений:

Анти-dsDNA IgG/IgM/IgA(Е/мл)

Пороговое значение (cut-off) 25

Положительные результаты должны быть выверены в соответствии с полной клинической картиной пациента. Также каждое терапевтическое решение должно быть принято индивидуально. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой собственный диапазон нормальных и патологических значений. Данные, приведенные выше, следует принимать как рекомендованные.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Параллелизм

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями были разбавлены буфером для образцов и проанализированы.

Образец	Разбавл.	Полученный (Е/мл)	Ожидаемый (Е/мл)	П/О, %
1	1:100	104,2	52,1	97
	1:200	50,6		
	1:400	24,9		
	1:800	11,2		
2	1:200	135,3	67,7	102
	1:400	68,9		
	1:800	35,2		
	1:1600	18,2		

13.2 Точность (воспроизводимость)

Статистика была посчитана для трех образцов по результатам 24 определений в одном круге анализов для точности внутри серии. Для определения точности между сериями были рассчитаны результаты 5 различных серий анализов с 6 определениями каждого:

В анализе		
Образец No	Средн. (МЕ/мл)	КВ [%]
1	26	4,5
2	61	3,1
3	114	6,4

Между анализами		
Образец No	Средн. (МЕ/мл)	КВ [%]
1	29	12,4
2	68	7,3
3	138	5,2

13.3 Специфичность

Микропланшет покрыт рекомбинантом двуспиральной ДНК. В процессе покрытия антигенная структура консервируется, и во время покрытия нет никаких последовательностей одно-спиральной ДНК. Поэтому, набор анти-dsDNA тест использует только аутоантитела специфические для двуспиральной ДНК.

14. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор является диагностическим. Определение клинического диагноза не должно основываться на результатах одного теста и должно учитывать все данные клинических и лабораторных исследований. Отрицательный анти-dsDNA не обязательно обозначает присутствие SLE.

15. ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не влияет гемолизированная (до 1000 мг/дл), липемическая (до 3 г/дл триглицеридов) сыворотка или сыворотка, содержащая билирубин (до 40 мг/дл). Не было обнаружено влияние при использовании антикоагулянтов. Но рекомендуется не использовать сильно гемолизированную или липемическую сыворотку.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола 97, г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 775 122; тел./факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua