

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG ДО ДВОСПІРАЛЬНОЇ ДНК

IgG anti dsDNA

Кат. №: **DSDNA.CE**

Дата випуску інструкції: **03-2020**
Версія: **2**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпасти.

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл IgG до двоспіральної ДНК у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір, кат. № DSDNA.CE, - це імуноферментний аналіз (ІФА), призначений для кількісного/якісного визначення аутоантитіл IgG до двоспіральної ДНК у плазмі та сироватці людини. Тільки для діагностики *in vitro*.

В. ВСТУП

Аутоімунітет - це нездатність організму розпізнати свої складові частини як себе, що дозволяє імунну відповідь проти власних клітин і тканин. Будь-яке захворювання, яке виникає внаслідок такої аберації імунної відповіді, називається **Аутоімунним Захворюванням**.

Антитіла до двоспіральної ДНК належать до групи Антинуклеарних Антитіл (АНА), які з'являються при ряді ревматоїдних захворювань, зокрема наявність аутоантитіл до нативної двоспіральної ДНК є типовою для клінічної картини Системного Червоного Вовчака (СЧВ).

Антитіла до двоспіральної ДНК з'являються в активній фазі СЧВ і їх концентрація є прогностичною для тяжкості захворювання. Кількісна оцінка аутоантитіл до двоспіральної ДНК стає дійсно корисною в подальшій терапії.

Антитіла до двоспіральної ДНК присутні приблизно у 90% хворих на СЧВ.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті двоспіральною ДНК. Під час 1-ї інкубації тверду фазу обробляють розведеними зразками, і антитіла IgG до двоспіральної ДНК захоплюються твердою фазою, якщо вони присутні.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка, у 2-й інкубації зв'язані антитіла до двоспіральної ДНК виявляються шляхом додавання антитіл до hIgG, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл IgG до двоспіральної ДНК, присутніх у зразку. IgG у зразку можна кількісно визначити за допомогою стандартної кривої, відкаліброваної за стандартним препаратом ВООЗ для антитіл до двоспіральної ДНК (Wo/80).

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для виконання 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 стрипів x 8 відривних лунок, покритих двоспіральною ДНК у присутності білків великої рогатої худоби. Пластини запечатані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4 °C.

2. Калібрувальна крива: CAL №...

6x2.0 мл (мл)/флакон. Готовий до використання та маркований синім кольором.

Стандартна крива складається з позитивної на IgG двоспіральної ДНК плазми людини, відкаліброваної за стандартним препаратом ВООЗ для антитіл до двоспіральної ДНК (Wo/80) і становить:

CAL1 = 0 МО/мл (IU/ml) або Негативний Контроль (NC)
CAL2 = 12.5 МО/мл (IU/ml)
CAL3 = 25 МО/мл (IU/ml) або Контроль Cut-off (CO)
CAL4 = 50 МО/мл (IU/ml)

CAL5 = 100 МО/мл (IU/ml)

CAL6 = 200 МО/мл (IU/ml)

або Позитивний Контроль (PC)

Містить білки сироватки людини, бичачі білки, буфер Трис з рН 7.8 +/-0.1, 0.09% азид натрію і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

3. Концентрат промивного буфера: WASHBUF 20X

1x60 мл (мл)/пляшка 20X концентрованого розчину. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буфера, рН 7.0 +/- 0.2, 0.05% Tween 20 та 0.045% ProClin 300.

4. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл (мл)/флакон. Готовий до використання, маркований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому козячі поліклональні антитіла до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис-буфер з рН 6.8 +/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин сульфат як консерванти.

5. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл (мл)/флакон. Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатного буфера, рН 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетра-метилбензидину (або ТМБ) та 0.02% перекису водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.

6. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 М (M)

1x15 мл (мл)/флакон. Містить розчин 0.3 М (M) H₂SO₄.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

7. Розчинник для зразків: DILSPE

2x60 мл (мл)/флакон. Готовий до використання та кодований фіолетово-блакитним кольором.

Містить бичачі білки, Трис-буфер з рН 7.8 +/-0.1, 0.09% азид натрію і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

8. Покривна фольга для планшета x 2 шт.

9. Вкладка інструкції x 1 шт.

Е. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Відкалібровані мікродозатори (1000, 100 і 10 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу ІФА (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА (сухий або вологий), встановлений на +37 °C (°C) (допуск +/-0.5 °C (°C)).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
- Відкалібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом завідуючого лабораторією.
- Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
- Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
- Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації стола, де проводиться тестування.

5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або агрегатів. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 повторних використання набору протягом 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка побутовим відбілювачем з 10% кінцевою концентрацією протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавуванням при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, EDTA та гепарином не спостерігалось.
2. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина вплине на ферментативну активність кон'югату, створюючи хибнонегативні результати.
3. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.
4. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до хибних результатів.
5. Сироватку та плазму можна зберігати при +2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно викиньте з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.

6. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (µ), щоб очистити зразок для тестування.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва. У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при +2-8 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки індикатор вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

Калібрувальна крива:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20X бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2..8 °C (°C).

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі. Уникайте забруднення рідини окислювальними хімікатами, пилом або мікробами. Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі. Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами. Не піддавайте сильному освітленню, впливу окислювачів та контакту з металевими поверхнями. Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Розчинник зразка:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі. Увага: Подразнююча речовина (H315, H319, P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Попереджувальні H-фрази:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні P-фрази:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікродозатори повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також необхідно проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з інструкцією виробника (пропонується дезактивація 0.1 M (M) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл (μl)/лунку промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною хибнопозитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск +/- 5%.
5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускну здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
6. При використанні автоматизованої станції для ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контролювані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані станції для ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.
7. Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильним пластиковим дозатором. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтеся, що пакет, який містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.

4. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте.
5. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
6. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
7. Якщо ви використовуєте автоматизовану станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
8. Переконайтеся, що мікродозатори встановлені на необхідний об'єм.
9. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
10. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

Кількісна процедура

Цей метод слід використовувати, коли потрібне кількісне визначення в МО/мл (IU/ml).

1. Розведіть зразки 1:101 у правильно позначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте набір для калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунки A1 та B1 порожніми для операції бланкування.
3. Потім внесіть 100 мкл (μl) Калібраторів в дублях. Потім внесіть 100 мкл (μl) розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку.
4. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при + 37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Стрипи повинні бути закриті покривною плівкою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте стрипи, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

5. Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ I.3).
6. Внесіть 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату в кожну лунку, окрім лунок A1+B1 для бланкування і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий в усі лунки, окрім лунок A1 та B1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

7. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при +37 °C (°C)**.
8. Промийте мікролунок, як описано раніше в кроці 5.
9. У кожну лунку внесіть 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунки A1 та B1 для бланкування. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 15 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

10. Внесіть 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність дозування, що й на етапі 9. Додавання кислоти змінить позитивні калібратори та позитивні зразки з синього на жовтий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад на A1 або B1.

Якісна процедура

Цей метод слід використовувати, коли потрібен якісний результат (позитивний/негативний).

1. Розведіть зразки 1:101 у правильно позначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника зразка + 10 мкл (μl)

зразка). Не розбавляйте набір для Калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.

2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунку А1 порожньою для операції бланкування.
3. Потім внесіть 100 мкл (μl) NC (CAL1) у В1+С1, 100 мкл (μl) СО (CAL3) у D1+E1+F1 та 100 мкл (μl) РС (CAL6) у F1. Потім внесіть 100 мкл (μl) розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку.
4. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при +37 °С (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки повинні бути закриті покривною плівкою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

5. Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ І.3).
6. Внесіть 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату в кожну лунку, окрім лунки А1 для бланкування і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім лунки А1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

7. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при +37 °С (°C)**.
8. Промийте мікролунок, як описано раніше в кроці 5.
9. У кожну лунку внесіть 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунку А1 для бланкування. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °С (°C)) протягом 15 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

10. Внесіть 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність дозування, що й на етапі 9. Додавання кислоти змінить позитивні калібратори та позитивні зразки з синього на жовтий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад на А1 (обов'язково).

Важливі загальні зауваження:

1. Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Калібратори або Контролі	100 мкл (μl)
Зразки розведені 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	45 хвилин
Температура	+37 °С (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	45 хвилин
Температура	+37 °С (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н ₂ О ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	15 хвилин
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Нижче наведено приклад схеми розподілу для **Кількісного** аналізу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 3										
B	BLK	CAL4	S 4										
C	CAL1	CAL5	S 5										
D	CAL1	CAL5	S 6										
E	CAL2	CAL6	S 7										
F	CAL2	CAL6	S 8										
G	CAL3	S 1	S 9										
H	CAL3	S 2	S 10										

Позначення: BLK = Бланк CAL = Калібратор S = Зразок

Нижче наведено приклад схеми розподілу в **Якісних** аналізах:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 2											
B	NC	S 3											
C	NC	S 4											
D	CO	S 5											
E	CO	S 6											
F	CO	S 7											
G	PC	S 8											
H	S 1	S 9											

Позначення: BLK = Бланк BLK = Бланк NC = CAL1 CO = CAL3 PC = CAL6

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб визначити, чи результати аналізу є відповідними.

Переконайтеся, що досягнуто наступних результатів:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення ОЩ 450 нм (nm)
CAL1 або NC 0 МО/мл (IU/ml)	< 0.200 середнього значення ОЩ 450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації < 30%
CAL2 12.5 МО/мл (IU/ml)	ОЩ 450 нм (nm) > ОЩ 450 нм (nm) CAL1 + 0.100
CAL6 або PC 200 МО/мл (IU/ml)	ОЩ 450 нм (nm) > 1.000

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.100	1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу
CAL1 або NC 0 МО/мл (IU/ml) > 0.200 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації > 30%	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в передкваліфікаційній підготовці; 2. чи використовується відповідний миючий розчин, а перед використанням вошер був ним праймований; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивного калібратора замість негативного); 4. чи не відбулось забруднення негативного калібратора або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або ферментного кон'югату; 5. чи мікродозатори не забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
CAL2 12.5 МО/мл (IU/ml) ОЩ 450 нм (nm) < ОЩ 450 нм (nm) CAL1 + 0.100	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного калібратора);

	3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в передкваліфікаційній підготовці; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.
CAL6 або PC 200 МО/мл (IU/ml) < 1.000 ОЩ 450 нм (nm)	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного калібратора); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в передкваліфікаційній підготовці; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо виникла якась із вищезазначених проблем після перевірки, повідомте про цю проблему керівнику для подальших дій.

Важлива примітка:

Аналіз слід проводити, виконуючи крок зчитування, описаний у розділі М, пункт 11.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

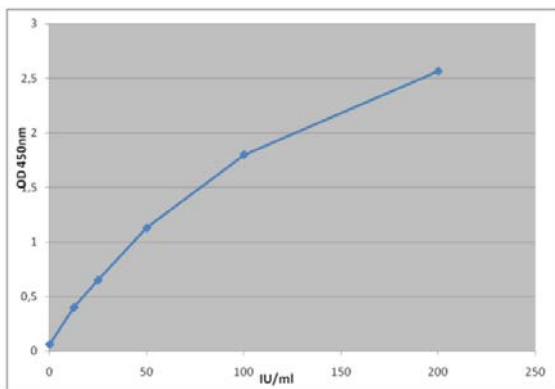
Якщо тест виявляється дійсним, виконайте наступне.

Кількісний аналіз

Використовуйте затверджену програму побудови кривої, щоб накреслити калібрувальну криву зі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) (пропонується інтерполяція з 4 параметрами).

Потім за калібрувальною кривою розрахуйте концентрацію антитіл до двоспіральної ДНК IgG у зразках.

Нижче наведено приклад калібрувальної кривої.



Важлива примітка:

Не використовуйте наведену вище калібрувальну криву для розрахунків.

Якісний аналіз

Обчисліть середнє значення ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) CO (CAL3) і застосуйте для отримання результатів таку формулу:

$$\text{середнє ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) CO} = \text{Cut-Off}$$

Потім визначте значення **S/Co (ОЩ Зразка 450 нм (nm)/620-630 нм (nm)/Cut-Off)** для всіх зразків.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразки з концентрацією нижче 25 МО/мл (IU/ml) або зі значенням S/Co < 1 вважаються нормальними для антитіл IgG до двоспіральної ДНК. Вважається, що зразки з концентрацією вище 25 МО/мл (IU/ml) або зі значенням S/Co > 1 мають аномально підвищену присутність антитіл IgG до двоспіральної ДНК.

Зразки з вмістом у діапазоні 12.5 < МО/мл (IU/ml) < 25 МО/мл (IU/ml) (або з 0.5 < S/Co < 1.0) слід перевірити.

МО/мл (IU/ml)	Інтерпретація
< 25	Нормальний
> 25	Підвищений

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні та патологічні діапазони.

Важливі примітки:

- Одних результатів цього тесту недостатньо для встановлення чіткого діагнозу аутоімунного захворювання. Необхідно проводити інші діагностичні тести, особливо в поєднанні з іншими аутоантитілами. Картина різних комбінацій антитіл та їх концентрація разом із загальною клінічною картиною пацієнта є корисними діагностичними інструментами при оцінці ревматоїдних аутоімунних захворювань.
- Позитивні результати повинні бути підтверджені щодо всього клінічного стану пацієнта.
- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена на панелях позитивних і негативних зразків з посиланням на CE-маркований референсний набір.

1. Межа виявлення

Межа виявлення аналізу була розрахована за допомогою I.G.S. відкаліброваного за стандартним препаратом ВООЗ для антитіл до двоспіральної ДНК (Wo/80), щоб забезпечити постійну та чудову чутливість пристрою.

Межа виявлення розрахована як середнє ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Калібратора 0 МО/мл (IU/ml) + 5 SD.

У таблиці нижче наведені середні значення ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) для цього стандарту при розведенні, а потім дослідженні в аналізі.

IGS МО/мл (IU/ml)	ЛОТ P1 ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм	ЛОТ P2 ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм
200	2.561	2.512
100	1.458	1.378
50	0.831	0.801
25	0.429	0.402
12.5	0.182	0.138
0	0.030	0.029

2. Діагностична Чутливість та Специфічність

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні Оцінки Ефективності на панелях зразків, які були класифіковані як позитивні референс-набором із маркуванням CE.

Діагностичну чутливість досліджували на щонайменше 50 зразках, позитивних з референсним набором. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів із клінічною історією аутоімунного захворювання.

Діагностичну специфічність визначали на панелях щонайменше 50 негативних зразків від нормальних осіб і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, що потенційно інтерферують.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів підготовки (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки. Жодної помилкової реактивності через метод підготовки зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були аналізовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків інтерферує з виконанням тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких інтерференцій не спостерігалось. Тестовий набір на антитіла IgG до двоспіральної ДНК специфічний лише для аутоантитіл, спрямованих до відповідного антигену. Перехресної реактивності не спостерігалось.

Оцінка ефективності надала наступні значення:

Чутливість	≥ 98 %
Специфічність	≥ 98 %

3. Точність

Дослідження, проведене на трьох зразках різної реактивності антитіл IgG до двоспіральної ДНК, досліджених у 16 повторах у трьох окремих пробігах, показало значення CV% у діапазоні 4-20% залежно від показань ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм (nm).

4. Достовірність

Достовірність аналізу була перевірена розведенням. Будь-який «хук-ефект», недооцінка, яка могла статися при високих дозах аналіту, була виключена.

5. ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналіту.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після відтавання, можуть давати деякі помилкові результати.

Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не об'єднаних.

Діагноз аутоімунного захворювання не слід встановлювати на основі одного результату тесту. Необхідно враховувати клінічний анамнез пацієнта, його симптоматику, а також інші діагностичні дані.

Помилкова позитивність оцінюється як менше ніж 2% від нормальної популяції.

ЛІТЕРАТУРА

1. A new ELISA for the detection of double-stranded DNA antibodies. W Emlen, P Jarusiripipat, G Burdick - Journal of immunological methods, 1990 - ncbi.nlm.nih.gov.
2. Clinical evaluation of various selected ELISA kits for the detection of anti-DNA antibodies. JA Avina-Zubieta, G Galindo-Rodriguez, L ... - Lupus, 1995 - lup.sagepub.com.
3. Detection of antibodies to DNA: a technical assessment. R Smeenk, M Hylkema - Molecular biology reports, 1993 – Springer.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

*Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it*

ТОВ ДІА.ПРО

*Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it*



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК В УКРАЇНІ

*ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, буд. 25
м. Івано-Франківськ, 76014, Україна
тел.: +38 (0342) 775 122
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua*

