

СР	7041/2007
	11.10.2012

Перший заступник  
Голови Державної служби України  
з лікарських засобів  
І.Б.Демченко  
11 жовтня 2012 р.

**Інструкція**  
**з використання тест-системи**  
**для визначення антитіл до ДНК (нативної, денатурованої, формалінізованої)**  
**в сироватці крові**  
**АТ до ДНК – ІФА**

**IN VITRO**

Зберігати при 2-10°C

**Принцип методу**

У наданій тест-системі використовується принцип непрямого імуноферментного аналізу. У лунки планшета з іммобілізованими антигенами (ДНК нативної, денатурованої, формалінізованої) вносять досліджуваний зразок. АТ до ДНК із зразка зв'язуються з антигенами на поверхні лунок. Незв'язаний матеріал видаляється відмивкою. У лунку вносять кон'югат (антитіла проти IgG людини, мічені пероксидазою). Після повторної відмивки активність ферменту, зв'язаного на поверхні лунки планшета, проявляється додаванням субстрату та вимірюється при довжині хвилі 450 нм.

Інтенсивність кольорової реакції прямо пропорційна кількості АТ до ДНК у зразку.

**Клінічне значення**

Антитіла до нативної двоспіральної ДНК (нДНК) спрямовані проти структур ядра клітини. Високоспецифічні для системного червоного вовчаку (СЧВ), виявляються під час активної фази у високих титрах. Визначення АТ до нДНК використовують для моніторингу терапії даного захворювання. Рівень АТ корелює з тяжкістю захворювання та наявністю гломерулонефриту, що дозволяє оцінити ризик та тяжкість вовчаного нефриту. Одноразове підвищення визначення АТ до нДНК дозволяє зробити діагностичний, але не прогностичний висновок. Відсутність зниження рівня антитіл або його наростання є несприятливою прогностичною ознакою. Антитіла можуть зникати при ремісії захворювання. Рідше і в більш низькій концентрації АТ до нДНК зустрічаються при інших дифузних хворобах сполучної тканини. При активному ревматичному процесі та ревматоїдному артриті, склеродермії, особливо при її активних та злоякісних формах, хворобі Рейно також відзначається значне підвищення антитіл до нативної ДНК. В ряді випадків ці антитіла можна виявити при вираженій активності хронічного активного гепатиту чи хворобі Шегрена, біліарному цирозі, хронічному вірусному гепатиті, цитомегаловірусній інфекції, онко захворюваннях, медикаментозній терапії та ін.

Антитіла до денатурованої ДНК (дДНК) виявляють при тих же захворюваннях, що нДНК, але для СЧВ це менш специфічно. Однак, у зв'язку з тим, що дДНК більш імуногенна, ніж нДНК, визначення антитіл тільки до дДНК дозволяє виявити виникнення захворювання в більш ранні терміни. Одночасне визначення антитіл до нДНК і дДНК збільшує діагностичну значимість цих антитіл. В активній фазі СЧВ антитіла до дДНК зустрічаються в 80-90% випадків.

Антитіла до одно спіральної формалінізованої ДНК (фДНК) широко зустрічаються як в нормі, так і при різноманітних системних захворюваннях сполучної тканин, інфекційних процесах (напр. туберкульозі), вірусних захворюваннях.

### Склад набору

1. Планшет з іммобілізованими антигенами: 1-4 стрипи – нативна ДНК, 5-8 – денатурована ДНК, 9-12 – формалінізована ДНК; 8x12 лунок (1 шт.)
2. Стрічка для заклеювання планшет (1 шт.)
3. Набір контролів, 1.2 мл (2 фл.)
4. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), концентрат 10x, 30 мл (1 фл.)
5. Кон'югат, 11 мл (1 фл.)
6. Субстрат, 11 мл (1 фл.)
7. Зупиняючий розчин, 11 мл (1 фл.)

### Аналітичні характеристики

Очікуванні межі оптичної щільності негативного контролю 0.1-0.3 оптичних одиниць (ОО).  
Коефіцієнт варіації результатів визначень не більш 10%.

### Матеріал для дослідження

Використовуйте свіжу, вільну від домішок сироватку крові. Зберігайте зразки не більше 48 годин при 2-10°C. Довгострокове зберігання допускається в замороженому вигляді при температурі -20°C. Повторне заморожування-відтавання не допускається. Не використовуйте мутні, хильозні та гемолітичні зразки.

### Перелік необхідного устаткування

Автоматичні одно- та багатоканальні дозатори фіксованого або варіабельного об'єму 5-1000 мкл.  
Загальне лабораторне устаткування.  
Аналізатор імуноферментний з довжиною хвилі 450 нм.

### Підготовка реагентів

1. Перед використанням набір витримайте при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. До цього не знімайте стрічку для заклеювання з планшета, щоб не утворювався конденсат.
2. Приготуйте необхідну кількість розчину фосфатно-сольового буфера (ФСБ). Для цього концентрат розбавте 10-кратним об'ємом дистильованої води в чистому посуді. Отриманий розчин стабільний протягом 5-ти діб при кімнатній температурі або 30 діб у холодильнику 2-10°C.
3. Підготовка досліджуваних зразків: перед дослідженням 10 мкл сироватки розводять в 1 мл ФСБ.  
Не розбавляйте контрольні зразки!

### Проведення аналізу

1. Помістіть у рамку потрібну кількість стрипів – 12 лунок для контролів та зразків в 2 повторах.
2. Внесіть у лунки 100 мкл контролів та досліджуваних зразків.
3. Інкубуйте 40 хвилин при температурі 20-25°C, періодично струшуючи або на шейкері.
4. Відмийте стрипи 3 рази розчином ФСБ.
5. Внесіть у лунки 100 мкл кон'югату.
6. Інкубуйте 40 хвилин при температурі 20-25°C, періодично струшуючи або на шейкері.
7. Відмийте стрипи 5 разів розчином ФСБ.
8. Внесіть у лунки 100 мкл субстрату.
9. Інкубуйте 15-20 хвилин при температурі 20-25°C в темному місці.
10. Внесіть у лунки 100 мкл зупиняючого розчину.
11. Не більше як через 5 хв. виміряйте оптичну щільність (ОЩ) у лунках на фотометрі при довжині хвилі 450 нм. Бланк фотометра виставляйте проти повітря.
12. Визначте концентрацію АТ до ДНК в досліджуваних зразках по формулі.

### Примітка

1. Не змішуйте та не використовуйте в одній постановці реагенти різних серій.
2. Після використання реагенту негайно закривайте кожен флакон **СВОЮ** кришкою.
3. Усі проби і стандарти бажано ставити в двох паралелях (повторах).
4. Відмивання планшета може проводитися як вручну, так і з використанням автоматичних пристроїв. Вносити по 250 мкл розчину ФСБ в лунки при кожному відмиванні. Затримка при відмиванні («замочування») не потрібна. Після закінчення ручного відмивання різко переверніть планшет на фільтрувальний папір для видалення залишків буферу.

### Оцінка результатів дослідження

Для визначення наявності антитіл використовують індекс реакції (ІР):

$$IP = \frac{E_{дос}}{E_{нег}}$$

де:  $E_{дос}$  - оптична щільність досліджуваної сироватки,

$E_{нег}$  - оптична щільність негативного контролю.

### Референтні величини

Грунтуючись на результатах досліджень, проведених лабораторіями, рекомендуємо користуватися нормами, приведеними нижче. Разом з тим, відповідно до правил GLP (Гарної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна сама визначити для себе параметри норми, характерні для обстежуваної популяції.

$IP > 1.9$  свідчить про наявність антитіл. Враховуючи можливу похибку аналізу, досліджувану сироватку вважають позитивною при  $IP > 2.0$ .

$IP \leq 2.0$  проба вважається негативною.

### Вимоги безпеки

1. Категорично забороняється піпетування ротом.
2. Засобами індивідуального захисту при роботі з наборами є марлеві пов'язки та гумові рукавички.
3. Знезараження сироваток, тестових слайдів чи скляних пластин проводити згідно з наказом МОЗ СРСР №408 від 29.12.89 р. «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в стране».

### Умови зберігання

Набір повинен зберігатися при температурі від 2-10°C. Не допускається замороження!

Після розкриття пакета **ретельно заклейте** лунки, що залишилися, стрічкою для заклеювання, щоб запобігти впливу вологи під час зберігання.

Усі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, якщо зберігати його щільно закритим, в захищеному від світла місці та запобігати забруднення під час його використання.

### Гарантії виробника

1. Виробник гарантує відповідність якості наборів вимогам ТУ при додержанні споживачем умов зберігання.
2. Гарантійний термін зберігання становить 6 міс. з дня виготовлення набору.

СР	7041/2007
	11.10.2012

ТОВ НВЛ "Гранум"  
61050, м. Харків  
вул. Юр'ївська, 17  
т/ф (057) 768-07-14

### Паспорт

Тест-система для визначення антитіл до ДНК

(нативної, денатурованої, формалінізованої) в сироватці крові

### АТ до ДНК – ІФА

### IN VITRO

Серія **704**

Дата виготовлення **04.12.2012**

Термін придатності **04.06.2013** Зберігати при 2-10°C

№/п	Показник	Вимоги ТУ У 24.4-31557962-002-2002		Результати контролю
<b>1. Показники правильності визначення</b>				
1.1	Очікуванні межі ОЩ негативного контролю, ОО	0.1-0.3		відповідає
1.2	Коефіцієнт варіації результатів визначень не більш, %	10		відповідає
<b>2. Зовнішній вигляд, комплектація</b>				
2.1	Планшет з іммобілізованими антигенами	полістирол	8x12	відповідає
2.2	Стрічка для заклеювання планшет		1 шт.	відповідає
2.3	Набір контролів	жовтий	2 фл. x 1.2 мл	відповідає
2.4	Фосфатно-сольовий буфер, (ФСБ) концентрат 10x	прозорий	1 фл. x 30 мл	відповідає
2.5	Кон'югат	синій	1 фл. x 11мл	відповідає
2.6	Субстрат	прозорий	1 фл. x 11 мл	відповідає
2.7	Зупиняючий розчин	прозорий	1 фл. x 11 мл	відповідає

Термін зберігання – 6 місяців з дня виготовлення.

Висновок ВТК: відповідає ТУ У 24.4-31557962-002-2002