



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

IN VITRO

Зберігати при 4-10°C

**Принцип методу**

У наданій тест-системі використовується принцип непрямого імуноферментного аналізу. У лунки планшета з іммобілізованими антигенами (ДНК нативної, денатурованої, формалінізованої) вносять досліджуваній 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 лунок 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 двоспиральної 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. Буфер для розведення зразків, концентрат 10x, 10 мл (1 фл.)
5. Відмиваючий розчин, концентрат 20 x, 22 мл (1 фл.)
6. Кон'югат, 11 мл (1 фл.)
7. Субстрат, 11 мл (1 фл.)
8. Зупиняючий розчин, 11 мл (1 фл.)

**Аналітичні характеристики**

Очікуванні межі оптичної щільності негативного контролю 0.1-0.35 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 4-10°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 планшету, щоб не утворювався конденсат.
2. Приготуйте відмиваючий розчин. Для цього концентрат розбавте у 20 разів дистильованою водою в чистому посуді (1 мл концентрату + 19 мл дистильованої води). Отриманий розчин стабільний протягом 5-ти діб при кімнатній температурі або 30 діб у холодильнику 4-10°C.
3. Приготуйте необхідну кількість розчину буферу для розведення зразків. Для цього концентрат розбавте у 10 разів дистильованою водою в чистому посуді (1 мл концентрату + 9 мл дистильованої води). Отриманий розчин стабільний протягом 5-ти діб при кімнатній температурі або 30 діб у холодильнику 4-10°C.
4. Підготовка досліджуваних зразків: перед дослідженням 10 мкл сироватки розводять в 1 мл буферу для розведення зразків.

Не розбавляйте контрольні зразки!

**Проведення аналізу**

1. Помістіть у рамку потрібну кількість стрипів – 12 лунок для контролів та зразків в 2 повторях.
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 відмиваючим розчином.
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 відмиваючим розчином.
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.

**Примітки**

1. Не змішуйте та не використовуйте в одній постановці реагенти різних серій.
2. Після використання реагенту негайно закривайте кожен флакон своєю кришкою.
3. Усі проби і стандарти бажано ставити в двох повторях.
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 не потрібна. Після закінчення ручного відмивання різко перегорніть 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 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 ≤2.0 проба вважається негативною.

**Вимоги безпеки**

1. Категорично забороняється піпетування ротом.
2. Використовувати засоби індивідуального захисту при роботі з набором.
3. Знезараження сироваток, тестових слайдів чи скляних пластин проводити згідно з наказом МОЗ України від 11.08.2014 р. № 552 «Про затвердження Державних санітарних норм та правил «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я».

**Умови зберігання**

Набір повинен зберігатися при температурі від 4-10°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 12 міс. з дня виготовлення набору.