

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«07» 12 2008 г.

М.П.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации аутоиммунных антител класса G
к одноцепочечной ДНК в сыворотке крови
(Векто-ssДНК-IgG)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Векто-ssДНК-IgG предназначен для определения концентрации аутоиммунных антител класса G (IgG) к одноцепочечной ДНК (ssДНК) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Антитела против ДНК могут быть подразделены на две группы: 1) антитела, которые связываются только с нативной двухцепочечной ДНК (dsДНК) и 2) антитела, «узнающие» также одноцепочечную ДНК (ssДНК).

Большинство антител к двухцепочечной ДНК связываются с дезоксирибозофосфатными составляющими ДНК, тогда как антитела к одноцепочечной ДНК в основном связываются с основаниями, составляющими ДНК, которые в нативной ДНК «замаскированы» в спиральной структуре.

1.3. Аутоиммунные заболевания характеризуются присутствием антител против собственных антигенных структур – так называемых, аутоиммунных антител. Наличие аутоантител к нативной ДНК типично для клинической картины при заболевании системной красной волчанкой; они проявляются также при различных заболеваниях ревматоидной природы.

Антитела к dsДНК обнаруживаются во время активной фазы системной красной волчанки, причём концентрация их в крови положительно коррелирует с тяжестью заболевания.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.П. Гришаевым, старшим научным сотрудником НИИ СД О.Н. Гришаевой.

Гришаев
08.12.08

Определение концентрации аутоантител имеет важное значение также для оценки эффективности терапии у больных системной красной волчанкой.

Болезни, подобные системной красной волчанке, могут вызываться некоторыми лекарственными препаратами. Для их дифференциальной диагностики количественное определение анти-ssДНК является важным диагностическим инструментом. Кроме того, увеличение концентрации аутоантител к ssДНК отмечено при мононуклеозе, гепатитах и различных формах лейкоза.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

На первой стадии анализа исследуемые образцы, калибровочные пробы и контрольную сыворотку инкубируют в лунках стрипов с иммобилизованной ssДНК. Несвязавшийся материал удаляют отмывкой. Связавшиеся IgG выявляют при инкубации с конъюгатом антител к IgG человека с пероксидазой хрена. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации IgG к ssДНК в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация IgG к ssДНК в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованной на внутренней поверхности лунок одноцепочечной ДНК (ssДНК), готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества IgG к ssДНК – 0; 12,5; 25; 50; 100; 200 Ед /мл; аттестованные относительно стандартов IgG к ssДНК (фирма ORGENTEC Diagnostika GmbH, Германия, кат. № 416-6050); концентрации IgG к ssДНК в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных вели-

чин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 1,5 мл);

- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG к ssДНК, готовая для использования – 1 флакон (1,5 мл);

- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);

- раствор для предварительного разведения сывороток – 1 флакон (10 мл);

- раствор для разведения сывороток – 1 флакон (12 мл);

- раствор для разведения конъюгата – 1 флакон (13 мл);

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 2 флакона (по 28 мл);

- субстратный буферный раствор – 1 флакон (13 мл);

- тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);

- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);

- пленка для заклеивания планшета – 2 шт;

- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт;

- ванночка для реагента – 2 шт;

- наконечники для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемая в наборе одноцепочечная ДНК (ssДНК) обеспечивает специфическое взаимодействие с аутоантителами к ssДНК.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG к ssДНК в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора Векто-ssДНК-IgG не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации IgG к ssДНК в образцах сыворотки крови при разведении их раствором для разведения сывороток имеет линейный характер в диапазоне концентраций 12,5-200 Ед/мл и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG к ssДНК предписанной в пробе, полученной пу-

тём смешивания равных объёмов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 25 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgG к ssДНК не превышает 2 Ед/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию аутоиммунных антител класса G к одноцепочечной ДНК измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 120 здоровых доноров Юго-Восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет. Концентрация IgG к ssДНК у здоровых доноров не превышает 20 Ед/мл.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации IgG к ssДНК, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;
- холодильник бытовой;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 1$ °C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5, 10, 20, 50, 100 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 50, 100 и 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- колбы вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре $+2-8$ °C не более 5 сут или при температуре минус 20 °C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре ($+18-25$ °C).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить

вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора

Готовится в мерном цилиндре.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре +30–40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8 °С не более 3 сут.

7.4. Приготовление калибровочных проб и контрольной сыворотки

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений. Перед использованием встряхнуть.

7.5. Подготовка анализируемых образцов исследуемых сывороток

Готовится во вспомогательном планшете за 5–10 мин до начала анализа.

Использовать в течение 3 ч после приготовления.

Сыворотки крови развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток: внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток и добавить по 10 мкл цельной сыворотки, тщательно перемешать. При этом цвет раствора в лунках должен измениться с малинового на желтый. Если изменения цвета не произошло, результат анализа данной сыворотки может быть неправильным.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в стеклянном флаконе за 5–10 мин до окончания первой инкубации!

Использовать в течение 3 ч после приготовления, хранить при комнатной температуре (+18–25 °С).

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Готовится в стеклянном флаконе за 5–10 мин до окончания второй инкубации!

Использовать в течение 3 ч после приготовления; хранить в защищенном от света месте.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	25-кратный концентрат фосфатно- солевого буферного раствора с твином, мл	Дистилли- рованная вода, мл	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения- конъюгата, мл	Концентрат тетраметил- бензидина, мл	Субстрат- ный буферный раствор, мл
2	4,0	96	0,2	2,0	0,14	2,0
3	6,0	144	0,3	3,0	0,21	3,0
4	8,0	192	0,4	4,0	0,28	4,0
5	10	240	0,5	5,0	0,35	5,0
6	12	288	0,6	6,0	0,42	6,0
7	14	336	0,7	7,0	0,49	7,0
8	16	384	0,8	8,0	0,56	8,0
9	18	432	0,9	9,0	0,63	9,0
10	20	480	1,0	10,0	0,70	10,0
11	22	528	1,10	11,0	0,77	11,0
12	24	576	1,20	12,0	0,84	12,0

7.8. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и по 100 мкл контрольной сыворотки. В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и в дубликатах по 10 мкл анализируемых образцов сыворотки крови (см п. 7.5).

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $+37 \pm 1$ °C.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 300 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повто-

рить 5 раз. После промывки следует тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевёрнутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.6).

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.12. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $+37 \pm 1$ °C.

7.13. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором так, как это указано в п. 7.10.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.7) и инкубировать в темноте в течение 25-30 мин (в зависимости от степени развития окрашивания) 25 мин при комнатной температуре ($+18-25$ °C).

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.15. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на фотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить через 10 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации IgG к ssДНК в калибровочных пробах (Ед/мл).

9.2. Определить содержание IgG к ssДНК в контрольной сыворотке и анализируемых пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения анализируемых образцов необходимо полученную концентрацию IgG к dsДНК умножить на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Векто-ssДНК-IgG должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности (9 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25 °C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения конъюгата, раствор для предварительного разведения сывороток, субстратный буферный раствор и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности;

- концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флакона можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре +2-8 °C не более 2 мес.

- калибровочные пробы, раствор для разведения сывороток, контрольную сыворотку и концентрат конъюгата после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2-8 °C не более 1 мес;

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 3 ч;

- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2-8 °C не более 3 сут;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 3 ч;

- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации IgG к ssДНК в контрольной сыворотке.

10.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре +2-8 °C не более 5 сут или при температуре минус 20 °C (и ниже) не более 3 мес. Повторное замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

10.4. Если концентрация IgG к ssДНК в анализируемых образцах сыворотки крови

превышает 200 Ед/мл, образец следует дополнительно развести в 10 раз. Для этого к 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток добавить 10 мкл исследуемой цельной сыворотки и перемешать, 10 мкл полученного раствора сыворотки (разведение 1:10) смешать с 90 мкл раствора для разведения сывороток. 10 мкл полученного таким образом раствора сыворотки (разведение 1:100) использовать для постановки ИФА в соответствии с п. 7.8. Полученный результат умножить на 10.

10.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

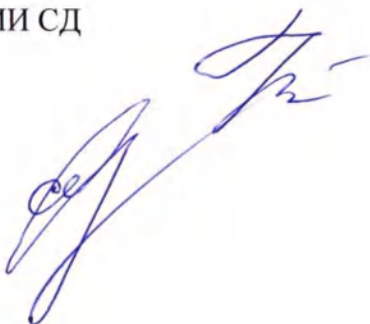
По вопросам, касающимся качества набора Векто-ssДНК-IgG, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

и в **Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора** по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95; 120-60-96.

Старший научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



О.Н. Гришаева

М.П. Гришаев