



DiaSorin S.p.A.
Via Crescentino snc - 13040 Saluggia (VC) - Italy
www.diasorin.com
Tel. +39.0161.4871



LIAISON® dsDNA (310310) Антитела к двухцепочечной ДНК

1. Назначение

Количественное определение аутоантител класса IgG к двухцепочечной ДНК (дцДНК) в сыворотке или плазме человека методом хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA) с помощью анализатора LIAISON®.

2. Введение

Общей отличительной чертой системных ревматоидных заболеваний является присутствие в кровотоке аутоантител к различным клеточным антигенам. Антитела к дцДНК относятся к антиядерным антителам (АЯА), направленным против различных структур клеточного ядра. Антитела к дцДНК являются маркером больных активной формой системной красной волчанки, их появление коррелирует с началом волчаночного нефрита. Наличие антител к дцДНК строго указывает на данное заболевание, однако их отсутствие не во всех случаях позволяет исключить заболевание системной красной волчанкой. Низкие титры антител к дцДНК обнаруживаются в крови в случае других ревматоидных заболеваний и, с меньшей частотой, у людей без симптомов ревматоидных заболеваний. Согласно ряду исследований существует корреляция между степенью заболевания и флуктуациями концентрации антител. Следовательно, количественное определение аутоантител к дцДНК имеет большое значение для терапии больных ревматоидными заболеваниями, например, для контроля над течением болезни, оценки активности болезни (которая находится в прямой зависимости от титра антител в кровотоке) и результата лечения.

Для определения антител к дцДНК был разработан ряд методов. Наибольшее распространение получил метод непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве субстрата простейшего жгутикового микроорганизма *Crithidia luciliae*, радиоиммуноанализ по Фарру и, в последнее время, твердофазный иммуноферментный анализ ELISA. Чувствительность, специфичность, трудоемкость и объективность методик может существенно варьировать.

3. Принцип метода

Метод количественного определения антител к дцДНК представляет собой непрямой хемилюминесцентный иммуноанализ (CLIA). Синтетическая дцДНК связана с магнитными микрочастицами, мышинные моноклональные антитела к человеческим IgG мечены производным изоломинола (конъюгат антител с красителем). Во время первой инкубации антитела к дцДНК, присутствующие в калибраторах, контролях и пробах, связываются с твердой фазой. Во время второй инкубации конъюгат взаимодействует с IgG к дцДНК, уже фиксированными на твердой фазе. После каждой инкубации не связавшиеся молекулы удаляются во время цикла промывки. Затем к реакционной смеси добавляются реактивы для активации, индуцирующие хемилюминесцентную реакцию. Интенсивность люминесценции, измеряемая с помощью фотоумножителя в относительных единицах интенсивности, отражает концентрацию антител к дцДНК (IgG) в калибраторах, контролях и пробах пациентов.

4. Состав набора

Реагентный картридж

Магнитные частицы (2,3 мл)	Магнитные частицы, покрытые синтетической дцДНК; БСА, фосфатно-солевой буфер; <0,1% азид натрия.
Калибратор 1 (2,1 мл)	Человеческая сыворотка/плазма, содержащая низкую концентрацию IgG к дцДНК; БСА; фосфатный буфер; консерванты; инертный краситель (желтый). Концентрация антител в калибраторе определена с использованием 1-го Международного стандарта антител к дцДНК ВОЗ (WHO Wo/80).
Калибратор 2 (2,1 мл)	Человеческая сыворотка/плазма, содержащая высокую концентрацию IgG к дцДНК; БСА; фосфатный буфер; консерванты; инертный краситель (синий). Концентрация антител в калибраторе определена с использованием 1-го Международного стандарта антител к дцДНК ВОЗ (WHO Wo/80).
Раствор для разведения образцов (28 мл)	БСА; фосфатный буфер; консерванты; инертный краситель (желтый).
Конъюгат (23 мл)	Мышиные моноклональные антитела к человеческим IgG, меченные производным изолюминола (аминобутилэтилизолуминолом); БСА; фосфатно-солевой буфер; консерванты.
Количество определений	100

Все реагенты готовы к использованию. Порядок расположения реактивов в таблице отражает их расположение в картридже реактивов.

Необходимые материалы, не входящие в набор

Реакционные модули (каталожный номер 319130)

Комплект реагентов стартовый (каталожный номер 319102)

Реагент для контроля системы (каталожный номер 319150)

Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100)

Мешки для отработанных реакционных модулей (каталожный номер 450003)

Дополнительные материалы, рекомендованные для работы

Контроль антител к дцДНК (каталожный номер 310311)

Набор растворов для обслуживания (каталожный номер 310990)

5. Предупреждение

Только для *In vitro* диагностики.

Все образцы человеческой сыворотки/плазмы, использованные для производства набора, были протестированы на наличие антител к вирусу гепатита С, ВИЧ 1 и ВИЧ 2, а также HBs-антигена и были признаны отрицательно реагирующими в вышеуказанных тестах. Но, поскольку не существует метода исследований, который бы гарантировал полную инфекционную безопасность биоматериалов человеческого происхождения, рекомендуется обращаться с набором, как с потенциально инфекционным.

6. Меры предосторожности

Не употребляйте пищу, напитки, не курите и не наносите косметику в лаборатории, где проводятся анализы.


Не переливайте растворы ртом.

Избегайте прямого контакта со всеми потенциально инфекционными материалами, надевая защитную одежду, такую как лабораторные халаты, защитные очки и одноразовые перчатки. В конце каждого анализа тщательно мойте руки.

Избегайте всплесков или образования аэрозолей. Любую утечку биологического реагента следует смыть с помощью раствора гипохлорита натрия с 5%-ным активным хлором и утилизировать как инфекционные отходы. Все образцы и реагенты, содержащие биологические материалы, используемые в анализе, должны считаться потенциально способными передавать инфекционные агенты. С отходами следует обращаться с осторожностью и утилизировать их в соответствии с лабораторными нормами и нормами законов, действующими в стране. Любые материалы, подлежащие повторному использованию, должны быть надлежащим образом стерилизованы в соответствии с местными законами и нормами.

Проверяйте эффективность цикла стерилизации/обеззараживания.

В соответствии с Положением ЕС 1272/2008 (CLP - классификация, маркировка и упаковка), опасные реагенты классифицируются и маркируются следующим образом:

РЕАГЕНТЫ:	[CAL], [CONJ], [DIL], [SPE]
КЛАССИФИКАЦИЯ:	Сенсибилизация кожи 1 H317
СИГНАЛЬНОЕ СЛОВО:	Внимание
ОБОЗНАЧЕНИЕ / ПИКТОГРАММЫ:	 GHS07 – Восклицательный знак
ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПАСНОСТИ:	H317 Может вызывать аллергическую реакцию на коже.
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:	P261 Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/испарений/аэрозоля. P280 Надевать защитные перчатки /защитную одежду/средства защиты глаз/ средства защиты лица. P363 Стирать загрязненную одежду перед повторным использованием.
СОДЕРЖИТ: (только вещества, предписанные согласно Статье 18 Постановления ЕС 1272/2008).	реакционная масса: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он [ЕС № 247-500-7] и 2-метил-2Н -изотиазол-3-он [ЕС № 220-239-6] (3:1) (ProClin® 300).

В соответствии с Положением ЕС 1272/2008 (CLP - классификация, маркировка и упаковка) [SORB] маркируется как EUN210; по запросу доступны паспорта безопасности.

Дополнительную информацию смотрите в паспортах безопасности, доступных на сайте: www.diasorin.com.

7. Подготовка интегрального картриджа реактивов.

Перед удалением алюминиевых мембран с флаконов аккуратно перемешайте их содержимое, держа интеграл горизонтально. Избегайте пенообразования. Удалите алюминиевые мембраны с каждого из флаконов. Проверните колесо флакона с магнитными частицами, чтобы удостовериться, что оно свободно вращается, продолжая вращать колесо, добейтесь, чтобы суспензия стала равномерно коричневой. Эта процедура инициирует процесс ресуспендирования магнитных частиц. Поместите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 30 минут. Анализатор автоматически перемешивает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.

8. Хранение и стабильность интегрального картриджа реактивов

Всегда храните интегралы в вертикальном положении, в противном случае последующее перемешивание магнитных частиц будет затруднено.

Невскрытые реактивы стабильны до окончания срока годности при условии их хранения в вертикальном положении при температуре 2-8°C. Запрещается замораживать реактивы, входящие в состав картриджа. Запрещается использовать интеграл после окончания срока годности, указанного на этикетке интеграла. После вскрытия интеграла (удаления алюминиевых мембран) его содержимое стабильно в течение 4 недель при условии хранения при температуре 2-8°C в холодильнике или на борту анализатора.

9. Подготовка исследуемого материала

Для исследования могут использоваться сыворотка или плазма. Цитрат, ЭДТА и гепарин могут быть использованы в качестве антикоагулянтов. Кровь должна быть собрана в асептических условиях с помощью венопункции, необходимо дать время для образования сгустка крови, далее сыворотка должна быть отделена от сгустка как можно скорее.

Мутные, липемичные пробы, а также пробы с твердыми частицами и дебрисом эритроцитов перед исследованием могут потребовать дополнительной очистки путем фильтрации или центрифугирования. Не рекомендуется исследовать сильно гемолизированные и липемичные пробы, а также пробы с признаками бактериальной контаминации. Перед установкой пробы в анализатор необходимо удалить все пузыри с ее поверхности.

Стабильность образцов: **7 дней при температуре 2-8°C**. Для более длительного хранения пробы должны быть заморожены при температуре -20°C или ниже. После разморозки пробу необходимо аккуратно перемешать. 10 проб с различной реактивностью хранились 7 дней при температуре 2-8°C, после чего были 5 раз заморожены-разморожены. Полученные результаты существенно не отличались друг от друга.

Минимально необходимый объем 170 µл (20 µл на исследование + 150 µл мертвый объем).

10. Калибровка

Исследование калибраторов, входящих в состав интеграла, позволяет перекалибровать мастер-кривую, хранящуюся в памяти анализатора, с использованием значений концентрации калибраторов, зашифрованных в штрих-коде этикетки интеграла.

Калибровка должна быть проведена в трех повторах в следующих случаях:

- Используется новая серия набора реактивов или набора запускающих реактивов.
- Прошло более 2 недель с момента последней калибровки.
- Было проведено обслуживание анализатора.
- Результаты исследования контрольных сывороток выходят за пределы допустимого диапазона.

11. Процедура анализа

Строгое следование рекомендациям инструкции пользователя гарантирует получение корректных результатов. Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в штрих-коде этикетки интеграла. В случае неполадок сканера штрих-кодов или повреждения штрих-кода информация об интеграле должна быть введена вручную (см. Инструкцию по применению реактивов «LIAISON®»).

Процедура анализа, выполняемого анализатором, состоит из следующих стадий:

1. Раскапывание калибраторов, контролей или проб в кюветы реакционного модуля.
2. Добавление магнитных частиц.
3. Добавление раствора для разведения образцов.
4. Инкубация.
5. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
6. Добавление конъюгата.
7. Инкубация.
8. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
9. Добавление запускающих реактивов и измерение интенсивности флуоресценции

12. Контроль качества

Каждая лаборатория должна установить частоту проведения контроля качества самостоятельно.

Для контроля качества необходимо использовать контроль LIAISON®:

- а. по меньшей мере 1 раз в день перед постановкой проб пациентов
- б. каждый раз при использовании нового реагентного картриджа
- в. Каждый раз после калибровки анализатора или согласно местным требованиям к контролю качества

LIAISON® контроль доступен для проведения внутреннего контроля качества, постановка делается в 1 повторности. Контрольные значения должны лежать в пределах ожидаемого диапазона: всякий раз, когда один или оба контроля находятся за пределами ожидаемых диапазонов, следует провести калибровку и повторить тестирование контроля. Если контрольные значения, полученные после успешной калибровки, повторно выходят за пределы предварительно определенных диапазонов, тестирование следует повторить с использованием неоткрытого контрольного флакона. Если контрольные значения лежат вне ожидаемых диапазонов, результаты не должны сообщаться пациенту.

Эффективность других контролей должна оцениваться на совместимость с данным анализом перед их использованием. Затем следует установить соответствующие диапазоны значений для используемых материалов контроля качества.

13. Интерпретация результатов.

Анализатор автоматически рассчитывает концентрацию IgG к дцДНК в МЕ/мл (международные единицы в миллилитре). За более подробной информацией обратитесь к Инструкции пользователя.

Измеряемый диапазон: 0-240 МЕ/мл IgG к дцДНК.

Пробы с концентрацией антител выше верхнего предела измеряемого диапазона могут быть автоматически разведены анализатором с помощью функции Dilute (разведение) и исследованы повторно (рекомендуемый фактор разведения 1:10). Полученный результат будет автоматически умножен на фактор разведения. Количество раствора для разведения образцов в интеграле достаточно для 15 предварительных разведений (помимо того количества раствора для разведения образцов, которое требуется для проведения теста, как такового).

Пробы с концентрацией IgG к дцДНК ниже 20 МЕ/мл должны расцениваться, как отрицательные.

Пробы с концентрацией IgG к дцДНК от 20 до 25 МЕ/мл должны расцениваться, как сомнительные («серая зона»). *Сомнительные пробы должны быть исследованы повторно для подтверждения первоначального результата. Пробы, результат повторного измерения которых положителен, должны расцениваться, как положительные. Пробы, результат повторного измерения которых отрицателен, должны расцениваться, как отрицательные. Если результат повторного измерения сомнительный, то необходимо провести повторный забор крови не ранее, чем через 1 неделю после получения первого результата.*

Пробы с концентрацией IgG к дцДНК равной или большей 25 МЕ/мл должны расцениваться, как положительные.

Отрицательный результат обычно свидетельствует о том, что в кровотоке пациента отсутствуют антитела к дцДНК, но не всегда позволяет исключить наличие специфического ревматоидного заболевания.

Положительный результат обычно свидетельствует о присутствии в крови антител к дцДНК, что в свою очередь может служить указанием на наличие системной красной волчанки.

14. Ограничения

Строгое следование инструкциям к прибору и реактиву необходимо для получения достоверных результатов.

Бактериальная контаминация или нагревание пробы могут повлиять на результат исследования.

Результат теста качественный: положительный или отрицательный по отношению к присутствию IgG к дцДНК. Не рекомендуется использовать результат одного теста для постановки диагноза. При постановке диагноза результаты всегда следует рассматривать вместе с данными истории болезни и другими диагностическими исследованиями.

Рекомендуется использовать тест на присутствие антител к дцДНК в случае наличия клинических симптомов и/или подозрений на наличие соответствующего заболевания. Скрининговые исследования населения показали незначительную диагностическую ценность данного маркера. Антитела к дцДНК не обнаруживаются в 20-60% случаев заболевания системной красной волчанкой. И напротив, антитела к дцДНК могут определяться у небольшого количества людей в отсутствие болезни.

15. Специфические рабочие характеристики

15.1. Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность можно определить, как способность анализа точно выявить конкретный анализ в присутствии потенциально интерферирующих факторов в матрице образцов (например, антикоагулянты, гемолиз, эффекты обработки пробы) или перекрестнореагирующих антител.

Интерференция. Контролируемое исследование потенциально интерферирующих веществ или состояний показало, что на выполнение анализа не влияют антикоагулянты (цитрат натрия, ЭДТА, гепарин лития и натрия), гемолиз (вплоть до 1000 мг/дл гемоглобина), липемия (вплоть до 3000 мг/дл триглицеридов), билирубинемия (вплоть до 20 мг/дл билирубина), биотин (вплоть до 3500 нг/мл) или небольшое количество циклов заморозки-разморозки образцов.

Перекрестное взаимодействие. Как правило, наличие потенциально интерферирующих антител не дает интерференции при тестировании. Исследованные антитела: (а) иммуноглобулины к различным инфекционным агентам, таким как ЦМВ, ВЭБ, ВЗВ, вирус краснухи, *Toxoplasma gondii*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*; (б) антитела к ревматоидному фактору.

15.2. Точность

Различные образцы, содержащие различные концентрации специфических аналитов, были исследованы для изучения повторяемости и воспроизводимости (изменчивость внутри и между анализами). Изменчивость, показанная в таблицах ниже, не приведет к неправильной классификации образца.

Повторяемость	A	B	C	D
Число определений	20	20	20	20
Среднее значение (индекс)	4.2	58.4	107.5	198.0
Стандартное отклонение	0.19	2.32	4.20	10.27
К.В. (%)	4.7	4.0	3.9	5.2

Воспроизводимость	E	B	C	D
Число определений	20	20	20	20
Среднее значение (индекс)	4.7	57.8	111.5	197.4
Стандартное отклонение	0.35	3.47	9.76	8.47
К.В. (%)	7.5	6.0	8.7	4.3

15.3. Правдивость

Достоверность анализа была проверена тестом на разбавление.

Тест на разбавление. Два образца сыворотки, содержащие высокие концентрации IgG против дцДНК, были

протестированы как таковые и после серийного разбавления разбавителем образца. Измеренные концентрации IgG против дцДНК в сравнении с ожидаемыми концентрациями анализировали линейной регрессией. Коэффициенты корреляции (r) варьировались от 0,996 до 0,999.

Степень разведения	Ожидаемые концентрации, МЕ/мл	Измеренная концентрация, МЕ/мл	% Восстановления	Степень разведения	Ожидаемые концентрации, МЕ/мл	Измеренная концентрация, МЕ/мл	% Восстановления
Исходный образец	-	194,5	-	Исходный образец	-	367,6	-
1:2	97,3	86,9	89,0	1:4	91,9	86,2	94,0
1:4	48,6	48,8	100,0	1:8	46,0	40,1	87,0
1:8	24,3	24,4	100,0	1:16	23,0	20,4	89,0
1:16	12,2	13,4	111,0	1:32	11,5	10,9	95,0
1:32	6,1	6,9	113,0	1:64	5,7	5,2	90,0

15.4 Эффект переноса

Эффект переноса был исследован путем тестирования пяти отрицательных образцов до и после одного высокопозитивного образца. Полученные результаты показывают, что при использовании анализатора LIAISON® перенос не наблюдается.

15.5. Эффект высокой дозы насыщения

Всякий раз, когда тестируются образцы, содержащие чрезвычайно высокие концентрации антител, эффект насыщения может имитировать концентрации ниже реальных. Однако хорошо оптимизированный двухэтапный метод исключает сильно заниженные результаты, поскольку аналитические сигналы остаются стабильно высокими (кривая насыщения). Анализ эффекта насыщения оценивали путем тестирования трех образцов с высоким титром, положительных на IgG против дцДНК. Все образцы привели к значениям концентрации выше диапазона измерений, которые можно было бы ожидать с сыворотками с высоким титром, что указывает на отсутствие ошибочной классификации образцов.

15.6. Диагностическая специфичность и чувствительность

Диагностическая специфичность и чувствительность оценивались путем тестирования 269 образцов, отобранных из разных групп населения (случайно выбранные доноры крови; субъекты с подозрением на аутоиммунные заболевания; пациенты с клинически доказанной системной красной волчанкой). Образцы были испытаны несколькими методами сравнения, такими как контрольный анализ ELISA и радиоиммуноанализ Фарра.

2 положительных или сомнительных и 99 отрицательных результатов наблюдались в ожидаемой отрицательной популяции (доноры крови) - диагностическая специфичность: 98,0% (95% доверительный интервал: 93,0-99,8%).

16 отрицательных и 90 положительных или сомнительных результатов наблюдались в ожидаемой положительной популяции (пациенты с системной красной волчанкой) - диагностическая чувствительность: 84,9% (95% доверительный интервал: 76,6-91,1%).

Группа пациентов	№	Тест Liaison		ИФА		РИА	
		< 20 МЕ/мл (-)	> 20 МЕ/мл (± /+)	< 30 МЕ/мл (-)	> 30 МЕ/мл (± /+)	< 7 МЕ/мл (-)	> 7 МЕ/мл (+)
Доноры крови	101	99 (98,0%)	2 (2,0%)	95 (94,1%)	6 (5,9%)	99 (98,0%)	2 (2,0%)
Пациенты с другими аутоиммунными заболеваниями	62	54 (87,1%)	8 (12,9%)	51 (82,3%)	11 (17,7%)	48 (77,4%)	14 (22,6%)
Пациенты с СКВ	106	16 (15,1%)	90 (84,9%)	18 (17,0%)	88 (83,0%)	5 (4,7%)	101 (95,3%)