

# НАБОР ИФА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ АНТИ-ANA

## ORG 538, ANAScreen

Каталог. № : **ORG 538**

Методика от **08-2012**

Количество : **96**

Производитель: **Orgentec (Германия)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА – ELISA для скрининга присутствия в сыворотке или плазме антинуклеарных антител при диагностике системных заболеваний соединительной ткани. Он определяет совместно в одной ячейке АЯА направленные против антигенов SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, RNP-70, RNP/Sm, Scl-70, Centromer-B и Jo-1.

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Болезни воспаления соединительных тканей характеризуются идиопатическим происхождением в связи с нарушением клеточного и гуморального иммунитета, системным поражением органов и хроническим течением. К тому же, болезни соединительных тканей характеризуются перекрестными симптомами, что затрудняет постановку диагноза.

Предполагается, что смешанные заболевания соединительных тканей выявляют широкие серологические характеристики: присутствие антиядерных антител. Эти антитела направленные против части клеточных ядер и цитоплазмы и большинство ревматических заболеваний характеризуются присутствием одного или нескольких антиядерных антител.

Антитела к dsDNA, ssDNA, гистону, RNP и Sm ассоциируются с SLE, так как антитела к SSA/Ro и SSB/La могут появляться при SLE и синдроме Шегрена. Антитела к Jo-1 наблюдаются при полимиозите и дерматомиозите, так как антитела к Scl-70 и центомеру могут появляться в пациентов при прогрессивном системном склерозе. Анти-гистоновые антитела ассоциируются с SLE и медикаментозной волчанкой, тогда как анти-RNP антитела связаны со смешанным заболеванием соединительной ткани (MCTD) и с SLE. Антитела, направленные против центомера, ассоциируются с синдромом CREST.

Хотя иммунофлюоресцентная технология традиционно используется для определения аутоантител с Hep2 клетками, сейчас широко известно, что ELISA технология предлагает прекрасную альтернативу. Иммунофлюоресцентная технология часто приводит к ошибкам при интерпретации и очень трудоемкая при большом количестве исследуемых образцов.

Этот набор дает возможность коллективного одновременного чувствительного скрининга аутоантител, в одной ячейке, которые, возможно, присутствуют в сыворотке пациента.

### ПРИНЦИП ТЕСТА

Очищенные антигены (SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, RNP-70 kd, RNP/Sm, Scl-70, Centromer-B и Jo-1) привиты к микроячейкам. Антитела к этим антигенам, если присутствуют в разбавленной сыворотке, связываются с микроячейками. Промывание микроячеек удаляет несвязанные антитела сыворотки. Анти-человеческие IgG конъюгированный пероксидазой хрена иммунологически связываются с связанными антителами пациента, формируя конъюгат-антитело-антиген комплекс. Промывание микроячеек удаляет несвязанный конъюгат. Энзимный субстрат при присутствии связанного конъюгата гидролизуется до формирования голубого окраса. Добавления кислоты останавливает реакцию, формируя желтый конечный продукт. Интенсивность этого желтого цвета фотометрически измеряется при 450 нм.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию – **1 планшет**.
2. Калибратор, содержащий антитела к ANA в сыворотке/буферном матриксе (PBS, BSA, детергент, NaN<sub>3</sub> 0.09 %), желтого цвета. Готов к использованию. 1 флакон/15 мл

3. Отрицательный контроль в сыворотке/буферном матриксе, (PBS, BSA, детергент, NaN<sub>3</sub> 0.09 %), желтого цвета. Готов к использованию. 1 флакон/15 мл
4. Буфер образцов P, содержащий PBS, BSA, моющее средство, консервант азид натрия 0.09%, желтый, концентрат (5x). 1 флакон/20 мл.
5. Раствор ферментного конъюгата, содержит анти-человеческие антитела IgG, меченные HRP; PBS, BSA, моющее средство, консервант Проклин 0,05%, светло-красный. Готов к использованию. 1 флакон/15 мл.
6. Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию, бесцветный. - 1 флакон/15 мл.
7. Стоп раствор (содержит кислоту). Готов к использованию – 1 флакон/15 мл.
8. Буферный промывочный раствор, концентрат (50x) - 1 флакон/20 мл.
9. Инструкция по использованию – 1 шт.
10. Сертификат контроля качества – 1 шт.

### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционно: контрольный фильтр с длиной волны 620 нм
  - Программное обеспечение для ридера
  - Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объемом 100 мкл
  - Вortexный миксер
  - Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
  - Таймер
  - Дистиллированная или деионизированная вода
  - Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
  - Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора
- Наборы ORGENTEC ИФА являются подходящими для использования на открытых автоматизированных процессорах. Каждый анализ должен быть оценен на соответствующей автоматизированной системе. Подробная информация предоставляется по запросу.

### СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

- Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
- Дайте возможность крови сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием.
- Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
- Образцы должны храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20°C до шести месяцев.
- Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
- Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить набор при 2 - 8 °C
- Держать микропланшетные лунки в герметичном мешочке с осушителем.
- реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
- Не поддавать реагенты для анализа воздействию тепла, солнца или сильного света в течении хранения и использования.
- Разбавленный буфер образца и промывочный буфер стабильны по крайней мере 30 дней при 2 - 8 °C. Рекомендуется использование в тот же день.

### ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
- Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
- Все материалы следует привести к комнатной температуре.
- Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
- Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
- Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
- Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
- Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.

- Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

#### ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп-раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (NaN<sub>3</sub>) в качестве консерванта. Он способен образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с медью или свинцом. При использовании реагентов, содержащих азид натрия необходимо наличие большого количества воды. Азид натрия может быть токсичен при попадании внутрь организма. В концентрациях, присутствующих в реагентах, он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, мы настоятельно рекомендуем следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 8, 9, 10).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не отбирайте образцы ртом.
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором пережиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

##### Приготовление промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

##### Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием.

##### Приготовление образца

Разбавьте образцы пациентов 1:100 буфером для образцов перед анализом. Для этого добавьте до 10 мкл образца 990 мкл буфера для образца в пробирке из полистирола. Тщательно перемешайте. Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для контролей/калибраторов и проб пациентов.

1. Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку.  
Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °С).  
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
2. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.  
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.  
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
3. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.  
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.

4. Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.

Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Бихроматическое измерение проводите при 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Пример пипетирования:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL											
B	C-											
C	P1											
D	P2											
E	P3											
F												
G												
H												

P1... - образцы пациентов, CAL - калибратор, C - контроль отрицательный

#### ОЦЕНКА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм для Калибраторов/Контролей и результатов контролей совпадает с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

#### РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первая оптическая плотность (OD) граничного значения рассчитывается путем умножения оптической плотности калибратора на специфический тестовый фактор 0.5:

$$OD \text{ Cut-off} = OD \text{ Калибратора} * 0.5$$

Затем оптическая плотность образца сравнивается с оптической плотностью граничного значения:

Отрицательный: OD образца < OD Cut-off  
Положительный: OD образца ≥ OD Cut-off

Для более точных результатов оптическая плотность образца выражается как значение индекса:

$$\text{Индекс} = OD \text{ образца} / OD \text{ Cut-off}$$

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

##### Калибровка

Система анализа калибруется против международно признанной контрольной сыворотки от CDC, Атланта США.

##### Диапазон измерения

Не применяется.

##### Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение Cut-off Индекс 1.0

##### Интерпретация результатов

Отрицательный: Индекс < 1.0  
Пограничный: Индекс 1.0 – 1.2  
Положительный: Индекс > 1.2

##### Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образца, чтобы продемонстрировать динамический диапазон анализа. Активность для каждого разведения была рассчитана как значение Индекса.

Образец	Разведение	Полученное значение, Индекс	Ожидаемое значение, Индекс	П/О, %
1	1:100	5.8	5.8	100
	1:200	2.7	2.9	93
	1:400	1.6	1.5	110
	1:800	0.8	0.7	110
2	1:1600	0.4	0.4	106
	1:100	4.9	4.9	100
	1:200	2.7	2.5	110
	1:400	1.3	1.2	106

	1:800	0.6	0.6	98
	1:1600	0.3	0.3	90



### Предел обнаружения

Не применяется.

### Воспроизводимость

Внутри тестовая точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов из результатов 24 определений в одном анализе. Результаты для точности в пределах анализа приведены в таблице ниже.

Межсерийная точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов по результатам 6 определений в 5 различных анализах. Результаты для выполнения к запуску точности приведены в таблице ниже.

Внутри анализа		
Образец	Среднее Значение Индекса	CV [%]
1	1.1	3.5
2	1.9	2.4
3	3.2	2.2

Между анализами		
Образец	Среднее Значение Индекса	CV [%]
1	1.2	6.5
2	1.9	4.0
3	3.3	3.8

### Перекрестно реагирующие вещества

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

### Результаты исследований

Study population	n	n_Pos	%
SLE	63	60	95.2
Sjogren's Syndrome	10	10	100.0
MCTD	10	10	100.0
Poly- Dermatomyositis	8	7	87.5
Scleroderma	10	10	100.0
CREST	9	9	100.0
Normal human sera	148	3	2.0

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 538	Pos	108	3	110
	Neg	4	145	
		110	148	258

Sensitivity: 98.4 %  
Specificity: 98.0 %  
Overall agreement: 97.3 %

### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Этот анализ предназначен в качестве диагностической помощи. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах одного теста, он должен быть сделан врачом после оценки всех клинических и лабораторных исследований. Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально.

Выше указанные патологические и нормальные диапазоны для антител в образцах пациента следует рассматривать только в качестве рекомендаций. Каждая лаборатория должна установить свои собственные нормы, в соответствии с ISO 15189 или другие действующие правила лаборатории.

### СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- Добавить **100 мкл** калибратор, контроль или образец пациента  
 → Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре  
 → Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
- Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата  
 → Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре  
 → Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
- Добавить **100 мкл** раствора субстрата  
 → Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- Добавить **100 мкл** стоп раствора  
 → Выдержать **5 минут**  
 → Считать при 450 нм

### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)