

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К МУТИРОВАВШЕМУ ЦИТРУЛИНИРОВАННОМУ ВИМЕНТИНУ

ORG 548, Anti-MCV

Каталог. № : **ORG 548**
Количество : **96**
Производитель: **ORGENTEC**
Diagnostika GmbH, (Германия)

Методика от **09-2011**



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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Anti-MCV является непрямым твердофазным ферментным иммуноанализом по количественному и полуколичественному определению антител класса IgG к мутировавшему цитрулинированному виментину (MCV) в сыворотке человека. Метод предназначен только для использования в *in vitro* диагностике как помощь в диагностировании ревматоидного артрита в сочетании с другими лабораторными и клиническими исследованиями.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАЗНАЧЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) является одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний. Основной характеристикой РА является воспаление сустава, приводящее к его повреждению и потере функции. Ранняя диагностика РА и немедленное начало соответствующего лечения очень важны для предупреждения полного повреждения сустава. Диагностика РА в первую очередь основывается на клинической манифестации, до настоящего момента серологические исследования были ограничены определением аутоантител к ревматоидному фактору (RF). RF является чувствительным серологическим маркером РА, с умеренной специфичностью, около 70%. Во многих исследованиях было показано, что у RF-негативных пациентов определяются антитела к цитруллинированным аргининовым остаткам в белках филаментов.

Расщепление аргинина до цитруллина это процесс, катализируемый ферментом пептидил-аргинин дезиминазой (peptidylarginine deiminase, PAD), при котором аминокислота аргинин (Arg) преобразуется в цитруллин. В процессе модификации положительно заряженная NH₂ группа отщепляется с присоединением кислорода [4].

Набор ORGENTEC Anti-MCV ELISA обладает высокой чувствительностью и специфичностью к аутоантителам против модифицированного цитруллинированного виментина. Модифицированный цитруллинированный виментин постоянно обнаруживается в синовиальной ткани у пациентов с РА. Недавно были обнаружены выделение и модификация виментина макрофагами в зависимости от провоспалительных сигналов [12]. Титр антител к виментину у пациентов с РА строго коррелирует с показателем активности заболевания. (DAS).

ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Анализ проводится в микропланшете, в лунках которого сорбирован мутировавший цитруллинированный виментин (MCV). Если антитела к этому антигену присутствуют в разведенных образцах сыворотки, то они связываются с иммобилизованным в микрокапках антигеном. При промывке удаляются не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с аутоантителами из образцов сывороток пациентов, связавшихся с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуются комплексы конъюгат/антитело/антиген. Избыток конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизуетея с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора при этом цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG в образце.

СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Состав	Для 96 определений
Кол-во, шт.: 1	Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 модулей по 8 ячеек каждый, покрытых мутировавшим цитрулинированным виментином (MCV). Готов к использованию.
6 флаконов, 1.5 мл каждый	Калибраторы антител к анти-MCV класса IgG (A-F) в сывороточном/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0.1% (w/w)), содержащие IgG: 0; 20; 40; 100; 300; 1000 Ед/мл. Готовы к использованию.
2 флакона, 1.5 мл каждый	Контроли анти-MCV в сывороточном/буферном матриксе (PBS, BSA, NaN ₃ <0.1% (w/w)), положительный (1) и отрицательный (2); информацию о соответствующих концентрациях искать во вкладыше инструкции. Готовы к использованию.
1 флакон, 15 мл	Буфер образца (Tris, NaN ₃ <0.1% (w/w)), концентрат желтого цвета (5x).
1 флакон, 15 мл	Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300<0.5 % (v/v)), (бледно-розовый), содержит поликлональный анти-человеческий IgG; помеченный пероксидазой хрена. Готов к использованию.
1 флакон, 15 мл	Раствор субстрата TMB, Готов к использованию.
1 флакон, 15 мл	Стоп раствор (содержит кислоту). Готов к использованию.
1 флакон, 20 мл	Промывочный раствор (PBS, NaN ₃ <<0.1% (w/w)), концентрат (50x).

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Считывающее устройство микропланшета, снимающее показатели конечной точки с длиной волны 450 нм
- Многоканальный дозатор или пипетка для дозирования на 100 мкл
- Вихревая мешалка
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Лабораторное часовое устройство (60 минут)
- Программное обеспечение по обработке данных
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Мерный цилиндр на 100 и 1000 мл
- Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

ЗАБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦОМ

1. Провести забор образцов цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
2. Дать крови возможность свернуться и отделить сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать загрязнения гемолизом или липемией, но не вмешиваться в проведение теста.
4. Образцы должны храниться при 2-8 °C до 5 дней или при -20 °C до шести месяцев.
5. Избегать повторного замораживания и размораживания образцов сыворотки и мочи. Это может привести к потере активности протеина.
6. Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °C.
2. Хранить ячейки микропланшета запечатанными в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности.
4. Не поддавать реагенты влиянию жары, солнца или сильного света во время хранения или использования.
5. Разбавленный буфер образцов и моющий буфер стабильны до 30 дней при хранении при 2-8 °C.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Исследования, проведенные для демонстрации работы теста, основаны на тестировании одиночного образца, дублирование измерений не требуется.
2. Не использовать компоненты набора после окончания срока годности.
3. Не менять компоненты набора между разными лотами.
4. Все материалы следует привести к комнатной температуре (20-28 °C).
5. Все реагенты должны быть готовы перед началом проведения анализа. После начала, анализ необходимо проводить беспрерывно для получения надежных и точных результатов.

- Проводить все шаги анализа в указанном порядке.
- Всегда использовать свежеразбавленные образцы.
- Пипетировать все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Для предотвращения загрязнения менять 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 в определенное время.
- Контрольная сыворотка или фонд должны анализироваться в плановом порядке, как неизвестные, для проверки работы реагентов и анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей, на этикетках флаконов указаны соответствующие концентрации. Используя эти концентрации, может быть вычислена калибровочная кривая для полуколичественного считывания результатов пациента.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты, содержащие человеческую сыворотку, были протестированы и найдены отрицательными к Вирусу Гепатита В, Гепатита С, ВИЧ 1 и ВИЧ 2. Тестируемые методы были одобрены FDA. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN₃) является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации 0/09 % в продукте, тем не менее, не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности (8,9,10).
- Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
- Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Придерживаться установленных правил для проведения контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контролей и/или объединенной сыворотки. При работе со всеми реагентами, контролями и образцами сыворотки соблюдать существующие правовые нормы.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера образца

Разбавить содержимое каждого флакона концентрата буфера образца (5x) с дистиллированной или ионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием.

Приготовление промывочного раствора

Разбавить содержимое каждого флакона концентрата промывочного раствора (50x) с дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

Приготовление образца

Разбавить все образцы пациента в соотношении 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Для этого смешайте 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в полистироловых пробирках. Смешать хорошо. Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Подготовить достаточное количество модулей микропланшета для помещения контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов.

- Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки. Мы рекомендуем тестировать калибраторы и контроли в

дублях для большей достоверности. Разница между дублированными результатами не должна превышать $\pm 10\%$. Дублирование тестирования для образцов не требуется. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (20-28 °C). Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора.

- Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку. Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре. Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора.
- Добавить **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку. Инкубировать 15 ± 2 минуты при комнатной температуре.
- Добавить **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку модулей и инкубировать 5 минут при комнатной температуре. Считать оптическую плотность при 450 нм и рассчитать результаты. Бихроматическое измерение проводить при 600-690 нм (рекомендуется). Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считать оптическую плотность за это время.

A	SA	P1		
B	SB	P2		
C	SC	P3		
D	SD	P4		
E	SE	P5		
F	SF	P6		
G	C1	P..		
H	C2	P..		

SA-SF: стандарты от А до F
P1,P2..образцы пациентов 1,2
C1: положительный контроль
C2: отрицательный контроль

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Этот тест является действительным только, если оптическая плотность при 450 \pm 10 нм для Положительного Контроля (1) и Отрицательного Контроля (2), а также для Калибратора А и F, совпадает с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате Контроля Качества, содержащимся в каждом наборе! Если какие-либо критерии не соблюдены, исследование считается недействительным и должно быть повторено.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычисление результатов

Для Анти-MCV ИФА рекомендуется метод 4-параметрической регрессии с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

Рекомендуемая линейно-логарифмическая диаграмма

Использовать линейно-логарифмическую миллиметровку и отложить среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Провести оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Калибровочные точки также могут быть соединены в участки прямых линий. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

Пример вычисления

Указанные ниже значения являются типичными для Анти-MCV ИФА. Эти данные предназначены только для иллюстрации и не могут быть использованы для вычисления результатов пациентов.

№	Позиция	OD	Концентрация	Установленная концентрация
Калибратор А	A1	0.027	0	0
Калибратор В	B1	0.163	20.9	20
Калибратор С	C1	0.296	40.4	40
Калибратор D	D1	0.655	98.2	100
Калибратор E	E1	1.460	303.1	300
Калибратор F	F1	2.326	997.5	1000
Контроль 1	G1	1.154	203.8	
Контроль 2	H1	0.058	5.1	

Интерпретация результатов

При изучении нормального диапазона использовались образцы сыворотки здоровых пациентов, и был установлен следующий диапазон значений:

Анти-MCV [Ед/мл]: нормальный = <20, положительный = ≥ 20

Положительные результаты должны оцениваться на фоне общего клинического статуса пациента. Также каждое терапевтическое решение должно приниматься индивидуально.

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных и патологических значений антител анти-MCV в сыворотке. Вышеуказанные контрольные значения должны приниматься только как рекомендательные.

Калибровка

Так как нет Международной контрольной подготовки для антител к Анти-MCV, система калибрована в произвольных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Величины, полученные в результате данного анализа, предназначены только как помощь в диагностике. Точный клинический диагноз не должен быть основан на результатах одного теста, но должен быть установлен врачом после всех клинических и лабораторных исследований.
2. Отрицательный результат анти-МСV не исключает наличия заболевания.
3. Антитела от разных пациентов могут иметь различные авидитеты. Парные сыворотки для серологических исследований в одно и тоже время и при одинаковых условиях дадут лучшие указания на процесс заболевания.
4. Оптимальные результаты будут достигнуты только при строгом соблюдении инструкции.
5. Использовать только свежие образцы сыворотки или образцы, замороженные и оттаянные только один раз. Образцы, хранившиеся неправильно, или подвергавшиеся многократному замораживанию-оттаиванию, могут давать ложные результаты.
6. Воспроизводимые результаты зависят от правильного пипетирования, контроля за инкубационным временем и температурой, а также от промывания тестовых полосок и тщательного перемешивания всех приготовленных растворов.
7. Не царапать лунки во время промывания и аспирации. Промывать и заполнять лунки реагентами с осторожностью. Во время промывания проверить, заполнены ли все лунки равномерно с промывочным раствором, и что в лунках нет остатков.
8. Соблюдать инструкции по использованию надлежащих фотометров; проверить установку правильной длины волны и контрольной длины волны соответственно.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При предельном уровне cut-off > 20 Ед/мл, 1 образец был положительным со специфичностью 99.5 %.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая Чувствительность (Limit of blank)

Буфер для образцов был разбавлен в соответствии с инструкциями и были проведены измерения 32 раза на одной пластине. Предел обнаружения был вычислен как среднее значение оптической плотности (OD) буфера для образцов плюс 3 SD и выражается эта величина в Ед/мл. Критерий приемочной оценки: Аналитическая чувствительность должна быть < 1 Ед/мл. Среднее значение + 3 SD было 0.044 OD для буфера для образцов, что соответствовало аналитической чувствительности 0.6 Ед/мл.

Предел обнаружения (LOD)

Предел обнаружения был составлен 1 Ед/мл.

Интерферирующие вещества

Интерференция билирубина, гемолиза и липемии была оценена с использованием отрицательной сыворотки, низко положительной сыворотки и высоко положительной сыворотки, разбавленных с соответствующей интерферирующей субстанцией в возрастающих концентрациях. Гемолиз (до 1000 мг/дл), билирубин (до 40 мг/дл) и липемия (концентрация триглицеридов) (до 3000 мг/дл) в человеческой сыворотке не влияют на результаты данного анализа.

Воспроизводимость

Внутрисерийный анализ

Внутрисерийная воспроизводимость была определена повторением 24 измерений трех образцов с использованием набора Анти-МСV. Точность в пределах анализа показана ниже:

Межсерийный анализ

Точность от анализа к анализу была определена по результатам 6 различных анализов при 5 исследованиях 3 образцов. Среднее значение, Стандартное отклонение и Коэффициент вариативности десяти измерений приведены ниже:

Intra-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	22.7	6.2
2	118.8	6.4
3	548.1	4.6

Inter-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	20.2	5.3
2	111.0	9.2
3	451.6	7.7

Линейность

Sample	Dilution	Observed U/ml	Expected U/ml	O/E [%]
1	1:100	882.8	882.8	100
	1:200	386.0	441.4	87
	1:400	205.2	220.7	93
	1:800	110.7	110.4	100
	1:1600	52.2	55.2	95
2	1:100	932.1	932.1	100
	1:200	486.0	466.1	104
	1:400	250.1	233.0	107
	1:800	126.6	116.5	109
	1:1600	61.7	58.3	106
3	1:100	727.9	727.9	100
	1:200	362.4	364.0	100
	1:400	178.2	182.0	98
	1:800	85.7	91.0	94
	1:1600	47.1	45.5	104

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Study population	n	n Pos	%
Rheumatoid Arthritis	490	398	81.2
Other diseases	522	14	2.7
Normal human sera	234	1	0.4

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 548	Pos	398	15	1248
	Neg	92	741	
		490	756	

Sensitivity: 81.2 %
Specificity: 98.0 %
Overall agreement: 91.4 %

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- 1 Пипетировать 100 мкл калибратора, контроля или образца пациента
 → Инкубировать 30 минут при комнатной температуре
 → Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с 300 мкл промывочного раствора
- 2 Пипетировать 100 мкл ферментного конъюгата
 → Инкубировать 15 минут при комнатной температуре
 → Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с 300 мкл промывочного раствора
- 3 Пипетировать 100 мкл раствора Субстрата
 → Инкубировать 15 минут при комнатной температуре
- 4 Добавить 100 мкл Стоп раствора
 → Выдержать 5 минут
 → Считать результат 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
www.diameb.com