

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG АУТОАНТИТЕЛ К ЦИКЛИЧЕСКОМУ ЦИТРУЛЛИНИРОВАННОМУ ПЕПТИДУ (ССР)

ORG 601, Anti-CCP hs

Каталог. № : **ORG 601**

Методика от **08-2012**

Количество : **96**

Производитель: **ORGENTEC
GmbH, (Германия)**



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

НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Anti-CCP является непрямым ферментным иммуноанализом твердой фазы (ELISA) для количественного измерения аутоантител класса IgG к циклическому цитруллинированному пептиду в человеческой сыворотке или плазме. Анализ предназначен только для использования в *in vitro* диагностике.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Высокоочищенный белок циклического цитруллинированного виментина (ССР) нанесен в лунки.

Антитела к нанесенным антигенам, если присутствуют в разбавленной пробе пациента, связываются с соответствующим антигеном. Промыванием микролунок удаляются несвязанные неспецифические компоненты сыворотки и плазмы. Античеловеческие антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), иммунологически обнаруживают связанные антитела пациента, формируя комплекс конъюгат/антитело/антиген. Промывание микролунок удаляет несвязанный конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизует с образованием синей окраски. Добавление кислоты останавливает реакцию, формируя конечный продукт желтого цвета. Интенсивность этого желтого цвета фотометрически измеряется при 450 нм. Количество цвета прямо пропорционально концентрации антител, присутствующих в исходном образце.

ОБОБЩЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА (См. оригинал инструкции).

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. – **1 планшет**. Готов к использованию.
2. **Калибраторы А-Ф** в сыворотке/буферном матриксе, содержащие 0; 20; 40; 100; 300 и 1000 Ед/мл – **6 флаконов, 1,5 мл каждый**. Готовы к использованию.
3. Контроли в сыворотке/буферном матриксе (**положительный и отрицательный**), для соответственной концентрации в приложении пакета внутри – **2 флакона, 1,5 мл каждый**. Готов к использованию.
4. **Буфер образцов**, желтый, **концентрат (5x)** - **1 флакон, 15 мл**.
5. Раствор **ферментного конъюгата** (бледно красный), содержащий анти-человеческие-IgG, меченые пероксидазой хрена - **1 флакон, 15 мл**. Готов к использованию.
6. **Раствор субстрата ТМБ** - **1 флакон, 15 мл**. Готов к использованию.
7. **Стоп-раствор** – **1 флакон, 15 мл**. Готов к использованию.
8. **Буферный промывочный раствор, концентрат (50x)** - **1 флакон, 20 мл**.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный считыватель с длиной волны измерения 450 нм.
2. Программное обеспечение.
3. Многоканальный диспенсер или пипетка для дозирования на 100 мкл.
4. Вихревой миксер.
5. Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл.
6. Лабораторное часовое устройство.
7. Дистиллированная или неионизированная вода.
8. Мерный цилиндр на 100 и 1000 мл;

9. Пластмассовый 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

1. Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
2. Дайте возможность крови сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
4. Образцы должны храниться при 2-8⁰С до 5 дней или при -20⁰С до шести месяцев.
5. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
6. Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
2. Не меняйте компоненты набора между разными партиями.
3. Все материалы следует привести к комнатной температуре (20-28⁰С).
4. Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить беспрерывно для получения надежных и точных результатов.
5. Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
6. Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
8. Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
9. Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
10. Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
11. Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
12. Не используйте повторно ячейки микропланшета.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроли и/или пулов сыворотки.
- Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в их оригинальной упаковке.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов. Необходимо контролировать сроки годности, предоставленные на этикетках коробок и флаконов. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
- Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры перед использованием и хорошо перемешайте их.
- В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами сыворотки соблюдайте официальные правила. При обращении с потенциально инфекционно опасными материалами должны выполняться следующие предосторожности:
 - в помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить;
 - не отбирайте образцы ртом;
 - при обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

- 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 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.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление промывочного раствора

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

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона (x5) буфера для образцов дистиллированной 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. Примечание: Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество полосок для постановки калибраторов, контролей и предварительно разбавленных проб пациентов.

1. Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку.
Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °C).
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	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

P1, ... patient sample A-F calibrators C+, C- controls

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.

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественного вычисления результатов пациентов концентрация контролей может быть использована для создания калибровочной кривой. Концентрация неизвестных показателей может быть вычислена с помощью этой калибровочной кривой.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Калибровка

Эта система анализа откалибрована в относительных условных единицах. Она откалибрована относительно внешнего анализа анти-ССР, так как на сегодняшний день нет никаких международных контрольных сывороток для РА диагностики.

Диапазон измерения

Диапазон составляет 0- 1000 Ед/мл

Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение 20 Ед/мл

Интерпретация результатов

Отрицательный: < 20 Ед / мл

Положительный: ≥ 20 Ед / мл

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 с помощью SMC® Technology.

Sample	Dilution	Observed	Expected	O/E
		U/ml	U/ml	[%]
1	1:100	1109.2	1109.2	100
	1:200	467.3	550.0	85
	1:400	245.4	275.0	89
	1:800	115.0	137.5	84
	1:1600	57.1	68.9	83
	1:3200	31.4	29.7	106
2	1:6400	14.4	14.9	97
	1:12800	7.6	7.4	103
	1:100	320.4	320.4	100
	1:200	165.0	174.9	94
	1:400	94.8	87.4	108
	1:800	48.4	43.7	111
3	1:1600	24.6	21.9	112
	1:100	122.1	122.1	100
	1:200	61.0	59.3	103
	1:400	31.3	29.7	105
	1:800	14.5	14.8	98
	1:1600	7.5	7.4	101

Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила: 1 Ед/мл.

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.

Sample	Intra-Assay	
	Mean U/ml	CV %
1	18.6	7.8
2	83.8	6.0
3	297.5	8.6

Sample	Inter-Assay	
	Mean U/ml	CV %
1	26.4	9.9
2	75.9	7.9
3	304.7	9.6

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

<u>Study population</u>	<u>n</u>	<u>n Pos</u>	<u>%</u>
Rheumatoid Arthritis	259	237	91.5
Other Arthritis	22	6	27.3
Other rheumatic disease	37	1	2.7
Healthy controls	118	1	0.8

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 601	Pos	237	8	259
	Neg	22	169	
		259	177	436

Sensitivity: 91.5 %
Specificity: 95.5 %
Overall agreement: 93.1 %

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

1. Добавить **100 мкл** калибратор, контроль или образец пациента
 - Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
 - Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
2. Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата
 - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
 - Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
3. Добавить **100 мкл** раствора субстрата
 - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
4. 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
www.diameb.com