

## НАБОР

# ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТА НА МЕМБРАНЕ

### ORG 710, ANA-9-Line

Каталог. № : **ORG 710**

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.

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для полуколичественного определения аутоантител класса G к экстрагируемым ядерным антигенам (ENAs): SS-A 52, SS-A 60, SS-B, RNP/Sm, Sm, центромера B, Jo-1, Scl-70 и рибосомальные белки. Анализ предназначен для диагностики *in vitro* аутоиммунных заболеваний.

#### КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Системные аутоиммунные заболевания мультифакторны в клинических проявлениях и имеют большое количество сходных симптомов. Для диагностики аутоиммунных ревматических заболеваний с целью чёткой интерпретации результатов необходимо ограничить группу больных только пациентами с очевидными признаками аутоиммунного заболевания. Присутствие аутоантител против обычно недоступных антигенов (цитоплазмы, нуклеоплазмы, ядерного матрикса и нуклеосом) - фактически один из признаков системного аутоиммунного заболевания (Tap, 1988; Sturgess, 1992).

В последнее время выяснилось, что системные заболевания можно дифференцировать по их профилю антиядерных антител (ANA). Существует тесная корреляция между профилем присутствующих ANA и конкретным заболеванием, что делает их идеальным диагностическим маркером (Mongey и Hess, 1991; Von Muhlen, 1995). Кроме того, при детекции ANA с использованием теста непрямой иммунофлуоресценции (IFA) на HEp-2 клетках рекомендуется или необходима дальнейшая иммунологическая дифференцировка (Pollock, 1999; Tap и другие, 1997) по причинам:

- различной специфичности половины (50%) IFA-положительных сывороток;
- образцы от «здоровых лиц», положительные в IFA-тесте, отрицательны при анализе диагностически значимых специфических антител;
- отрицательный IFA-тест не исключает наличия некоторых специфических антител к экстрагируемым ядерным антигенам (ENA);
- вариабельность интерпретации IFA-теста между лабораториями находится в пределах 36-51% коэффициента вариации (Tap и другие, 1997).

Превосходные чувствительность и специфичность системы иммуноблот достигаются благодаря использованию очищенных или рекомбинантных антигенов и делают этот метод важным диагностическим инструментом в клинической лаборатории для обнаружения ANA (Carey, 1997).

Наиболее распространённые ассоциированные с наличием ANA болезни:

#### Тип специфических антител Ассоциированное заболевание

Jo-1	Полимйозит/дерматомиозит
Scl-70	Склеродермия
Centromere B	CREST-синдром
SS-A/RO	SS, СКВ (20-30) %, НВ
SS-B/LA	СКВ, SS
U1-RNP	СКВ, СЗСС
SmBB', SmD	СКВ
Рибосомальные белки	СКВ (иногда этот вид антител связывают с нейropsychическими заболеваниями)

Сокращения: СКВ – системная красная волчанка; СЗСС – смешанное заболевание соединительной ткани; РА- ревматоидный артрит; SS – синдром Шегрена; НВ- неонатальная волчанка; CREST-синдром – синдром, включающий кальциноз (С), феномен Рейно (R),

нарушение моторики пищевода (Е), склеродактилию (S) и телеангиэктазию (Т).

#### ПРИНЦИП МЕТОДА

Высоко очищенные экстрагированные ядерные антигены связаны с нитроцеллюлозной мембраной в форме полосок.

Антитела к этим антигенам, присутствующие в разведенной сыворотке или плазме, связываются с мембраной. При промывке с мембранных стрипов удаляются неспецифические компоненты сыворотки или плазмы. Щелочная фосфатаза, конъюгированная с антителами к IgG человека, иммунологически выявляет связавшиеся антитела, присутствовавшие в сыворотке или плазме пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитела/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляется несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизует с образованием нерастворимого сине-фиолетового продукта. При промывке с мембранных стрипов удаляется не гидролизовавшийся субстрат. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствовавших в исходном образце.

#### 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 HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами данного набора, содержащими компоненты человеческого происхождения, следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат / р-нитро голубой тетразол хлорид. Если BCIP/NBT попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. 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 (0.09%), он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, настоятельно рекомендуется следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 7, 8, 9).
6. 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.
7. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
8. Не пипетируйте ртом
9. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить или пользоваться косметикой.

#### СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегайте гемолиза.
2. Отделите сыворотку от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C до 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагретым образцов сыворотки.

#### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Нитроцеллюлозные стрипы, каждый содержит очищенные или рекомбинантные антигены. Готовы для использования.	8 или 16
Разбавляющий буфер для образцов. Готов для использования.	1 флакон, 20 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат, 50x	1 флакон, 20 мл
Ферментный конъюгат, содержащий	1 флакон, 15 мл

поликлональные кроличьи анти-человеческие анти-IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой (содержит фосфатно-солевой буфер, NaN <sub>3</sub> <0,1 % (w/w), розового цвета). Готов для использования.	
Субстратный раствор BCIP/NBT. Готов для использования.	1 или 2 флакона, 13 мл
Нитроцеллюлозный калибровочный стрип (меченый CAL) для полуколичественной оценки.	1 или 2
Ванночки с инкубационными камерами для стрипов	1 или 2
Бланк-трафарет для учёта результатов анализа	1 или 2

#### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Пипетки на 10, 500 и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- Качающаяся платформа
- Пинцет
- Дистиллированная вода
- Мерный цилиндр на 1000 мл

#### ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2-8 °С в их оригинальной упаковке
2. Храните нитроцеллюлозные стрипы в хорошо запечатанном пластиковом контейнере, с осушителем.
3. **Важно:** Калибровочный стрип очень чувствителен к свету. Пожалуйста, храните его в темноте.
4. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
5. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться во время работы или хранения.
6. Разведенные буфер для промывок стабилен при 2-8°С по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

#### ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°С) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Для избегания перекрестной контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
8. С нитроцеллюлозными стрипами необходимо работать в перчатках или с помощью пинцета.
9. Необходимо точно соблюдать время всех инкубации
10. Контрольные сыворотки или пулы должны всегда анализироваться совместно с остальными образцами, при тех же условиях, для проверки качества выполнения методики и реагентов.
11. Убедитесь, что на стрипе во время инкубации нет пузырьков воздуха. Наличие пузырьков может привести к неравномерному окрашиванию бендов и неправильной интерпретации результатов.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНИЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

##### Приготовление буфера для промывок

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

##### Разбавитель

Готов к использованию.

##### Подготовка образцов

См. раздел Процедура теста. Эффективное разбавление составляет 1:101.

#### ПРОЦЕДУРА ИММУНОБЛОТА

Осторожно вставьте стрип с помощью пинцета в инкубационную камеру:

- затем добавьте **1,0 мл Разбавляющего буфера для образцов** в каждую камеру.

- Позвольте системе уравниваться в течение 5 минут при медленном покачивании.
- Добавьте **10 мкл сыворотки пациента** прямо в инкубационную камеру.
- Инкубируйте в течение **60 минут** в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
- Осторожно полностью удалите раствор со стрипов.
- Добавьте 2.0 мл Промывочного буфера, инкубируйте в течение 5 минут.
- Удалите как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.

- Добавьте **1,0 мл Ферментного конъюгата** в каждую инкубационную камеру.
- Инкубируйте в течение **30 минут** в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
- Полностью удалите раствор конъюгата со стрипа.
- Добавьте 2.0 мл Промывочного буфера, инкубируйте в течение 5 минут.
- Удалите как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.

- Добавьте **1.0 мл Субстратного раствора** на каждый стрип.
- Инкубируйте в течение **10 минут** в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
- Удалите Субстрат и промойте стрипы дистиллированной водой три раза, замачивая на 5 минут каждый раз для остановки реакции.
- Осторожно просушите стрипы промакиванием на бумажном полотенце.
- Позвольте стрипам полностью высохнуть на воздухе перед оценкой результатов.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

##### Контроль качества

Тест достоверен при условии, что Сывороточный контроль (первая полоса), Контроль конъюгата (вторая полоса) и Cut-Off контроль (третья полоса) изменили цвет в пределах реактивной полосы. Если эти критерии не выполнены, результат недействителен и анализ необходимо повторить.

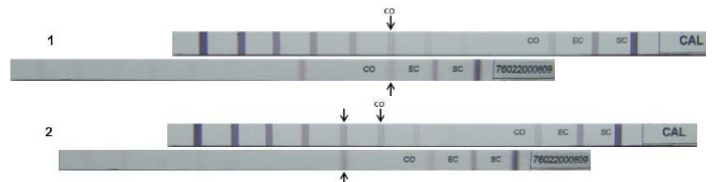
##### Интерпретация результатов

Антигены сорбированы на мембране в порядке, показанном на рисунке ниже.



Окраска полос сравнивается с окраской полос Калибровочного стрипа следующим образом:

1. Сравните полосу Cut-Off контроля на рабочем стрипе с полосой Cut-Off контроля Калибровочного стрипа.
2. Сравните полосы, сорбированные антигенами, на рабочем стрипе с калибровочными полосами на Калибровочном стрипе для полуколичественной оценки.



Замечания по интерпретации результатов пациентов:

1. Этот тест - полуколичественный анализ для определения специфических аутоантител в сыворотке пациентов, позволяющий различать отрицательные, пограничные, слабо положительные, положительные и высоко положительные результаты. Образцы с пограничными результатами необходимо проанализировать повторно или проверить альтернативными методами.
2. Сыворотка пациентов со многими аутоиммунными ревматологическими заболеваниями часто содержит специфические аутоантитела одновременно ко многим аутоантигенам. Такой конкретный образец может дать положительную реакцию с более чем одной полосой в этом анализе.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

##### Калибровка

Система анализа откалибрована по международно признанной контрольной сыворотке от CDC, Атланта, США.

#### Диапазон измерения

Оценка интенсивности синих линий, описанных выше, позволяет провести полуколичественное определение аутоантител класса IgG в образце, протестированном в количественных диапазонах:  
отрицательный, пограничный, слабый положительный, позитивный, сильный положительный.

#### Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены в этом анализе. Cut-off: пограничное значение

#### Интерпретация результатов

Нормальный: отрицательный

Повышенный: слабоположительный, положительный, сильно положительный

#### Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образцов. Активность каждого шага разбавления определяли с использованием калибровочной полосы.

Linearity				
Sample	Dilution	Observed	Expected	O/E
1	1:100	strong positive	strong positive	PASS
.	1:200	positive	positive	PASS
.	1:400	weak positive	weak positive	PASS
.	1:800	borderline	borderline	PASS
.	1:1600	negative	negative	PASS
2	1:100	strong positive	strong positive	PASS
.	1:200	positive	positive	PASS
.	1:400	weak positive	weak positive	PASS
.	1:800	borderline	borderline	PASS
.	1:1600	negative	negative	PASS

#### Чувствительность

Этот анализ иммуноблоттинга является полуколичественным методом анализа. Любая реактивность меньше граничной считается отрицательной.

#### 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.

Intra-Assay		
Sample	Mean	Result
1	negative	PASS
2	weak	PASS
3	positive	PASS

Inter-Assay		
Sample	Mean	Result
1	negative	PASS
2	weak	PASS
3	positive	PASS

#### 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.

Study population	n	n pos	%
SLE	25	19	76.0
Sjogren's Syndrome	15	14	93.3
MCTD	10	9	90.0
Scleroderma	5	5	100.0
CREST	5	5	100.0
Disease controls (Rheumatoid normal human sera	20	1	5.0
	80	2	2.5

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 710	Pos	52	3	160
ANA-9-Line	Neg	8	97	
		60	100	
Sensitivity:		86.7	%	
Specificity:		97.0	%	
Overall agreement:		93.1	%	

#### ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

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

#### СХЕМА ИНКУБАЦИИ ANA – 9 - Line

- Вставьте **блот-стрип** в инкубационную камеру.
  - ➔ Добавьте **1000 мкл** Разбавляющего буфера для образцов в инкубационную камеру.
  - ➔ Инкубируйте с перемешиванием в течение **5 минут**.
- Добавьте **10 мкл** сыворотки пациента и ресуспендируйте.
  - ➔ Инкубируйте с перемешиванием в течение **60 минут**.
  - ➔ Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по **5 минут 2000 мкл** Промывочного буфера, удалите Промывочный буфер.
- Добавьте **1000 мкл** Ферментного конъюгата на стрип.
  - ➔ Инкубируйте с перемешиванием в течение **30 минут**.
  - ➔ Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по **5 минут 2000 мкл** Промывочного буфера, удалите Промывочный буфер.
- Добавьте **1000 мкл** Субстрата на стрип
  - ➔ Инкубируйте с перемешиванием в течение **10 минут**
  - ➔ Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по **5 минут 1000 мкл дистиллированной воды**, высушите блот-стрип. Считайте результаты только после полного высыхания стрипа.



#### 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)