

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ РОЗДІЛЬНОГО НАПІВКІЛЬКІСНОГО І ЯКІСНОГО ВІЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО ANCA Pro

### 3301, Aeskulisa ANCA Pro

Каталог. №: 3301

Методика від 28-08-2007

Кількість : 96

Версія 002

Виробник : AESKU. Diagnostics,

(Німеччина)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

#### 1. Призначення

**AESKULISA ANCA Pro** є твердофазним імуноферментним аналізом з використанням високоочищеної нативної мієлопероксидази (MPO) та протеїнази 3 (PR3) з периферійних поліморфноядерних клітин крові людини і нативних Катепсина G, Еластази, Лактоферрину, Лізоциму і ВРІ (білок зі зростаючою бактеріальною проникністю) людини для роздільного напівкількісного і якісного виявлення антитіл проти цих антигенів в сироватці крові людини.

Аналіз є інструментом в діагностиці аутоімунного системного васкуліту.

#### 2. Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

##### Принцип тесту

Зразки сироватки, розбавлені 1:101, інкубують в мікропланшетах з внесенням конкретного антигена. Антитіла пацієнта, якщо вони присутні в зразку, зв'язуються з антигеном. Незв'язана фракція вимивається на наступній стадії. Потім анти-людський імуноглобулін, кон'югований з пероксидазою хрому (кон'югат), інкубують і відбувається реакція з комплексом антиген-антитіло в зразках в мікропланшетах. Незв'язаний кон'югат вимивається на наступній стадії. Додавання ТМВ субстрату генерує ферментативну колориметричну (синій колір) реакцію, яка зупиняється розведеною кислотою (колір змінюється на жовтий). Швидкість утворення кольору від хромогену є функцією кількості кон'югату, пов'язаного з комплексом антиген-антитіло, і вона пропорційна початковій концентрації відповідних антитіл у зразку пацієнта.

#### 3. Комплект поставки

##### Мають бути відновлені:

5x Буфер для зразків 1 флакон, 20 мл - 5x концентрований (білий ковпачок: жовтий розчин)  
Містить: Тріс, NaCl, BSA, азид натрію <0,1% (консервант)

50x Промивний буфер 1 флакон, 20 мл - 50x концентрований (білий ковпачок: зелений розчин)  
Містить: Тріс, NaCl, Твін 20, азид натрію <0,1% (консервант)

##### Готові до використання:

Калібратори А-D 4 флакона, 1,5 мл кожен 0, 10, 30, 100 Од/мл (білий ковпачок: жовтий розчин)

Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)

Калібратор Cut-off 1 флакон, 1,5 мл (синій ковпачок: жовтий розчин)  
Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)

Кон'югат 1 флакон, 15 мл IgG (синій ковпачок: синій розчин)  
Містить: Анти-імуноглобуліни людини, кон'юговані з пероксидазою хрому

Субстрат ТМВ 1 флакон, 15 мл (чорний ковпачок)  
Містить: стабілізований ТМВ/Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>

Стоп Розчин 1 флакон, 15 мл (білий ковпачок: безбарвний розчин)  
Містить: 1 М соляної кислоти

Мікропланшет 12 x 8-лункових смужок, які відокремлюються  
Покриття див. пункт 1

#### Необхідні матеріали, що не постачаються:

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Скляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, піпетки прецизійні (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) або регульована мультипіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір.

Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur.Ph. 4-е вид).

#### 4. Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини стабільні протягом 1 місяця при температурі +4 °C/39 °F, як мінімум.

**Реагенти і мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на ТМВ розчин. Зберігайте мікропланшети в призначеній для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте.**

#### 5. Заходи безпеки використання

##### 5.1 Небезпека для здоров'я

**Цей продукт призначений тільки ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO.** Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормального використання, притримуйтесь наступних заходів для максимальної безпеки:

##### Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички.

УВАГА! Калібратори, Контролі та Буфери містять азид натрію (NaN<sub>3</sub>) як консервант. NaN<sub>3</sub> може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN<sub>3</sub> може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні, змити з великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів. Будь ласка, зверніться до процедур дезактивації, як це вкладено CDC або до інших місцевих/національних керівних принципів.

Не паліть, не їжте і не пийте при роботі з набором.

Не піпетувати ротом.

Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад) був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог.

##### 5.2 Загальні зауваження щодо використання

Не змішуйте і не замініюйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-32 °C/68-89.6 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

**Інкубація: Ми рекомендуємо проводити тест при 30 °C/86 °F для автоматизованих систем.**

Ніколи не піддавайте компоненти більш високій температурі, ніж 37 °C/98.6 °F.

Завжди проводити піпетування розчину субстрату тільки з новими наконечниками. Захищати цей реагент від світла. Ніколи не піпетувати кон'югат з наконечниками, які використовувались з іншими реагентами до цього.

#### 6. Відбір проб, Використання та зберігання

Використовуйте переважно зібрані нещодавно зразки сироватки. Забір крові повинен проводитись відповідно до державних вимог.

Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Сироватка з частками повинна бути очищена центрифугуванням з низькою швидкістю (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати відразу, зберігати щільно закритими при температурі 2-8 °C/35-46 °F до трьох днів і замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

## 7. Процедура аналізу

### 7.1 Підготовчі заходи перед піпетуванням

Розвести концентровані реагенти:

Розвести концентрований буфер для взірців 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

### Зразки:

Розвести зразки сироватки 1:101 буфером для зразка (1x)

Наприклад, 1000 мкл буфера для зразків (1x) + 10 мкл сироватки. Добре перемішати!

### Промивання:

Підготувати 20 мл розведеного промивного буфера (1x) на 8 лунок або 200 мл на 96 лунок

Наприклад, 4 мл концентрату плюс 196 мл дистильованої води.

### Автоматизоване промивання:

Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

### Ручне промивання:

Видалити рідини з лунок перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку, почекаати 20 секунд. Повторити всю процедуру ще два рази.

### Мікропланшети:

Розрахуйте кількість лунок, необхідних для випробування. Видалити зайві лунки з рами, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, (2-8 °C/35-46 °F).

### 7.2 Проведення тестування

Схема піпетування: див. Додаток А, процедура випробування: див. Додаток В  
Ми рекомендуємо піпетування зразків і калібраторів у двох примірниках. Cut-off Калібратор повинен використовуватися тільки для якісного визначення.

- Внесіть 100 мкл розведеної сироватки кожного пацієнта в призначені лунки.
- Внесіть 100 мкл калібраторів або Cut-off Калібратора та Негативний і Позитивний контроль в призначені лунки.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл кон'югату в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл ТМБ субстрату в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F, захищеному від інтенсивного світла.
- Внесіть 100 мкл стоп розчину в кожну лунку, використовуючи той же порядок, як при піпетуванні субстрату.
- Інкубуйте 5 хвилин мінімум.
- Агітувати пластину ретельно протягом 5 сек.
- Зчитати абсорбцію при 450 нм (опційно 450/620 нм) протягом 30 хвилин.

### 8. Якісна та Напівкількісна Інтерпретація

Для напівкількісної інтерпретації побудувати стандартну криву, відклавши оптичну щільність (OD) кожного калібратора (вісь Y) по відношенню до відповідних значень концентрації в Од/мл (вісь X). Для досягнення найкращих результатів ми рекомендуємо використання log<sub>10</sub>/ln координат та 4-Параметрове налаштування. З OD кожного зразка зчитати відповідні концентрації антитіл, виражені в Од/мл.

### Приклад стандартної кривої

Ми рекомендуємо піпетування калібратора Cut-off паралельно у кожній постановці.

Калібратори/IgG	OD 450/620 нм
0 Од/мл	0.035
10 Од/мл	0.329
30 Од/мл	0.721
100 Од/мл	1.578
Cut-off калібратор	
15 Од/мл	0.45 OD

Нормальний діапазон	Сумнівний діапазон	Позитивні результати
< 12 Од/мл	12-18 Од/мл	> 18 Од/мл

### Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат якісний	Результат (Од/мл) напівкількісний
P 01	0.188/1.186	0.187	Негативний	5.0
P 02	1.334/1.335	1.335	Позитивний	71.4

### Не використовувати цей приклад для інтерпретації результатів пацієнтів!

Дані, характерні для конкретного лоту, знаходяться в листі контролю якості. Медичні лабораторії можуть проводити свій Контроль Якості використовуючи власні контроли і/або внутрішній пул сироваток, як це передбачено нормами ЄС.

Кожна лабораторія повинна встановити свої межі нормальних значень, ґрунтуючись на власних методах, контролях, обладнанні і популяції пацієнтів у відповідності зі своїми встановленими процедурами.

Для якісної інтерпретації зчитати оптичну щільність Cut-off калібратора і зразків пацієнтів. Порівняти OD пацієнта з OD Cut-off калібратора. Для якісної інтерпретації ми рекомендуємо розглядати сироватки в діапазоні 20% навколо порогового значення, як двозначні. Всі зразки з більш високим OD вважаються позитивними, зразки з більш низькими OD вважаються негативними.

**Негативний:** OD пацієнта < 0.8 x OD Cut-off  
**Сумнівний:** 0.8 x OD Cut-off ≤ OD пацієнта ≤ 1.2 x OD Cut-off  
**Позитивний:** OD пацієнта > 1.2 x OD Cut-off

### 9. Технічні дані

**Матеріал зразка:** сироватка  
**Об'єм зразка:** 10 мкл зразка, розведеного 1:101 в 1x буфері для зразків  
**Загальний час інкубації:** 90 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F  
**Діапазон калібрвання:** 0-100 Од/мл  
**Аналітична чутливість:** 1.0 Од/мл  
**Зберігання:** при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони  
**Кількість визначень:** 96 тестів

### 10. Дані продуктивності

#### 10.1 Аналітична Чутливість

Тестування буфера для зразків 30 разів на AESKULISA ANCA-Pro дало аналітичну чутливість 1.0 Од/мл.

#### 10.2 Специфічність і чутливість

Мікропланшет покритий високоочищеною нативною мієлопероксидазою (MPO) та протеїназою 3 з периферійних поліморфноядерних клітин крові людини і нативних Катепсина G, Еластази, Лактоферрину, Лізоциму і BPI. Перехресної реактивності з іншими аутоантигенами не було виявлено. Дані вивчалися з AESKULISA ANCA-Pro (REF 7301).

#### Кореляція:

Сумісність даних по продуктивності оцінювали з 30 сироватками, які тестувались на обох, AESKULISA 7301 і AESKULISA 3301. Лінійний регресійний аналіз двох продуктів показав, що два продукти еквівалентні. Дані можуть бути отримані за запитом.

#### 10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення. Тим не менше, через неоднорідність характеру людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підлягають цьому правилу.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація (Од/мл)	Очікувана концентрація (Од/мл)	Відновлення (%)
1	1/100	223.0	225.0	99.1
	1/200	110.5	112.5	98.2
	1/400	57.3	56.3	101.8
2	1/800	27.3	28.1	97.2
	1/100	163.6	165.0	99.2
	1/200	82.5	82.5	100.5
	1/400	42.9	41.3	103.9
1/800	21.9	20.6	106.3	

#### 10.4 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на трьох відібраних зразках сироватки, щоб представити діапазон в порівнянні зі стандартною кривою.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»  
 вул. Чорновола, 97  
 м. Івано-Франківськ, 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)

Intra-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
PR3	136.0	3.5
MPO	72.6	3.7
BPI	33.4	4.8
Elastase	24.9	5.7
Cathepsin-G	105.0	3.4
Lysozyme	36.9	4.1
Lactoferrin	86.4	4.1

Inter-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
PR3	128.0	3.5
MPO	70.9	3.7
BPI	35.3	4.8
Elastase	22.8	5.7
Cathepsin-G	110.0	3.4
Lysozyme	32.4	4.7
Lactoferrin	84.6	5.8

### 10.5 Калібрування

Через відсутність референтних матеріалів аналіз калібрується в Од/мл.

### ДОДАТОК А: Схема піпетування

Ми пропонуємо піпетування калібраторів, контролів і зразків наступним чином:

Для кількісної інтерпретації використовувати калібратори, щоб побудувати стандартну криву.

Для якісної інтерпретації використовувати Cut-off калібратор.

Antigen	for quantitative interpretation use calibrators to establish a standard curve						for qualitative interpretation use cut-off calibrator and CalA as negative control and CalD as positive control						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Cal. antigen	A	CalA	CalB	CalC	CalD		CalA	CC	CalD				
PR3	B	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
MPO	C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
BPI	D	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Elastase	E	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Cathepsin G	F	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Lysozym	G	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Lactoferrin	H	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12

CalA: калібратор А, CalB: калібратор В, CalC: калібратор С, CalD: калібратор D

CC: Калібратор Cut-off

P1: пацієнт 1

P2: пацієнт 2

P3: пацієнт 3

Cal антиген: антиген для калібраторів

### Додаток В: Процедура випробування

