

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG ДО Scl-70

## IgG anti Scl-70

Кат. № : **SCL70.CE**

Дата випуску інструкції: **2015/10**  
Версія: **1**



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

### Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного визначення антитіл IgG до Scl-70 в сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

#### А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Пристрій SCL-70.CE – це імуноферментний аналіз (ІФА) призначений для кількісного визначення аутоантитіл IgG до Scl-70 у плазмі та сироватці людини.

Тільки для діагностики in vitro.

#### В. ВСТУП

**Аутоімунність** - це нездатність організму розпізнати свої складові частини як себе, що дозволяє імунну відповідь проти власних клітин і тканин. Будь-яке захворювання, яке виникає внаслідок такої аберантної імунної відповіді, називається **Аутоімунним захворюванням**.

Ревматоїдні аутоімунні захворювання часто пов'язані з появою аутоантитіл проти кількох ядерних або цитоплазматичних антигенів. Ми можемо розрізняти антиядерні антитіла (ANA), пов'язані з аутоімунними системними захворюваннями, такими як СЧВ (системний червоний вовчак), РА (ревматоїдний артрит), склеродермія, ЗЗСТ (змішана хвороба сполучної тканини) та синдром Шегрена; і антиядерні антитіла, що екстрагуються (ЕНА), пов'язані з поліміозитом, СЧВ, ЗЗСТ і синдромом Шегрена.

Scl-70 є ядерним антигеном, що екстрагується: аутоантитіла до Scl-70 є специфічними для прогресуючого системного склерозу, рідкісного хронічного захворювання, що характеризується дифузним фіброзом, дегенеративними змінами та судинними аномаліями шкіри, суглобів та внутрішніх органів.

Анти Scl-70 присутні приблизно у 20-30% таких пацієнтів.

#### С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті препаратом рекомбінантного антигену Scl-70. Під час 1-ї інкубації тверду фазу обробляють розведеними зразками, а IgG проти SCL70 захоплюється, якщо є, твердою фазою.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка під час 2-ї інкубації зв'язані анти-SCL70 виявляються шляхом додавання антитіла до hlgG, міченого пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл IgG до SCL70, присутніх у зразку. IgG у зразку можна кількісно визначити за допомогою стандартної кривої, відкаліброваної в довільних одиницях на мілілітр (arbU/мл), оскільки немає міжнародного стандарту.

#### Д. КОМПОНЕНТИ

Набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

##### 1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 смужок x 8 відривних лунок, покритих білком Рекомбінантної ДНК Топоізомерази I (Scl-70) у присутності бичачих білків. Планшети запаковані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури; повторно закрийте невикористані смужки в пакет з осушувачем і зберігайте при 4°C (°C).

##### 2. Калібрувальна крива: CAL N°...

6x2.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання та позначений кольором. Стандартна крива, отримана з позитивної плазми Scl-70 IgG людини, титрованої за внутрішнім золотим стандартом у діапазоні: CAL1 = 0 arbU/мл (arbU/ml) // CAL2 = 12.5 arbU/мл (arbU/ml) // CAL3 = 25

arbU/мл (arbU/ml) // CAL4 = 50 arbU/мл (arbU/ml) / CAL5 = 100 arbU/мл (arbU/ml) // CAL6 = 200 arbU/мл (arbU/ml).

Містить білки людської сироватки, 2% казеїн, 10 мМ (mM) На-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.2% Твін 20, 10% фетальна теляча сироватка (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

##### 3. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буферу pH 7.0 +/-0.2, 0.05% Твін 20 і 0.1% Kathon GC.

##### 4. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання розчин і кодований червоним кольором. Містить поліклональні антитіла кози кон'юговані з пероксидазою хрому до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис буферу pH 6.8 +/-0.1, 0.1% Kathon GC і 0.02% гентаміцину сульфату як консервантів.

##### 5. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатного буферу, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксид, 0.03% тетра-метил-бензидину або ТМБ і 0.02% перекису водню або (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Примітка: Зберігати захищеним від світла, чутливий до сильного освітлення.

##### 6. Сірчана кислота: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15 мл/пляшка (ml/vial). Містить 0.3 M розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

##### 7. Розчинник для зразка: DILSPE

2x60 мл (ml). Готовий до використання та кодований синім кольором. Містить 2% казеїн, 10 мМ (mM) На-цитрат буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.2% Твін 20, 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 0.09% азиду натрію і 0.1% Kathon GS як консерванти. Для розведення зразків.

##### 8. Ущільнювальна фольга для планшету 2 шт.

##### 9. Вкладиш інструкції 1 шт.

#### Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (1000, 100 та 10 мкл (µl) одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревним вугіллям, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА, здатний забезпечити температуру +37 °C (°C) (допуск +/-0.5°C (°C)).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
- Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

#### Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
- Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
- Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
- Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
- Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.

6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендється, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку істотну втрату активності до 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедицині лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв (min).
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

## G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2°C... + 8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно виїняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) протягом кількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо після розморожування присутні частинки, центрифугуйте при 2000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. (min) або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ для очищення зразка перед тестуванням.

## H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

### Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став темно-зеленим, що вказує на виробничий дефект. У цьому випадку зателефонуйте в службу підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути на блискавку і зберігати при +2°-8°C (°C). Після першого відкриття, невикористані смужки стабільні, доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться з жовтого на зелений.

### Калібрувальна крива:

Готовий до використання компонент. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

### Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити подвійно дистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів миття.

**Примітка:** Після розведення. Промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2...8°C (°C).

### Ферментний Кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові, можливо стерильні одноразові контейнери.

### Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

### Розчинник для зразків:

Готови до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

### Сірчана кислота:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні **H-фрази:**

**H315** - Викликає подразнення шкіри.

**H319** - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази:**

**P280** - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

**P302+P352** - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКИРУ: Змити великою кількістю мила та води.

**P332+P313** - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

**P305+P351+P338** - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

**P337+P313** - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

**P362+P363** - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

## I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати. Їх також слід регулярно обслуговувати,

- щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.
- Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубацій підходять як сухі інкубатори, так і водяні бані, за умови, що інструмент валідований для інкубації тестів ІФА.
  - Вошер ІФА є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Перед використанням набору для звичайних лабораторних тестів вошер потрібно ретельно перевірити та правильно оптимізувати за допомогою контролів набору та референсних панелей. Зазвичай 4-5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (µl/well) промивного розчину = 1 цикл) достатньо, щоб переконатися, що аналіз працює належним чином. Рекоменується час замочування 20-30 секунд між циклами. Щоб правильно встановити їх кількість, рекомендується провести аналіз із контролями набору та добре охарактеризованими негативними та позитивними референсними зразками та перевірити відповідність значень, зазначених нижче у розділі «Внутрішній контроль якості». Регулярне калібрування об'ємів, що постачаються, та технічне обслуговування (знезараження та очищення голок) вошера повинні проводитися відповідно до інструкцій виробника.
  - Час інкубації має допуск  $\pm 5\%$ .
  - Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускна здатність  $\leq 10$  нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до  $\geq 2.0$ ; (c) лінійність до  $\geq 2.0$ ; (d) повторюваність  $\geq 1\%$ . Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
  - При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі О «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекоменується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за один запуск.
  - Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

## L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЯ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
- Переконайтеся, що Хромоген (ТМБ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
- Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
- Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
- Встановіть ІФА інкубатор на +37°C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.

- Переконайтеся, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
- Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

## M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

- Розведіть зразки 1:101 у правильно визначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (µl) Розчинника для Зразка + 10 мкл (µl) зразка). Не розбавляйте набір для калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залишіть лунку А1 та В1 порожньою для бланкування.
- Додайте 100 мкл (µl) Калібраторів у двох примірниках. Потім додайте 100 мкл (µl) розведених зразків у відповідно визначені пробірки.
- Інкубуйте мікропланшет при +37 °C (°C) протягом 45 хв.

**Важлива примітка:** Смужки повинні бути заклені клейкою герметизуючою фольгою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
- У всі лунки, крім А1+В1, внесіть піпеткою 100 мкл ферментного кон'югату та накрийте плівкою. Перевірте, чи цей червоний компонент був доданий у всі лунки, крім А1 та В1.

**Важливо:** Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі Ферментного Кон'югату. Може відбутися забруднення.

- Інкубуйте мікропланшет при +37 °C (°C) протягом 45 хвилин.
- Промити мікропланшет як описано на етапі 5.
- Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунки А1 та В1. Потім інкубуйте мікропланшет при кімнатній температурі (18-24 °C (°C) протягом 15 хвилин.

**Важлива примітка:** не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може утворитися високий фон.

- Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти в кожну лунку, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти перетворить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки з синього на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, при фільтрі 450 нм (зчитування) і при 620-630 нм (віднімання фону), бланкуючи інструмент на А1 або В1 або на обох (обов'язково).

## Загальні важливі зауваження:

- Якщо другий фільтр недоступний, переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням при 450 нм (nm). Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

## N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Калібратори	100 мкл (µl)
Розведені зразки 1:101	100 мкл (µl)
<b>1-а інкубація</b>	<b>45 хв</b>

Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	4-5 циклів
Ферментний кон'югат	100 мкл (µl)
<b>2-а інкубація</b>	<b>45 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	4-5 циклів
ТМВ/Н <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 мкл (µl)
<b>3-я інкубація</b>	<b>15 хв</b>
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (µl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)

Нижче у таблиці наведено приклад схеми видачі для кількісного аналізу:

Мікропланшет												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3									
B	BLK	CAL4	S4									
C	CAL1	CAL5	S5									
D	CAL1	CAL5	S6									
E	CAL2	CAL6	S7									
F	CAL2	CAL6	S8									
G	CAL3	S1	S9									
H	CAL3	S2	S10									

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор S = Зразок

### О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації здійснюється на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу є теж кваліфікованими.

Переконайтеся, що дотримані наступні параметри:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 Значення ОЩ 450 нм (nm)
CAL 1 0 arbU/мл (arbU/ml)	< 0.150 Середнього значення ОЩ450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації < 30%
CAL 2 12.5 arbU/мл (arbU/ml)	ОЩ450 нм (nm) > ОЩ450 нм (nm) CAL 1 + 0.100
CAL 6 200 arbU/мл (arbU/ml)	ОЩ450 нм > 0.750

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі та виконайте наступне:

Проблема	Перевірка
<b>Бланк-лунка</b> >0.100	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
<b>CAL 1</b> <b>0 arbU/мл (arbU/ml)</b> >0.150 ОЩ450 нм (nm) після бланкування  Коефіцієнт варіації > 30%	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтвержені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний відповідний м'який розчин і вошер був праймований ним перед використанням; 3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного калібратора замість негативного; 4. що жодного забруднення негативного калібратора або лунок, не відбулося через розлив позитивних зразків або ферментного кон'югату; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
<b>CAL 2</b> <b>12.5 arbU/мл (arbU/ml)</b>	1. що процедуру проведено правильно;

ОЩ450 нм (nm) < ОЩ450 нм (nm) CAL1 + 0.100	2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення калібратора.
<b>CAL 6</b> <b>200 arbU/мл (arbU/ml)</b> <0.750 ОЩ450 нм (nm)	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення позитивного контролю.

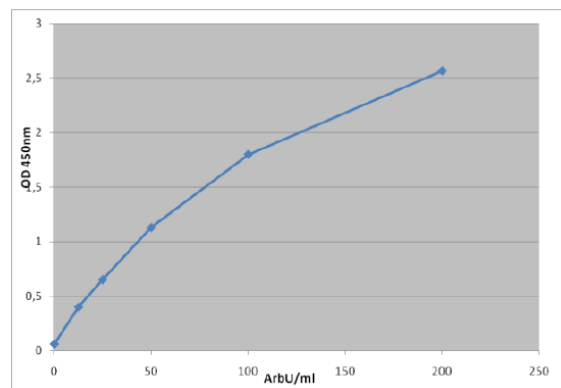
Якщо виникла будь-яка з перерахованих вище проблем, повідомте про проблему керівнику для подальших дій.

### Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Якщо тест виявиться дійсним, використовуйте для кількісного методу затверджену програму підгонки кривої, щоб накреслити калібрувальну криву на основі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm) (пропонується інтерполяція з 4 параметрами або квадратична інтерполяція).

Потім за калібрувальною кривою розраховують концентрацію антитіла IgG проти Scl-70 у зразках.

Приклад калібрувальної кривої показаний нижче:



### Важлива примітка:

Не використовувати дану калібрувальну криву для обчислень.

### Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразки з концентрацією нижче 12.5 arbU/мл (arbU/ml) вважаються нормальними на антитіла IgG проти Scl-70.

Зразки з концентрацією вищою, ніж 25 arbU/мл (arbU/ml) є позитивними на антитіла IgG проти Scl-70.

Зразки з концентрацією від 12.5 arbU/мл (arbU/ml) до 25 arbU/мл (arbU/ml) вважаються сумнівними.

arbU/мл	Інтерпретація
≤12.5	Нормальний
12.5 < arbU/мл < 25	Граничний
≥25	Підвищений

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свої власні діапазони нормальних та патологічних значень.

### Важливі примітки:

1. Одних результатів цього тесту недостатньо для встановлення чіткого діагнозу аутоімунного захворювання. Необхідно проводити інші діагностичні тести, особливо в поєднанні з іншими аутоантитілами. Картина різних комбінацій антитіл та їх концентрація разом із загальною клінічною картиною пацієнта є

корисними діагностичними інструментами при оцінці ревматоїдних аутоімунних захворювань.

2. Позитивні результати повинні бути перевірені, включаючи всю клінічну картину стану пацієнта.
3. Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом керівника лабораторії, щоб зменшити ризик невірних інтерпретацій та помилок у судженнях.
4. Коли результати випробувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.

## R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена на панелях позитивних і негативних зразків відповідно до СЕ-маркування референсного набору.

### 1. Межа виявлення

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл IgG до Scl-70.

За його відсутності визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), отриманий із плазми людини з високою концентрацією Scl-70 IgG, щоб забезпечити постійну та хорошу чутливість пристрою.

Межа виявлення розрахована як середня ОЩ450 нм (nm) Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) + 5 СВ.

У таблиці нижче наведені середні значення ОЩ450 нм (nm) для цього стандарту при розведенні, а потім дослідженні в аналізі.

IGS arbU/мл (arbU/ml)	Лот P1 ОЩ450 нм (nm)	Лот P2 ОЩ450 нм (nm)
200	2.459	2.647
100	1.879	2.042
50	1.009	1.185
25	0.456	0.633
12.5	0.202	0.367
0	0.010	0.062

### 2. Діагностична чутливість та специфічність:

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні оцінки ефективності на панелях зразків, які були класифіковані як позитивні референсним набором із маркуванням СЕ.

Діагностична **чутливість** була протестована на 50 зразках, класифікованих як позитивні за допомогою референсного набору. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів з аутоімунним захворюванням.

Діагностичну **специфічність** визначали на панелях із понад 50 негативних зразків від нормальних людей і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи потенційно інтерферуючі зразки.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватку. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були протестовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких перешкод не спостерігалось.

Тест-набір анти-Scl-70 IgG специфічний лише для аутоантитіл, спрямованих до відповідного антигену. Перехресної реактивності не спостерігалось.

Оцінка ефективності надала такі значення:

Чутливість	≥ 98%
Специфічність	≥ 98%

### 3. Точність

Дослідження, проведене на трьох зразках різної реактивності анти-IgG Scl-70, досліджених у 16 повторях у трьох окремих запусках, показало значення КВ% в діапазоні від 4 до 20% залежно від зчитувань ОЩ450 нм (nm).

### 4. Достовірність

Достовірність аналізу була перевірена за допомогою тестів на розведення. Будь-який «хук-ефект», недооцінка, яка може статися при високих дозах аналіту, була виключена.

## S. ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналіту.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після розмороження, можуть давати дещо помилкові результати.

Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не пулованих.

Діагноз аутоімунного захворювання не слід встановлювати на підставі одного результату дослідження. Необхідно враховувати клінічний анамнез пацієнта, його симптоматику, а також інші діагностичні дані.

Помилкова позитивність оцінюється як менше, ніж 2% від нормальної популяції.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Chromosoma. November 1986, Volume 94, Number 2, 0009-5915, pages 113-138. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95KDa protein identified as DNA Topoisomerase I. HH Goldner, C Szosteki, H-P Vosberg, H-J Lakomek, E Penner and F A. Bautz.
2. The Journal of Rheumatology. September 2005, 32(9):1643-1649. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). JL Senecal, J Henault, Y Raymond.
3. Current Rheumatology Reports. 2004, 6: 156-163. Antibodies in Scleroderma: direct pathogenicity and phenotypic associations. L Chung, MD and P J. Utz, MD.
4. The Journal of Immunology. 2001, 167: 7126-7133. Systemic sclerosis (Scleroderma): specific autoantigen genes are selectively overexpressed in Scleroderma fibroblasts. X Zhou, F K. Tan, M Xiong, D M. Milewicz, C A. Feghali, M J. Fritzler, J D. Reveille and F C. Arnett.
5. Rheumatology Advance. April 2009, 48(6):632-637. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA Topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. A Dellavance, C Gallindo, MG Soares, NP da Silva, RA Mortara and LEC Andrade.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила ISO 13485. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



## ВИРОБНИК

### DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milano) - Italy  
Phone +39 02 27007161  
Fax +39 02 44386771  
e-mail: info@diapro.it

### ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс с.р.л.  
вул. Г. Кардуччі, 27  
20099 Сесто Сан Джованні  
Мілан (МІ) Італія  
тел.: +39 02 2700 7161  
факс: +39 02 44386771  
e-mail: info@diapro.it



## УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

