

# НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

## ORG 522M, Rheumatoid Factor IgM

Каталог. № : **ORG 522M**

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.

### НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

Набор **Rheumatoid Factor IgM** предназначен для количественного определения антител класса IgM Ревматоидного Фактора методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Анализ предназначен только для диагностики *in vitro*.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Fc фрагменты высоко очищенного человеческого иммуноглобулина G нанесены в лунки.

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

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию. Код: <b>RF</b>	1
Калибратор А 0 Ед/мл, содержащий сывороточную/буферную матрицу (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор В 15 Ед/мл, содержащий антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор С 50 Ед/мл, содержащий антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор D 150 Ед/мл, содержащий антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор Е 500 Ед/мл, содержащий антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Контроли (Положительный и Отрицательный), содержащие антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтого цвета. Готовы к использованию. Концентрация указывается в сертификате анализа.	2 флакона 1.5 мл каждый
Буфер для образцов Р; содержит PBS, BSA, моющее средство, консервант азид натрия 0,09%, желтый, концентрат (5 х).	1 флакон 15 мл
Ферментный конъюгат, содержащий античеловеческие антитела IgG, меченые пероксидазой хрена; содержит PBS, BSA, детергент, консервант Проклин 0.05%, светло-красный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ, содержит 3,3', 5,5'-	
Тетраметилбензидин. Бесцветный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор, содержит кислоту. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, содержит Tris, детергент, консервант азид натрия 0.09%; концентрат (50x)	1 флакон 20 мл
Инструкция по применению	1 шт.

### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционально: контрольный фильтр с длиной волны 620 нм
  - Программное обеспечение для ридера
  - Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объемом 100 мкл
  - Вortexный миксер
  - Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
  - Таймер
  - Дистиллированная или деионизированная вода
  - Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
  - Пластиковый 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

- Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
- Дайте возможность крови сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием.
- Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
- Образцы должны храниться при 2-8<sup>o</sup>C до 5 дней или при -20<sup>o</sup>C до шести месяцев.
- Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
- Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

### ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
- Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
- Все материалы следует привести к комнатной температуре.
- Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
- Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
- Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Для предотвращения загрязнения меняйте 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 определенное время.
- Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

### ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- 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.
- Бычий сывороточный альбумин (BSA), используемый в компонентах, был протестирован на BSE и найден отрицательным.
- Избегайте контакта с субстратом ТМБ (3,3',5,5'-Тетраметилбензидином).

- Системная жидкость содержит кислоту, классификация - не является опасной. Избегать контакта с кожей.
- Контроль, буфер для образцов и промывочный буфер содержат азид натрия 0,09% в качестве консерванта. Эта концентрация классифицируется как неопасная.
- Ферментный конъюгат содержит ProClin 300 0.05% в качестве консерванта. Эта концентрация классифицируется как неопасная.

Во время работы с реагентами, контролями и образцами сыворотки соблюдать существующие правила лабораторной безопасности и надлежащей лабораторной практики:

- Меры первой помощи: при попадании на кожу, немедленно тщательно промыть водой с мылом. Снять загрязненную одежду и обувь и выстирать ее перед использованием. Если системная жидкость соприкасается с кожей, тщательно промойте водой. После контакта с глазами тщательно промойте глаза с приоткрытыми веками проточной водой в течение не менее 10 минут. Обратитесь к врачу, если это необходимо.
- Меры личной безопасности, защитное снаряжение и чрезвычайные меры:

Соблюдать правила безопасности лабораторий. Избегать контакта с кожей и глазами. Не глотать. Не пипетировать ртом. Не есть, не пить, не курить, не наносить макияж в местах работы с реагентами. При пролипании вытереть инертным материалом и выбросить в соответствующую емкость для утилизации отходов.

- Средства индивидуальной защиты: Использовать защитные перчатки из нитрил каучука или натурального латекса.

Пользуйтесь защитными очками.

- Неблагоприятные условия: Так как раствор субстрата является светочувствительным, хранить Alegria® полоски в темноте.
- При утилизации лабораторных отходов национальное или региональное законодательство должно соблюдаться.

Соблюдайте рекомендации по обеспечению контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контролей и/или объединенных сывороток.

## 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 образцов

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: Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для контролей/калибраторов и проб пациентов.

- 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.
- 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.
- Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.  
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
- 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	P2										
B	B	P3										
C	C											
D	D											
E	E											
F	C+											
G	C-											
H	P1											

P1, .... – образцы пациентов, A – E – калибраторы, C+, C- - контроли

## 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.

## РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественных результатов отложить оптическую плотность каждого калибратора согласно концентрации калибратора, чтобы построить калибровочную кривую. Концентрация образцов пациентов может быть затем оценена с калибровочной кривой с помощью интерполяции.

Для данного набора рекомендуется 4-параметрический с линейно-логарифмическими координатами метод для оптической плотности и концентрации.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Калибровка

Это система анализа откалибрована в относительных условных единицах. Калибровка связана с подготовкой первого Британского Стандарта 64/2 для ревматоидного фактора IgM как 100 Ед/мл.

### Диапазон измерения

Расчетный диапазон данного ИФА анализа составляет: 0-500 Ед/мл

### Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение Cut-off 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 как значение Индекса.

Образец	Разведение	Полученное значение Ед/мл	Ожидаемое значение Ед/мл	П/О, %
1	1:100	482.7	431.7	112
	1:200	218.0	215.9	101
	1:400	108.0	107.9	100
	1:800	54.5	54.0	101
	1:1600	26.7	27.0	99
	1:3200	13.4	13.5	99
2	1:100	549.3	502.7	109
	1:200	245.4	251.4	98
	1:400	125.2	125.7	100
	1:800	61.1	62.8	97
	1:1600	32.4	31.4	103
	1:3200	15.6	15.7	99
3	1:100	220.5	221.5	100
	1:200	110.4	110.7	100
	1:400	55.6	55.4	100
	1:800	27.3	27.7	99
	1:1600	13.9	13.8	101
	1:3200	6.7	6.9	97

### 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.

Внутри анализа		
Образец	Среднее Значение, Ед/мл	CV [%]
1	17.1	4.3
2	59.7	4.6
3	148.0	4.3

Между анализами		
Образец	Среднее Значение, Ед/мл	CV [%]
1	24.5	8.2
2	59.4	5.9
3	123.0	8.1

## 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

Study population	n	n Pos	%
Rheumatoid Arthritis	302	278	91.4
Normal human sera	169	11	6.5

  

ORG 522M	Clinical Diagnosis		
	Pos	Neg	
	Pos	Neg	
Pos	278	11	471
Neg	28	158	
	302	169	

Sensitivity: 91.4 %  
Specificity: 93.5 %  
Overall agreement: 92.1 %

## 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 всех 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 nm



## 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)