

# НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG И IgA К SACCHAROMYCES CEREVISIAE (ASCA)

## ORG 545, ASCA IgG/IgA

Каталог. № : **ORG 545**  
Количество : **96**  
Производитель: **Orgentec (Германия)**

Методика от **08-2012**



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

### ОБОБЩЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Настоящий набор предназначен для количественного определения антител класса IgG и IgA к *Saccharomyces cerevisiae* методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* и должен использоваться только в целях диагностики болезни Крона.

### КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Точная диагностика заболеваний внутренних органов человека (IBD), в частности, дифференциальная диагностика между двумя основными заболеваниями, язвенным колитом и болезнью Крона, важна для адекватного лечения и прогноза. Язвенный колит характеризуется воспалением и язвами верхнего слоя внутренней поверхности толстой и прямой кишки. Болезнь Крона вызывает широко распространенное воспаление желудочно-кишечного тракта с образованием гранулем, глубоко проникающих в пораженную ткань. Воспаление при болезни Крона асимметричное и сегментальное, с областями здоровых и пораженных тканей, в отличие от язвенного колита, при котором воспаление симметрично и непрерывно от проксимального отдела прямой кишки [1]. Для дифференциальной диагностики болезни Крона и язвенного колита могут быть использованы определения ANCA (антитела к цитоплазме нейтрофилов) и ASCA (антитела к *Saccharomyces cerevisiae*). ASCA направлены к олигосахаридным эпитопам маннан клеточной стенки (фосфолипидоманнан) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [2]. IgG, также как IgA ASCA имеют примерно 95-100% специфичности по отношению к болезни Крона. ASCA строго ассоциированы с болезнью Крона. Исследования показали только 5% ASCA IgG-положительных и 7% ASCA IgA-положительных результатов при язвенном колите, тогда как при болезни Крона чувствительность составляет 75% для IgG ASCA и 60% для IgA ASCA [3, 4]. Встречаемость атипичной ANCA (aANCA) при болезни Крона более редкая по сравнению с язвенным колитом. Распространенность ANCA варьирует от 50% до 90% при язвенном колите и от 10% до 20% при болезни Крона [5]. Комбинация двух серологических тестов делает возможной быструю и неинвазивную дифференциальную диагностику болезни Крона и язвенного колита.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ проводится в микропланшете, покрытом особо чистым препаратом маннан *Saccharomyces cerevisiae*. Присутствующие в образцах антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигеном. При промывке удаляют не связавшиеся компоненты сыворотки. Конъюгат антител к IgG или IgA человека с пероксидазой хрена добавляется в ячейки и иммунологически связывается с антителами из сывороток пациентов, связанных с иммобилизованными антигенами, в результате чего образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется при следующей промывке. Раствор хромогенного субстрата в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетсся с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением 1М соляной кислоты в качестве стоп-раствора, при этом Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность этого окрашивания определяют фотометрически при 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG или IgA антител в образце.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

<b>Формат набора</b>	<b>96 тестов</b>
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию.	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 6.3 Ед/мл, содержащий антитела ASCA 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 12.5 Ед/мл, содержащий антитела ASCA 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 25 Ед/мл, содержащий антитела ASCA 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 50 Ед/мл, содержащий антитела ASCA в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN <sub>3</sub> 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор F 100 Ед/мл, содержащий антитела ASCA 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 ASCA 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 азида натрия 0,09%, желтый, концентрат (5 х).	1 флакон 15 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий античеловеческие антитела IgG, меченые пероксидазой хрена; содержит PBS, BSA, детергент, консервант Проклин. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ, бесцветный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор, содержит кислоту. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50х)	1 флакон 20 мл
Инструкция по применению	1 шт.
Сертификат контроля качества	1 шт.

### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционно: 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>0</sup>С до 5 дней или при -20<sup>0</sup>С 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 °С
- 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 °С. Рекомендуется использование в тот же день.

#### 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

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 антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп-раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (№N3) 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, он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, мы настоятельно рекомендуем следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 8, 9, 10).
7. 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.
8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не отбирайте образцы ртом.
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководство по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или плув сыворотки.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

##### Приготовление промывочного раствора

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

##### Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной или деионизированной 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. Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

1. Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку.  
Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °С).  
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	A	P1								
B	B	P2	B	P2								
C	C	P3	C	P3								
D	D	P4	D	P4								
E	E	P5	E	P5								
F	F	P6	F	P6								
G	C+	P7	C+	P7								
H	C-	P8	C-	P8								

IgG IgG IgA IgA

P1 ... - образцы пациентов, AF - 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.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

##### Калибровка

Это система анализа откалибрована в относительных условных единицах, так как ни один международный контрольный препарат не доступен для данного анализа.

##### Диапазон измерения

Расчетный диапазон данного ИФА анализа составляет:

IgG: 0-100 Ед/мл IgA: 0-100 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  
IgG: 10 Ед/мл IgA: 10 Ед/мл

### Интерпретация результатов

Отрицательный: IgG < 10 Ед/мл IgA < 10 Ед/мл  
Положительный: ≥ 10 Ед/мл ≥ 10 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 из калибровочной кривой.

Образец	Разведение	Полученное значение, Ед/мл	Ожидаемое значение, Ед/мл	П/О, %
IgG 1	1:100	64.2	64.2	100
	1:200	34.1	32.1	106
	1:400	16.9	16.1	105
	1:800	7.6	8.0	95
IgG 2	1:100	53.9	53.9	100
	1:200	26.4	27.0	98
	1:400	12.9	13.5	96
	1:800	7.1	6.7	106
IgG 3	1:100	48.3	48.3	100
	1:200	25.9	24.4	107
	1:400	13.3	12.1	110
	1:800	6.8	6.0	113
IgA 1	1:100	64.2	64.2	100
	1:200	34.1	32.1	106
	1:400	16.9	16.1	105
	1:800	7.6	8.0	95
IgA 2	1:100	53.9	53.9	100
	1:200	26.4	27.0	98
	1:400	12.9	13.5	96
	1:800	7.1	6.7	106
IgA 3	1:100	48.3	48.3	100
	1:200	25.9	24.2	107
	1:400	13.3	12.1	110
	1:800	6.8	6.0	113

### Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила:  
IgG: 0.5 Ед/мл IgA: 0.5 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 IgG		
Образец	Среднее Значение, Ед/мл	CV [%]
1	9.6	4.3
2	19.3	6.6
3	76.5	8.8

Между анализами IgG		
Образец	Среднее Значение, Ед/мл	CV [%]
1	10.5	7.1
2	31.2	3.8
3	67.3	7.5

Внутри анализа IgA		
Образец	Среднее Значение, Ед/мл	CV [%]
1	5.1	5.2
2	26.8	6.1
3	66.4	6.1

Между анализами IgA		
Образец	Среднее Значение, Ед/мл	CV [%]
1	5.9	6.6
2	29.1	6.0
3	81.2	6.4

### 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	Pos IgG	%	Pos IgA	%
Crohn's disease	72	54	75.0	45	62.5
Normal human sera	130	4	3.1	3	2.3

  

	Clinical Diagnosis			Clinical Diagnosis		
	Pos	Neg		Pos	Neg	
ORG 545	54	4	ORG 545	45	3	202
IgG	18	126	IgA	27	127	202
	72	130		72	130	202

  

Sensitivity: 75.0 %	Sensitivity: 62.5 %
Specificity: 96.9 %	Specificity: 97.7 %
Overall agreement: 89.1 %	Overall agreement: 85.1 %

### 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

- Добавить **100 мкл** калибратор, контроль или образец пациента  
→ Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре  
→ Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
- Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата  
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре  
→ Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
- Добавить **100 мкл** раствора субстрата  
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)