

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ К ПРОТЕИНАЗЕ 3 (PR3), МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЕ (MPO) И КЛУБОЧКОВОЙ БАЗАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ (GBM) НА МЕМБРАНЕ

### ORG 789, ANCA-3-Line

Каталог. № : **ORG 789**

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

ANCA-3-Line - набор, основанный на иммуноферментном анализе на мембране, для полуколичественного определения аутоантител к PR3, MPO и GBM. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* с целью диагностики васкулитов.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Антинейтрофильные цитоплазматические антитела (ANCA) представляют собой группу антител, специфичных к компонентам цитоплазмы нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов. Данный набор ANCA-3-Line разработан для скрининга на аутоантитела к PR3, MPO и GBM. Определение этих антител значимо для выявления системного васкулита и дифференциальной диагностики системных заболеваний.

##### PR3 (Протеиназа 3)

PR3-ANCA является классическим аутоантигеном при гранулематозе Вегенера, с клинической специфичностью более 95%. Гранулематоз Вегенера – это первичный гранулематоз с проявлениями васкулита. Обычно титр антител коррелирует с активностью заболевания. В большинстве случаев при активной фазе заболевания могут быть обнаружены очень высокие титры анти-PR3 антител. В период проведения терапии титр антител падает и результаты становятся отрицательными к началу ремиссии.

##### MPO (Миелопероксидаза)

Антиген-мишень миелопероксидаза (MPO) в основном присутствует (70%) при микроскопическом полиангиите (MPA). Так как дифференциальная диагностика между MPA и другими аутоиммунными заболеваниями с легочной патологией (например, синдром Гудпасчера, системная красная волчанка, гранулематоз Вегенера) часто затруднена, выявление антител к MPO является, особенно на ранней стадии диагностики, очень важным.

##### GBM (клубочковая базальная мембрана)

Реактивность специфических анти-GBM антител при синдроме Гудпасчера направлена к 29 кДа домену NC1

$\alpha$ -3 цепи коллагена IV типа GBM. Первично синдром Гудпасчера является аутоиммунным заболеванием почек. Синдром рассматривается как аутоиммунное расстройство, состоящее из трех частей – гломерулонефрита, легочной геморрагии и образование анти-GBM антител.

В наборе ANCA-3-Line удачно сочетаются все преимущества метода иммуноблота и панели хорошо подобранных антигенов.

#### ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые препараты антигенов иммобилизованы на стрипах нитроцеллюлозной мембраны. 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, образая комплекс конъюгат/антитела/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляется несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизуется 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 мойте 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.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

#### СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая 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 нагреванием образцов сыворотки.

#### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	8 или 16 тестов
Нитроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными на них особо чистыми препаратами нативных антигенов. Готовы к использованию.	8 или 16
Буфер для образцов, готов к использованию. Данный буфер специально разработан для набора ANCA-3-Line и не может быть заменен буфером для образцов из других наборов для иммуноблотов.	1 флакон 20 мл
Буфер промывочный, <b>концентрат 50x</b>	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, NaN <sub>3</sub> <0.1 % (w/w)) ферментного конъюгата (розовый), содержащий поликлональные кроличьи анти-	1 флакон 15 мл

человеческие IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой. Готовы к использованию.	
Раствор субстрата (BCIP/NBT). Готов к использованию.	1 или 2 флакона, 13 мл
Предобработанные калибровочные нитроцеллюлозные стрипы (обозначены «CAL») для полуколичественного анализа. Готовы к использованию.	1 или 2
Емкости для инкубации	1 или 2
Листы данных. Готовы к использованию.	1 или 2

#### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

#### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8°C.
2. Содержит ячейки микропланшета, запечатанные в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока пригодности.
4. Не поддавайте реагенты влиянию жары, солнца или сильного света во время хранения или использования.
5. Разбавленные буфер образцов и моющий буфер стабильны 30 дней при хранении при 2-8°C.

#### 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°C) 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 избежания 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 инкубаций
10. Контрольные сыворотки или пулы должны всегда анализироваться совместно с остальными образцами, при тех же условиях, для проверки качества выполнения методики и реагентов.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ 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 уравновеситься 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.

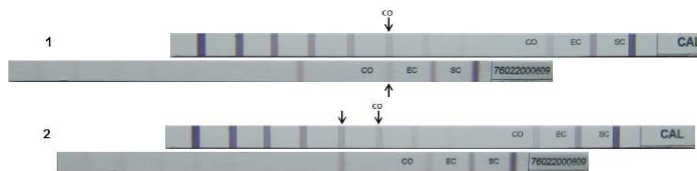
#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

Чувствительность, специфичность и доза-реакцию ANCA-3-Line иммуноблота оценивали с помощью клинически определенных контрольных сывороток, содержащих различные относительные количества сыворотки с известной специфичностью.

##### 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: слабopоложительный, 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.

#### Результаты исследований

Study population	n	n pos	%
Wegner's Granulomatosis	75	62	82.7
Microscopic Polyangiitis	15	9	60.0
Normal human sera	80	1	1.3

#### Clinical Diagnosis

		Pos	Neg	
ORG 789	Pos	71	1	
ANCA-3-Line	Neg	19	79	
		90	80	170

Sensitivity: 78.9 %

Specificity: 98.8 %

Overall agreement: 88.2 %

#### 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

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.



#### 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)