**НАЗВА І ПРИЗНАЧЕННЯ**

ACPA – це якісний імуноферментний аналіз (ELSIA) для кількісного визначення аутоантитіл класу IgG проти цитрулінових білків (ACP) у людськів сироватці або плазмі. Тест призначений виключно для in vitro діагностики, як допоміжний при діагностуванні ревматоїдного артриту.

**СТИСЛИЙ ОПИС І ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ**

Ревматоїдний артрит (RA) одне з найпоширеніших аутоімунних захворювань. Головна характеристика RA – це запалення суглобів, що спричиняє ушкодження чи втрату працездатності суглобів. Раннє діагностування RA і негайний початок відповідного лікування важливі для запобігання остаточного ушкодження суглобу. RA діагностується переважно в клінічних проявах і серологічна підтримка була досі в основному заборонена для визначення аутоантитіл проти ревматоїдного фактору (RF). RF – це чутливий серологічний маркер для RA з середньою специфічністю приблизно 70%. У декількох дослідженнях було виявлено, що визначення антитіл проти цитрулінових аргінінових залишків у філаментних білках, таких як Віментин трапляється у RF-негативних пацієнтів. Цитрулінізація – це процес, каталізований пептиларгінін деміназою (PAD), в якому амінокислота аргінін (Arg) перетворюється на цитрулін. В процесі цього перетворення позитивно заряджена NH2-група гідролізується в кисневу групу.

Тест ACPA ELSIA показує високу специфічність і чутливість до аутоантитіл проти цитрулінових білків.

**ПРИНЦИП ТЕСТУ**

ACPA знаходиться у мікролунках. Антитіла до цього антигену, при наявності в розбавленій сироватці або плазмі, зв’язуються з відповідним антигеном. Промивка лунок мікропланшету видаляє не специфічні компоненти сироватки і плазми. Кон’юговані не людські антитіла класу IgG пероксідази хріну (ПХ) імунно виявляють зв’язані антитіла пацієнта, утворюючи комплекс кон’югатів/антитіл/антигенів. Промивка мікролунок видаляє не зв’язаний кон’югат. Ферментний субстрат за наявності зв’язаного кон’югату гідролізує, утворюючи синій колір. Додавання кислоти припиняє реакцію, утворюючи жовтий кінцевий продукт. Інтенсивність цього жовтого кольору вимірюється фотометрично при 450нм. Інтенсивність кольору пропорційна до концентрації антитіл класу IgG в оригінальному зразку.

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ**

1. Усі реагенти в цьому комплекті призначені тільки для in vitro діагностики.
2. Не замінюйте компоненти комплекту компонентами з різних комплектів.
3. Компоненти, що містять людську сироватку, були протестовані за методиками, ухваленими Управлінням з контролю якості продуктів і ліків США, і показали негативний результат на поверхневий антиген гепатиту В, гепатит С, ВІЛ і ВІЛ-2. Жоден тест не може гарантувати відсутність поверхневих антигенів гепатиту В, гепатиту С, ВІЛ і ВІЛ-2, тому з усіма реагентами на основі сироватки людини треба поводитися так, ніби вони містять інфекцію.
4. Уникайте контакту з ТМБ (3,3’,5,5’-Тетраметил-бензідін). У разі попадання ТМБ на шкіру, ретельно змийте водою з милом.
5. Уникайте контакту з розчином інгібітору, який є кислотою. У разі попадання на шкіру, ретельно змийте водою і зверніться по медичну допомогу.
6. Деякі компоненти комплекту (Регулятори, Буфер зразків і Буферний розчин для промивки) містять азид натрію у якості запобіжного засобу. Азид натрію (NaN3) дуже токсичний і хімічно активний у чистій формі. У тій концентрації, у якій він міститься в продукції (0.09%), не шкідливий. Не дивлячись на те, що він класифікується, як не шкідливий, ми настійно рекомендуємо дотримуватись чітких передбачливих інструкцій з поведінки у лабораторії (див. 8., 9., 10).
7. Деякі компоненти комплекту містять Проклін 300 у якості запобіжного засобу. Коли викидаєте реагенти, що містять Проклін 300, промийте дренажні системи великою кількістю води для того, щоб при розбавленні компонентів їх концентрація впала нижче рівня активності.
8. Одягайте одноразові рукавички для роботи зі зразками і реагентами комплекту, і ретельно мийте руки після цього.
9. Забороняється набирати рідину в піпетку ротом.
10. Забороняється їсти, пити, курити або наносити макіяж поряд зі зразками чи реагентами комплекту.
11. Уникайте контакту між буферним Розчином Перекису і матеріалами, що легко окислюються; екстремальна температура може спричинити самозаймання.

Дотримуйтесь інструкцій з проведення контролю якості в медичних лабораторіях при аналізі регуляторів і/чи змішаної сироватки. При роботі з усіма реагентами комплекту, регуляторами і зразками сироватки дотримуйтесь існуючих правових норм.

**ЗМІСТ КОМПЛЕКТУ**

Розмір упаковки 96 тестів

Кількість 1 Подільні мікропланшети, які складаються з 12 модулів по 8 лунок, вкритих цитруліновим білком. Готові до використання.

6 пробірок по 1.5мл Буж-вимірники з Анти-Цитруліновими антитілами класу IgG (A-F) у матриксі сироватки/буферного розчину (Фосфатно-сольовий буферний розчин, Бичачий Сироватковий Альбумін, NaN3<0,1% (у ваговому відношенні)), що містить: IgG: 0; 10; 20; 50; 150; і 500 одиниць/мл. Готові до використання.

2 пробірки по 1,5мл ACPA регулятори у матриксі сироватки/буферного розчину (Фосфатно-сольовий буферний розчин, Бичачий Сироватковий Альбумін, NaN3<0,1% (у ваговому відношенні)) позитивний (1) і негативний (2), для відповідних концентрацій дивіться інструкцію всередині. Готові до використання.

1 пробірка, 20мл Буферний розчин для зразка (Трис, NaN3<0,1% (у ваговому відношенні)), жовтий концентрат (5х)

1 пробірка, 15мл Розчин ферментного кон’югата ((Фосфатно-сольовий буферний розчин, ПРОКЛІН 300 <0,5% (у об’ємному відношенні)), (блідо-червоний), що містить поліклональний заячий не людський IgG; маркірований пероксідазою хріну. Готовий до використання.

1 пробірка, 15мл Розчин субстрату ТМБ. Готовий до використання.

1 пробірка, 15мл Інгібітор (кислота). Готовий до використання.

1 пробірка, 20мл Розчин для промивки (Фосфатно-сольовий буферний розчин, NaN3<0,1% (у ваговому відношенні)), концентрат (50х).

**ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ**

1. Зберігайте комплект при 2-8˚С
2. Тримайте лунки мікропланшета в герметичному сухому пакеті з поглиначами вологи
3. Реагенти стабільні впродовж терміну придатності комплекту
4. Не піддавайте тестові реагенти нагріванню, сонячним променям або яркому світлу впродовж зберігання і використання
5. Розбавлений буферний розчин для зразка і буферний розчин для промивки стабільні впродовж принаймні 30 днів, якщо зберігаються при 2-8˚С

**НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ**

Устаткування

* Спектрофометр для мікропланшетів, здатний робити заміри кінцевої точки при 450нм
* Багатоканальний диспансер або повторювана піпетка на 100мкл
* Вихрова мішалка
* Піпетки на 10мкл, 100мкл, і 1000мкл
* Лабораторний таймер
* Програмне забезпечення для обробки інформації

Підготовка реагентів

* Дистильована або деіонізована вода
* Мірний циліндр на 100 і 1000мл
* Пластиковий контейнер для зберігання розчину для промивки

**ЗБІР ЗРАЗКІВ, ЗБЕРІГАННЯ І ОБРОБКА**

1. Зберіть зразки цільної крові використовуючи прийнятні медичні методи, щоб уникнути гемолізу.
2. Дайте крові згорнутися і відокремте сироватку за допомогою центрифуги.
3. Тест-сироватка повинна бути чистою и не гемолізованою. Контамінація гемолізом або ліпемією не бажана, але не заважає аналізу.
4. Зразки можуть зберігатися при 2-8˚С впродовж п’яти днів і при -20˚С впродовж шести місяців.
5. Уникайте повторного заморожування і розморожування зразків сироватки. Це може призвести до перемінної втрати активності аутоантитіл.
6. Не рекомендується тестування термоінактивованої сироватки.

**ЗАУВАЖЕННЯ ДО ПРОЦЕДУРИ**

1. Не використовуйте компоненти комплекту після закінчення терміну придатності.
2. Не замінюйте компоненти комплекту компонентами з різних комплектів.
3. Усі матеріали повинні бути кімнатної температури (20-28˚С).
4. Підготовте усі реагенти і зразки до початку аналізу. Якщо тест розпочато, він повинен проводитись без перерв для отримання максимально надійних і несуперечливих результатів.
5. Виконуйте усі етапи тесту тільки в зазначеній послідовності.
6. Завжди використовуйте свіжі розчини зразків.
7. Налийте усі реагенти і зразки на дно лунок за допомогою піпетки.
8. Для уникнення забруднення при перенесенні змінюйте наконечник для зразків і різних буж-вимірників комплекту.
9. Для отримання найкращих результатів ретельно промивайте мікролунки і видаляйте останні краплі буферного розчину для промивки.
10. Усі інкубаційні етапи повинні бути чітко хронометровані.
11. Контрольні зразки сироватки або пули повинні перевірятися як незнайомі субстанції для перевірки ефективності реагентів і самого тесту.
12. Не використовуйте повторно лунки мікропланшету.

Для всіх регуляторів відповідні концентрації зазначені на етикетках кожної пробірки. Використовуючи ці концентрації можна вирахувати калібрувальну криву для напівкількісного зчитування результатів пацієнта.

**ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ**

**Підготовка буфера зразка**

Перед використанням розбавте вміст кожної пробірки буферного концентрату для зразка (5х) дистильованою або деіонізованою водою до кінцевого об’єму в 100мл. Зберігайте у холодильнику: стабільний при 2-8˚С впродовж принаймні 30 днів з моменту приготування або до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.

**Підготовка розчину для промивки**

Перед використанням розбавте вміст кожної пробірки концентрату розчину для промивки (50х) дистильованою або деіонізованою водою до кінцевого об’єму в 1000мл. Зберігайте у холодильнику: стабільний при 2-8˚С впродовж принаймні 30 днів з моменту приготування або до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.

**Підготовка зразка**

Перед тестом розбавте усі зразки пацієнта буферним розчином для зразка у пропорції 1:100. Отже змішайте 10мкл зразка з 990мкл буферним розчином зразка в полістироловій трубці. Добре перемішайте. Регулятори готові до використання і їх не потрібно розбавляти.

**ПРОЦЕДУРА ВИПРОБУВАННЯ**

1. Підготовте достатню кількість модулів мікропланшетів для розміщення регуляторів і попередньо розведених зразків пацієнта.
2. Налийте за допомогою піпетки **100мкл** регуляторів і попередньо розведених зразків пацієнта в лунки у двох примірниках.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| A | **SA** | **SE** | **P1** | **P5** |  |  |
| B | **SA** | **SE** | **P1** | **P5** |  |  |
| C | **SB** | **SF** | **P2** | **P..** |  |  |
| D | **SB** | **SF** | **P2** | **P..** |  |  |
| E | **SC** | **C1** | **P3** |  |  |  |
| F | **SC** | **C1** | **P3** |  |  |  |
| G | **SD** | **C2** | **P4** |  |  |  |
| H | **SD** | **C2** | **P4** |  |  |  |

SA-DF : стандарти від A до F

Р1, Р2..: зразок пацієнта 1, 2 …

C1: позитивний регулятор

С2: негативний регулятор

1. Інкубуйте впродовж 30 хвилин при кімнатній температурі (20-28˚С)
2. Вилийте вміст мікролунок і промийте 3 рази **300мкл** розчину для промивки.
3. Налийте **100мкл** ферментного кон’югату в кожну лунку
4. Інкубуйте впродовж 15 хвилин при кімнатній температурі
5. Вилийте вміст мікролунок і промийте 3 рази **300мкл** розчину для промивки
6. Налийте **100мкл** розчину субстрату ТМБ в кожну лунку
7. Інкубуйте впродовж 15 хвилин при кімнатній температурі
8. Додайте **100мкл** інгібітору у кожну лунку модулів і інкубуйте впродовж 5 хвилин при кімнатній температурі
9. Зніміть показання оптичної щільності при 450нм і підрахуйте результати. Рекомендується біхроматичне вимірювання при 600-690нм.

**Утворений колір стабільний впродовж принаймні 30 хвилин. Зніміть показання оптичної щільності в цей період.**

**Автоматизація**

Тест АNA Hep Screen ELISA придатний для використання в відкритих автоматичних процесорах ELISA. Процедура випробування, яка описана вище, підходить для використання як з автоматизацією, так і без неї.

**ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ**

**Контроль якості**

Тест дійсний тільки якщо оптична щільність при 450нм для Позитивного Регулятора (1) і Негативного Регулятора (2), як і для Буж-вимірників A і F, відповідає відповідному діапазону, зазначеному в Сертифікаті Контролю Якості, який додається до кожного тестового комплекту! Якщо будь-який з цих критеріїв не відповідає, результат не дійсний і тест необхідно повторити.

**Обчислення результатів**

Для АСРА ELISA вибирається метод обробки інформації чотирьохпараметричною підгонкою з лінійно-логарифмічними координатами для оптичної щільності і концентрацією.

**Рекомендований лінійно-логарифмічний графік**

Спочатку підрахуйте показники усередненої оптичної щільності для кожної лунки буж-вимірника. Використовуйте лінійно-логарифмічну міліметрівку і нанесіть показники усередненої оптичної щільності для кожного буж-вимірника навпроти концентрації. Намалюйте найбільш згладжуючу криву, яка охоплює траєкторію всіх точок буж-вимірника. Точки буж-вимірника також можуть бути з’єднані прямими відрізками. Концентрація невідомих може бути обчислена з кривої буж-вимірників шляхом інтерполяції.

**Інтерпретація результатів**

При нормальних показниках дослідження зі зразками сироватки здорових донорів крові наступні показники були встановлені для АСРА тесту:

АСРА IgG [одиниць/мл]

Нормальний: <10

Позитивний: ≥10

Позитивні результати повинні бути перевірені враховуючи загальний клінічний стан пацієнта. Також кожне рішення для терапії повинне бути прийняте індивідуально.

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила свої власні нормальні і патологічні показники Анти-Цитрулін Білкових Антитіл у сироватці або плазмі. Вищенаведені показники наведені виключно для пояснення.

**ЕКСПЛУАТАЦІЙНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

**Точність вимірів (Відтворюванність)**

Статистика для Коефіцієнта варіацій (КВ) була розрахована для кожного з трьох зразків за результатами 24 визначень за один прохід для відтворюванності вимірювань в серії. Поточна точність вимірювань була розрахована за результатами 5 окремих проходів з 6 визначеннями для кожного зразка:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Відтворюванність результатів в серії | | |
| №  зразка | Показник  (одиниць/мл) | КВ  (%) |
| 1 | 35 | 3.8 |
| 2 | 394 | 5.4 |
| 3 | 937 | 4.9 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Відтворюванність результатів між серіями | | |
| №  зразка | Показник  (імунізуючи одиниць/мл) | КВ  (%) |
| 1 | 42 | 4.5 |
| 2 | 547 | 5.7 |
| 3 | 978 | 6.4 |

**Чутливість**

Найнижча межа виявлення для АСРА була визначена на 2 одиницях/мл.

**Специфічність**

Мікропланшет вкритий цитруліновими білками. Тест АСРА призначений виключно для виявлення аутоантитіл проти цитрулінових білків.

**Калібрування**

Оскільки для АСРА антитіл немає жодних міжнародних стандартів, система калібрована зі застосуванням умовних одиниць.

**ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ**

АСРА ELISA – це допоміжна діагностика. Конкретний клінічний діагноз не повинен базуватися виключно на результатах тесту, а повинен бути зроблений лікарем після отримання усіх клінічних і лабораторних результатів.

**ІНТЕРФЕРУЮЧІ РЕЧОВИНИ**

Інтерференції з гемолітичною (до 1000мг/дл) і ліпемічною (до 3г/дл тригліцеридів) сироваткою, або сироваткою, що містить білірубін (до 40мг/дл), не спостерігалося. Також не спостерігалося ніяких інтерферуючих ефектів з застосуванням антикоагулянтів. Проте з практичних причин рекомендується уникати надмірно гемолізованих і ліпемізованих зразків.

**БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК**

1. F.Bobbio-Pallavicini, C.Alpini, R.Caporali, S.Avalle, S.Bugatti, C.Montecuccio. Autoantibody profile inrheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. Arthritis Res Ther 2004, 6:R264-R272 (DOI10.1186/ar1173)

2. E.R.Vossenaar, N.Depres, E.Lapointe, A.van der Heijden, M.Lora, T.Senshu, W.J. van Venfooij, H.A. Menard. Rheumatoid arthritis specific anti Sa antibodies target citrullinated vimentin. Arthritis Research & Therapie Vol. 6 No. 2

3. M.Escalon, F.J.Lopees-Longo, C.M. Gonzalez, I.Monteagudo, M.Rodriguez-Mahou, R.Grau, L.Carreno. Anti-Sa Sera from patients with Rheumatoid Arthritis contain at least 2 different subpopulations of Anti-Sa antibodies. The Journal of Rheumatology 2002; 29:10 2053-60

4. Ch.Vincent, L.Nogueira, M.Sebba, S.Chapuy-Regaud, M.Arnaud, O.Letourneur, D.Rolland, B.Rounie, A.Cantagrel, M.Jolivet, G.Serre. Detecion of antibodies to dertermined recombinant tat filaggrin by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Arthritis & Rheumatism Vo. 46, No. 8, August 2002, pp. 2051-58

5. G.Steiner, J.Smolen. Antibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. Arthritis Res 2002, 4 (suppl 2):S1-S5

6. R.Goldbach-Mansky, J.Lee, A.McCoy, J.Hoxworth, C.Yarboro, J.S.Smolen, G.Steiner, A.Rosen, C.Zhang, H.A.Menard, Z.J.Zhou, T.Palosuo, W.J.Van Venrooij, R.L.Wilder, J.H.Klippel, H.R.Schumacher Jr., H.S.El-Gabalawy. Rheumatoid arthritis associated antibodies in patients with synovitis of recent onset. Arthritis Res 2000, 2:236–243

**ІНКУБАЦІЙНА СХЕМА**

1. Налийте за допомогою піпетки **100мкл** буж-вимірника, регулятора або зразка пацієнта

Інкубуйте впродовж **30 хвилин** при кімнатній температурі

Вилийте вміст мікролунок і промийте 3 рази **300мкл**  розчину для промивки

1. Налийте **100мкл** ферментного кон’югату

Інкубуйте впродовж **15 хвилин** при кімнатній температурі

Вилийте вміст мікролунок і промийте 3 рази **300мкл** розчину для промивки

1. Налийте **100мкл** розчину субстрату

Інкубуйте впродовж **15 хвилин** при кімнатній температурі

1. Додайте **100мкл** інгібітору

Залишіть на **5 хвилин**

Зніміть показання при **450нм**

**СИМВОЛИ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В ТЕСТАХ DEMEDITEC**

|  |  |
| --- | --- |
| **Символ** | **Тлумачення** |
|  | Звіртеся з інструкціями з використання |
|  | Відповідає стандартам ЄС |
|  | Для in vitro діагностики |
|  | Тільки для досліджень |
|  | Номер у каталозі |
|  | Номер партії / Код серії |
|  | Містить достатню кількість для <n> тестів |
|  | Температура зберігання |
|  | Термін придатності |
|  | Виробник |
| **Distributed by** | Дистриб’ютор |
| **Content** | Вміст |
| **Volume/No.** | Об’єм / Номер |