

**НАБОР ИФА**  
**ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ**  
**РИБОСОМНОГО БЕЛКА IgA, IgG, IgM**

**1431-1, Ribosomal P**

Каталог. № : 1431-1  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 12-12-2006



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

**ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ**

Твердофазовым иммуноферментный анализ рибосомного белка IgG, А, М - (ELISA/ИФА) компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» предназначен для определения и полуколичественного измерения IgG, А, М антител к рибосомному белку в образцах человеческих сывороток. Анализ предназначен для обнаружения антител в отдельном образце сыворотки. Результаты анализа применяются как средство диагностики системной волчанки. Только для диагностического использования *in vitro*.

**ВВЕДЕНИЕ**

Системная аутоиммунная болезнь характеризуется наличием циркулирующих ауто-антител, направленных на широкий спектр клеточных антигенов. Системная волчанка (SLE), обычно упоминающаяся как волчанка, наиболее известна из этих болезней. Другие возможные болезни соединительной ткани включают смешанное заболевание соединительной ткани, синдром Шегрена, склеродермию и полимиозит/дерматомиозит. Большая часть может быть диагностирована клиническим обследованием и их антитело профилирует к различным вовлеченным антигенам, которые включают dsDNA, SM, RNP, Ro, La, Scl-70, Jo-1 и гистоны. Поэтому, иммунологические анализы на аутоантитела полезны для диагностики и прогностические оценки аутоиммунной болезни.

**ПРИНЦИП ТЕСТА**

Твердофазовый иммуноферментный анализ компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» предназначен для определения IgG, А, М антител к антигенам рибосомного белка. Очищенные антигены рибосомного белка фиксируются на лунке в твердой фазе микролунок. Разбавленные анализируемые сыворотки добавляются в каждую лунку. Если присутствуют антитела, которые распознают антиген, формируются комплексы антиген-антитело. После инкубации для удаления несвязанного антитела промываются лунки. Фермент, меченный анти-человеческим IgG, М и А, добавляется в каждую лунку. Если присутствует антитело, конъюгат связывается с комплексами антитело-антиген. После инкубации лунки промываются, чтобы удалить несвязанный конъюгат. В каждую лунку добавляется раствор субстрата. При наличии фермента субстрат изменяет цвет. После инкубационного периода реакция останавливается, и интенсивность цвета фотометрически измеряется, проводя не прямое измерение специфического антитела в образце пациента.

**КОМПОНЕНТЫ НАБОРА**

1. **Микропланшет**, покрытый антигеном рибосомного белка: 96 лунок, снабжаемых рамкой для полосок и хранящихся в мешочке из фольги с высушивающим средством/индикатором влажности (1 планшет).
2. **Разбавитель сыворотки**: готовый к использованию. Содержит проклин (0,1%) в качестве консерванта, рН 7,5 +/- 0,2 (1 бутылка, 30 мл).
3. **Калибратор**: человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и пенстреп (0,01%) добавлены в качестве консервантов. Специфический фактор набора напечатан на этикетке флакона (1 флакон, 0,4 мл).
4. **Высоко положительный контроль**: человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и пенстреп (0,01%) добавлены в качестве консервантов. Установленный диапазон напечатан на этикетке флакона (1 флакон, 0,4 мл).
5. **Низко положительный контроль**: человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и пенстреп (0,01%) добавлены в качестве консервантов. Установленный диапазон напечатан на этикетке флакона (1 флакон, 0,4 мл).

6. **Отрицательный контроль**: человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и пенстреп (0,01%) добавлены в качестве консервантов. Установленный диапазон напечатан на этикетке флакона (1 флакон, 0,4 мл).
7. **Конъюгат пероксидазы хрена**: готовый к использованию. Козлиный анти-человеческий IgG, М и А, содержащий проклин (0,1%) в качестве консерванта (1 бутылка, 16 мл).
8. **Раствор хромогена/субстрата**: тетраметилбензидин (ТМВ). Готовый к использованию (1 бутылка, 15 мл).
9. **Промывочный буфер (20х концентрат)**: Содержит TBS, твин и проклин (0,1%) в качестве консерванта (одна бутылка, 50 мл).
10. **Стоп раствор**: Содержит раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> готовый к использованию (1 бутылка, 15 мл).

**ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ**

1. Каждая донорская единица, использованная в приготовлении калибратора и контролей была протестирована одобренным FDA методом на наличие антитела к ВИЧ-1, также и поверхностному антигену вируса гепатита В, дала отрицательный результат. Поскольку не один их методов анализа не дает полной гарантии нана отсутствие ВИЧ-1, вируса гепатита В или других возбудителей инфекций, с этими образцами/реагентами так же как и с образцами пациентов необходимо обращаться с соблюдением 2 уровня биобезопасности, как рекомендуется для любого потенциально инфекционного образца сыворотки или крови человека.
2. Некоторые реагенты в этом наборе содержат азид натрия в качестве консерванта. Азиды могут реагировать с оловянными или медными сточными трубами, образуя взрывчатые вещества азидов. При уничтожении реагентов промыть большим количеством воды, чтобы минимизировать нагромождения азидов.
3. Реагенты содержат консерванты, которые могут быть ядовиты при глотании.
4. Не пипетировать ртом. Избегать контакта реагентов и образцов пациентов с кожей или слизистыми оболочками.
5. Не позволять стоп раствору вступать в контакт с кожей или глазами. При контакте немедленно смыть большим количеством воды.
6. Избегать брызгов или образования аэрозолей.
7. Не использовать сыворотки, инактивированные теплом.
8. Не смешивать и не заменять реагенты разных партий или других производителей.
9. Не разбавлять и не подмешивать реагенты набора.
10. Не загрязнять перекрестно реагенты или образцы.
11. Не использовать раствор субстрата ТМВ, если он начал превращаться в синий.
12. Многогранная стеклянная посуда должна быть вымыта и полностью ополаскиваться от всех детергентов.
13. Не изменять реагент и инкубационные температуры выше или ниже комнатной температуры (21 - 25°C).
14. Промывка важна. Неправильно промытые лунки дадут ошибочные результаты. Не позволяйте лунке высохнуть между инкубациями.
15. Это изделие предназначено только - для ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *IN VITRO*.

**ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

1. Промывочная бутылка, автоматизированная или полуавтоматическая система промывки микропланшета.
2. Микропипетки, включая многоканальные, способные к точному распределению объемов 10-200 мкл (менее чем 3% КВ).
3. Мерные цилиндры на 1 л.
4. Бумажные полотенца.
5. Пробирки для разбавления сыворотки.
6. Емкости для многоканальных пипеток.
7. Наконечники для пипеток.
8. Дистиллированная или деионизированная вода. CAP тип 1 или аналог.
9. Таймер с точностью измерения +/- 1 сек.
10. Ванночки для утилизации отходов и 0,5% гипохлорит натрия (50 мл отбеливателя в 950 мл воды).
11. Микропланшетный считыватель с одной или двойной длиной волны измерения с фильтром 450 нм. При использовании двойной длины волны настройте референтный фильтр на 600-650 нм. Прочтите руководство пользователя или свяжитесь с производителем аппарата, чтобы установить спецификации работоспособности линейности считывателя.

**УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ**

1. Все компоненты набора, которые хранятся при их рекомендуемых условиях хранения, устойчивы до даты

истечения срока годности на их этикетке. Не использовать после истечения их срока годности.

2. Покрытые антигеном лунки. Неиспользованные полоски должны быть немедленно вторично запечатаны в мешочках из фольги с высушивающим средством и индикатором влажности и возвращены на хранение при 2-8°C. Если мешочек герметично закрыть пленкой, лунки устойчивы в течение 30 дней. Если мешочек вторично запечатан термическим способом, лунки устойчивы до окончания их срока годности.
3. Все другие реагенты хранятся при 2-8°C в их оригинальных упаковках.
4. Хранить 1X (разбавленный) промывочный буфер при комнатной температуре (21 - 25°C) до 5 дней, или 1 неделю между 2 - 8°C.

#### СБОР ОБРАЗЦОВ

1. Асептически соберите образцы крови венепункцией, используя приемлемую методику.
2. Сыворотка, содержащая видимые частицы вещества должна быть отцентрифугирована на низкой скорости.
3. Сыворотки могут храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20 до -70°C до шести месяцев в неразмораживающейся камере.
4. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов пациентов.
5. Избегайте использования гемолизированных, липемических или бактериологически зараженных сывороток.

#### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты перед использованием должны быть извлечены из места охлаждения и приведены к комнатной температуре (21 - 25°C). Возвратите все реагенты в холодильник сразу после использования.
2. Все образцы и контроли должны быть смешаны перед использованием.
3. Разбавить 50 мл 20X промывочного буфера до 1 л дистиллированной и/или деионизированной водой. Хорошо перемешать.

#### ОБЩАЯ ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Определить число пациентов, которые нужно проанализировать. Для каждого анализа калибратор должен использоваться в двойном экземпляре. Также высоко положительный контроль, отрицательный контроль и бланк реагент (БР) должны использоваться в каждом анализе. Проверьте программное обеспечение и требования к планшету для правильных постановок калибратора / контроля.
2. Пример постановки:

|    |                        |    |            |
|----|------------------------|----|------------|
| 1A | БР                     | 2A | Пациент #2 |
| 1B | Отриц. контроль        | 2B | Пациент #3 |
| 1C | Калибратор             | 2C | Пациент #4 |
| 1D | Калибратор             | 2D | Пациент #5 |
| 1E | Калибратор             | 2E | Пациент #6 |
| 1F | Высоко полож. контроль | 2F | Пациент #7 |
| 1G | Низко полож. контроль  | 2G | Пациент #8 |
| 1H | Пациент #1             | 2H | Пациент #9 |

3. Для каждой анализируемой сыворотки провести разбавление сыворотки 1:21. Добавьте 10 мкл каждого образца сыворотки к 200 мкл разбавителя образца. Хорошо перемешать.
4. Достаньте требуемое количество лунок из мешочка и установите в держателе для полосок. Оставшиеся полоски необходимо герметично закрыть с осушителем/индикатором влажности. Мешочек необходимо закрыть под влиянием тепла или скрутить и конец запечатать лентой. Если цвет индикатора изменится на из синего на розовый, полоски не должны использоваться.
5. Перенесите 100 мкл предварительно разбавленных образцов в реакционные лунки, используя многоканальную пипетку. Извлеките и удалите каждый образец, по крайней мере, 3 раза, чтобы гарантировать соответствующее смешивание образца перед переносом в реакционную лунку. Используйте новые наконечники пипеток для каждого образца. Добавьте 100 мкл разбавителя сыворотки к бланк реагенту.
6. 5 Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25°C) 30 минут +/- 1 минута.
7. Промыть реакционный планшет 3 раза 1x промывочным буфером. Вытряхнуть жидкость из лунок. При использовании промывочной бутылки, полуавтоматического или автоматизированного промывочного оборудования добавьте в каждую лунку промывочный буфер, убедившись в отсутствии воздушных пузырьков в лунках. Вытряхните весь промывочный буфер из лунок. Повторите промывку еще 2 раза. Для

автоматизированного оборудования может потребоваться до 5 промывок. После конечной промывки вытряхните промывочный буфер и удалите остатки промывочного буфера, постучав резко планшетом по бумажному полотенце. Промывочный буфер можно собирать в ванночку и обрабатывать 0,5% гипохлоритом натрия (отбеливателем) в конце дня.

8. Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую лунку, включая лунку бланк реагента. При добавлении избегайте пузырьков, поскольку они могут выдавать ошибочные результаты.
9. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25°C) в течении 30 минут +/- 1 минуты.
10. Повторите промывку как описано в этапе 6.
11. Добавить в каждую лунку 100 мкл раствора хромогена/субстрата (ТМВ), включая лунку бланк реагента, сохраняя постоянный темп добавления вдоль планшета.
12. Инкубировать каждую лунку реакционного планшета при комнатной температуре (21-25°C) в течении 15 минут +/- 2 минут.
13. Добавить 100 мкл стоп раствора следуя способу добавления раствора хромогена/субстрата (ТМВ), включив лунку бланк реагента. Положительные образцы должны превратиться из синего в желтый. Осторожно постучите планшет, чтобы смешать содержимое лунок. Подождать минимум 5 минут и провести считывание.
14. Образовавшийся цвет необходимо считать на планшетном считывателе ИФА, оборудованном 450 нм фильтром. При использовании двойной длины волны, установите референтный фильтр на 600 - 650 нм. Измерять каждую оптическую плотность (ОП) ссылаясь на бланк реагент. Планшет необходимо считать в течении 30 минут после завершения анализа.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Калибратор и контроли должны использоваться в каждой процедуре анализа.
2. Бланк реагент должен быть < 0.15 ОП при 450 нм.
3. Среднее значение ОП для калибратора должно быть  $\geq 0.30$  при 450 нм.
4. Заданные значения для высокого, низкого и отрицательного контроля должны быть в их соответствующих диапазонах, напечатанных на флаконах. Если значения контролей вне пределов их соответствующих диапазонов, анализ должен считаться недействительным, и он должен быть повторен.
5. Если вышеуказанные критерии не выполнены после повторного анализа, свяжитесь с технической службой производителя.

#### ВЫЧИСЛЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Значение калибратора: Вычислить среднее значение калибратора из 3 определений калибратора. Если любое из трех значений калибраторов отличается более чем на 15% от среднего. Пройгнорируйте значение и вычислите среднее из 2 остальных значений.
2. Поправочный коэффициент: Для отслеживания повседневных колебаний в активности анализа под влиянием комнатной температуры и времени, поправочный коэффициент определен производителем для каждой партии наборов. Поправочный коэффициент напечатан на флаконе калибратора.
3. Пороговое значение ОП: Пороговое значение ОП для каждого анализа определяется умножением поправочного коэффициента на среднее значение калибратора, полученное в этапе 1.
4. Заданное значение: Вычислите заданное значение для каждого образца, разделив значение ОП образца на пороговое значение ОП, полученное в этапе 3.

Пример: ОП, полученные для калибратора = 0.38, 0.42

Среднее значение ОП для калибратора = 0.40

ОП, полученные для сывороток пациентов = 0.60

Поправочный коэффициент = 0.50

Пороговое значение = 0.50 x от 0.40 до 0.20

Заданное значение = от 0.60/0.20 до 3.00

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Заданное значение интерпретация

< 0.90 отрицательный

0.91 - 1.09 сомнительный

$\geq 1.10$  положительный

Образцы с заданными значениями в сомнительном диапазоне должны быть повторно проанализированы. Если после этого результат остается прежним, проанализируйте повторно альтернативным методом или проанализируйте новый образец.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Результаты анализа не должны интерпретироваться как диагностические. Результаты должны использоваться только как вспомогательное средство при диагностике. Результаты должны интерпретироваться вместе с клинической оценкой пациента.
2. В анализе должна использоваться только сыворотка. Необходимо избегать иктерической, липемической, гемолизированной и инaktivированной теплом сыворотки.
3. Заданные значения  $\geq 10.00$  должны быть зафиксированы со значением более 10.
4. Образцы с заданными значениями в сомнительном диапазоне должны быть проанализированы повторно. Если результаты все еще сомнительные, повторить с использованием альтернативного метода или проанализировать новый образец.

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

1. Для определения распространенности антитела рибосомного белка в пациентах с волчанкой, на наборе для определения рибосомного белка компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» была проверена 451 сыворотка от когорты пациентов с волчанкой. 45 сывороток оказались положительными со степенью распространенности 9,98%. Данные указывают, что распространенность антитела рибосомного белка в людей с волчанкой аналогична данным, которые можно найти в литературе (12-20%).
2. Антитела к рибосомному белку редки в людей в норме.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Чувствительность и специфичность

Результаты набора ИФА рибосомного белка IgG, A, M компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» были сравнены с результатами, полученными в анализе сыворотки по Оухтерлони от клинически определенной волчанки (к-во = 46) и образцов в норме (к-во = 137). Таблица 1 подводит итог данных.

Таблица 1

### Чувствительность и специфичность набора ИФА рибосомного белка IgG, A, M

|                   |          | Полож. | Сомнит.   | Отриц. | Общее |
|-------------------|----------|--------|-----------|--------|-------|
|                   |          | > 1.10 | 0.91-1.09 | < 0.90 |       |
| Анализ Оухтерлони | Положит. | 46     | 0         | 0      | 46    |
|                   | Отриц.   | 1      | 0         | 136    | 137   |
|                   | Общее    | 47     | 0         | 136    | 183   |

Относительная чувствительность =  $46/46 = 100\%$  95% Доверительный интервал = 93.5% - 100%  
Относительная специфичность =  $136/137 = 99.3\%$  95% Доверительный интервал = 97.8% - 100%  
Относительное совпадение =  $182/183 = 99.5\%$  95% Доверительный интервал = 98.4% - 100%

Для относительной чувствительности был вычислен доверительный интервал 95%, допуская 1 ошибочный отрицательный результат.

## ТОЧНОСТЬ

Точность ИФА рибосомного белка IgG, A, M компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» была определена во время 8 анализов 6 разных сывороток в 3 разных анализах. Таблица 2 подводит итог данных. С использованием соответствующей методики пользователь должен получить КВ(и) меньше чем 15 %.

Таблица 2

### Данные точности набора рибосомного белка

| Анализ 1 (к-во=8) |       |       |                           | Анализ 2 (к-во=8) |       |       |
|-------------------|-------|-------|---------------------------|-------------------|-------|-------|
| Сыворотка #       | X     | CO    | KB                        | X                 | CO    | KB    |
| 1                 | 1.57  | 0.117 | 7.4%                      | 1.62              | 0.113 | 7.0%  |
| 2                 | 1.68  | 0.176 | 10.5%                     | 1.60              | 0.095 | 5.9%  |
| 3                 | 2.98  | 0.113 | 3.8%                      | 2.83              | 0.128 | 4.5%  |
| 4                 | 2.89  | 0.115 | 4.09%                     | 2.95              | 0.135 | 4.6%  |
| 5                 | 0.29  | 0.027 | 9.29%                     | 0.18              | 0.035 | 19.6% |
| 6                 | 0.09  | 0.042 | 46.3%                     | 0.08              | 0.016 | 20.5% |
| Анализ 3 (к-во=8) |       |       | Между анализами (к-во=24) |                   |       |       |
| X                 | CO    | KB    | X                         | CO                | KB    |       |
| 1.50              | 0.134 | 8.9%  | 1.57                      | 0.127             | 8.1%  |       |
| 1.66              | 0.148 | 8.9%  | 1.65                      | 0.143             | 8.7%  |       |
| 2.74              | 0.127 | 4.6%  | 2.85                      | 0.155             | 5.5%  |       |
| 2.94              | 0.068 | 2.3%  | 2.92                      | 0.109             | 3.7%  |       |
| 0.20              | 0.039 | 19.6% | 0.22                      | 0.056             | 25.6% |       |
| 0.08              | 0.037 | 46.5% | 0.10                      | 0.048             | 48.0% |       |

X = среднее значение рибосомного белка  
CO = стандартное отклонение

KB = коэффициент вариации

## ЛИНЕЙНОСТЬ

Заданные значения рибосомного белка компании «Диагностик Аутомейшн Инк.» были определены при последовательных двукратных разбавлениях 5 положительных сывороток. Заданные значения были сравнены с  $\log_2$  разбавления путем стандартной линейной регрессии. Данные в Таблице 3 указывают, что анализ полуколичественный.

Таблица 3

| Сыворотка # | Неразбавл. | 1:2  | 1:4   | 1:8   |
|-------------|------------|------|-------|-------|
| 1           | 2.70       | 2.52 | 2.24  | 1.93  |
| 2           | 2.53       | 2.29 | 1.99  | 1.57  |
| 3           | 2.89       | 2.71 | 2.47  | 2.23  |
| 4           | 3.68       | 3.18 | 2.59  | 1.94  |
| 5           | 2.09       | 1.38 | 0.94  |       |
| 1:16        | 1:32       | 1:64 | 1:128 | r     |
| 1.57        | 1.33       | 0.98 |       | 0.997 |
| 1.20        | 0.86       |      |       | 0.997 |
| 1.93        | 1.57       | 1.20 | 0.90  | 0.994 |
| 1.59        | 1.00       | 0.68 |       | 0.997 |
|             |            |      |       | 0.991 |

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Сыворотки, содержащие высокий уровень антител к потенциально перекрестно-реактивным антигенам анализировались набором ИФА рибосомного белка компании «Диагностик Аутомейшн Инк.». Данные в Таблице 4 указывают, что антитела, чередующиеся с аутоантигенами не реагируют перекрестно с клиническим набором ИФА рибосомного белка.

Таблица 4

### Перекрестная реактивность

| Сыворотка # | Заданное значение производителя | Интерпретация | Специфичность |
|-------------|---------------------------------|---------------|---------------|
| 1           | 0.21                            | -             | Ro            |
| 2           | 0.18                            | -             | Ro            |
| 3           | 0.17                            | -             | Ro            |
| 4           | 0.13                            | -             | La            |
| 5           | 0.09                            | -             | La            |
| 6           | 0.10                            | -             | La            |
| 7           | 0.09                            | -             | ScI-70        |
| 8           | 0.18                            | -             | ScI-70        |
| 9           | 0.17                            | -             | ScI-70        |
| 10          | 0.15                            | -             | Jo-1          |
| 11          | 0.18                            | -             | Jo-1          |
| 12          | 0.15                            | -             | Jo-1          |
| 13          | 0.38                            | -             | Sm            |
| 14          | 0.43                            | -             | Sm            |
| 15          | 0.40                            | -             | Sm            |
| 16          | 0.19                            | -             | RNP           |
| 17          | 0.15                            | -             | RNP           |
| 18          | 0.14                            | -             | RNP           |
| 19          | 0.14                            | -             | DNA           |



## 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)

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»