

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО СКРИНИНГА АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ

### ORG 600, ANA Detect

Каталог. № : **ORG 600**  
Количество : **96**  
Производитель: **ORGENTEC**  
**GmbH, (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.

### НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он разработан для качественного скрининга аутоантител класса IgG в одной ячейке к ядерным антигенам: dsDNA, гистонам, SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, SmRNP, Scl-70, PM-Scl-100, Jo-1, и центромерным антигенам.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Очищенные антигены (SS-A 52 (Ro 52), SS-A 60 (Ro 60), SS-B (La), RNP/Sm, RNP-70, RNP-A, RNP-C, SmBB', Sm-D, Sm-E, Sm-F, Sm-G, Scl-70, Jo-1, dsDNA, ssDNA, poly-nucleosomes, mono-nucleosomes, histone complex, histone H1, histone H2A, histone H2B, histone H3, histone H4, PM-Scl-100, centromere B) привиты к микросферам. Антитела к этим антигенам, если присутствуют в разведенных сыворотке или плазме, связываются с соответствующим антигеном.

Промывка ячеек удаляет неспецифические компоненты сыворотки или плазмы.

Раствор конъюгата анти-человечье-IgG-пероксидаза хрена добавляется в ячейки для определения аутоантител, связанных с иммобилизованными антигенами. Избыточный ферментный конъюгат удаляется промывочным раствором.

Хромогенный раствор субстрата, в присутствии связанного конъюгата гидролизует с образованием голубого цвета. Добавление кислоты останавливает реакцию с образованием желтого цвета. Интенсивность окраски прямо считывается при 450 нм.

Набор калиброван по международно признанному стандарту сыворотки от CDC, Атланта, США и затем по референсному препарату ВОЗ для человеческой антиdsDNA Wo/80.

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Воспалительные заболевания соединительной ткани характеризуются идиопатическим генезом, нарушениями клеточного и гуморального иммунитета, системной недостаточностью органов и хроническим течением болезни. Кроме того, на клиническую картину соединительнотканного заболевания накладываются индивидуальные симптомы, что усложняет постановку правильного диагноза.

При рассмотрении разнообразия смешанных заболеваний соединительной ткани такие нарушения характеризуются общими серологическими признаками: присутствием антинуклеарных антител (ANA). Эти антитела направлены против структур ядра и цитоплазмы клетки. Присутствие специфических ANA в сыворотке пациентов коррелирует с тем или иным заболеванием из выше перечисленных.

Антитела к двуспиральной и односпиральной ДНК, гистонам, ядерному рибонуклеопротеину, Smith антигену ассоциируются с СКВ, тогда как антитела к SS-A (Ro) и SS-B (La), встречаются и при СКВ, и при синдроме Шегрена. Антитела к Jo-1 встречаются при полимиозите и дерматомиозите, тогда как антитела к Scl-70 и центромере появляются у пациентов с прогрессирующим системным склерозом. Антигистоновые антитела ассоциируются с СКВ и медикаментозной волчанкой, антиRNP антитела связаны со смешанным заболеванием соединительной ткани и СКВ. Антитела к центромере ассоциированы с CREST-синдромом.

Хотя ИФА методики традиционно используют для выявления аутоантител в сочетании с HEp2 клетками, сейчас становится известным, что ИФ технологии предлагают отличную альтернативу.

ELISA позволяет проводить чувствительный скрининг на один или большее количество аутоантител, возможно, присутствующих в

сыворотке пациентов, одновременно в одной лунке.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным лизоцимом – **1 планшет**.
2. Контроли А (отрицательный), В (cut-off), С (положительный) микро-альбумина в буфере, см. вкладыш со значениями – **3 флакона, 0,5 мл каждый**. Готовы к использованию.
3. Буфер образцов, желтый, готов к использованию - **1 флакон, 15мл**.
4. Раствор ферментного конъюгата (бледно красный), содержащий поликлональный анти-человеческий альбумин, меченый пероксидазой хрена - **1 флакон, 15 мл**. Готов к использованию.
5. Раствор субстрата ТМБ - **1 флакон, 15 мл**. Готов к использованию.
6. Стоп раствор (1M HCl) – **1 флакон, 15 мл**. Готов к использованию.
7. Буферный промывочный раствор, **концентрат** - **1 флакон, 20 мл**.

### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с длиной волны измерения 450 нм;
2. Многоканальный диспенсер или пипетка для дозирования на 100 мкл;
3. Вортекс;
4. Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл;
5. Лабораторное часовое устройство;
6. Программное обеспечение.
7. Дистиллированная вода;
8. Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
9. Пластиковый контейнер для хранения промывочного р-ра.

### СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

### ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8°C.
2. Содержит ячейки микроплшета 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. Разбавленный буфер образцов и моющий буфер стабилен 30 дней при хранении при 2-8°C

### ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
  2. Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
  3. Все материалы следует привести к комнатной температуре.
  4. Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить беспрерывно для получения надежных и точных результатов.
  5. Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
  6. Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
  7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
  8. Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
  9. Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
  10. Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
  11. Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
  12. Не используйте повторно ячейки микроплшета.
- Для всех контролей, на этикетках флаконов указаны соответствующие концентрации. Используя эти концентрации, может быть вычислена калибровочная кривая для полуколичественного считывания результатов пациента.

## ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не смешивайте 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 сыворотки 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 (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте тем не менее не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
7. Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
8. Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
9. Не пипетируйте ртом.
10. Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

### Приготовление буферного промывочного раствора

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

### Приготовление буфера 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. Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

## МЕТОДИКА

Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей и разбавленных проб пациентов в дублях.

1. 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.
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 при комнатной температуре. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Бихроматическое измерение проводите при 600-690 нм (рекомендуется). Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A											
B	B											
C	C											
D	P1											
E	P2											
F	P3											
G												
H												

P1, ... patient sample A-C controls

## ОЦЕНКА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм для Отрицательного контроля (A), cut-off контроля (B), Положительного контроля (C) и сильно Положительного контроля (D) 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.

## ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для качественных результатов оптическая плотность (OD) образца сравнили с оптической плотностью Контроля B:

Отрицательные: OD образца < OD Контроля B

Положительные: OD образца ≥ OD Контроля B

Для точных результатов оптическая плотность образца выражается как значение индекса:

Индекса = OD образца / OD Контроля B

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Калибровка

Система откалибрована по международно признанной контрольной сыворотке от CDC, Атланта, США и, кроме того, против эталонного препарата ВОЗ WO/80.

### Диапазон измерения

Не применяется.

### Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение Индекс 1.0

### Интерпретация результатов

Отрицательный: Индекс < 1.0

Пограничный: Индекс 1.0 – 1.2

Положительный: Индекс > 1.2

### Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образцов. Активность для каждой стадии разбавления рассчитывают как Индекс.

Sample	Dilution	Observed Index	Expected Index	O/E [%]
-	-	-	-	-
1	1:100	4.8	4.8	100
-	1:200	2.2	2.4	92
-	1:400	1.3	1.2	108
-	1:800	0.6	0.6	100
2	1:100	2.8	2.8	100
-	1:200	1.5	1.4	107
-	1:400	0.8	0.7	114
-	1:800	0.4	0.4	111
3	1:100	3.5	3.5	100
-	1:200	1.7	1.8	94
-	1:400	0.8	0.9	89
-	1:800	0.5	0.5	96

### Линейность

Не применяется.

### Воспроизводимость

Статистика для коэффициентов вариации (CV) была рассчитана для каждого из 3 образцов в 24 определениях в одной постановке для оценки воспроизводимости внутри серии.

Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 6 различных серий анализов по 5 определений каждого из 3 образцов:

Внутри серии			
Образец, No	Среднее Значение Индекса	CV, (%)	
1	1,8	6,9	
2	2,4	9,1	
3	2,8	10,4	
Между сериями			
Образец, No	Среднее Значение Индекса	CV, (%)	
1	1,6	9,9	
2	3,7	10,4	
3	4,1	11,2	

### 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	%
SLE	63	62	98.4
Sjogren's Syndrome	2	2	100.0
MCTD	9	9	100.0
Poly- Dermatomyositis	8	8	100.0
Scleroderma	3	3	100.0
CREST	9	9	100.0
Normal human sera	148	3	2.0

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 600	Pos	93	3	242
	Neg	1	145	
		94	148	

Sensitivity: 98.9 %  
Specificity: 98.0 %  
Overall agreement: 98.3 %

### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор является диагностическим. Определение клинического диагноза не должно основываться на результатах одного теста и должно учитывать все данные клинических и лабораторных исследований.

Через совокупный эффект каждого покрытого антигена, сыворотка с положительными результатами при ANA Screen ELISA анализе может быть определена как отрицательная при проведении подтверждающего теста.

### СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- 1 Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей или образца пациентов
  - Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
  - Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 2 Добавить **100 мкл** ферментного конъюгата
  - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
  - Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 3 Пипетировать **100 мкл** раствора Субстрата
  - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- 4 Добавить **100 мкл** Стоп раствора
  - Выдержать **5 минут**
  - Считать результат при **450 нм**



### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-ФранкОвск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
е-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)