

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИНУКЛЕАРНИХ АНТИТІЛ, ПРОФІЛЬ НА 6 ПАРАМЕТРІВ

## ENA 6 parameters profile

Кат. №: **ENA6PRO.CE**

Дата випуску інструкції: **03-2020**

Версія: **2**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпасти.

**Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного визначення антитіл IgG до Ro/SSA, La/SSB, U1-sn RNP68/70 кДа (kDa), Sm, Scl-70, Jo-1 в сироватці та плазмі людини**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

### A. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного визначення аутоантитіл IgG до Ro/SSA, La/SSB, U1-sn RNP68/70 кДа (kDa), Sm, Scl-70, Jo-1 в плазмі і сироватці людини.

Тільки для діагностики in vitro.

### B. ВСТУП

**Аутоімунітет** - це нездатність організму розпізнати свої складові частини як себе, що дозволяє імунну відповідь проти власних клітин і тканин. Будь-яке захворювання, яке виникає внаслідок такої аберантної імунної відповіді, називається **Аутоімунним Захворюванням**.

Ревматоїдні аутоімунні захворювання часто асоціюються з аутоантитілами до Ядерних Антигенів. Ми можемо розрізняти Антинуклеарні Антитіла (ANA), пов'язані з аутоімунними системними захворюваннями, такими як SLE (системний червоний вовчак), RA (ревматоїдний артрит), склеродермія, MCDT (змішана хвороба сполучної тканини) та синдром Шегрена; і Екстраговані Антинуклеарні Антитіла (ENA), пов'язані з аутоімунними системними захворюваннями, такими як поліміозит, SLE, MCDT і синдром Шегрена.

Серологічне виявлення антинуклеарних антитіл (ENA), що екстрагуються, у пацієнтів з підозрою на аутоімунні захворювання є звичайною практикою в кожній імунологічній лабораторії. Коли цей перший діагностичний крок виконується з позитивними результатами, ми можемо продовжити виявлення ізоляту та кількісне визначення окремих антитіл.

### C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті смужками з рекомбінантними або очищеними специфічними антигенами ENA: Ro/SSA, La/SSB, U1-sn RNP68/70 кДа (kDa), Sm, Scl-70, Jo-1.

| Позиція | Аутоантиген                  | Композиція          |
|---------|------------------------------|---------------------|
| A       | Сироватковий альбумін людини | Негативний контроль |
| B       | SSA                          | Рек. Ag             |
| C       | SSB                          | Рек. Ag             |
| D       | U1-sn RNP68/70 кДа (kDa)     | Рек. Ag             |
| E       | Sm                           | Нативний Ag         |
| F       | Scl-70                       | Рек. Ag             |
| G       | Jo-1                         | Рек. Ag             |
| H       | hIgG                         | Позитивний контроль |

Під час 1-ї інкубації тверду фазу обробляють розведеними зразками, а антинуклеарні IgG, якщо вони присутні, захоплюються твердою фазою.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка у 2-й інкубації виявляються зв'язані антинуклеарні IgG шляхом додавання антитіла анти-hIgG, міченого пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антинуклеарних антитіл IgG, присутніх у зразку. Таким чином, наявність IgG у зразку можна визначити за допомогою граничного значення cut-off, здатного розрізняти негативні та позитивні зразки.

Для забезпечення внутрішньої перевірки аналітичної системи включені контроли.

### D. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для виконання 12 тестів.

#### 1. Мікропланшет: MICROPLATE

1 шт. 12 смужок x 8 відривних лунок, покритих рекомбінантними та нативним антигеном (Sm), у присутності бичачих білків. Смужки A і H покриті внутрішніми контролями (Позитивним і Негативним). Пластини запаковуються в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4 °C (°C).

#### 2. Негативний контроль: CONTROL -

1x2.0 мл/флакон (ml/vial). Містить сироватку людини, негативну на антитіла ENA IgG, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 10% фетальної сироватки теляти (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль кодується жовтим кольором.

#### 3. Позитивний контроль: CONTROL +

1x2.0 мл/флакон (ml/vial). Містить сироватку людини, позитивну на антитіла ENA IgG, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 10% фетальної сироватки теляти (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль кодується зеленим кольором.

#### 4. Концентрат промивного буфера: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка (ml/bottle) 20X концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 та 0.1% Kathon GC.

#### 5. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання, кодований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому козячі поліклональні антитіла до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис-буфер pH 6.8 +/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцину сульфат як консерванти.

#### 6. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буфер, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетраметил-бензидину (або TMB) та 0.02% перекису водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

*Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.*

#### 7. Сірчана кислота: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M (M)

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить 0.3 M (M) розчин H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

#### 8. Розчинник для зразків: DILSPE

1x20 мл/флакон (ml/vial). Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.2% Tween 20, 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

#### 9. Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

#### 10. Вкладиш інструкції x 1 шт.

### E. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (1000, 100 і 10 мкл (µl)) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА (сухий або вологий), встановлений на +37 °C (°C) (допуск +/-0.5 °C (°C)).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
- Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

## **F. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген (ТМВ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведені на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 повторних використань пристрою протягом 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися як рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

## **G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно виїняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (µ), щоб очистити зразок для тестування.

## **H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ**

### **Мікропланшет:**

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшет досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва. У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2-8 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

### **Негативний та Позитивний контролі:**

Готовий до використання компонент. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

### **Концентрат Промивного буфера:**

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20X бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

*Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при + 2..8 °C (°C).*

### **Ферментний кон'югат:**

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімікатами, пилом або мікробами.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові стерильні одноразові контейнери.

### **Хромоген/Субстрат:**

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

### **Розчинник зразка:**

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

### **Сірчана кислота:**

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Легенда:

Попереджувальні **Н-фрази**:

**H315** - Викликає подразнення шкіри.

**H319** - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **Р-фрази**:

**R280** - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

**P302+P352** - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

**P332+P313** - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

**P305+P351+P338** - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

**P337+P313** - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

**P362+P363** - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

## I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

- Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
- Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водняні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
- Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 М (М) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μ/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилок позитивних реакцій.
- Час інкубації має допуск +/- 5%.
- Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускна здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
- При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендуються використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.

- Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

## L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
- Переконайтеся, що Хромоген (ТМВ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
- Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
- Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
- Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
- Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
- Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

## M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

- Розведіть зразки 1:101 у правильно позначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте Контролі, оскільки вони готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок.
- Потім внесіть 100 мкл (μl) Негативного, Позитивного Контролів та розведених зразків у кожен лунку в один смужковий модуль згідно з наведеною нижче таблицею прикладу.

|        |   | Мікропланшет |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|--------|---|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
|        |   | 1            | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12  |
| Казеїн | A | NC           | PC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| SSA    | B | NC           | PC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| SSB    | C | NC           | PC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| RNP-68 | D | NC           | PC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| Sm     | E | NC           | PC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| Scl-70 | F | NC           | PC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| Jo-1   | G | NC           | PC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
| hlgG   | H | NC           | PC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |

Легенда: NC = Негативний Контроль PC = Позитивний Контроль S = Зразок

- Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при + 37 °C (°C)**.

**Важливе зауваження:** Смужки повинні бути заклеєні клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

- Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ I.3).
- Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного кон'югату в кожен лунку і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки.

**Важлива примітка:** Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

- Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при +37 °C (°C)**.
- Промийте мікрорунки, як у кроці 5.
- У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 15 хвилин**.

**Важливе зауваження:** Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

- Піпетуйте 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить позитивний контроль та позитивні зразки з блакитного кольору на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі 1.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове).

**Важливі загальні зауваження:**

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

**N. СХЕМА АНАЛІЗУ**

| Метод                             | Операції   |
|-----------------------------------|--|
| Контролі                          | 100 мкл (µl)   |
| Зразки розведені 1:101            | 100 мкл (µl)   |
| <b>1-а інкубація</b>              | <b>45 хвилин</b>   |
| Температура                       | +37 °C (°C)  |
| Кроки промивання                  | 5 циклів із 20 хв. замочування АБО<br>6 циклів без замочування |
| Ферментний кон'югат               | 100 мкл (µl)   |
| <b>2-а інкубація</b>              | <b>45 хвилин</b>   |
| Температура                       | +37 °C (°C)  |
| Кроки промивання                  | 5 циклів із 20 хв. замочування АБО<br>6 циклів без замочування |
| ТМВ/Н <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 100 мкл (µl)   |
| <b>3-я інкубація</b>              | <b>15 хвилин</b>   |
| Температура                       | кімнатна   |
| Сірчана кислота                   | 100 мкл (µl)   |
| Зчитування ОЩ                     | 450 нм (nm)/620-630 нм (nm)                                    |

**O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ**

Перевірка валідації проводиться на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу є відповідними.

Переконайтеся, що досягнуто наступних результатів:

| Параметр                 | Вимоги  |
|--------------------------|---|
| Лунка А                  | < 0.200 значення OD450 нм (nm)                          |
| Лунка Н                  | > 0.750 значення OD450 нм (nm)                          |
| Негативний контроль (NC) | < 0.200 значення OD450 нм (nm) у всіх лунках від В до G |
| Позитивний контроль (PC) | > 0.750 значення OD450 нм (nm) у всіх лунках від В до G |

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

| Проблема                                      | Перевірити  |
|---|---|
| <b>Лунка А</b> > 0.200 значення OD450 нм (nm) | 1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу |
| <b>Негативний контроль</b>                    | 1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в  |

|  |  |
|--|--|
| > 0.200 значення OD450 нм (nm) у всіх лунках від В до G<br>коефіцієнт варіації > 30% | <ol style="list-style-type: none"> <li>рамках попереднього кваліфікаційного дослідження;</li> <li>чи використовується відповідний миючий розчин, а перед використанням вошер був ним праймований;</li> <li>чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивного контролю замість негативного);</li> <li>чи не відбулось забруднення негативного контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або ферментного кон'югату;</li> <li>чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом;</li> <li>чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.</li> </ol> |
| <b>Позитивний контроль</b><br>OD450 нм (nm) < 0.750 у всіх лунках від В до G         | <ol style="list-style-type: none"> <li>чи процедура була правильно виконана;</li> <li>чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного контролю);</li> <li>чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні;</li> <li>чи не відбулось зовнішнього забруднення контролю.</li> </ol>   |
| <b>Лунка Н</b><br>< 0.750 значення OD450 нм (nm)                                     | <ol style="list-style-type: none"> <li>чи процедура була правильно виконана;</li> <li>чи під час внесення Ферментного Кон'югату;</li> <li>чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні;</li> <li>чи не відбулось зовнішнього забруднення Ферментного Кон'югату.</li> </ol>  |

Якщо виникла якась із вищезазначених проблем після перевірки, повідомте про цю проблему керівнику для подальших дій.

**P. РЕЗУЛЬТАТИ**

Якщо тест виявляється дійсним, результати розраховуються на основі середнього значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) лунок A1 та A2 за допомогою граничного значення cut-off (Co), визначеного за такою формулою:

$$\text{Cut-Off} = \text{середнє}(A1+A2) + 0.300$$

Значення, знайдене для тесту, використовується для інтерпретації результатів, як описано в наступному параграфі.

**Важливе зауваження:** Коли обчислення результатів здійснюється за допомогою оперативної системи автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для обчислення величини cut-off та отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

**Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ**

Пристрій ENA6PRO.CE, який містить 6 видів антигенів, дає чітку вказівку на те, негативний чи позитивний зразок щодо певного антитіла. Результати тесту за параметрами інтерпретуються як співвідношення значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) зразка (S) і граничного значення cut-off (Co), або S/Co, відповідно до наступної таблиці:

| S/Co             | Інтерпретація |
|------------------|---------------|
| < 0.8            | Нормальний    |
| 0.8 ≤ S/Co < 1.2 | Сумнівний     |
| ≥ 1.2            | Підвищений    |

Нормальний результат свідчить про те, що у пацієнта не вироблені антитіла ENA IgG.

Будь-якого пацієнта, у якого виявлено неоднозначний результат, слід повторно перевірити на другому зразку, взятому через 1-2 тижні після первинного зразка, та/або повторно перевірити за допомогою набору ІФА, специфічного для кількісної оцінки одиночного аутоантитіла.

Підвищений результат вказує на те, що у пацієнта вироблені антитіла ENA IgG.

Нижче наведено приклад розрахунку:

**Значення IGS OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm):**

**Важлива примітка:**

Наведені нижче дані не повинні використовуватися замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Значення A1-A2: 0.025-0.070 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm)  
Середнє значення: 0.048 OD 450 nm (nm)

Cut-off = 0.048+0.300 = 0.348 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm)

|        |   | NC    | PC    | S1    |
|--------|---|-------|-------|-------|
|        |   | 1     | 2     | 3     |
| Казеїн | A | 0.025 | 0.070 | 0.030 |
| SSA    | B | 0.058 | 3.998 | 3.998 |
| SSB    | C | 0.023 | 3.343 | 2.873 |
| RNP-68 | D | 0.032 | 1.909 | 0.071 |
| Sm     | E | 0.039 | 2.339 | 0.090 |
| Scl-70 | F | 0.023 | 1.396 | 0.071 |
| Jo-1   | G | 0.018 | 2.209 | 0.046 |
| hlgG   | H | 2.116 | 2.313 | 1.902 |

Легенда: NC = Негативний Контроль PC = Позитивний Контроль S = Зразок

Негативний контроль: < 0.200 значення OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) в лунках від B1 до G1; S/Co < 0.8 - прийнято

Позитивний контроль: > 0.750 значення OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) в лунках від B2 до G2; S/Co > 1.2 – прийнято

- Зразок 1: Лунка A3 < 0.200 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) - прийнято  
Лунка B3 3.998 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) - S/Co > 1.2 - підвищений для SSA  
Лунка C3 2.873 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) - S/Co > 1.2 - підвищений для SSB  
Лунка D3 0.071 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) - S/Co < 0.8 - норма для U1-sn RNP68/70 кДа (kDa)  
Лунка E3 0.090 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) - S/Co < 0.8 - норма для Sm  
Лунка F3 0.071 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) - S/Co < 0.8 - норма для Scl70  
Лунка G3 0.046 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) - S/Co < 0.8 - норма для Jo1  
Лунка H3 > 0.750 OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) - прийнято

**Важливі примітки:**

- Одних результатів цього тесту недостатньо для встановлення чіткого діагнозу аутоімунного захворювання. Необхідно провести інші діагностичні тести, особливо кількісне визначення окремих антитіл. Картина різних комбінацій антитіл та їх концентрація разом із загальною клінічною картиною пацієнта є корисними діагностичними інструментами при оцінці ревматоїдних аутоімунних захворювань.
- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.

**R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Оцінку продуктивності проводили на панелях позитивних і негативних зразків з посиланням на референсний набір з маркуванням CE.

**1. Межа виявлення**

Європейське Співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту.

За його відсутності визначено Внутрішній Золотий Стандарт (або IGS), отриманий з плазми людини, яка містить усі шість аутоантитіл із високою концентрацією, щоб забезпечити постійну та високу чутливість пристрою.

Межа виявлення розрахована як середнє значення OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) лунки A1 Негативного Контролю + 5 SD.

У таблиці нижче наведені середні значення OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) для цього стандарту при розведенні, а потім дослідженні в аналізі.

|        |   | LP1   | LP2   |
|--------|---|-------|-------|
|        |   | 1     | 2     |
| Казеїн | A | 0.084 | 0.062 |
| SSA    | B | 3.998 | 3.998 |
| SSB    | C | 3.170 | 2.986 |
| RNP-68 | D | 1.699 | 1.511 |
| Sm     | E | 2.236 | 1.861 |
| Scl-70 | F | 1.202 | 1.004 |
| Jo-1   | G | 2.241 | 1.949 |
| hlgG   | H | 1.486 | 1.774 |

**2. Діагностична Чутливість та Специфічність**

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні Оцінки Ефективності на панелях зразків, які були класифіковані як позитивні референс-набором із маркуванням CE.

Діагностичну чутливість досліджували на щонайменше 50 зразках, позитивних з референсним набором. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів із клінічною історією аутоімунного захворювання.

Діагностичну специфічність визначали на панелях щонайменше 50 негативних зразків від нормальних осіб і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, що потенційно інтерферують.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів підготовки (цитрат, EDTA та гепарин), так і сироватки. Жодної помилкової реактивності через метод підготовки зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були аналізовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків інтерферує з виконанням тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких інтерференцій не спостерігалось.

Перехресної реакції не спостерігалось.

Оцінка Ефективності надала такі значення:

|               |        |
|---------------|--------|
| Чутливість    | ≥ 98 % |
| Специфічність | ≥ 98 % |

**3. Точність**

Негативний та позитивний контроль використовували для перевірки цього параметра шляхом тестування 12 повторень одного зразка на двох партіях продукту. Значення CV%, отримані в цьому дослідженні, становили 4-20% залежно від значень OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm). Отримана варіабельність не призвела до неправильної класифікації зразків.

**5. ОБМЕЖЕННЯ**

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналізу.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після відтавання, можуть давати деякі помилкові результати.

Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не об'єднаних.

Діагноз аутоімунного захворювання не слід встановлювати на основі одного результату тесту. Необхідно враховувати клінічний анамнез пацієнта, його симптоматику, а також інші діагностичні дані.

Помилкова позитивність оцінюється як менше ніж 2% від нормальної популяції.

**T. ЛІТЕРАТУРА**

- Int J Pathology. Dec 2007; 5(2):67-71. Pattern of anti-ENA (extractable nuclear antigens) antibodies in different clinical disorders; a clinical laboratory based study. I Siddiqui, J Farooqi, F Ghani, A Habib, DA Shariff.
- Journal of Clinical Pathology. 2001, 54:413; doi:10.1136/jcp. It is useful to test for antibodies to extractable nuclear antigens in the presence of a negative antinuclear antibody on Hep-2 cells? KF Thomson, A Murphy, MJD Goodfield, SA Misbah.
- Modern Medical Laboratory. Vol 31, №6, Page 495-499 (2003). Immunity. The measuring method of anti-ENA antibody. Sakai, Hiroshi.
- Annals of the New York Academy of Sciences. 2005, vol. 1050, pp. 327-339. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. P Eissfeller, M Sticherling, D Sholz, K Hennig, T Luttich.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



#### ВИРОБНИК

##### **DIA.PRO**

*Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milano) - Italy  
Phone +39 02 27007161  
Fax +39 02 44386771  
e-mail: info@diapro.it*

##### **ТОВ ДІА.ПРО**

*Діагностік Біопробс s.r.l.  
вул. Г. Кардуччі, 27  
20099 Сесто Сан Джованні  
Мілан (МІ) Італія  
тел.: +39 02 2700 7161  
факс: +39 02 44386771  
e-mail: info@diapro.it*



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

*ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)*

