

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0
Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58
Internet: www.orgentec.com

Návod k použití
2013-02



ORG 544 ENA-4-Profile

KRÁTKÝ POPIS

ENA-4-Profile je testovací systém ELISA pro kvalitativní měření IgG tříd protilátek proti SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Sm, RNP/Sm ve vzorcích lidského séra nebo plasmy. Tento product je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

POUŽÍVANÉ SYMBOLY

	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro		Mikrotitrační
	Výrobce		Kalibrátor
	Katalogové číslo		Kalibrátor
	Dostačuje pro		Kalibrátor
	Kód šarže		Kalibrátor
	Spotřebujte do		Kontrola pozitivní
	Teplotní omezení		Kontrola negativní
	Viz návod k použití		Vzorkový pufr
	Chraňte před slunečním světlem		Enzymový konjugát
	Pro jednorázové použití		TMB substrátový roztok
	Datum výroby		Ukončovací roztok
			Promývací pufr
			Připraven k použití

PRINCIP TESTU

Mikrotitrační destičky jsou potaženy čistěným extractable nuclear antigens (ENA) SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Sm, RNP/Sm.

Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: protilátky přítomné v pozitivních vzorcích se navážou na antigen nanesený na povrch reakčních jamek a vytvoří komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Následně přidání enzymatický konjugát se naváže na imobilizovaný komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při druhém promytí odstraní nenavázaný enzymatický konjugát. Po přidání enzymatického substrátu dojde k hydrolyze a ke vzniku zbarvení v průběhu inkubace. Přídavek kyseliny zastaví reakci, které tvoří žlutý finální produkt. Intenzita žlutého zbarvení odpovídá koncentraci komplexu protilátky a antigenu a lze ji fotometricky měřit při vlnové délce 450 nm.

OBSAH SOUPRAVY

ORG 544		Dostačuje pro 96 stanovení
	1	Dělitelná mikrotitrační destička obsahující 12 modulů s 8 jamkami. Připraveno k použití. Kód produktu na mikrotitrační:
	1x 1 ml	Kalibrátor SS-A (hraniční), obsahující ENA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1 ml	Kalibrátor SS-B (hraniční), obsahující ENA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1 ml	Kalibrátor Sm (hraniční), obsahující ENA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1 ml	Kalibrátor RNP (hraniční), obsahující ENA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 2 ml	Kontrola pozitivní, obsahující ENA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
	1x 2 ml	Kontrola negativní, obsahující ENA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
	20 ml	Vzorkový pufr P; žlutá; obsahuje PBS, BSA, saponáty, ochranný prostředek azid sodný 0.09%, 5x koncentrát.
	15 ml	Enzymový konjugát; světle červená; obsahuje protilidské protilátky IgG, označeno HRP; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek PROCLIN 0,05%
	15 ml	TMB substrátový roztok; 3,3', 5,5'- tetramethyl-benzidín. Připraveno k použití.
	15 ml	Ukončovací roztok; obsahuje kyselinu. Připraveno k použití.
	20 ml	Promývací pufr; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát.
	1	Návod k použití: ELISA Mini-CD
	1	Certifikát analýzy

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- Reader – čtečka mikrotitračních desek schopná koncových měření při 450 nm; volitelně 620 nm referenční vlnové délky
- software pro redukci dat
- vícekanálový dávkovač nebo pipeta pro opakované dávkování o obsahu 100 µl
- mixér Vortex
- mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- laboratorní stopky
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- odměrný válec na 1000 ml, 100 ml
- plastová nádoba pro skladování promývacího roztoku

Automatizace

Orgentec ELISA sety lze použít na otevřených automatických procesorech ELISA. Každý test musí být validní na příslušném automatizovaném systému. Informace jsou k dispozici na vyžádání.

ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

- Krevní vzorky odebírat podle platných směrnic a metod.
- Krev nechat sražit a sérum získat odstředěním.
- Používání hemolitičkových, lipemických a ikterických sér je potřeba se vyhnout.
- Při teplotě 2 - 8 °C chlazené vzorky séra a plazmy mohou být skladovány až 5 dní. Je-li plánováno delší skladování, měly by být vzorky rozděleny na alikvotní části a při -20 °C hluboce zmrazeny.
- Vyhnout se opakovanému rozmrazení a zmrazení! To může vést k variabilní ztrátě aktivity autoprotlátek nebo protilátek.
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2-8°C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Skladujte mikrotitrační hermeticky uzavřeny a v suchu v dodaném zásobníku.
- Uchovatelnost neotevřené soupravy je 18 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální šarže.
- Rozředěný mycí roztok a vzorkový pufr jsou stabilní minimálně 30 dní, jsou-li skladovány při 2-8°C. Doporučujeme spotřebovat stejný den.

POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Složky soupravy nepoužívejte po uplynutí doby trvanlivosti.
- Nezaměňujte jednotlivé součásti souprav z různých šarží a produkty.
- Všechny složky musejí mít pokojovou teplotu (20 – 28 °C).
- Připravte si všechny složky a vzorky. Jakmile test začne, je nutné provést celý bez přerušení.
- Dvojité kontroly mohou být provedeny. Tímto způsobem chyby pipetování mohou být více zřejmé.
- Provádějte jednotlivé kroky testu výhradně v určeném pořadí.
- Vždy používejte čerstvě naředěné vzorky.
- Pipetujte veškeré složky a vzorky na dna jamek.
- Aby nedocházelo ke kontaminaci, vyměňujte špičku mezi jednotlivými vzorky a kontrolami soupravy.
- Dosažení nejlepších výsledků je podmíněno důkladným vymytím titračních jamek a důkladným odstraněním promývacího pufru.
- Všechny kroky inkubace musejí být přesně časovány.
- Mikrotitrační destičku nepoužívejte opakovaně.

UPOZORNĚNÍ A PREVENCE

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Komponenty obsahující lidské sérum byly otestovány a nebyly nalezeny HBsAg, HCV, HIV1 a HIV2 dle schválených metod FDA. Žádný test nemůže zaručit absenci HBsAg, HCV, HIV1 nebo HIV2 a je tedy nutno s každým lidským sérem, obsahujícím látky testu, manipulovat jako s infekčním materiálem.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhněte se kontaktu se substrátem TMB (3,3',5,5'-tetrametyl benzidín).
- Ukončovací roztok obsahuje kyselinu, dle klasifikace je bezpečná. Zabraňte kontaktu s pokožkou.
- Kontrola, vzorkový roztok a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace obsahuje 0.05% ProClinu 300 jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:

- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchněte důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně opláchněte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Dle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze: Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepijte, nekuřte nebo nenanášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a políty materiál řádně zlikvidujte.
- Limity vystavení / ochrana osob: Noste ochranné rukavice z nitrilové pryže nebo přirozeného latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.

- Situace, kterým je třeba předcházet: Roztok substrátu je citlivý na světlo. Skladujte na tmavém místě.
 - Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.
- Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami séry.

Příprava Složek

WASH

Naředte obsah Promývacího pufru koncentrátu (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000ml (1l).

DILUENT

Vzorkový pufr P: Před použitím, naředte obsah (20 ml) lahvičky koncentrovaného vzorkového pufru 5x destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 100 ml.

Příprava Složek

Před použitím naředěňte vzorků od pacientů 1:100 se vzorku pufru:

Přidejte 990 µl předdefinovaného vzorkového pufru ve zkumavce a přidejte 10 µl vzorku.

Dobře promíchejte. Kontrolní vzorky a kalibrátory jsou připraveny k použití a není třeba je ředit.

PŘÍPRAVA SLOŽEK

Připravte si dostatečný počet mikrotitračních modulů pro všechny kontrolních vzorky a ředěné vzorky.

1. Napipetujte do jamek po 100 µl kalibračních roztoků, kontrolních roztoků a ředěných vzorků pacientů. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě (20 – 28 °C).
Odstraňte obsah mikrojamek a promyjte je třikrát pomocí 300 µl promývacího roztoku.
2. Do každé jamky přidejte 100 µl enzymového konjugátu. Inkubujte po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
Odstraňte obsah mikrojamek a promyjte je třikrát pomocí 300 µl promývacího roztoku.
3. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku TMB substrátu. Inkubujte po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
4. Do každé jamky přidejte 100 µl ukončovacího roztoku. Inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Odečtete optickou densitu při vlnové délce 450 nm (referenční 600–690 nm) a vypočtete výsledky. Vzniklá barva je stabilní minimálně po dobu 30 minut. Během této doby odečtete optickou densitu.

Příklad pro pipetovací schéma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Antigeny ve modulů:
A	C+	C+	C+	C+									red = SS-A
B	SS-A	SS-B	Sm	RNP									blue = SS-B
C	C-	C-	C-	C-									yellow = Sm
D	P1	P1	P1	P1									green = RNP
E	P2	P2	P2	P2									
F	P3	P3	P3	P3									
G	P4	P4	P4	P4									
H	P5	P5	P5	P5									

red blue yellow green
P1, ... Vzorky Kalibrátor: SS-A, SS-B, Sm, RNP C+, C- Kontrola

VALIDACE

Tento test je platný, pouze pokud optická densita při vlnové délce 450 nm pro kalibrátory / kontroly a výsledky kontrol odpovídá příslušným rozsahům hodnot uvedených v osvědčení o analýze přiloženém u každé testovací soupravy. Pokud kterékoli z těchto kritérií není splněno, jsou výsledky neplatné a test je nutno opakovat.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro kvalitativní výsledky: pro každý antigen u profilu optické density (OD) vzorku v porovnání s OD antigen-specifického kalibrátoru

Negativní: OD vzorku < OD kalibrátoru

Pozitivní: OD vzorku ≥ OD kalibrátoru

Pro podrobné výsledky se optická densita vzorku vyjádřený jako Indexová hodnota:

Index = OD vzorku / OD Kalibrátoru

CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

KALIBRACE

Test Systém je kalibrován proti mezinárodně uznávaného referenčního séra od CDC, Atlanta

Rozsah měření

neplatí

Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků sér dárců zdravé krve byly stanoveny následující rozsahy pomoci analýzy ELISA:

Cut-off Index 1.0

Interpretace výsledků

negativní Index < 1.0
hraniční Index 1.0 - 1.2
pozitivní Index > 1.2

Linearita

Vzorky pacientů obsahující vysoké hladiny specifických protilátek byly ředěny vzorku pufru.. Činnost každého kroku ředění byla vypočtena jako Indexová hodnota.

Vzorek	Ředění	Pozorovaná Index	Očekávaná Index	P/O [%]
(SS-A)	1:100	4.9	4.9	100
.	1:200	2.5	2.4	103
.	1:400	1.3	1.2	105
.	1:800	0.6	0.6	98
(SS-B)	1:100	5.2	5.2	100
.	1:200	2.5	2.6	97
.	1:400	1.3	1.3	95
.	1:800	0.6	0.7	88
(Sm)	1:100	4.5	4.5	100
.	1:200	2.2	2.3	96
.	1:400	1.1	1.1	96
.	1:800	0.5	0.6	89
(RNP/Sm)	1:100	4.2	4.2	100
.	1:200	2.0	2.1	96
.	1:400	1.0	1.0	94
.	1:800	0.5	0.5	94

Limit detekce

neplatí

Technické údaje

Intraanalizační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 nálezů v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

Interanalizační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 6 nálezů při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-Assay		
Vzorek	Průměr Index	CV %
SS-A	1.5	4.3
SS-B	1.3	5.0
Sm	1.7	3.1
RNP/Sm	1.1	3.9

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr Index	CV %
SS-A	1.4	3.6
SS-B	1.2	4.0
Sm	1.7	2.3
RNP/Sm	1.2	3.6

Interference

Nebyla pozorována žádná interference se séry, která byla hemolytická (až do 1 000 mg/dl), lipemická (až do 3g/dl triglyceridů) nebo obsahovala bilirubin (až 40 mg/dl). Taktéž nebyly pozorovány žádné efekty interference s použitím antikoagulancií (EDTA, heparin, citrát).

Výsledky studie

Study population	n	n Pos*	%
SLE	63	56	88.9
Sjogren's Syndrome	10	10	100.0
MCTD	10	10	100.0
Scleroderma	10	3	30.0
Rheumatoid arthritis	60	2	3.3
Normal human sera	148	3	2.0

* positive for one or more antigens

		Klinická diagnóza		
		Pos	Neg	
ORG 544	Pos	79	5	301
	Neg	14	203	
		93	208	
		senitivitát	84.9 %	
		specifická	97.6 %	
		diagnostická efektivita	93.7 %	

HRANICE METODY

Toto vyšetření je diagnostická pomůcka. Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediného testu, ale měly by být hodnoceny lékařem po všech klinických a laboratorních testech a porovnány s celkovým klinickým obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by měla být přijata individuálně.

Výše patologické a normální referenční rozmezí pro protilátek u vzorků pacientů je třeba považovat za doporučení pouze. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí podle normy ISO 15189 nebo jiné použitelné laboratorní pokyny.

REFERENCE

- Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. Ann Rheum Dis 2003; 62(6):556-560.
- Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test. Lupus 2010; 19(8):906-912.
- Brouwer R, Hengstman GJ, Vree EW, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. Ann Rheum Dis 2001; 60(2):116-123.
- Castro C, Gourley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(2 Suppl 2):S238-S247.
- Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G et al. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. Autoimmun Rev 2011; 10(3):150-154.
- Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibodies predate

- the onset of Systemic Lupus Erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 13(1):R30.
7. Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis JID* - 0372355 2004; 63(4):386-394.
 8. Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus* 2011; 20(3):250-255.
 9. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(7):1052-1056.
 10. Kattah NH, Kattah MG, Utz PJ. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. *Immunol Rev* 2010; 233(1):126-145.
 11. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 2009; 4:1.
 12. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420-1422.
 13. Petri M, Magder L. Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review. *Lupus* 2004; 13(11):829-837.
 14. Poole BD, Schneider RI, Guthridge JM, Velte CA, Reichlin M, Harley JB et al. Early targets of nuclear RNP humoral autoimmunity in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60(3):848-859.
 15. Putova I, Dostal C, Becvar R. Prevalence of antinucleosome antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109:275-286.
 16. Reville JD. Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus JID* - 9204265 2004; 13(5):290-297.
 17. Simon JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sanchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(2):220-224.
 18. Sinclair D, Saas M, Williams D, Hart M, Goswami R. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies?--The routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs. *Clin Lab* 2007; 53(3-4):183-191.
 19. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(2):316-324.
 20. Maidhof W., Hilius O. Lupus: an overview of the disease and management options. *P T* 2012; 37(4):240-9.
 21. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012; 64(6):797-808.

