

## 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  
2013-03



## ORG 689 ANCAscreen hs (high sensitive)

### KRÁTKÝ POPIS

ANCAscreen je testovací systém ELISA pro kvalitativní měření IgG tříd protilátek proti PR3, MPO 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		Kontrola
	Katalogové číslo		Kontrola
	Dostačuje pro		Kontrola
	Kód šarže		Vzorkový pufr
	Spotřebujte do		Enzymový konjugát
	Teplotní omezení		TMB substrátový roztok
	Viz návod k použití		Ukončovací roztok
	Chraňte před slunečním světlem		Promývací pufr
	Pro jednorázové použití		Připraven k použití
	Datum výroby		

### PRINCIP TESTU

Mikrotitrační destičky jsou potaženy čištěným antigenem PR3, MPO.

Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: protilátky přítomné v pozitivních vzorcích se naváží 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 enzymatického konjugátu 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. Přidání 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 689		1	Dostačuje pro 96 stanovení
		1	Dělitelná mikrotitrační destička obsahující 12 modulů s 8 jamkami. Připraveno k použití. Kód produktu na mikrotitrační: <b>ANC</b>
		1x 1.5 ml	Kontrola A (negativní), obsahující PR3, MPO protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
		1x 1.5 ml	Kontrola B (hraniční), obsahující PR3, MPO protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
		1x 1.5 ml	Kontrola C (pozitivní), obsahující PR3, MPO protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
		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-DVD
		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 srazit a sérum získat odstředěním.
- Používání hemolytických, lipemických a ikerických sér je potřeba se vyhnout.
- Při teplotě 2 - 8 °C chlazené vzorky séra a plasmy 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 autoprotilátek 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.
- Dvojitě kontroly mohou být provedeny. Tímto způsobem chyby pipetování mohou být více zřejmé.
- Provádějte jednotlivé kroky testu výhradně v určeném pořadí.
- Vždy používejte čerstvé 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 benzidin).
- 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 oplachujte 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 vyhlídání absorbuje 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 předředěného 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 mikrojamky 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 mikrojamky 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.  
Odečtěte optickou densitu při vlnové délce 450 nm (referenční 600–690 nm) a vypočítejte výsledky. Vzniklá barva je stabilní minimálně po dobu 30 minut. Během této doby odečtěte optickou densitu.

Příklad pro pipetovací schéma:

	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, ... Vzorky A-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 je (OD) vzorku v porovnání s optickou densitou Control B:

Negativní: OD vzorku < OD Kontroly B

Pozitivní: OD vzorku ≥ OD Kontroly B

Podrobné výsledky optické density vzorku jsou vyjádřeny jako Indexová hodnota:

Index = OD vzorku / OD Kontroly B

## CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

### KALIBRACE

Tento analyzační systém je zkaližován v relativních smluvených jednotkách, protože nejsou k dispozici žádné mezinárodní referenční přípravky.

### 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
pozitivní	Index ≥ 1.0

### Linearita

Jedná se o kvalitativní test. Požadavky na kvantitativní rozbor nejsou použitelné.

## Limit detekce

neplatí

## Technické údaje

Intraanalyzační 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.

Interanalyzační 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 %
1 (MPO)	1.3	3.4
2 (PR3)	1.2	5.4
3 (MPO)	1.4	4.1
4 (PR3)	1.1	4.4
5 (MPO)	4.0	3.3
6 (PR3)	4.2	4.5

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr Index	CV %
1 (MPO)	1.1	4.6
2 (PR3)	0.9	11.9
3 (MPO)	1.3	9.6
4 (PR3)	1.4	4.5
5 (MPO)	4.6	9.0
6 (PR3)	3.9	7.4

## 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 antikoagulantů (EDTA, heparin, citrát).

## Výsledky studie

		Klinická diagnóza		
		Pos	Neg	
ORG 689	Pos	39	1	
	Neg	2	43	
		41	44	85
	senitivita	95.1 %		
	specifita	97.7 %		
	diagnostická efektivita	96.5 %		

## 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

- Jennette, J. C. and Falk, R. J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies and Associated Diseases: A Review. Am. J. Kidney Dis. 1990, Vol. XV, No. 6: 517 -529.
- Gross, W. L. et al. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Diseases: A Rheumatologist's Perspective. Am. J. Kidney Dis. 1991, Vol. XVIII, No. 2: 175 - 179.
- Wieslander, J. How are Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies Detected? Am. J. Kidney Dis. 1991, Vol. XVIII, No. 2: 154 - 158.
- Lesavre, P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies antigen specificity. Am. J. Kidney Dis. 1991, Vol. XVIII, No. 2: 159 - 163.
- Hagen, E. C. et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved the assays, and the clinical and possible pathogenic consequences. Blood 1993, Vol. 81: 1996 - 2000.

- Gross, W. L. et al. Immunodiagnostische und immunopathogenetische Bedeutung von Anti- Neutrophilen-Cytoplasma-Antikörpern. Dtsch. Med. Wochenschr. 1993, Vol. 118: 191 - 199.

