

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
2012-08



ORG 509 Anti-SS-B

KRÁTKÝ POPIS

Anti-SS-B je testovací systém ELISA pro kvantitativní měření IgG tříd protilátek proti SS-B 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		Kalibrátor
	Teplotní omezení		Kalibrátor
	Viz návod k použití		Kontrola pozitivní
	Chraňte před slunečním světlem		Kontrola negativní
	Pro jednorázové použití		Vzorkový pufr
	Datum výroby		Enzymový konjugát
			TMB substrátový roztok
			Ukončovací roztok
			Promývací pufr
			Připraven k použití

PRINCIP TESTU

Mikrotitrační destičky jsou potažené čistěným antigenem SS-B

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 hydrolýze 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 509		96	Dostačuje pro 96 stanovení
	1		Dělitelná mikrotitrační destička obsahující 12 modulů s 8 jamkami. Připraveno k použití. Kód produktu na mikrotitrační:
	1x 1.5 ml		Kalibrátor A 0 U/ml, obsahující séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml		Kalibrátor B 12.5 U/ml, obsahující SS-B protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml		Kalibrátor C 25 U/ml, obsahující SS-B protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml		Kalibrátor D 50 U/ml, obsahující SS-B protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml		Kalibrátor E 100 U/ml, obsahující SS-B protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml		Kalibrátor F 200 U/ml, obsahující SS-B protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
	1x 1.5 ml		Kontrola pozitivní, obsahující SS-B protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
	1x 1.5 ml		Kontrola negativní, obsahující SS-B protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití. Koncentrace je uvedena v certifikátu o analýze.
	15 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-benzidin. 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 hemolitických, lipemických a ikerických 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 autoprotoláték nebo protiláték.
- 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 neotevřenésoupravy je 18 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální šarži.
- 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 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, opláchnete 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, nepije, nekuřte nebo nenanášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a politý 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 naředěndte vzorků od pacientů 1:100 se vzorku pufru: Přidejte 990 µl předdefiného 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 optické densitu.

Příklad pro pipetovací schéma:

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

P1, ... Vzorky A-F Kalibrátor 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 kvantitativní výsledky proložte optickou hustotu každého kalibrátoru versus kalibrační koncentrace a vytvořte kalibrační křivku. Koncentrace neznámých sér lze pak odhadnout interpolací kalibrační křivky. Software pro zpracování dat se 4-parametrovou křivkou padnou a lin-log souřadnice optické density a koncentrace je nejlepší metoda.

CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

KALIBRACE

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

Rozsah měření

Vypočet rozsahu analýzy ELISA je 0 - 200 U/ml

Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků sér dárců zdravé krve byly stanoveny následující rozsahy pomoci analýzy ELISA: Cut-off 25 U/ml

Interpretace výsledků

negativní	< 15 U/ml
hraniční	15 - 25 U/ml
pozitivní	> 25 U/ml

Linearity

Vzorky pacientů obsahující vysokou hladinu určité protilátky byly sériově zředěny ve vzorkovém roztoku pro ukázkou dynamického rozsahu analýzy a horního / spodního konce linearity. Aktivita pro každý roztok byla spočítána z kalibrační křivky pomocí 4-Fit s parametrem-lin-log souřadnicích.

Vzorek	Ředění	Pozorovaná U/ml	Očekávaná U/ml	P/O [%]
1	1:100	124.2	127.1	98
.	1:200	62.4	34.8	98
.	1:400	33.2	17.4	104
.	1:800	16.1	8.7	101
2	1:100	104.4	104.4	100
.	1:200	53.1	52.2	102
.	1:400	27.6	26.1	106
.	1:800	13.9	13.1	107

Límit detekce

Funkční citlivost 1 U/ml

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			Inter-Assay		
Vzorek	Průměr U/ml	CV %	Vzorek	Průměr U/ml	CV %
1	28.8	5.6	1	24.5	11.0
2	67.1	5.8	2	70.5	6.9
3	143.2	5.2	3	157.6	4.1

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	%
Sjögren's syndrome	70	43	61.4
Rheumatoid arthritis	20	1	5.0
Normal human sera	100	4	4.0

		Klinická diagnóza	
		Pos	Neg
ORG 509	Pos	43	5
	Neg	27	115
		70	120 190
senitivitát		61.4	%
specifícita		95.8	%
diagnostická efektivita		83.2	%

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 protilátke 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

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. Castro C, Gourley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(2 Suppl 2):S238-S247.

5. 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.

6. 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, Vette 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. Reveille 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.

