

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 530 ANCAcombi

KRÁTKÝ POPIS

ANCAcombi je testovací systém ELISA pro kvalitativní měření IgG tříd anti-neutrophil cytoplasmic protilátek (ANCA) proti PR3, MPO, BPI, Elastase, Cathepsin G, Lysozyme, Lactoferrin ve vzorcích lidského séra nebo plasmu. Tento produkt 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

Na jednotlivé řady A až H destičky s mikrojamkami jsou nanášeny purifikované antigeny PR3, MPO, BPI, Elastase, Cathepsin G, Lysozyme, Lactoferrin.

Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: protilátky přítomné v pozitivních vzorcích se naváží na antigen nanášený na povrch reakčních jamek a vytvoří komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Následně přidaný 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 530		1	Dostačuje pro 96 stanovení
		1	Dělitelná mikrotitrační destička obsahující 12 modulů s 8 jamkami. Připraveno k použití. Kód produktu na mikrotitrační: ANC
		1x 1.5 ml	Kontrola A (negativní), obsahující ANCA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
		1x 1.5 ml	Kontrola B (hraniční), obsahující ANCA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
		1x 1.5 ml	Kontrola C (pozitivní), obsahující ANCA protilátky v séru / puferová matrice (PBS, BSA, saponáty, NaN3 0.09%). Připraveno k použití.
		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-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 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 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 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 látku 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 koncentráту (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 linek:
A	A	B	C										Reference
B	P1	P2	P3										PR3
C	P1	P2	P3										MPO
D	P1	P2	P3										BPI
E	P1	P2	P3										Elastase
F	P1	P2	P3										Cathepsin G
G	P1	P2	P3										Lysozym
H	P1	P2	P3										Lactoferrin

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

Nejprve pro každý antigen povlakem řadě je optické hustoty (OD) vzorku upravena o hodně specifickým faktorem je uvedeno v osvědčení o analýze:

$$\text{OD vzorku adj.} = \text{OD vzorku} * \text{hodně specifický faktor}$$

Pro každý antigen povlakem řadě vzorku OD adj. se vyjadřuje jako hodnota indexu

$$\text{Index} = \text{OD vzorku adj.} / \text{OD CONTROL B}$$

CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

KALIBRACE

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

Rozsah měření

neplatí

Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků sér dárčů zdravé krve byly stanoveny následující rozsahy pomocí analýzy ELISA: Cut-off Index 1.0

Interpretace výsledků

negativní	Index < 1.0
pozitivní	Index ≥ 1.0

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 [%]
PR3	1:100	3.7	3.7	100
	1:200	1.9	1.8	103
	1:400	1.0	0.9	103
MPO	1:100	3.4	3.4	100
	1:200	1.8	1.7	106
	1:400	0.9	0.9	100
BPI	1:100	3.8	3.8	100
	1:200	2.0	1.9	104
	1:400	0.9	0.9	100
Elastase	1:100	3.0	3.0	100
	1:200	1.6	1.5	105
	1:400	0.7	0.7	100
Cathepsin G	1:100	2.8	2.8	100
	1:200	1.3	1.4	91
Lysozyme	1:400	0.6	0.7	83
	1:100	3.1	3.1	100
	1:200	1.5	1.6	94
Lactoferrin	1:400	0.7	0.8	91
	1:100	3.6	3.6	100
	1:200	1.7	1.8	94
1:400	0.8	0.9	89	

Limit detekce

neplatí

Technické údaje

Intraanalyzační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 nálezu 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 nálezu při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-Assay		
Vzorek	Průměr Index	CV %
PR3	1.8	3.2
MPO	2.0	2.8
BPI	1.3	4.2
Elastase	1.3	4.6
Cathepsin G	1.4	5.1
Lysozyme	1.1	4.5
Lactoferrin	1.9	3.0

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr Index	CV %
PR3	1.7	2.8
MPO	1.9	2.0
BPI	1.3	2.8
Elastase	1.2	3.3
Cathepsin G	1.4	2.8
Lysozyme	1.0	3.7
Lactoferrin	1.8	2.4

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 antikoagulancií (EDTA, heparin, citrát).

Výsledky studie

Sample Description	IFA	n	n Pos	%
ANCA vasculitis / non-ANCA vasculitis or other conditions	POS	102	92	90.2
healthy controls / non-rheumatological or non-ANCA vasculitis	neg	234	32	13.7

		Citlivost imunologické			
		Pos	Neg		
ORG 530	Pos	92	32		
	Neg	10	202		
		102	234	336	
		senitivität	90.2		
		specifická	86.3		
		diagnostická efektivita	87.5		

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

- Hauschild, S.; Schmitt, W.H.; Csernok, E.; Flesch, B. K.; Rautmann, A.; Gross, W.L. ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases. ANCA-associated Vasculitides: Immunological and clinical aspects. Edited by W. L. Gross, Plenum Press, New York, 1993, pp. 245 - 251.
- Schmitt, W.H.; Csernok, E.; Flesch, B. K.; Hauschild, S., Gross, W.L. Autoantibodies directed against Lysozyme: A new target Antigen for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). ANCA-associated Vasculitides: Immunological and clinical aspects. Edited by W. L. Gross, Plenum Press, New York, 1993, 267 - 272.
- Skogh, T. and Peen, E. Lactoferrin, Anti-Lactoferrin antibodies and inflammatory disease. ANCA-associated

Vasculitides: Immunological and clinical aspects. Edited by W. L. Gross, Plenum Press, New York, 1993, pp. 533 - 538.

4. Stoffel, M. P.; Csernok, E.; Herzberg, C.; Johnston, T.; Carroll, S.F. and Gross, W. L. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders. Clin. Exp. Immunol. 1996, No. 104, pp. 54 - 59.
5. Zhao, M. H.; Jayne, D. R. W.; Ardiles, L. G.; Culey, F.; Hodson, M.E. and Lockwood. Autoantibodies against bactericidal/permeability increasing protein in patients with cystic fibrosis. J. Med. 1996, No. 89, pp. 259 - 265.
6. Wiik, A.; Stumman, L.; Kjeldsen, L.; Borregaard, N.; Ullman, S.; Jacobsen, S. and Halberg, P. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. Proceedings of the 6th international ANCA workshop, France - July 1995, pp. 15 - 17.
7. Jenette, J. C. and Falk, R. J. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated disease: A review. Am. J. of Kidney Disease 1990, Vol. XV, No. 6, pp. 517 - 529.
8. Schmitt, W. H. and Gross, W.L. Antineutrophil zytoplasmatische Antikörper (ANCA). Internist 1995, No. 36, pp. 282 - 290.
9. Gross, W.L. and Rheinhold-Keller, E. ANCA-assoziierte Vaskulitiden (Wegener Granulomatose, Churg-Strauss-Syndrom, Mikroskopische Polyangiitis) - 1. Systematik, Pathogenese und Klinik. Z. Rheumatol (1995), No. 54, pp. 279 - 290.
10. de Grot, K.; Schnabel, A. and Gross, W. L. ANCA-assoziierte Vaskulitiden (Wegener Granulomatose, Churg-Strauss-Syndrom, Mikroskopische Polyangiitis) - 1. Diagnostisches Procedere. Z. Rheumatol (1995), No. 54, pp. 291 - 302.
11. Schultz H, Weiss JP: The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. Clin Chim Acta 2007, 384:12-23.
12. Schultz H: From infection to autoimmunity: a new model for induction of ANCA against the bactericidal/permeability increasing protein (BPI). Autoimmun.Rev 2007, 6:223-227.
13. Talor MV, Stone JH, Stebbing J, Barin J, Rose NR, Burek CL: Antibodies to selected minor target antigens in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). Clin.Exp.Immunol. 2007, 150:42-48.

