

**ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ELISA) ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ К ЭКСТРАГИРУЕМЫМ ЯДЕРНЫМ АНТИГЕНАМ (ЕНА) В
СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА**

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	2
2. Назначение	2
3. Принцип метода	2
4. Компоненты набора	3
5. Материалы, не входящие в комплект поставки	3
6. Сбор и подготовка образцов	3
7. Подготовка реагентов	3
8. Процедура проведения анализа	3
9. Схема проведения анализа	4
10. Вычисление результатов	4
11. Интерпретация результатов	5
12. Критерии валидации	5
13. Диапазоны нормальных значений	5
14. Диапазоны измерений	5
15. Точность	5
16. Специфичность и чувствительность	6
17. Литература	6
18. Меры предосторожности для пользователей	6

**ELISA FOR THE SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION OF AUTOANTIBODIES TO
EXTRACTABLE NUCLEAR ANTIGENS (ENA) IN HUMAN SERUM OR PLASMA**

CONTENT

1. Background	8
2. Intended use	8
3. Kit components	8
4. Material needed, but not provided with the kit	8
5. Principle	8
6. Specimen collection & Preparation	9
7. Preparation of reagents	9
8. Testing scheme ai-line ELISA	9
9. Assay procedure	10
10. Calculation of results	10
11. Result interpretation	10
12. Validation criteria	10
13. Reference ranges	10
14. Measuring range	11
15. Precision	11
16. Specificity and Sensitivity	11
17. Literature	11
18. Precautions for users	11

Каталожный № **REF** 25023 Σ 8 x 12 определений**ВВЕДЕНИЕ**

Циркулирующие аутоантитела (aab) класса IgG к внутриклеточным структурам, в частности, к экстрагируемым ядерным антигенам (ENA), являются характерной особенностью системных аутоиммунных заболеваний. Наиболее важные включают двухцепочечную ДНК (dsDNA), Ro, La, центромерные белки, Scl-70 (топоизомераза I, топо I), антиген Смита (Sm), рибонуклеопротеины (RNP), Jo-1 и PM/Scl. Аутоантитела к комплексу dsDNA и Sm считаются высокоспецифичными маркерами для определения системной красной волчанки (SLE) и могут обнаруживаться у 5-30% (Sm) и 20-70% (dsDNA) пациентов, страдающих системой красной волчанкой (SLE). Благодаря высокой специфичности аутоантител анти-Sm и анти-dsDNA в отношении заболевания, они были включены в диагностические критерии Американского колледжа ревматологии (ARC). Аутоантитела анти-RNP считаются связанными с системной красной волчанкой (SLE), но также выявляются и при других аутоиммунных воспалительных нарушениях. Системная склеродермия (SSc) характеризуется наличием аутоантител анти-Scl-70 и анти-CENP. Аутоантитела к Ro52 и La (SS-B) могут обнаруживаться в образцах пациентов, страдающих системной красной волчанкой (SLE), синдромом Шегрена (SjS), смешанным заболеванием соединительных тканей (MCTD) и системной склеродермией (SSc). Аутоантитела анти-Jo-1 впервые были описаны после выявления в сыворотке пациента, страдающего миозитом.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест методом твердофазного иммуноферментного анализа ENA Profile 8 ELISA предназначен для полуколичественного определения экстрагируемых ядерных антигенов (ENA) и помогает диагностировать системные, ревматические аутоиммунные нарушения.

Линия	ENA	Связь с заболеванием	Частота встречаемости
A	dsDNA	Системная красная волчанка (SLE)	20-70%
B	RNP/Sm	Системная красная волчанка (SLE), смешанное заболевание соединительных тканей (MCTD), системная склеродермия (SSc)	5-30%
C	Sm	Системная красная волчанка (SLE)	5-20%
D	Ro52	Системная красная волчанка (SLE), синдром Шегрена (SjS), системная склеродермия (SSc)	20-90%
E	La (SS-B)	Системная красная волчанка (SLE), синдром Шегрена (SjS)	10-30%
F	Scl-70	Системная склеродермия (SSc)	20-40%
G	CENP-B	Системная склеродермия (SSc)	10-20%
H	Jo-1	Миозит	20-40%

ПРИНЦИП МЕТОДА

В тест SLE Profile 8 ELISA входят четыре разных набора микротитровальных стрипов, окрашенных в разные цвета (8 x 12 лунки) и покрытых двухцепочечной ДНК (желтый цвет), антигеном Смита (оранжевый цвет), комплексом RNP/Sm (коричневый цвет) и Rib-P (бесцветный). Сначала в микротитровальные лунки вносят разведенные образцы пациентов (1:101), контроли и калибратор (без разведения). Это приводит к связыванию антител, наличие которых характерно для системной красной волчанки (SLE), с иммобилизованными антигенами. После промывания, добавляют конъюгат антител к IgG с пероксидазой хрена (HRP), который связывается с антителами, характерными для системной красной волчанки (SLE). Несвязанное вещество удаляется в процессе еще одного цикла промывания. В конце, связывание антител, характерных для системной красной волчанки (SLE) визуализируют посредством инкубации с субстратом ТМБ (тетраметилбензидин) с получением в итоге синего цвета, который, после остановки реакции с помощью стоп-раствора, превращается в желтый цвет. Оптическая плотность (ОП) окрасившегося в желтый цвет продукта прямо пропорциональна количеству связанных антител, характерных для системной красной волчанки (SLE), и может быть измерена спектрофотометрически на длине волны 450 нм.

(SLE), анализируют одновременно с образцами. Полуколичественные результаты находят путем вычисления отношений значения ОП (оптическая плотность) калибратора и образцов.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Стрипы для микротитрования, с нанесенными антигенами	MICROWELL	по 8 антигенов на каждый стрип
Конъюгат пероксидазы хрена (HRP) с антителами класса IgG	CONJ HRP G	1 x 12 мл
Концентрированный промывочный буфер	WASHBUF B 25x	1 x 50 мл
Субстрат ТМБ	SUB TMB	1 x 12 мл
Стоп-раствор (0.5 M H ₂ SO ₄)	STOP H₂SO₄	1 x 12 мл
Буфер для разведения	DILBUF B	1 x 60 мл
Калибратор	CAL	1 x 2 мл
Отрицательный контроль	CONTROL -	1 x 2 мл
Положительный контроль	CONTROL +	1 x 2 мл

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Пипетки объемом 2-10 мкл, 10-100 мкл и 200-1000 мкл, дозатор Multipette, наконечники для пипеток, флаконы для разведения образца, стеклянный мерный цилиндр, микропланшетный ридер, фольга для закрывания, устройство для промывки микропланшетов (по выбору).

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для данного анализа можно использовать сыворотку или плазму. Для сохранения целостности образца никакие добавки или консерванты не требуются. Образцы следует хранить при 2-8°C и проводить анализ в течение 48 часов после взятия образцов. Если невозможно провести анализ в течение 48 часов или если нужна транспортировка образцов, образцы необходимо закрыть и заморозить. Следует избегать повторного замораживания и размораживания. Замороженные образцы следует размораживать при комнатной температуре (комнатная температура, 20-25°C) и, аккуратно переворачивая, тщательно перемешивать перед анализом. Не рекомендуется использовать гемолизированные или липемические образцы.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Прежде чем использовать все реагенты, обеспечьте достижение их комнатной температуры. Неиспользуемые микротитрационные стрипы нужно надлежащим образом повторно герметично упаковать в имеющийся пакет из фольги с десикантом.

Буфер для разведения: готов к применению;

Конъюгат пероксидазы хрена: готов к применению;

Раствор субстрата: готов к применению;

Стоп-раствор: готов к применению;

Калибратор и контроли: готов к применению;

Концентрированный промывочный буфер: концентрированный промывочный буфер необходимо развести водой высокой степени очистки в соотношении 1:25 (Пример: для 1 стрипа требуется 40 мл промывочного буфера, поэтому 1,6 мл концентрированного промывочного буфера нужно развести водой высокой степени очистки до получения конечного объема 40 мл). Полученный таким образом промывочный буфер стабилен в течение одной недели при комнатной температуре.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Создайте схему пипетирования. Калибратор необходимо протестировать в двух повторностях, и точно так же настоятельно рекомендуется анализировать контроли.

2. Разведите образцы пациентов в соотношении **1:101** в Буфере для разведения (10 мкл сыворотки + 1 мл Буфера для разведения для двойного определения / 5 мкл сыворотки + 0,5 мл Буфера для разведения для одного определения).
3. Поместите нужные стрипы с нанесенными антителами в рамку. Надлежащим образом герметично закройте пакет из алюминия с оставшимися стрипами и осушителем.
4. В соответствии со схемой пипетирования с помощью пипетки перенесите 100 мкл калибраторов, контролей и разведенных образцов пациентов в лунки, покрытые антигенами.
5. Накройте планшет и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
6. Промойте планшет вручную или используйте для этой цели подходящее устройство для промывки планшетов ELISA, промывать необходимо минимум 3 раза, каждый раз используя 300 мкл на лунку. Удалите остатки жидкости, выстучав микропланшет на полотенце.
7. Добавьте 100 мкл конъюгата пероксидазы хрена с антителами класса IgG во все лунки. Накройте планшет и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
8. Повторите процедуру промывки, как описано в пункте 6.
9. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку, накройте планшет и инкубируйте 15 минут при комнатной температуре (субстрат ТМБ чувствителен к свету).
10. С помощью пипетки перенесите 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку в том же порядке, что и субстрат. Рекомендуется перемешать раствор в лунках, слегка постучав по рамке. На длине волны 450 нм прочитайте значения оптической плотности (эталонная длина волны 620 нм*), используя соответствующий микропланшетный ридер, и рассчитайте результаты для образцов пациентов и контролей, как описано на странице 5.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА: AI-LINE ELISA



ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитывают отношения между значением оптической плотности (ОП) [Δ 450 нм – 620 нм] каждого образца пациента и средним значением ОП [450 нм] калибратора. То же самое делают с контролями. Умножают все полученные отношения на коэффициент преобразования (F). Этот

коэффициент преобразования специфичен для партии и указывается в Сертификате контроля качества. Получаемые значения выражаются в относительных единицах (ОЕ).

$$\text{Вычисления: Образец, ОЕ} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП калибратора}} \times F$$

Пример:

$$\begin{aligned} \text{ОП калибратора} &= 1.9 \\ \text{ОП образца} &= 0.6 \\ \text{Коэффициент преобразования F} &= 10 \end{aligned}$$

$$\text{Образец, ОЕ} = \frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП калибратора}} \times 10, \text{ Образец, ОЕ} = \frac{0.6}{1.9} \times 10, \text{ Образец, ОЕ} = 3.2 \text{ ОЕ}$$

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для интерпретации результатов используют следующие пороговые значения:

< 1	ОЕ	Отрицательный
1-1.5	ОЕ	Пограничный
> 1.5	ОЕ	Положительный

Для определения пороговых значений использовали контрольные образцы, полученные при наличии заболевания, и образцы сыворотки здоровых людей.

КРИТЕРИИ ВАЛИДАЦИИ

Значение ОП калибратора и значения контролей, выраженные в относительных единицах, должны соответствовать диапазонам, указанным в Сертификате контроля качества. Если это не так, необходимо проверить условия проведения анализа и, вероятно, повторить анализ.

ДИАПАЗОНЫ НОРМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Ниже указано найденное среднее значение, полученное по образцам, взятым у явно здоровых людей в качестве контролей. Каждая лаборатория должна определить свои собственные диапазоны нормальных значений.

Параметр	Среднее	Стандартное отклонение
dsDNA	0,4	0,2
RNP/Sm	0,4	0,2
Sm	0,5	0,2
Ro52	0,3	0,1
La (SS-B)	0,3	0,1
Scl-70	0,4	0,2
CENP-B	0,2	0,1
Jo-1	0,3	0,1

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЕНИЯ

От 0.1 до 10 относительных единиц (ОЕ).

ТОЧНОСТЬ

Вариабельность и воспроизводимость оценивали по трем разным положительным образцам сыворотки. Вариабельность в пределах одного анализа для измерения, проведенного в четырех повторностях, была менее 7%. Вариабельность между сериями анализов, определенная по измерениям в двух повторностях как минимум в трех разных сериях анализов, была менее 10%.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Антиген	Чувствительность	Специфичность
dsDNA	100% ¹	100% ¹
RNP/Sm	96% или 100% ¹	89,5% ¹
Sm	11,2% ²	98,8% ¹
Ro52	78,9% ^{2,3}	100% ¹
La (SS-B)	14,8% ^{2,4}	100% ¹
Scl-70	22% ²	100% ²
CENP-B	100% ¹	97,9% ¹
Jo-1 ¹	92% ¹	99% ¹

¹ аналитическая, ² клиническая, ³ при синдроме Шегрена, ⁴ при синдроме Шегрена

ЛИТЕРАТУРА

1. Tan EM: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol 1989, 44:93-151.
2. Mahler M, Raijmakers R, Fritzler MJ: Challenges and Controversies in Autoantibodies Associated with Systemic Rheumatic Diseases. Curr Rheumatol Rev 2007, 12:67-78.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. В соответствии со статьей 1, параграф 2b, Европейской директивы 98/79/ЕС, для использования медицинских изделий для диагностики in-vitro производителем предусмотрено обеспечение пригодности, технических характеристик и безопасности продукта. Поэтому необходимо строго следовать процедуре анализа, информации, особым указаниям и мерам предосторожности, изложенным в инструкциях по применению. Набор необходимо использовать только в соответствии с описанием, представленным на странице 1 (предназначение).
2. Тест необходимо проводить в соответствии с данной инструкцией, в которой представлена вся необходимая информация, а также особые указания и меры предосторожности. Необходимо подвергнуть проверке использование наборов для анализа вместе с анализаторами или аналогичным оборудованием. Никакие изменения конструкции, состава или процедуры анализа, равно как и использование в сочетаниях с другими продуктами, не одобренными производителями, не разрешены; за такие изменения, которые могут привести к ложным результатам и другим инцидентам, ответственность несет сам пользователь. Производитель не несет ответственности за любые результаты визуального анализа образцов пациентов.
3. Набор предназначен для использования только обученными и квалифицированными специалистами, проводящими исследования или осуществляющими диагностику. Беременные женщины не должны проводить данный анализ.
4. Лабораторное оборудование следует содержать в соответствии с инструкциями производителя, перед применением необходимо проверить правильность его работы.
5. Только для диагностического применения in-vitro. Только для однократного применения. Не используйте компоненты с истекшим сроком годности. Не сочетайте с данным набором реагенты других поставщиков или компоненты наборов из других партий (если только на странице 1 не указано иное).
6. Не используйте компоненты набора, если упаковка компонента повреждена. Пожалуйста, прежде чем использовать, проверьте все растворы на предмет микробного загрязнения. Сразу же после использования плотно закрывайте флаконы, чтобы избежать испарения и микробного загрязнения. Не меняйте завинчивающиеся крышки флаконов с реагентами.
7. Набор прошел оценку для использования при температурах, указанных в Схеме проведения анализа. Более высокие или более низкие температуры могут привести к получению значений, не соответствующих диапазонам контроля качества.
8. Процедура промывания безусловно важна. Неправильное промывание станет причиной ошибочных результатов. Рекомендуется использовать многоканальную пипетку и автоматическое устройство для промывки.

9. Чтобы избежать перекрестного загрязнения и ложноположительных результатов рекомендуется проводить все этапы пипетирования надлежащим образом. Используйте только чистые наконечники для пипеток, дозаторы и лабораторную посуду.
10. Диагностические компоненты, полученные на основе сыворотки крови человека, были протестированы методом с маркировкой СЕ на антитела к ВИЧ 1/ВИЧ 2, антитела к ядерному антигену вируса гепатита В, антитела к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В, и были признаны отрицательными. Тем не менее, с материалами на основе сыворотки крови человека, следует обращаться как с потенциально инфицированными (БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ).
11. Некоторые компоненты набора могут содержать бычий сывороточный альбумин, который, по данным производителя, не несет в себе никакой известной возможности инфицирования. Поскольку иногда могут встречаться неподдающиеся обнаружению возбудители инфекции, мы рекомендуем обращаться с любым продуктом животного происхождения как с потенциально заразным.
12. В отношении всех реагентов необходимо соблюдать следующие правила безопасности:
 - Не допускать попадания в глаза, на кожу или на одежду (P262). Не вдыхать спрей (P260). Никогда не следует осуществлять пипетирование с помощью рта, всегда необходимо использовать подходящие устройства для пипетирования.
 - В СЛУЧАЕ ПРОГЛАТЫВАНИЯ: прополоскать рот. НЕ вызывать рвоту (P301/330/331)
 - В СЛУЧАЕ ПОПАДАНИЯ НА КОЖУ (или на волосы): Сразу же удалить/снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой/душем (P303/361/353).
 - В СЛУЧАЕ ВДЫХАНИЯ: Вывести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить покой в положении, удобном для дыхания (P303/340).
 - В СЛУЧАЕ ПОПАДАНИЯ В ГЛАЗА: Осторожно промывать водой в течение нескольких минут. Если есть контактные линзы, снять их, если это не сложно. Продолжить промывание глаз. (P305/351/338)
 - Во время проведения анализа нельзя есть, пить и курить. Нельзя держать поблизости продукты питания, корма и напитки.
 - Необходимо надевать защитные перчатки/защитную одежду/средства для защиты глаз (P280). Следует тщательно мыть руки после обращения с продуктом (P264) и обеспечить уход за кожей.
 - По запросу может быть предоставлен паспорт безопасности вещества.
13. Стоп-раствор вызывает тяжелые ожоги кожи и травмы глаз (H314).
14. ТМБ в высоких концентрациях может быть потенциально мутагенным. В связи с низкой концентрацией ТМБ в данном растворе субстрата мутагенный эффект можно исключить, при условии надлежащего способа применения.
15. Консерванты (Бронидокс, Тимеросал, Азид) токсичны для водных организмов, но их концентрация не опасна для окружающей среды. При утилизации большие объемы реагентов следует смывать большим количеством воды. Тимеросал (Промывочный буфер В) может вызывать поражение органов при длительном или многократном воздействии (H373).
16. Отходы, в составе которых присутствует сыворотка, следует собирать в отдельные контейнеры, содержащие надлежащее дезинфицирующее средство в достаточной концентрации. С данным веществом следует обращаться в соответствии с национальными руководствами или нормативами, касающимися биологической опасности и безопасности.
17. Настоящим отсылаем вас к национальным нормативам по медицинским изделиям, касающимся наборов для анализов, предназначенных для in-vitro диагностики.

DR. FOOKE
LABORATORIEN GMBH

Более подробную информацию о продукции, деловых контактах, оформлении заказов, можно получить у специалистов компании Доктор Фооке:

+7 (495) 799-1165, +7 (495) 725-1169
sale@fooke.ru, info@fooke.ru
www.fooke.ru

REF 25023 Σ 8 x 12 Determinations

BACKGROUND

Circulating IgG autoantibodies (aab) to intracellular structures especially to extractable nuclear antigens (ENA) represent a characteristic feature of systemic autoimmune diseases.

Among the most important ones are double-stranded DNA (dsDNA), Ro, La, centromere proteins, Scl-70 (topoisomerase I, topo I), the Smith antigen (Sm), Ribonucleoproteins (RNP), Jo-1 and PM/Scl. Aab against dsDNA and the Sm Complex rate as highly-specific markers for the systemic lupus erythematosus (SLE) and can be detected in 5-30% (Sm) and 20-70% (dsDNA) of SLE patients. Based on the high disease-specificity of anti-Sm and anti-dsDNA aab they were included as diagnose criteria of the American College of Rheumatology (ACR). Anti-RNP aab are considered as SLE associated antibodies which are also found in other inflammatory autoimmune disorders. Systemic sclerosis (SSc) is characterized by the occurrence of anti-Scl-70 and anti-CENP aab. Aab to Ro52 and La (SS-B) can be detected in samples from SLE, sj gren syndrome (SjS), mixed connective tissue disease (MCTD) and SSc patients. Anti-Jo-1 aab were first described in the serum of a myositis patient.

INTENDED USE

The ENA Profile 8 ELISA is intended for the semi-quantitative determination of ENAs and adds to the diagnosis of systemic, rheumatic autoimmune disorders.

Line	ENA	Disease association	Prevalence
A	dsDNA	SLE	20-70%
B	RNP/Sm	SLE, MCTD, SSc	5-30%
C	Sm	SLE	5-20%
D	Ro52	SLE, SjS, SSc	20-90%
E	La (SS-B)	SLE, SjS	10-30%
F	Scl-70	SSc	20-40%
G	CENP-B	SSc	10-20%
H	Jo-1	Myositis	20-40%

KIT COMPONENTS

Microtiter strips, antigen coated	MICROWELL	8 antigens per stripe
Anti-IgG HRP-Conjugate	CONJ HRP G	1 x 12 mL
Concentrated Washing Buffer	WASHBUF B 25x	1 x 50 mL
TMB Substrate	SUB TMB	1 x 12 mL
Stop Solution (0.5 M H ₂ SO ₄)	STOP H₂SO₄	1 x 12 mL
Dilution Buffer	DILBUF B	1 x 60 mL
Calibrator	CAL	1 x 2 mL
Negative Control	CONTROL -	1 x 2 mL
Positive Control	CONTROL +	1 x 2 mL

MATERIAL NEEDED, BUT NOT PROVIDED WITH THE KIT

2-10 µL, 10-100 µL and 200-1000 µL pipettes, Multipette, pipette tips, vials for diluting the specimen, graduated glass cylinder, microplate-reader, covering foil, microplate-washer (optional).

PRINCIPLE

The SLE Profile 4 ELISA contains four different sets of colour coded microtitrestrips (4 x 24 wells), which are coated with dsDNA (yellow), Smith antigen (orange), RNP/Sm (brown) or Rib-P (colourless). Initially,

diluted patient samples (1:101), Controls and the Calibrator (undiluted) are applied to the microtiter-wells. This leads to the binding of SLE associated antibodies to the immobilized antigens. After washing an anti-IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate is added which binds to SLE associated antibodies. Unbound material is removed by another washing cycle. Finally the binding of SLE associated antibodies is visualized by incubation with TMB Substrate resulting in the development of a blue colour turning into yellow after stopping the reaction with stop solution. The optical density (OD) of the yellow colour is directly proportional to the amount of bound SLE associated antibodies and can be measured spectrophotometrically at 450 nm. A Calibrator with a known concentration of SLE associated antibodies is tested simultaneously with the samples. Semi-quantitative results can be determined by calculating the ratios from the OD value of the Calibrator and the samples.

SPECIMEN COLLECTION & PREPARATION

Either Serum or Plasma can be used in this test. No additives or preservatives are necessary to maintain the integrity of the specimen.

Specimens should be stored at 2-8°C and assayed within 48 hours after collection. If the assay cannot be performed within 48 hours or if the specimen has to be shipped, cap the specimen and keep it frozen. Repeated freezing and thawing should be avoided. Frozen specimens should be thawed at room temperature (RT, 20-25°C) and mixed thoroughly by gentle inversion before assaying. The use of haemolysed or lipemic specimens is not recommended

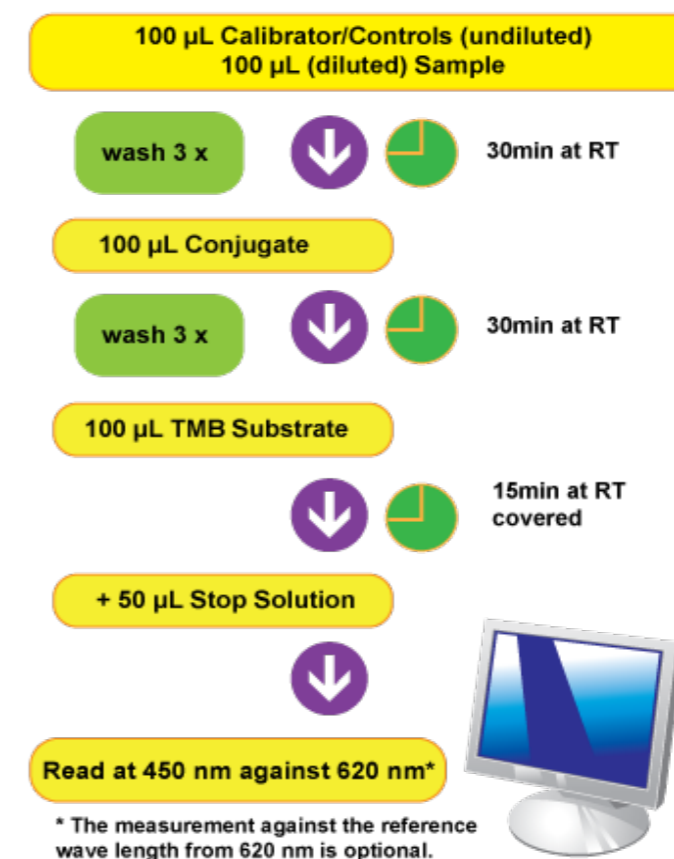
PREPARATION OF REAGENTS

Allow all reagents to come to RT before use.

Unused microtiterstrips have to be resealed properly in the provided foil bag containing a desiccant.

Dilution Buffer: ready to use; **HRP Conjugate:** ready to use; **Substrate Solution:** ready to use; **Stop Solution:** ready to use; **Calibrator and Controls:** ready to use; **Concentrated Washing Buffer:** the Concentrated Washing Buffer has to be diluted 1:25 in aqua bidest. (Example: One strip requires 40 mL of Washing Buffer, therefore 1.6 mL concentrated Washing Buffer have to be diluted to a final volume of 40 mL with aqua bidest.). The resulting Washing Buffer is stable for one week at RT.

TESTING SCHEME AI-LINE ELISA



ASSAY PROCEDURE

1. Create a pipetting scheme. It is a must to test the Calibrator in duplicate and this is highly recommended for Controls.
2. Dilute patient samples 1:101 in Dilution Buffer (10 µL serum + 1 mL Dilution Buffer for double determination / 5 µL serum + 0.5 mL Dilution Buffer for single determination).
3. Place the required coated wells into a frame. Properly reseal the aluminium bag with the remaining strips and desiccant.
4. Pipette 100 µL of Calibrators, Controls and diluted patient samples into the antigen coated wells according to the pipetting scheme.
5. Cover the plate and incubate for 30 min at RT.
6. Wash the plate manually or with an appropriate ELISA plate washer at least 3 times with minimally 300 µL per well. Remove residual liquid by dunking the microplate on a tissue.
7. Add 100 µL of anti-IgG HRP conjugate to all wells. Cover the plate and incubate for 30 min at room temperature.
8. Repeat washing procedure as described in step 6.
9. Add 100 µL of TMB Substrate to each well, cover the plate and incubate for 15 min at RT (TMB substrate is light sensitive).
10. Pipette 50 µL of Stop Solution in the same order as the substrate to each well. It is recommended to mix the solution in the wells by carefully knocking on the frame. Read OD at 450 nm (reference wave length 620 nm*) using an appropriate microplate reader and calculate the results of patient samples and controls as described on page 8.

CALCULATION OF RESULTS

Calculate the ratios between the OD value [450 nm – 620 nm] of each patient sample and the mean OD value [450 nm] of the Calibrator. Do the same for the controls. Multiply all obtained ratios by the conversion factor (F). This conversion factor is lot specific and is stated on the Quality Control Certificate. Resulting values are expressed as relative units (RU).

$$\text{Calculation: RU sample} = \frac{\text{OD Sample}}{\text{OD Calibrator}} \times F$$

Example:

OD Calibrator	= 1.9
OD Sample	= 0.6
Conversion factor F	= 10

$$\text{RU sample} = \frac{\text{OD Sample}}{\text{OD Calibrator}} \times 10, \text{RU sample} = \frac{0.6}{1.9} \times 10, \text{RU sample} = 3.2 \text{ RU}$$

RESULT INTERPRETATION

For interpretation of the results use the following cut-off values.

< 1	RU	Negative
1-1.5	RU	Borderline
> 1.5	RU	Positive

The cut-off values were determined using disease controls and normal sera.

VALIDATION CRITERIA

The OD value of the Calibrator and the RU values of the Controls have to meet the ranges stated on the QC-Certificate. Otherwise, the test conditions should be verified and the test should probably be repeated.

REFERENCE RANGES

The average value of samples from apparently healthy controls was found following. Each laboratory should establish its own reference ranges.

MEASURING RANGE

0.1 up to 10 relative units (RU).

PARAMETER	Mittelwert	Standard-abweichung
dsDNA	0.4	0.2
RNP/Sm	0.4	0.2
Sm	0.5	0.2
Ro52	0.3	0.1
La (SS-B)	0.3	0.1
Scl-70	0.4	0.2
CENP-B	0.2	0.1
Jo-1	0.3	0.1

PRECISION

Variability and reproducibility was evaluated with three different positive sera. The Intra-assay variability for a quadruplicate measure-ment was below 7%. The Inter-assay variability, de-termined with duplicates taken from eight dif-ferent runs, was below 10%.

SPECIFICITY AND SENSITIVITY

Antigen	Sensitivity	Specificity
dsDNA	100% ¹	100% ¹
RNP/Sm	96% или 100% ¹	89,5% ¹
Sm	11,2% ²	98,8% ¹
Ro52	78,9%	100% ¹
La (SS-B)	14,8%	100% ¹
Scl-70	22% ²	100% ²
CENP-B	100% ¹	97,9% ¹
Jo-1 ¹	92% ¹	99% ¹

¹ analytical, ² clinical, ³ in SjS, ⁴ in SjS

LITERATURE

1. Tan EM: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol 1989, 44:93-151.
2. Mahler M, Raijmakers R, Fritzler MJ: Challenges and Controversies in Autoantibodies Associated with Systemic Rheumatic Diseases. Curr Rheumatol Rev 2007, 12:67-78.

PRECAUTIONS FOR USERS

1. In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of in-vitro diagnostic medical devices is intended to secure suitability, performance and safety of the product by the manufacturer. Therefore the test procedure, information, precautions and warnings stated in the instructions for use have to be followed strictly. The kit has only to be used as described on page 8 (intended use).
2. The test must be performed according to this instruction, which contains all necessary information, precautions and warnings. The use of the test kit with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition of the test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes resulting in false results and other incidents. The manufacturer is not liable for any results obtained by visual analysis of patient samples.
3. The kit is intended for use by trained and qualified professionals carrying out research or diagnostic activities

only. Pregnant women should not perform the test.

4. Laboratory equipment has to be maintained according to the manufacturer's instructions and must be tested for its correct function before use.

5. For in-vitro diagnostic use only. Use only once. Do not use components exceeding the expiry date. Do not combine reagents of other suppliers or kit components of different lots (unless specified on page 1) with this kit.

6. Do not use kit components when the package of the component is damaged. Please check all solutions prior to use for microbiological contamination. Cap vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbiological contamination. Do not interchange screw caps of the reagent vials.

7. The kit was evaluated for use at the temperatures specified in the Testing scheme. Higher or lower temperatures may result in values not meeting the quality control ranges.

8. The washing procedure is absolutely important. Improper washing will cause erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette and an automated washer.

9. To avoid cross-contamination and false-positive results it is recommended to perform all pipetting steps properly. Use only clean pipette tips, dispensers and lab ware.

10. Test components based on human serum were tested using a CE marked method for the presence of antibodies against HIV 1 / HIV 2, Anti-HBc, and Anti-HCV as well as for hepatitis antigen HBsAg and were found to be negative.

Nevertheless, material based on human serum should be handled as potentially infectious (BIOHAZARD).

11. Some kit components may contain bovine serum albumin, of which according to the manufacturer no infectious potential is known. Due to the eventual occurrence of undetectable infectious agents we recommend to handle any product of animal origin as potentially infectious.

12. The following safety rules should be followed with all reagents:

- Do not get in eyes, on skin, or on clothing (P262). Do not breathe spray (P260). Pipetting should never be done by mouth, but with suitable pipetting devices.

- IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting (P301/330/331)

- IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower (P303/361/353).

- IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing (P303/340).

- IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. (P305/351/338)

- Don't eat, drink or smoke while performing the test. Keep away from food, feed and beverage.

- Wear protective gloves/protective clothing/eye protection (P280). Wash hands thoroughly after handling (P264) and care for your skin.

- Material safety data sheet is available on request.

13. Stop Solution causes severe skin burns and eye damage (H314).

14. TMB in high concentrations may be potentially mutagenic. Due to the low concentration of TMB in this substrate solution a mutagenic effect can be ruled out, if it is properly used.

15. The preservatives (Bronidix, Thimerosal, Azid) are toxic to aquatic life, but their concentration is not hazardous to environment anymore. On disposal, flush large volumes of reagents with plenty of water.

Thimerosal (WashBuf B) may cause damage to organs through prolonged or repeated exposure (H373)

16. Waste containing serum must be collected in separate containers containing an appropriate disinfectant in sufficient concentration. This material has to be treated according to national biohazard and safety guidelines or regulations.

17. We refer to the national regulations of medical devices regarding in-vitro diagnostic test kits.



Более подробную информацию о продукции, деловых контактах, оформлению заказов, можно получить у специалистов компании Доктор Фооке:

+7 (495) 799-1165, +7 (495) 725-1169
sale@fooke.ru, info@fooke.ru
www.fooke.ru