

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ELISA) ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АНТИ-RO60 В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	2
2. Назначение	2
3. Принцип метода	2
4. Компоненты набора	2
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	4
12. Критерии валидации	5
13. Диапазоны нормальных значений	5
14. Диапазоны измерений	5
15. Точность	5
16. Специфичность	5
17. Чувствительность	5
18. Литература	5
19. Меры предосторожности для пользователей	5

ELISA FOR THE SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION OF RO60 ELISA IN HUMAN SERUM OR PLASMA

CONTENT

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

ВВЕДЕНИЕ

Циркулирующие аутоантитела класса IgG к внутриклеточным структурам, в частности, к ядерным антигенам, являются характерной особенностью системных аутоиммунных заболеваний. Один из таких антигенов, Ro60, часто является мишенью для аутоантител у пациентов с синдромом Шегрена (SjS), системной красной волчанкой (SLE), смешанным заболеванием соединительных тканей (MCTD) и системной склеродермией (SSc). Ro60 вместе с Ro52 часто называют антигеном SS-A (антиген А синдрома Шегрена). Антитела анти-Ro60 часто сопровождаются антителами анти-La. Совместное присутствие антител анти-Ro60 и анти-Ro52 носит зависимый от заболевания характер, содержание этих антител достигает значительно более высоких уровней у пациентов, страдающих миозитом или системной склеродермией (SSc). Кроме того, похоже, что антитела анти-Ro60 играют важную роль в развитии волчанки новорожденных и врожденной блокады сердца, особенно в случае направленности к определенным эпитопам Ro60.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест методом твердофазного иммуноферментного анализа Ro60 ELISA предназначен для количественного определения антител, специфичных для белка Ro60. Результаты теста Ro60 ELISA помогают диагностировать системную склеродермию (SSc) и связанные аутоиммунные нарушения, указанные антитела следует использовать в качестве маркера, позволяющего прогнозировать течение заболевания.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Микротитровальные планшеты для теста Ro60 ELISA покрыты рекомбинантным антигеном Ro60. Сначала в микротитровальные лунки вносят разведенные образцы пациентов (1:101), контроли и калибратор (без разведения). Это приводит к связыванию антител анти-Ro60 с иммобилизованным антигеном Ro60. После промывания, добавляют конъюгат антител к IgG с пероксидазой хрена (HRP), который связывается с антителами анти-Ro60. Несвязанное вещество удаляется в процессе еще одного цикла промывания. В конце, связывание антител анти-Ro60 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 анти-Ro60 и может быть измерена спектрофотометрически на длине волны 450 нм. Калибратор с известной концентрацией антител анти-Ro60 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	12 x 8 лунок
Конъюгат пероксидазы хрена (HRP) с антителами класса IgG	CONJ HRP G	1 x 15 мл
Концентрированный промывочный буфер	WASHBUF B 25x	1 x 50 мл
Субстрат ТМБ	SUB TMB	1 x 15 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 анализировать в течение 48 часов после взятия образцов. Если невозможно провести анализ в течение 48 часов или если нужна транспортировка образца, образец 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 осушителем.

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: готовы 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 анализировать в двух повторностях, и точно так же настоятельно рекомендуется анализировать контроли.
2. Разведите образцы пациентов в соотношении **1:101** используя для этой цели буфер 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, с нанесенными 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 не менее 300 мкл на лунку. Удалите остатки жидкости из лунок, выстучав ее 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 внесите 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 4.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА: AI-LINE ELISA

100 мкл Калибратора / Контролей (без разведения)
100 мкл Образца (разведенного)

3-х кратная
промывка



30 мин при комнатной
температуре

100 мкл Конъюгата

3-х кратная
промывка



30 мин при комнатной
температуре

100 мкл Субстрат ТМБ



15 мин при комнатной
температуре
в закрытом виде

+ 50 мкл Стоп-раствора



Считывание результатов на
длине волны 450 нм в сравнении
с длиной волны 620 нм*



* Измерение в сравнении с референсной
длиной волны 620 нм осуществляется по желанию.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитывают отношения между значением оптической плотности (ОП) [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).

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

Пример:

ОП калибратора = 1.9
ОП образца = 0.6
Коэффициент преобразования F = 10

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

Среднее значение, полученное по образцам, взятым у явно здоровых людей в качестве контролей, составляло 0.4 ОЕ (стандартное отклонение 0.1 ОЕ). Каждая лаборатория должна определить свои собственные диапазоны нормальных значений.

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 в пяти разных сериях анализов, была менее 10%.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Установлено, что клиническая специфичность составляла 100% при анализе в сравнении со здоровыми донорами и контролями с несвязанными заболеваниями.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Аналитическая чувствительность в сравнении с прошедшей валидацию Эталонной системой, которая была одобрена Управлением по контролю над лекарственными средствами и пищевыми продуктами (FDA), составляла 99% при анализе в сравнении со здоровыми донорами и контролями с несвязанными заболеваниями. Установлено, что клиническая специфичность в отношении синдрома Шегрена (SjS) и системной красной волчанки (SLE) составляла 68,4% и 58,9%, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

См. на странице 10.

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 2 (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 производителем, 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 2 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 CE 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 разным.

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.

BACKGROUND

Circulating IgG autoantibodies to intracellular structures especially to nuclear antigens represent a characteristic feature of systemic autoimmune diseases. One of those antigens, the Ro60 is frequently the target of autoantibodies in patients with Sjögren syndrome (SjS), systemic lupus erythematosus (SLE), mixed connective tissue disease (MCTD) and systemic sclerosis (SSc). The Ro60, together with Ro52 is often termed as SS-A antigen (Sjögren syndrome-A antigen). Anti-Ro60 are frequently accompanied by anti-La antibodies. The coexistence of anti-Ro60 and anti-Ro52 antibodies is disease dependent and reaches significantly higher degrees in myositis or SSc patients. Moreover, anti-Ro60 antibodies seem to play an important role for neonatal lupus and congenital heart block, especially those directed against certain Ro60 epitopes.

INTENDED USE

The Ro60 ELISA is intended for the semi-quantitative determination of antibodies specific for the Ro60 protein. The results of the Ro60 ELISA aid to the diagnosis of systemic sclerosis and related autoimmune disorders and should be used as prognostic marker for the disease progression.

PRINCIPLE

The Ro60 microtiter ELISA plates are coated with recombinant Ro60 antigen. Initially, diluted patient samples (1:101), Controls and the Calibrator (undiluted) are applied to the microtiter wells. This leads to the binding of anti-Ro60 antibodies to the immobilized Ro60 antigen. After washing an anti-IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate is added which binds to the anti-Ro60 antibodies. Unbound material is removed by another washing cycle. Finally the binding of anti-Ro60 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 of the yellow colour is directly proportional to the amount of bound anti-Ro60 antibodies and can be measured spectrophotometrically at 450 nm. A Calibrator with a known concentration of anti-Ro60 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.

KIT COMPONENTS

Microtiter strips, antigen coated	MICROWELL	12 strips x 8 wells
Anti-IgG HRP-Conjugate	CONJ HRP G	1 x 15 mL
Concentrated Washing Buffer	WASHBUF B 25x	1 x 50 mL
TMB Substrate	SUB TMB	1 x 15 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).

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;

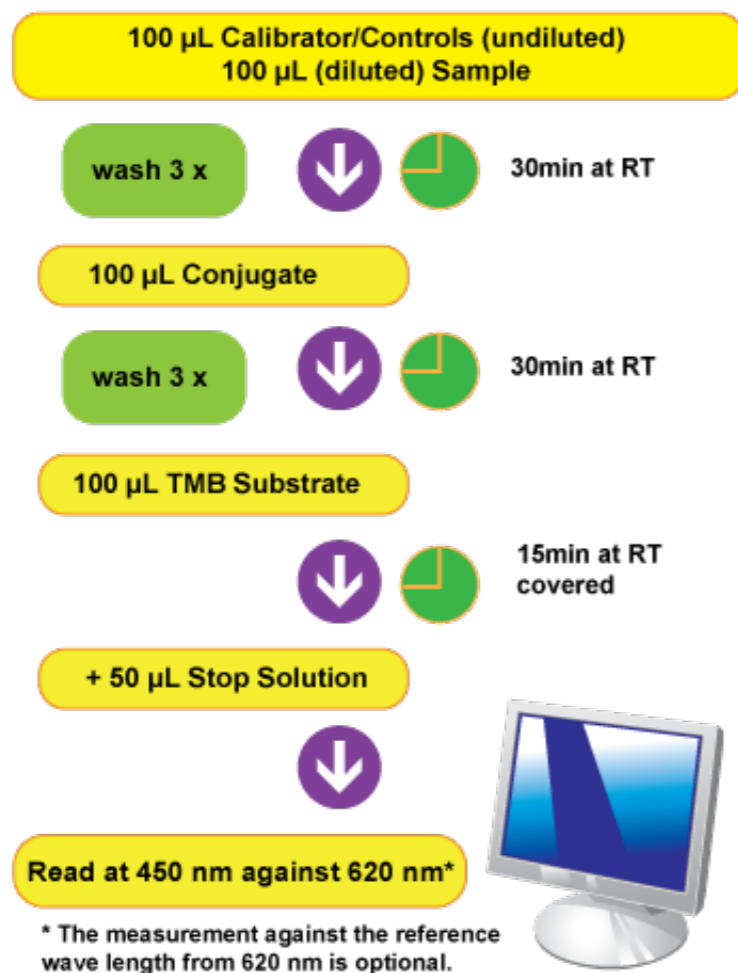
Substrate Solution: ready to use;

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 9.

CALCULATION OF RESULTS

Calculate the ratios between the OD value [Δ 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 at 0.4 RU (Standard Deviation

0.1 RU). Each laboratory should establish its own reference ranges.

MEASURING RANGE

0.1 up to 10 relative units (RU).

PRECISION

Variability and reproducibility was evaluated with three different positive sera. The Intra-assay variability for a quadruplicate measurement was below 7%. The Inter-assay variability, determined with duplicates taken from five different runs, was below 10%.

SPECIFICITY

The clinical specificity was found at 100% tested against healthy donors and unrelated disease controls.

SENSITIVITY

The analytical sensitivity in comparison to a validated FDA approved Reference system was found at 99% tested against healthy donors and unrelated disease controls. The clinical specificities for SjS and SLE were found at 68.4% and 58.9%, respectively.

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.
3. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M: Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev* 2009.

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 7 (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 7) 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 (Bronidox, 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

DR. FOOKE
LABORATORIEN GMBH

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