



Инструкция по применению

Действительна от 27.05.2024

ANA HEp-2 plus



8101



10 x 12



81040



40 x 12

Набор для метода непрямой иммунофлуоресценции (ИРИФ) предназначен для определения антител класса IgG к антинуклеарным и цитоплазматическим антигенам в сыворотке



ДжиЭй Джинерик Эссейс ГмбХ
Людвиг-Эрхард Ринг 3
15827 Бланкенфельде-Малов ОТ Далевиц
Германия

Телефон: +49 33708 4417 0
Факс: +49 33708 4417 25

info@genericassays.com
www.genericassays.com



1 Назначение

ANA HEp-2 plus - это иммунофлуоресцентный анализ (ИРИФ) для качественного и полуколичественного определения антител IgG в сыворотке крови человека к антинуклеарным и цитоплазматическим антигенам на клеточной линии HEp-2.

ANA HEp-2 plus применяется для диагностики системных аутоиммунных заболеваний в сочетании с другими клиническими и лабораторными исследованиями.

Иммунофлуоресцентный анализ предназначен для мануальной профессиональной *in-vitro* диагностики.

2 Диагностическая значимость

Системные аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка, прогрессирующий системный склероз, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, дерматомиозит и смешанные заболевания соединительной ткани, характеризуются появлением разнообразных аутоантител, направленных против нуклеопротеиновых антигенов. Хотя значение и патологическая актуальность некоторых аутоантител еще не полностью раскрыты, выявление аутоантител широко распространено и играет важную роль в диагностике системных аутоиммунных заболеваний.

3 Принцип анализа

ИРИФ (непрямой анализ иммунофлуоресценции) - это метод для определения специфических антител. Срезы тканей или клетки, содержащие интересующий антиген, иммобилизуются на предметных стеклах. Если в образце пациента присутствуют специфические антитела, они связываются с антигеном в ткани. Меченные флуоресцеином вторичные антитела (ФИТЦ), выявляют флуоресцентным окрашиванием, образовавшийся иммунный комплекс. Характер свечения оценивается с помощью флуоресцентного микроскопа. Тип свечения свидетельствует о наличии специфических антител в образце пациента.

4 Компоненты теста

Компонент	Описание
120 (480) Определения	
Предметные стекла A Ag 12 10 (40) шт.	10 (40) предметных стекол (готовых к применению), 12 лунок на предметное стекло, каждая лунка покрыта клетками HEp-2
Отрицательный контроль N CONTROL - 1 x 2,0 (3,0) мл	Разбавленная человеческая сыворотка (готово к применению; содержит азид натрия)
Положительный контроль P CONTROL + 1 x 2,0 (3,0) мл	Разбавленная человеческая сыворотка (готово к применению; содержит азид натрия)
Разбавитель пробы B DIL 1 x 50 (2 x 100) мл	Раствор (готовый к использованию; содержит азид натрия)
ФСБ буфер C BUF PBS 2 (8) x 10 г	ФСБ буфер (сухое вещество для 2/8 x 1000 мл)
Конъюгат IgG D CONJ 10 (20) мл	Поликлональное античеловеческое антитело IgG, конъюгированное с FITC (готово к применению; содержит азид натрия)
Среда для заливки E MOUNT 1 (3) x 3,0 мл	Раствор ФСБ с глицерином и антиобесцвечивающим агентом (готовый к применению; содержит азид натрия)
Шаблоны для стекла F TEMPL 10 (40) шт.	Шаблоны из впитывающей бумаги
Покровные стекла G COVER 12 (48) шт.	Покровные стекла
Сертификат QC 1 шт.	-
Инструкция по применению 1 шт.	-

5 Необходимые дополнительные материалы

- Общее лабораторное оборудование
- Микропипетки (5 - 1000 мкл) и одноразовые наконечники
- Мерный цилиндр (100 - 1000 мл)
- Пробирки для приготовления разведений и штативы
- Роторный миксер или другой ротатор
- Влажная камера
- Пластиковая бутылка для мытья
- Ванночка для окрашивания предметных стекол
- Флуоресцентный микроскоп с фильтром возбуждения на 490 нм и блокирующим фильтром: 520 нм
- Адсорбирующая бумага или бумажное полотенце
- Дистиллированная или деионизированная вода

6 Хранение и стабильность

Все компоненты теста должны храниться при температуре от 2 °C до 8 °C, предпочтительно в оригинальной коробке с набором. При соблюдении условий хранения в оригинальной упаковке стабильность набора гарантируется до истечения срока годности. После вскрытия все компоненты набора при надлежащем хранении остаются стабильными в течение не менее 2 месяцев.

7 Общая информация

Данный продукт предназначен только для диагностики *in vitro*. Перед использованием необходимо внимательно ознакомиться с инструкцией по применению. Она применяется только для данного продукта с указанным составом и должна строго соблюдаться для обеспечения достоверных результатов теста. Отступления могут привести к ошибочным результатам теста. Компоненты не должны заменяться реагентами других партий или других производителей.

Необходимо избегать загрязнения реагентов, используя асептические методы при извлечении аликвот из флаконов. После использования флаконы с реагентами должны быть плотно закрыты соответствующими крышками.

Перекрестное загрязнение образцов или реагентов может привести к несовместимым результатам тестирования, поэтому необходимо избегать его путем использования последовательной техники пипетирования.

Необходимо избегать воздействия сильного света на реагенты в течение всей процедуры испытания и хранения.

Недостаточная промывка приведет к низкой точности и повышенным измерительным сигналам. После каждого этапа промывки остатки жидкости должны быть полностью удалены.

8 Подготовка к анализу

8.1 Подготовка реагентов

Перед использованием в течение не менее 30 минут все компоненты, включая предметные стекла, должны быть доведены до комнатной температуры (КТ: 18 °C - 25 °C). Все жидкие компоненты должны быть аккуратно перемешаны для обеспечения однородности.

8.1.1 Предметные стекла

Предметные стекла индивидуально запечатаны с влагопоглотителем в алюминиевые пакеты. Осторожно вынимайте их из пакетов непосредственно перед использованием.

8.1.2 Контроли

Положительные и отрицательные контроли готовы к использованию и не требуют разведения. Контроли должны применяться при каждой постановке теста. Лаборатории также могут валидировать свои собственные контрольные образцы и использовать их в качестве альтернативы.

8.1.3 Разбавитель пробы

Разбавитель для проб готов к применению.

8.1.4 Буфер ФСБ

Перед использованием буферную смесь ФСБ (PBS) необходимо растворить в 1,0 л дистиллированной воды и хорошо смешать. Полученный промывочный раствор должен иметь pH $7,4 \pm 0,2$. Приготовленный ФСБ стабилен в течение 4 недели при хранении при температуре 2-8 °C и соблюдении правил использования.

Не используйте раствор, если ФСБ помутнел, образовался осадок или изменился pH.

8.1.5 Конъюгат

Конъюгат готов к применению. Следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на раствор.

8.1.6 Среда для заливки

Среда для заливки готова к применению.

8.2 Подготовка образцов

8.2.1 Пробы пациента

Производится забор крови из вены, рекомендуется использовать свежесобранную сыворотку. Не используйте липемические гемолизные образцы или бактериально зараженные. Перед анализом, если в этом есть необходимость, центрифугированием удалите из сыворотки любые включения и используйте для анализа только очищенные образцы. Образцы не должны подвергаться термической инактивации.

8.2.2 Разбавление пробы

Образцы должны быть разбавлены 1:80 (например, 5 мкл + 395 мкл) разбавителем для проб и тщательно перемешаны. Следует избегать образования пены.

Для титрования образцов рекомендуется готовить 4-кратное серийное разведение с разбавителем проб на основе исходного разведения 1:80, например: 100 мкл разведенного образца сыворотки + 300 мкл разбавителя проб, в результате чего получаются разведения 1:320; 1:1280, 1:5120 и т.д.

8.2.3 Хранение образцов

Образцы могут храниться при 2-8 °C в течение трех дней. Для длительного хранения требуется температура -20° C. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания. Если образцы должны использоваться для нескольких анализов, разделите образцы на аликвоты и храните при температуре -20° C.

9 Производительность теста

9.1 Процедура

Необходимо подготовить достаточное количество предметных стекол. Не прикасайтесь к лункам и не допускайте высыхания предметных стекол с субстратом в течение всей процедуры тестирования. Необходимо соблюдать указанные время и температуру инкубации и избегать значительных временных сдвигов при пипетировании проб и реагентов.

Шаг	Описание
1. Нанесение контролей и разбавленных проб	Нанесите по 25 мкл (1 капля) готовых к использованию контролей и 25 мкл разбавленных проб в каждую лунку. Убедитесь, что каждая лунка заполнена
2. Инкубация	Инкубируйте в течение 30 мин. при комнатной температуре во влажной камере
3. Промывка	Аспирируйте жидкость из каждой лунки и осторожно промойте промывочным раствором ФСБ с помощью бутылки для промывки. Не направляйте поток ФСБ непосредственно на лунки. Для предотвращения перекрестного загрязнения избегайте промывания одной лунки через другие лунки. Для 12-луночных предметных стекол проведите струю ФСБ от средней линии предметного стекла последовательно вдоль обоих рядов до края. Промойте 2 x 5 мин в меняющемся растворе ФСБ в промывочной ванночке, слегка встряхивая. Извлеките предметные стекла из промывки по одному, стряхнув лишний ФСБ -раствор и тщательно осушив вокруг внешних краев с помощью, прилагаемой впитывающей шаблон-бумаги.
4. Нанесение конъюгата	Добавьте 25 мкл (1 каплю) готового к применению конъюгата в каждую лунку. Убедитесь, что каждая лунка заполнена.
5. Инкубация	Инкубируйте в течение 30 мин. при комнатной температуре во влажной камере, защищенной от прямого света.
6. Промывка	Повторите весь цикл промывки, как описано в п. 3.
7. Добавление среды для заливки	Нанесите по 1 капли в каждую лунку готовой к применению среды для заливки
8. Покрывтие	Осторожно поместите одно покрывное стекло на предметное стекло, чтобы среды для заливки образовала равномерный слой между покрывным стеклом и предметным стеклом. Избегайте воздушных пузырьков. Сотрите излишки среды с краев и нижней части предметного стекла с помощью впитывающей бумаги.
9. Анализ	Проанализируйте слайд с помощью флуоресцентного микроскопа с длинами волн возбуждения 490 нм и эмиссии 520 нм в течение 24 часов. Избегайте более длительной экспозиции одного поля, чтобы минимизировать обесцвечивание флуоресценции FITC.

9.2 Автоматизация

Автоматизированная обработка иммуноанализа должна быть выполнена аналогично ручному использованию и валидирована пользователем.

10 Расчёт результатов

10.1 Метрологическая прослеживаемость

Иммуноанализ калибруется с использованием внутренних образцов в качестве эталонов.

10.2 Оценка

Оценка проводится по типу свечения и интенсивности флуоресценции. Интенсивность флуоресценции может быть полуколичественно определена в соответствии с рекомендациями CDC, Атланта, США:

4+ = максимальная флуоресценция, яркий желто-зеленый цвет

3+ = менее яркая желто-зеленая флуоресценция

2+ = определенная, но тусклая желто-зеленая флуоресценция

1+ = очень тусклая приглушенная флуоресценция

Степень интенсивности не имеет клинического значения и имеет лишь ограниченную ценность как показатель титра. Различия в оптике микроскопа, фильтрах и источнике света могут привести к различиям в интенсивности.

Разведение сыворотки считается отрицательным на ANA, если клетки HEp-2 проявляют флуоресценцию менее 1+ и не имеют четко различимого рисунка. В отсутствие флуоресценции клетки могут выглядеть тускло-зелеными.

Разведение сыворотки считается положительным на ANA, если интенсивность флуоресцентного окрашивания составляет 1+ или выше с четко различимым рисунком флуоресценции.

Если проводится полуколичественная оценка путем титрования, результат должен быть представлен как обратная величина последнего разведения, в котором обнаружена интенсивность флуоресценции 1+ яблочно-зеленого цвета с четко различимым рисунком окрашивания. Для определения конечного титра обычно используется титрование 2х шагом, можно экстраполировать титр конечной точки, пример:

1:80= 3+

1:320= 2+

1:1280= +/-

1:5120 = - Экстраполированный титр равен 640.

10.3 Критерии достоверности теста

Испытания действительны только при соблюдении следующих критериев действительности:

- Отрицательный контроль должен быть оценен отрицательно.
- Положительный контроль должен быть оценен положительно со специфичным ядрышковым свечением, как указано на сертификате к набору, с интенсивностью флуоресценции от 3+ до 4+.

Если эти критерии не соблюдены, тест недействителен и должен быть повторен.

10.4 Устранение неполадок

В случае не достоверного теста следует проверить сроки годности и условия хранения, время и температуру инкубации, а также точную работу всех используемых приборов. Если причину установить не удалось, обратитесь к поставщику или производителю продукта. Рекомендации по устранению неисправностей предоставляется по запросу.

10.5 Референтные значения

Референтные диапазоны указаны ниже:

	Интерпретация
Титр антител < 1:80	отрицательный
Титр антител ≥ 1:80	позитивный

В связи с различными показателями встречаемости заболевания в отдельных регионах, каждая лаборатория должна проверить диапазон предельных значений с помощью собственных анализов и при необходимости скорректировать его.

10.6 Интерпретация результатов тестирования

Положительный результат теста указывает на наличие специфических антител. Отрицательный результат указывает на отсутствие специфических антител, но не исключает возможность аутоиммунной реакции. В случае пограничного результата теста достоверная оценка невозможна.

В соответствии с гистологическим расположением антигенов в ядре и цитоплазме клеток HEp-2 были описаны различные типы свечения:

10.6.1 Гомогенное

Диффузное, равномерное окрашивание всего ядра, с ярким окрашиванием нуклеосом, или без нее. При гомогенном типе свечения в делящихся клетках характерно ярко окрашиваются конденсированные хромосомы. Основными структурными единицами хроматина являются нуклеосомы - комплексы ДНК и

гистонов. Хромосомная область митотических клеток демонстрирует яркое положительное окрашивание.

10.6.2 Гранулярный

Флуоресцентные скопления по всему ядру, которые могут быть от очень мелких до очень крупных в зависимости от типа присутствующего антитела. В одном образце может наблюдаться более одного типа свечения. Хромосомная область митотических клеток обычно отрицательна. (Антигены: Sm, RNP, SS-A, SS-B)

10.6.3 Центромерный

Дискретные пятна на всей площади ядра; число соответствует числу, кратному числу нормальной хромосомы. Характер окрашивания митотических клеток будет соответствовать характеру окрашивания хромосом, причем парные точки выстраиваются в экваториальной плоскости во время метафазы и затем на этапе анафазы сдвигаются к их соответствующим centrosomam. (Антигены: центромерные белки хромосом)

10.6.4 Ядрышковый

Флуоресцентное окрашивание интерфазных ядер HEp-2, резко отделенных от неокрашенной нуклеоплазмы. Флуоресценция нуклеол может быть однородной, пятнистой или комковатой. Часто сопровождается крапчатым рисунком. (Антигены: PMScl, РНК-полимераза I, фибрилларин)

10.6.5 Цитоплазматический тип свечения

Гранулированная или волокнистая флуоресценция в цитоплазме. (Антигены: рибосомальные фосфопротеины, т-РНК-синтазы, митохондрии, скелетные белки)

Номенклатура типов свечения антинуклеарного фактора в соответствии с Международным консенсусом см. на сайте <https://www.anapatterns.org>.

10.7 Ограничения метода

До 10% нормального взрослого населения обнаруживают антинуклеарные антитела. Известно, что есть зависимость АНА от возраста и пола. С увеличением возраста частота встречаемости АНА возрастает. Поэтому низкий положительный титр может быть нормальным для некоторых людей при отсутствии других клинических признаков. Однако у здоровых молодых людей АНА не должен быть. У пациентов с СКВ, проходящих стероидную терапию или находящихся в стадии ремиссии, АНА может быть отрицательным. У родственников пациентов, страдающих СЗСТ, иногда выявляются положительные АНА у них впоследствии может развиваться это заболевание.

Определение конечного титра свечения может варьироваться в зависимости от типа и состояния используемого флуоресцентного микроскопа, а также в зависимости от субъективной оценки различных специалистов.

Образцы и промывочные растворы, загрязненные бактериями или грибами, могут вызвать неспецифическое окрашивание субстрата клеточной культуры.

Протеолитические ферменты в образцах пациентов могут привести к повреждению или потере субстрата клеточной культуры, зафиксированных на предметном стекле.

Интерпретация результатов анализов всегда должна рассматриваться в сочетании с клинической картиной пациента. Диагноз не должен основываться на результатах единственного метода диагностики. Для постановки диагноза необходимо оценить все клинические и лабораторные данные. Для подтверждения необходимо провести дополнительные исследования.

11 Эксплуатационные характеристики

11.1 Аналитические характеристики

11.1.1 Аналитическая чувствительность и специфичность

Перекрестной реактивности антител против аналогичных антигенов не наблюдалось.

11.1.2 Точность

Точность результатов теста оценивалась путем определения внутри- и межаналитической вариации при анализе нескольких образцов с различной активностью антител. Различий в качественной оценке не обнаружено.

11.2 Диапазон измерений

11.2.1 Диагностическая чувствительность и специфичность

Чувствительность и специфичность оценивались путем анализа 391 образца от пациентов с системными аутоиммунными заболеваниями (103 системный склероз (СС), 45 синдром Шегрена

(СШ), 174 системная красная волчанка (СКВ), 36 ревматоидный артрит РА, 13 Смешанное заболевание соединительной ткани (СЗСТ), 20 миозит (ИВМ) и 304 образца от пациентов с другими заболеваниями и доноров крови (21 инфекционные заболевания (ИБ), 11 парепротейнемия (ПП), 93 аутоиммунное заболевание печени (АИГ), 78 воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), 101 здоровые доноры (ЗД)).

		Диагностические показатели
Чувствительность	СС	> 99 %
	СШ	97.8 %
	СКВ	98.9 %
	РА	86.1 %
	СЗСТ	> 99 %
Специфичность	(ИВМ)	95.2 %
	ИБ	84.9 %
	ПП	90.1 %
	АИГ	86.9 %
	ВЗК	> 99 %
	ЗД	83.2 %

12 Предупреждения и меры предосторожности

Продукт предназначен исключительно для использования в диагностике *in vitro* квалифицированным, уполномоченным и обученным персоналом. Со всеми компонентами теста и человеческими образцами следует обращаться осторожно как с потенциально опасными. Следует придерживаться надлежащей лабораторной практики (GLP) и всех соответствующих нормативных актов.

В случае повреждения изделия или неправильной, или неточной информации о продукте, включая маркировку, пожалуйста, свяжитесь с производителем или поставщиком.

Данный продукт содержит препараты человеческого и/или животного происхождения. Любой материал, полученный из жидкостей или органов, использованных для приготовления компонентов, был протестирован и признан отрицательным на HBsAg (антиген вируса гепатита В) и анти-ВИЧ, а также анти-ВГС антитела. Тем не менее, со всеми компонентами и всеми образцами пациентов следует обращаться как с потенциально опасными в соответствии с национальным законодательством и соответствующими руководствами по биологической безопасности.

Поскольку продукт содержит потенциально опасные материалы, необходимо соблюдать следующие меры предосторожности: Не курите, не ешьте и не пейте во время работы с материалом набора или образцами. Избегайте прямого контакта с материалом набора или образцами, надев защитные перчатки, лабораторный халат и защитные очки. Никогда не пипетируйте материал через рот. Быстро вытирайте разливы и тщательно мойте пораженную поверхность дезинфицирующим средством. Тщательно мойте руки после использования.

Некоторые реагенты содержат азид натрия (< 0,1 %) в качестве консерванта, их нельзя глотать, допускать контакта с кожей или слизистой. Возможное образование азидов тяжелых металлов в сливе, должно быть предотвращено путем достаточного промывания водой.

Необходимо соблюдать содержащуюся в паспорте безопасности информацию о возможных опасностях, мерах первой помощи, мерах в случае непреднамеренного выброса больших количеств, обращении и хранении, средствах индивидуальной защиты, информацию об утилизации, а также информацию о токсикологии.

О любом серьезном инциденте, произошедшем в связи с устройством, необходимо сообщить производителю и компетентному органу государства-члена, в котором находится пользователь и/или пациент.

13 Утилизация

Для дезактивации и утилизации следует придерживаться рекомендаций МЗ, а также соответствующих местных и национальных экологических инструкций и правил. Образцы, потенциально загрязненные материалы и инфекционные отходы должны быть обеззаражены, например, автоклавированием в течение 20 мин. при 121 °C.

14 Ссылки

- Tan EM: Antibodies to nuclear antigens (ANA) and their immunobiology and medicine. Adv. Immunol. 1982, 33, 167 – 240.

- Tan EM: Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv. Immunol. 1989, 44, 93 - 151.

- Moore AE, Sabachewsk L, Toolan HW: Culture characteristics of four permanent lines of human cells. Cancer Res. 1955, 15, 998 - 1002.

- Weller TH, Coons AH: Fluorescent antibody studies with agents of Varicella and Herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954, 86, 789 – 94.

- Lyster HC, Forrester FT: The Immunofluorescence (IF) test. In: Immunofluorescence methods in virology, USDHHS, Georgia, 1979, 71 – 81.

- Nakamura RM et al: Advances in laboratory test for autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. Med. Lab. 1984, 15, 190 – 8.

- Nothman DD et al: Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. Ann. Intern. Med. 1975, 83, 464 – 9.

- Molden DP: ANA profiles in systemic rheumatic disease. Diagn. Med. 1985, 12 – 8.

- Miyachi K et al: Autoantibody to nuclear antigen in proliferating cells. J. Immunol. 1978, 121, 2228 – 34.

- Fritzler MJ et al: Speckled pattern antinuclear antibodies resembling anticentromere antibodies. Arth. Rheum. 1984, 27, 92 – 6.

- Tan EM et al: Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Arth. Rheum. 1980, 23, 617 – 25.

- Penning C et al: An analysis of systemic sclerosis patients with autoantibodies to the nucleolar proteins PM-Scl, RNA polymerase I and Fibrillarin. A.R.A. Mtg 1987, D29.

- McCarthy GA et al: Unique antinuclear antibody staining only the mitotic spindle apparatus. New Engl. J. Med. 1981, 305, 703.

- Bianchi FB et al: Ultrastructural localisation and characterisation of a ribosomal antibody detected by immunofluorescence in SLE. Clin. Exp. Immunol. 1974, 17, 629 – 36.

- Vazquez-Abad D et al: Localization of histidyl-tRNA synthetase (Jo-1) in human laryngeal epithelial carcinoma cell line (HEp-2 cells). Cell Tissue Res. 1996, 286, 487 – 91.

15 Символы

	Производитель
	Маркировка соответствия CE
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Номер по каталогу
	Уникальный идентификатор устройства
	Код партии
	Температурный диапазон
	Срок годности
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Содержит достаточно для <n> тестов
	Не используйте повторно
	Осторожно!
	Биологический риск
	Беречь от солнечного света
	Слайд с 12 лунками
	Отрицательный контроль
	Положительный контроль
	Разбавитель пробы
	Конъюгат
	PBS ФСБ буфер
	Среда для заливки
	Шаблоны для стекла
	Покровные стекла

16 Изменения

Изменения в действующих инструкциях по применению	
Текущая версия	017/05.2024
Резюме изменений	Без изменений. Гармонизация с версией DE.