



DiaSorin S.p.A.
Via Crescentino snc - 13040 Saluggia (VC) - Italy
www.diasorin.com
Tel. +39.0161.4871



LIAISON® ANA Screen (310300) Антядерные антитела

1. Назначение

Совокупное качественное определение аутоантител к следующим антигенам: двухцепочечная ДНК (дцДНК), RNP/Sm (70 кД), SS-A (Ro) (60 кД), SS-B (La), Scl-70, Jo-1, центромера (CENP-B) и митохондрии в человеческой сыворотке или плазме, а также выявление сывороток, положительных по тесту непрямо́й иммунофлуоресценции с использованием клеток HEp-2, методом хемилуминесцентного иммуноанализа (CLIA) с помощью анализатора LIAISON®.

Данный тест был разработан для диагностики болезней соединительной ткани, таких как системная красная волчанка, смешанная соединительнотканная болезнь, синдром Шегрена, системный склероз, идиопатический полимиозит, дерматомиозит и CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и телеангиэктазия).

Использовать только для “*in vitro*” диагностики.

2. Введение

Многие системные аутоиммунные заболевания часто сопровождаются появлением в кровотоке антядерных антител (АЯА, ANA). Если появляются подозрения относительно наличия у пациента аутоиммунного нарушения, первым диагностическим шагом является скрининг на наличие в крови АЯА. Эти антитела, направленные на ряд компонентов клеточного ядра и цитоплазмы, были изначально ассоциированы с системной красной волчанкой, однако список заболеваний, сопровождающихся синтезом АЯА., был расширен, так как многие ревматоидные заболевания характеризуются появлением одного или нескольких АЯА. В частности, SS-B и SS-A характерны для системной красной волчанки (СКВ), синдрома Шегрена; дцДНК и Sm – для СКВ; RNP – для смешанной соединительнотканной болезни и СКВ; Scl-70 – для склеродермы; Jo-1 – для полимиозита; центромеры - для CREST-синдрома. Традиционно, АЯА определяют методом непрямо́й иммунофлуоресценции с использованием клеток линии HEp-2 в качестве субстрата. Положительные по этому тесту пробы затем исследуют с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), Вестерн-блота или метода иммунопреципитации для идентификации специфических антител.

В последнее время для определения АЯА с помощью ELISA используется смесь диагностически значимых аутоантигенов наряду с ядерными экстрактами клеток линии HEp-2. Преимуществами ELISA по сравнению с методом непрямо́й иммунофлуоресценции является легкость выполнения исследования, независимо от количества проб, отсутствие субъективного вклада в оценку результатов, получение полуколичественных результатов и небольшое количество ложноположительных результатов. Метод непрямо́й иммунофлуоресценции на клетках HEp-2, вдобавок, в некоторых случаях может демонстрировать отсутствие чувствительности к SS-A (Ro), SS-B (La), Sm или дцДНК. К отрицательным сторонам ELISA по сравнению с иммунофлуоресценцией можно отнести недостаток чувствительности к неизвестным ядерным и цитоплазматическим аутоантигенам и отсутствие таких моделей реактивности на АЯА, которые были продемонстрированы с помощью метода иммунофлуоресценции.

Диагностическая ценность АЯА неизвестной специфики, однако, еще недостаточно определена, так как внешне здоровые люди могут быть положительными по тесту на наличие АЯА, но при этом не демонстрировать клинически значимые симптомы. И наоборот, как только специфическая реактивность была идентифицирована, модель реактивности на АЯА уже перестает представлять интерес для диагностики. Набор реактивов LIAISON® ANA Screen является отличной альтернативой методам непрямо́й иммунофлуоресценции и ELISA в целях скрининга проб пациентов на наличие клинически значимых АЯА.

3. Принцип метода

Метод качественного определения АЯА представляет собой непрямо́й хемилуминесцентный иммуноанализ (CLIA). Рекомбинантные антигены [дцДНК, SS-A(Ro), SS-B (La), RNP/Sm, Scl-70, Jo-1, CENP-B и митохондрии] высокой степени очистки и ядерный экстракт клеток линии HEp-2 связаны с магнитными микрочастицами, мышинные моноклональные антитела к человеческим IgG мечены производным изолюминола (конъюгат антител с красителем). Во время первой инкубации АЯА, присутствующие в калибраторах, контролях и пробах, связываются с твердой фазой. Во время второй инкубации конъюгат взаимодействует с

антиядерными IgG, уже фиксированными на твердой фазе. После каждой инкубации не связавшиеся молекулы удаляются во время цикла промывки. Затем к реакционной смеси добавляются реактивы для активации, индуцирующие хемилюминесцентную реакцию. Интенсивность люминесценции, измеряемая с помощью фотоумножителя в относительных единицах интенсивности, отражает концентрацию АЯА (IgG) в калибраторах, контролях и пробах пациентов.

Антигены, входящие в состав набора	Источник
Двухцепочечная ДНК (дцДНК) RNP/Sm	Синтетический антиген Природные антигены из тимуса теленка, очищенные с помощью аффинной хроматографии
SS-A (Ro)	Природные антигены из тимуса теленка, очищенные с помощью аффинной хроматографии
SS-B (La)	Экспрессированы в <i>E.coli</i>
Scl-70	Экспрессированы в <i>Baculovirus</i>
Jo-1	Экспрессированы в <i>E.coli</i>
Центромера (CENP-B)	Экспрессированы в <i>E.coli</i>
Митохондрия (PDC)	Экспрессированы в <i>E.coli</i>
Клетки HEp-2	Ядерный лизат культуры клеток эпителиальной карциномы гортани линии HEp-2

4. Состав набора

Реагентный картридж

Магнитные частицы (2,3 мл)	Магнитные частицы, покрытые высокоочищенными природными или рекомбинантными антигенами (dsDNA, SS-A (Ro), SS-B (La), RNP/Sm, Scl-70, Jo-1, CENP-B и митохондриальным) и ядерным экстрактом лизата клеток HEp-2, БСА, фосфатный буфер; <0,1% азид натрия.
Калибратор 1 (2,1 мл)	Человеческая сыворотка/плазма, содержащая низкую концентрацию IgG к ядерным антигенам; БСА; фосфатный буфер; 0,2% ProClin 300; инертный краситель (желтый). Концентрация антител в калибраторе определена с использованием внутреннего стандарта DiaSorin.
Калибратор 2 (2,1 мл)	Человеческая сыворотка/плазма, содержащая высокую концентрацию IgG к ядерным антигенам; БСА; фосфатный буфер; 0,2% ProClin 300; инертный краситель (синий). Концентрация антител в калибраторе определена с использованием внутреннего стандарта DiaSorin.
Раствор для разведения образцов (28 мл)	БСА; фосфатный буфер; 0,2% ProClin 300; инертный краситель (желтый).
Конъюгат (23 мл)	Мышиные моноклональные антитела к человеческим IgG; меченные производным изолюминола; БСА; фосфатный буфер; 0,2% ProClin 300, консерванты.
Количество определений	100

Все реагенты готовы к использованию. Порядок расположения реактивов в таблице отражает их расположение в картридже реактивов.

Необходимые материалы, не входящие в набор

Реакционные модули (каталожный номер 319130)

Комплект реагентов стартовый (каталожный номер 319102)

Реагент для контроля системы (каталожный номер 319150)

Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100)

Мешки для обработанных реакционных модулей (каталожный номер 450003)

Дополнительные материалы, рекомендованные для работы

Контроль Антиядерных антител (отрицательный и положительный) (каталожный номер 310301)

Набор для очистки LIAISON® (каталожный номер 310990)

5. Предупреждение

Только для *In vitro* диагностики.

Все образцы человеческой сыворотки/плазмы, использованные для производства набора, были протестированы на наличие антител к вирусу гепатита С, ВИЧ 1 и ВИЧ 2, а также HBs-антигена и были признаны отрицательно реагирующими в вышеуказанных тестах. Но, поскольку не существует метода исследований, который бы гарантировал полную инфекционную безопасность биоматериалов человеческого происхождения, рекомендуется обращаться с набором, как с потенциально инфекционным.

6. Меры предосторожности

Не употребляйте пищу, напитки, не курите и не наносите косметику в лаборатории, где проводятся анализы.

Не переливайте растворы ртом.


Избегайте прямого контакта со всеми потенциально инфекционными материалами, надевая защитную одежду, такую как лабораторные халаты, защитные очки и одноразовые перчатки. В конце каждого анализа тщательно мойте руки.

Избегайте всплесков или образования аэрозолей. Любую утечку биологического реагента следует смыть с помощью раствора гипохлорита натрия с 5%-ным активным хлором и утилизировать как инфекционные отходы.

Все образцы и реагенты, содержащие биологические материалы, используемые в анализе, должны считаться потенциально способными передавать инфекционные агенты. С отходами следует обращаться с осторожностью и утилизировать их в соответствии с лабораторными нормами и нормами законов, действующими в стране. Любые материалы, подлежащие повторному использованию, должны быть надлежащим образом стерилизованы в соответствии с местными законами и нормами.

Проверяйте эффективность цикла стерилизации/обеззараживания.

В соответствии с Положением ЕС 1272/2008 (CLP - классификация, маркировка и упаковка), опасные реагенты классифицируются и маркируются следующим образом:

РЕАГЕНТЫ:	[CAL], [CONJ], [DIL/SPE]
КЛАССИФИКАЦИЯ:	Сенсибилизация кожи 1 H317
СИГНАЛЬНОЕ СЛОВО:	Внимание
ОБОЗНАЧЕНИЕ / ПИКТОГРАММЫ:	 GHS07 – Восклицательный знак
ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПАСНОСТИ:	H317 Может вызывать аллергическую реакцию на коже.
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:	P261 Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/испарений/аэрозоля. P280 Надевать защитные перчатки /защитную одежду/средства защиты глаз/ средства защиты лица. P363 Стирать загрязненную одежду перед повторным использованием.
СОДЕРЖИТ: (только вещества, предписанные согласно Статье 18 Постановления ЕС 1272/2008).	реакционная масса: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он [ЕС № 247-500-7] и 2-метил-2Н -изотиазол-3-он [ЕС № 220-239-6] (3:1) (ProClin® 300).

В соответствии с Положением ЕС 1272/2008 (CLP - классификация, маркировка и упаковка) [SORB] маркируется как EUN210; по запросу доступны паспорта безопасности.

Дополнительную информацию смотрите в паспортах безопасности, доступных на сайте: www.diasorin.com.

7. Подготовка интегрального картриджа реактивов.

Перед удалением алюминиевых мембран с флаконов аккуратно перемешайте их содержимое, держа интеграл горизонтально. Избегайте пенообразования. Удалите алюминиевые мембраны с каждого из флаконов. Проверните колесо флакона с магнитными частицами, чтобы удостовериться, что оно свободно вращается, продолжая вращать колесо, добейтесь, чтобы суспензия стала равномерно коричневой. Эта процедура инициирует процесс ресуспендирования магнитных частиц. Поместите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 30 минут. Анализатор автоматически перемешивает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.

8. Хранение и стабильность интегрального картриджа реактивов

Всегда храните интегралы в вертикальном положении, в противном случае последующее перемешивание магнитных частиц будет затруднено.

Невыскранные реактивы стабильны до окончания срока годности при условии их хранения в вертикальном

положении при температуре 2-8°C. Запрещается замораживать реактивы, входящие в состав картриджа. Запрещается использовать интеграл после окончания срока годности, указанного на этикетке интеграла. После вскрытия интеграла (удаления алюминиевых мембран) его содержимое стабильно в течение 4 недель при условии хранения при температуре 2-8°C в холодильнике или на борту анализатора.

9. Подготовка исследуемого материала

Для исследования могут использоваться сыворотка или плазма. Цитрат, ЭДТА и гепарин могут быть использованы в качестве антикоагулянтов. Кровь должна быть собрана в асептических условиях с помощью венопункции, необходимо дать время для образования сгустка крови, далее сыворотка должна быть отделена от сгустка как можно скорее.

Мутные, липемичные пробы, а также пробы с твердыми частицами и дебрисом эритроцитов перед исследованием могут потребовать дополнительной очистки путем фильтрации или центрифугирования. Не рекомендуется исследовать сильно гемолизированные и липемичные пробы, а также пробы с признаками бактериальной контаминации. Перед установкой пробы в анализатор необходимо удалить все пузырьки с ее поверхности.

Стабильность образцов: **7 дней при температуре 2-8°C**. Для более длительного хранения пробы должны быть заморожены при температуре -20°C или ниже. После разморозки пробу необходимо аккуратно перемешать. 10 проб с различной реактивностью хранились 7 дней при температуре 2-8°C, после чего были 5 раз заморожены-разморожены. Полученные результаты существенно не отличались друг от друга.

Минимально необходимый объем 170 µл (20 µл на исследование + 150 µл мертвый объем).

10. Калибровка

Калибрование при помощи калибраторов, входящих в состав интеграла, позволяет перекалибровать мастер-кривую, хранящуюся в памяти анализатора, с использованием значений концентрации калибраторов, зашифрованных в штрих-коде этикетки интеграла.

Калибровка должна быть проведена в трех повторах в следующих случаях:

- Используется новая серия набора реактивов или набора запускающих реактивов (Starter Kit).
- Прошло более 2 недель с момента последней калибровки.
- Было проведено обслуживание анализатора.
- Результаты исследования контрольных сывороток выходят за пределы допустимого диапазона.

11. Процедура анализа

Строгое следование рекомендациям инструкции пользователя гарантирует получение корректных результатов. Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в штрих-коде этикетки интеграла. В случае неполадок сканера штрих-кодов или повреждения штрих-кода информация об интеграле должна быть введена вручную (см. Инструкцию по применению реактивов «LIAISON®»).

Процедура анализа, выполняемого анализатором, состоит из следующих стадий:

1. Раскапывание калибраторов, контролей или проб в кюветы реакционного модуля.
2. Добавление магнитных частиц.
3. Добавление раствора для разведения образцов.
4. Инкубация.
5. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
6. Добавление конъюгата.
7. Инкубация.
8. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
9. Добавление запускающих реактивов и измерение интенсивности флуоресценции

12. Контроль качества

Каждая лаборатория должна установить частоту проведения контроля качества самостоятельно.

Для контроля качества необходимо использовать контроль LIAISON® ANA Screen (кат.№ 310301):

- а. по меньшей мере 1 раз в день перед постановкой проб пациентов
- б. каждый раз при использовании нового реагентного картриджа
- в. Каждый раз после калибровки набора
- г. каждый раз при использовании нового лота Starter Kit

д. для того, чтобы оценить адекватность работы открытого интеграла в соответствии с руководящими принципами или требованиями местных нормативных актов или аккредитованных организаций.

Предупреждение. Поскольку термочувствительные эпитопы присутствуют на покрытии микрочастиц, необходимо проводить проверку контроля качества всякий раз, когда используется новый интеграл реагентов для того, чтобы убедиться в правильности хранения набора и неизменной производительности.

Контроли LIAISON® следует ставить в 1 повторности для контроля эффективности анализа. Контрольные значения должны лежать в пределах ожидаемого диапазона: всякий раз, когда один или оба контроля находятся за пределами ожидаемых диапазонов, следует провести калибровку и повторить тестирование контроля. Если контрольные значения, полученные после успешной калибровки, повторно выходят за пределы предварительного определенных диапазонов, тестирование следует повторить с использованием неоткрытого контрольного флакона. Если контрольные значения лежат вне ожидаемых диапазонов, результаты не должны сообщаться пациенту.

Эффективность других контролей должна оцениваться на совместимость с данным анализом перед их использованием. Затем следует установить соответствующие диапазоны значений для используемых материалов контроля качества.

13. Интерпретация результатов.

Анализатор автоматически рассчитывает концентрацию АЯА класса IgG в индексах. За более подробной информацией обратитесь к Инструкции пользователя.

Пороговое значение для разграничения образцов содержащих и не содержащих антиядерные IgG антитела – индекс 1,5.

Интерпретация результатов осуществляется следующим образом:

Пробы с концентрацией АЯА класса IgG ниже 1,5 индексов должны расцениваться, как отрицательные.

Пробы с концентрацией АЯА класса IgG равной или большей 1,5 индексов должны расцениваться, как положительные.

Отрицательный результат обычно свидетельствует о том, что в кровотоке пациента отсутствуют антитела к соответствующим антигенам, но не всегда позволяет исключить наличие специфического ревматоидного заболевания, так как большие соединительнотканными заболеваниями тканей могут быть негативными по тесту на АЯА. Положительный результат обычно указывает на присутствии в крови АЯА, что может быть показателем наличия соединительнотканной болезни. Однако присутствие АЯА не является диагностическим признаком ревматоидной болезни, так как внешне здоровые люди с положительным результатом на АЯА могут быть отрицательными по тесту на наличие в крови клинически значимых аутоантител.

14. Ограничения

Строгое следование инструкциям к прибору и реактиву необходимо для получения достоверных результатов.

Бактериальная контаминация или нагревание пробы могут повлиять на результат исследования.

Результат теста качественный: положительный или отрицательный по отношению к присутствию IgG к АЯА. Не рекомендуется использовать результат одного теста для постановки диагноза. При постановке диагноза результаты всегда следует рассматривать вместе с данными истории болезни и другими диагностическими исследованиями.

Пробы пациентов с соединительнотканной болезнью могут быть отрицательными по тесту на АЯА. Однако отрицательный результат не позволяет исключить наличие системной ревматоидной болезни. И наоборот, АЯА могут выявляться в популяции и в отсутствии болезни.

Специфическая реактивность пробы на определенные антигены не может быть определена с использованием данного набора реактивов. Рекомендуется провести дополнительное исследование положительных проб на присутствие специфических антител.

Образцы от пациентов, получающих терапевтические дозы биотина (витамин Н, В7 или В8), могут влиять на иммуноанализ, основанный на биотинилированных реагентах. Никаких помех не наблюдалось при тестировании концентрации биотина в сыворотке до 3500 нг / мл с LIAISON ANA Screen (подробнее см. §15.1).

15. Специфические рабочие характеристики

15.1. Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность можно определить, как способность анализа точно выявить конкретный аналит в присутствии потенциально интерферирующих факторов в матрице образцов (например, антикоагулянты, гемолиз, эффекты обработки пробы) или перекрестно реагирующих антител.

Интерференция. Контролируемое исследование потенциально интерферирующих веществ или состояний показало, что на выполнение анализа не влияют антикоагулянты (цитрат натрия, ЭДТА, гепарин лития и натрия), гемолиз (вплоть до 1000 мг/дл гемоглобина), липемия (вплоть до 3000 мг/дл триглицеридов), билирубинемия (вплоть до 20 мг/дл билирубина), биотин (вплоть до 3500 нг/мл) или небольшое количество циклов заморозки-разморозки образцов.

Перекрестное взаимодействие. Как правило, наличие потенциально интерферирующих антител не дает интерференции при тестировании. Исследованные антитела: (а) иммуноглобулины к различным инфекционным агентам, таким как ЦМВ, ВЭБ, ВЗВ, вирус краснухи, *Toxoplasma gondii*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*; (б) антитела к ревматоидному фактору.

15.2. Точность

Различные образцы, содержащие различные концентрации специфических аналитов, были исследованы для изучения повторяемости и воспроизводимости (изменчивость внутри и между анализами). Изменчивость, показанная в таблицах ниже, не приводит к неправильной классификации образца.

Повторяемость	A	B	C	D	E	F
Число определений	20	20	20	20	20	20
Среднее значение (индекс)	0,22	2,64	3,10	4,90	6,96	9,44
Стандартное отклонение	0,01	0,10	0,18	0,37	0,45	0,45
К.В. (%)	3,7	3,8	5,6	7,5	6,4	4,8

Воспроизводимость	A	G	H	I	J
Число определений	20	20	20	20	20
Среднее значение (индекс)	0.24	2.50	4.34	5.84	7.90
Стандартное отклонение	0.02	0.19	0.5	0.40	0.45
К.В. (%)	7.2	7.7	8.2	6.8	5.7

15.3 Эффект переноса

Эффект переноса был исследован путем тестирования пяти отрицательных образцов до и после одного высокопозитивного образца. Полученные результаты показывают, что при использовании анализатора LIAISON® перенос не наблюдается.

15.4. Диагностическая специфичность и чувствительность

Диагностическая специфичность и чувствительность были оценены путем тестирования следующих двух образцов популяции.

Первая популяция: 529 образцов, полученных от пациентов, проходящих рутинное скрининговое исследование на АЯА, было протестировано. 87 из 529 образцов были положительными (1:160) по результатам проведенного Нер-2 иммунофлуоресцентного исследования (IFA) и 442 из 529 образцов были определены как отрицательные. По результатам тестирования на LIAISON® ANA Screen, 37 из 87 IFA-положительных образцов были определены как положительные и 408 из 442 IFA-отрицательных образцов были определены как отрицательные, общая сходимость результатов составила 84,1% (95% доверительный интервал: 80,7 – 87,1%).

После разрешения противоречивых результатов путем тестирования на антитела ENA и dsDNA с помощью дополнительных тестов (ELISA, дот-блот-тест, Иммунофлуоресцентный анализ Crithidia luciliae), 17 образцов были включены в ожидаемую положительную популяцию, а 57 образцов остались нерешенными и, следовательно, не были включены в анализ данных. Результаты представлены ниже.

10 положительных результатов и 408 отрицательных результатов наблюдались в ожидаемой отрицательной популяции, изученной - диагностическая специфичность: 97,6% (95% доверительный интервал: 95,6-98,8%).

2 отрицательных результата и 52 положительных результата наблюдались в ожидаемой положительной популяции, диагностическая чувствительность: 96,3% (95% доверительный интервал: 87,3-99,6%).

Общее число образцов	Результаты IFA (1:160)	Результаты Liaison	Классификация после исследования сомнительных результатов образцов
529	87 положительных	37 положительных	Согласующиеся положительные результаты
		50 отрицательных	2 образца положительны на антитела к ENA или dsDNA 48 образцов неразрешенных дополнительными тестами
	442 отрицательных	34 положительных	10 отрицательных образцов на антитела к ENA или dsDNA 15 положительных образцов на антитела к ENA или dsDNA 9 образцов неразрешенных дополнительными тестами
		408 отрицательных	Согласующиеся отрицательные результаты

Была протестирована вторая популяция из 134 образцов, полученных от пациентов, пораженных клинически определенной болезнью соединительной ткани. Частота присутствия антиядерных антител при различных заболеваниях соединительной ткани сообщается в следующей таблице, где приведены результаты теста LIAISON® ANA Screen, а также ожидаемая частота присутствия антиядерных антител, полученных путем косвенного иммунофлуоресцентного анализа (Kavanaugh et al., Arch. Pathol. Lab. Med., 124: 71, 2000).

Заболевание	Количество / общее число	% положительных образцов на Liaison	Ожидаемый % IFA- положительных результатов
Системная красная волчанка	65 / 74	87,8%	95-100%
Синдром Шегрена	25 / 26	96,1%	40-70%
Полимиозит	2 / 2	100%	30-80%
CREST синдром	4 / 4	100%	20-60%
Смешанные заболевания соединительной ткани	6 / 6	100%	100%
Системный склероз	18 / 22	81,8%	60-80%