

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgA РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

ORG 522A, Rheumatoid Factor IgA

Каталог. № : **ORG 522A**Методика от **08-2012**Количество : **96**Производитель: **Orgentec (Германия)**

Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

Набор **Rheumatoid Factor IgA** предназначен для количественного определения антител класса IgA Ревматоидного Фактора методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Анализ предназначен только для диагностики *in vitro*.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Fc фрагменты высоко очищенного человеческого иммуноглобулина G нанесены в лунки.

Антитела к нанесенным антигенам, если они присутствуют в разбавленной пробе пациента, связываются с соответствующим антигеном. Промывание лунок удаляет несвязанные неспецифические компоненты сыворотки и плазмы. Анти-человеческие антитела, конъюгированные Пероксидазой хрена (HRP), иммунологически обнаруживают связанные антитела пациента, формируя комплекс конъюгат/антитело/антиген. Промывание лунок удаляет несвязанный конъюгат Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизует с образованием синей окраски. Добавление кислоты останавливает реакцию, образуя желтый конечный продукт. Интенсивность этого желтого цвета измеряется фотометрически при 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации антител, присутствующих в исходном образце.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию. Код: RF	1
Калибратор А 0 Ед/мл, содержащий сывороточную/буферную матрицу (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор В 15 Ед/мл, содержащий антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор С 50 Ед/мл, содержащий антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор D 150 Ед/мл, содержащий антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор Е 500 Ед/мл, содержащий антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Контроли (Положительный и Отрицательный), содержащие антитела Нуклеосомы в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтого цвета. Готовы к использованию. Концентрация указывается в сертификате анализа.	2 флакона 1.5 мл каждый
Буфер для образцов Р; содержит PBS, BSA, моющее средство, консервант азида натрия 0,09%, желтый, концентрат (5 х).	1 флакон 15 мл
Ферментный конъюгат, содержащий античеловеческие антитела IgG, меченые пероксидазой хрена; содержит PBS, BSA, детергент, консервант Проклин 0.05%, светло-красный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ, содержит 3,3', 5,5'-	
Тетраметилбензидин. Бесцветный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор, содержит кислоту. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, содержит Tris, детергент, консервант азид натрия 0.09%; концентрат (50x)	1 флакон 20 мл
Инструкция по применению	1 шт.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционально: контрольный фильтр с длиной волны 620 нм
 - Программное обеспечение для ридера
 - Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объемом 100 мкл
 - Вortexный миксер
 - Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
 - Таймер
 - Дистиллированная или деионизированная вода
 - Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
 - Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора
- Наборы ORGENTEC ИФА являются подходящими для использования на открытых автоматизированных процессорах. Каждый анализ должен быть оценен на соответствующей автоматизированной системе. Подробная информация предоставляется по запросу.

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

- Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
- Дайте возможность крови сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием.
- Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
- Образцы должны храниться при 2-8^oC до 5 дней или при -20^oC до шести месяцев.
- Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
- Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить набор при 2 - 8 °C
- Держать микропланшетные лунки в герметичном мешочке с осушителем.
- реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
- Не поддавать реагенты для анализа воздействию тепла, солнца или сильного света в течении хранения и использования.
- Разбавленный буфер образца и промывочный буфер стабильны по крайней мере 30 дней при 2 - 8 °C.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
- Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
- Все материалы следует привести к комнатной температуре.
- Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить беспрерывно для получения надежных и точных результатов.
- Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
- Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
- Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
- Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
- Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
- Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Бычий сывороточный альбумин (BSA), используемый в компонентах, был протестирован на BSE и найден отрицательным.
- Избегайте контакта с субстратом ТМБ (3,3',5,5'-Тетраметилбензидином).

- Системная жидкость содержит кислоту, классификация - не является опасной. Избегать контакта с кожей.
- Контроль, буфер для образцов и промывочный буфер содержат азид натрия 0,09% в качестве консерванта. Эта концентрация классифицируется как неопасная.
- Ферментный конъюгат содержит ProClin 300 0.05% в качестве консерванта. Эта концентрация классифицируется как неопасная.

Во время работы с реагентами, контролями и образцами сыворотки соблюдать существующие правила лабораторной безопасности и надлежащей лабораторной практики:

- Меры первой помощи: при попадании на кожу, немедленно тщательно промыть водой с мылом. Снять загрязненную одежду и обувь и выстирать ее перед использованием. Если системная жидкость соприкасается с кожей, тщательно промойте водой. После контакта с глазами тщательно промойте глаза с приоткрытыми веками проточной водой в течение не менее 10 минут. Обратитесь к врачу, если это необходимо.
- Меры личной безопасности, защитное снаряжение и чрезвычайные меры:

Соблюдать правила безопасности лабораторий. Избегать контакта с кожей и глазами. Не глотать. Не пипетировать ртом. Не есть, не пить, не курить, не наносить макияж в местах работы с реагентами. При пролипании вытереть инертным материалом и выбросить в соответствующую емкость для утилизации отходов.

- Средства индивидуальной защиты: Использовать защитные перчатки из нитрил каучука или натурального латекса.

Пользуйтесь защитными очками.

- Неблагоприятные условия: Так как раствор субстрата является светочувствительным, хранить Alegria® полоски в темноте.
- При утилизации лабораторных отходов национальное или региональное законодательство должно соблюдаться.

Соблюдайте рекомендации по обеспечению контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контролей и/или объединенных сывороток.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона (x5) буфера для образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием.

Приготовление образцов

Разбавьте образцы пациентов 1:100 буфером для образцов перед анализом. Для этого добавьте до 10 мкл образца 990 мкл буфера для образца в пробирке из полистирола. Тщательно перемешайте. Примечание: Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для контролей/калибраторов и проб пациентов.

1. Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку.
Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °C).
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
2. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
3. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
4. Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Бихроматическое измерение проводите при 600-690 нм.
Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Пример пипетирования:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P2										
B	B	P3										
C	C											
D	D											
E	E											
F	C+											
G	C-											
H	P1											

P1, – образцы пациентов, A – E – калибраторы, C+, C- - контроли

ОЦЕНКА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм для Калибраторов/Контролей и результатов контролей совпадает с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественных результатов отложить оптическую плотность каждого калибратора согласно концентрации калибратора, чтобы построить калибровочную кривую. Концентрация образцов пациентов может быть затем оценена с калибровочной кривой с помощью интерполяции.

Для данного набора рекомендуется 4-параметрический с линейно-логарифмическими координатами метод для оптической плотности и концентрации.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Калибровка

Это система анализа откалибрована в относительных условных единицах. Калибровка связана с подготовкой первого Британского Стандарта 64/2 для ревматоидного фактора.

Диапазон измерения

Расчетный диапазон данного ИФА анализа составляет: 0-500 Ед/мл

Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение Cut-off 20 Ед/мл

Интерпретация результатов

Отрицательный: < 20 Ед/мл

Положительный: ≥ 20 Ед/мл

Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образца, чтобы продемонстрировать динамический диапазон анализа. Активность для каждого разведения была рассчитана как значение Индекса.

Образец	Разведение	Полученное значение Ед/мл	Ожидаемое значение Ед/мл	П/О, %
1	1:100	550.0	463.1	119
	1:200	229.8	231.6	99
	1:400	112.3	115.8	97
	1:800	58.2	57.9	101
	1:1600	25.6	28.9	89
	1:3200	14.3	14.5	99
2	1:100	424.2	380.1	112
	1:200	185.4	190.1	98
	1:400	93.2	95.0	98
	1:800	47.3	47.5	100
	1:1600	22.7	23.8	95
	1:3200	12.7	11.9	107
3	1:100	239.0	240.9	99
	1:200	121.2	120.5	101
	1:400	60.4	60.2	100
	1:800	25.6	30.1	85
	1:1600	14.5	15.1	96
	1:3200	6.6	7.5	88

Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила:

1 Ед/мл

Воспроизводимость

Внутри тестовая точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов из результатов 24 определений в одном анализе. Результаты для точности в пределах анализа приведены в таблице ниже.

Межсерийная точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов по результатам 6 определений в 5 различных анализах. Результаты для выполнения к запуску точности приведены в таблице ниже.

Внутри анализа		
Образец	Среднее Значение, Ед/мл	CV [%]
1	21.1	6.4
2	116.6	5.3
3	238.9	7.2

Между анализами		
Образец	Среднее Значение, Ед/мл	CV [%]
1	25.6	6.1
2	90.7	5.8
3	114.7	7.8



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

Перекрестно реагирующие вещества

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Результаты исследований

Study population	n	n_Pos	%
Rheumatoid Arthritis	302	235	77.8
Normal human sera	169	12	7.1

Clinical Diagnosis			
		Pos	Neg
ORG 522A	Pos	235	12
	Neg	67	157
		302	169

Sensitivity: 77.8 %
Specificity: 92.9 %
Overall agreement: 83.2 %

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Этот анализ предназначен в качестве диагностической помощи. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах одного теста, он должен быть сделан врачом после всех оценки всех клинических и лабораторных исследований. Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально.

Выше указанные патологические и нормальные диапазоны для антител в образцах пациента следует рассматривать только в качестве рекомендаций. Каждая лаборатория должна установить свои собственные нормы, в соответствии с ISO 15189 или другие действующие правила лаборатории.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- Добавить **100 мкл** калибратор, контроль или образец пациента
 - Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
 - Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
- Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата
 - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
 - Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
- Добавить **100 мкл** раствора субстрата
 - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- Добавить **100 мкл** стоп раствора
 - Выдержать **5 минут**
 - Считать при 450 нм