

НАБІР ІФА

ДЛЯ РОЗДІЛЬНОГО НАПІВКІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ IgG АНТИТІЛ ДО ENA-6Pro

3103, Aeskulisa ENA-6Pro

Каталог. №: 3103

Методика від 28-08-2007

Кількість : 96

Версія 002

Виробник : AESKU. Diagnostics,
(Німеччина)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. Призначення

AESKULISA ENA-6Pro являє собою твердофазний імуноферментний аналіз для роздільного напівкількісного визначення IgG антитіл проти шести клітинних і ядерних антигенів у сироватці крові людини. Лунки покриті рекомбінантними SS-B, SS-A (52 кДа), Scl 70, Jo-1 і високо очищеним нативним людським snRNP/Sm, Sm і SS-A (60 кДа). Аналіз є інструментом в диференціальній діагностиці системних ревматичних захворювань.

2. Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

Принцип тесту

Зразки сироватки, розбавлені 1:101, інкубують в Мікропланшетах з внесенням конкретного антигена. Антитіла пацієнта, якщо вони присутні в зразку, зв'язуються з антигеном. Незв'язана фракція вимивається на наступній стадії. Потім анти-людські імуноглобуліни, кон'юговані з Пероксидазою хрому (кон'югат), інкубують і відбувається реакція з комплексом антиген-антитіло в зразках в Мікропланшетах. Незв'язаний кон'югат вимивається на наступній стадії. Додавання ТМВ субстрату генерує ферментативну колориметричну (синій колір) реакцію, яка зупиняється розведеною кислотою (колір змінюється на жовтий). Швидкість утворення кольору від хромогену є функцією кількості кон'югату, пов'язаного з комплексом антиген-антитіло, і вона пропорційна початковій концентрації відповідних антитіл у зразку пацієнта.

3. Комплект поставки

Мають бути відновлені:

5x Буфер для зразків 1 флакон, 20 мл - 5x концентрований (білий ковпачок: жовтий розчин)
Містить: Тріс, NaCl, BSA, азид натрію <0,1% (консервант)

50x Промивний буфер 1 флакон, 20 мл - 50x концентрований (білий ковпачок: зелений розчин)
Містить: Тріс, NaCl, Твін 20, азид натрію <0,1% (консервант)

Готові до використання:

Калібратори А-D 4 флакона, 1,5 мл кожен 0, 10, 30, 100 Од/мл (білий ковпачок: жовтий розчин)
Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)

Калібратор Cut-off 1 флакон, 1,5 мл (синій ковпачок: жовтий розчин)
Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)

Кон'югат 1 флакон, 15 мл IgG (синій ковпачок: синій розчин)
Містить: Анти-імуноглобуліни людини, кон'юговані з пероксидазою хрому

Субстрат ТМВ 1 флакон, 15 мл (чорний ковпачок)

Містить: стабілізований ТМВ/H₂O₂

Стоп Розчин 1 флакон, 15 мл (білий ковпачок: безбарвний розчин)

Містить: 1 М соляної кислоти

Мікропланшет 12 x 8-лункових смужок, які відокремлюються
Покриття див. пункт 1

Необхідні матеріали, що не постачаються:

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Скляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, піпетки прецизійні (10, 100, 200,

500, 1000 мкл) або регульована мультипіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір.

Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur.Ph. 4-е вид).

4. Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і Мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини стабільні протягом 1 місяця при температурі +4 °C/39 °F, як мінімум.

Реагенти і Мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на ТМВ розчин. Зберігайте Мікропланшети в призначеній для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте.

5. Заходи безпеки використання

5.1 Небезпека для здоров'я

Цей продукт призначений тільки ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO.

Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормальної використання, притримуйтеся наступних заходів для максимальної безпеки:

Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички.

УВАГА! Калібратори, Контролі та Буфери містять азид натрію (NaN₃) як консервант. NaN₃ може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN₃ може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні, змити з великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів. Будь ласка, зверніться до процедур дезактивації, як це викладено CDC або до інших місцевих/національних керівних принципів.

Не паліть, не їжте і не пийте при роботі з набором.

Не піпетувати ротом.

Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад) був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог.

5.2 Загальні зауваження щодо використання

Не змішуйте і не замінійте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-32 °C/68-89.6 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

Інкубація: Ми рекомендуємо проводити тест при 30 °C/86 °F для автоматизованих систем.

Ніколи не надавайте компоненти більш високій температурі, ніж 37 °C/98.6 °F.

Завжди проводити піпетування розчину субстрату тільки з новими наконечниками. Захищати цей реагент від світла. Ніколи не піпетувати кон'югат з наконечниками, які використовувалися з іншими реагентами до цього.

6. Відбір проб, Використання та зберігання

Використовуйте переважно зібрані нещодавно зразки сироватки. Забір крові повинен проводитись відповідно до державних вимог.

Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Сироватка з частками повинна бути очищена центрифугуванням з низькою швидкістю (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати відразу, зберігати щільно закритими при температурі 2-8 °C/35-46 °F до трьох днів і замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

7. Процедура аналізу

7.1 Підготовчі заходи перед піпетуванням

Розвести концентровані реагенти:

Розвести концентрований буфер для взірців 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

Зразки:

Розвести зразки сироватки 1:101 буфером для зразка (1x)
Наприклад, 1000 мкл буфера для зразків (1x) + 10 мкл сироватки.
Добре перемішати!

Промивання:

Підготувати 20 мл розведеного промивного буфера (1x) на 8 лунок або 200 мл на 96 лунок
Наприклад, 4 мл концентрату плюс 196 мл дистильованої води.

Автоматизоване промивання:

Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

Ручне промивання:

Видалити рідини з лунок перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку, почекати 20 секунд. Повторити всю процедуру ще два рази.

Мікропланшети:

Розрахуйте кількість лунок, необхідних для випробування. Видалити зайві лунки з рами, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, (2-8 °C/35-46 °F).

7.2 Проведення тестування

Схема піпетування: див. Додаток А, процедура випробування: див. Додаток В
Ми рекомендуємо піпетування зразків і калібраторів у двох примірниках.

- Внесіть 100 мкл розведеної сироватки кожного пацієнта в призначені лунки.
- Внесіть 100 мкл калібраторів або Cut-off Калібратора в призначені лунки.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл кон'югату в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл ТМБ субстрату в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F, захищеному від інтенсивного світла.
- Внесіть 100 мкл стоп розчину в кожну лунку, використовуючи той же порядок, як при піпетуванні субстрату.
- Інкубуйте 5 хвилин мінімум.
- Агітувати пластину ретельно протягом 5 сек.
- Зчитати абсорбцію при 450 нм (опційно 450/620 нм) протягом 30 хвилин.

8. Якісна та Напівкількісна Інтерпретація

Побудувати стандартну криву, відклавши **оптичну щільність (OD) кожного калібратора (вісь Y)** по відношенню до відповідних значень концентрації в **Од/мл (вісь X)**. Для досягнення найкращих результатів ми рекомендуємо використання log/lip координат та 4-Параметрове налаштування. З OD кожного зразка зчитати відповідні концентрації антитіл, виражені в **Од/мл**.

Приклад стандартної кривої

Ми рекомендуємо піпетування калібратора Cut-off паралельно у кожній постановці.

Калібратори/IgG	OD 450/620 нм
0 Од/мл	0.042
10 Од/мл	0.323
30 Од/мл	0.757
100 Од/мл	1.602
Cut-off калібратор	
15 Од/мл	0.451 OD

Нормальний діапазон	Сумнівний діапазон	Позитивні результати
< 12 Од/мл	12-18 Од/мл	> 18 Од/мл

Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат якісний	Результат (Од/мл) напівкількісний
P 01	0.188/1.186	0.187	Негативний	5.0
P 02	1.334/1.335	1.335	Позитивний	71.4

Не використовувати цей приклад для інтерпретації результатів пацієнтів!

Дані, характерні для конкретного лоту, знаходяться в листі контролю якості. Медичні лабораторії можуть проводити свій Контроль Якості використовуючи власні контролю і/або внутрішній пул сироваток, як це передбачено нормами ЄС.

Кожна лабораторія повинна встановити свої межі нормальних значень, ґрунтуючись на власних методах, контролях, обладнанні і популяції пацієнтів у відповідності зі своїми встановленими процедурами.

Для **якісної інтерпретації** зчитати оптичну щільність Cut-off калібратора і зразків пацієнтів. Порівняти OD пацієнта з OD Cut-off калібратора. Для якісної інтерпретації ми рекомендуємо розглядати сироватки в діапазоні 20% навколо порогового значення, як двозначні. Всі зразки з більш високим OD вважаються позитивними, зразки з більш низькими OD вважаються негативними.

Негативний: OD пацієнта < 0.8 x OD Cut-off
Сумнівний: 0.8 x OD Cut-off ≤ OD пацієнта ≤ 1.2 x OD Cut-off
Позитивний: OD пацієнта > 1.2 x OD Cut-off

9. Технічні дані

Матеріал зразка: сироватка
Об'єм зразка: 10 мкл зразка, розведеного 1:101 в 1x буфері для зразків
Загальний час інкубації: 90 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F
Діапазон калібрування: 0-100 Од/мл
Аналітична чутливість: 1.0 Од/мл
Зберігання: при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони
Кількість визначень: 96 тестів

10. Дані продуктивності

10.1 Аналітична Чутливість

Тестування буфера для зразків 30 разів на *AESKULISA ENA-6Pro (REF7103)* дало аналітичну чутливість 1.0 Од/мл.

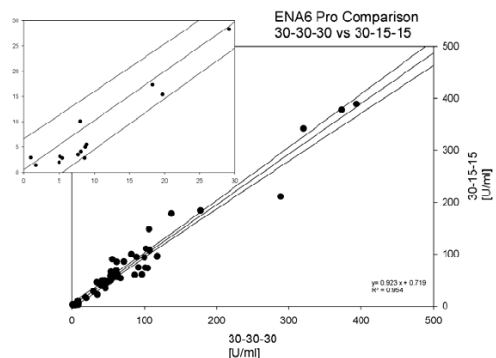
10.2 Специфічність і чутливість

Мікропланшет покритий високоочищеними та/або рекомбінантними антигенами (SS-A, SS-B, snRNP/Sm, Sm, Scl-70, Jo-1). Перехресної реактивності з іншими аутоантигенами не було виявлено. Дані вивчалися з *AESKULISA ENA-6Pro (REF 7103)*.

Кореляція:

Сумісність даних по продуктивності оцінювали з 62 сироватками, які тестувались на обох, *AESKULISA 7103* і *AESKULISA 3103*. Лінійний регресійний аналіз двох продуктів показав, що два продукти еквівалентні. 15 з цих сироваток близькі до значень cut-off.

	Чутливість
SS-A	80% для синдрому Шогрена
SS-B	40-74% для синдрому Шогрена
Sm	10-30% для SLE
U1-snRNP	100% для змішаного захворювання сполучної тканини
Scl 70	20-48% для системної склеродерми
Jo-1	25% для поліміозиту і дерматомиозиту



10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення. Тим не менше, через неоднорідність характеру людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підлягають цьому правилу.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація (Од/мл)	Очікувана концентрація (Од/мл)	Відновлення (%)
1	1/100	112.0	110.0	101.8
	1/200	56.4	55.0	102.6
	1/400	28.0	27.5	101.8
	1/800	14.3	13.8	103.6
2	1/100	83.8	85.0	98.6
	1/200	41.1	42.5	96.7
	1/400	20.8	21.3	97.7
	1/800	9.8	10.6	92.5

10.4 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на трьох відібраних зразках сироватки, щоб представити діапазон в порівнянні зі стандартною кривою.

Intra-Assay		
ENA-6Pro	Mean U/ml	CV (%)
SSA	45.7	1.5
SSB	124.8	2.6
SnRNP	20.0	3.1
Sm	51.6	1.7
ScI-70	19.3	3.1
Jo-1	65.5	4.2

Inter-Assay		
ENA-6Pro	Mean U/ml	CV (%)
SSA	44.2	1.3
SSB	123.3	2.4
SnRNP	21.7	2.8
Sm	54.6	3.9
ScI-70	22.4	3.7
Jo-1	68.4	1.7

10.5 Калібрування

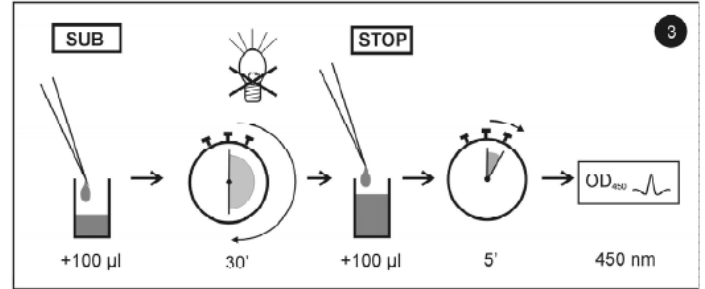
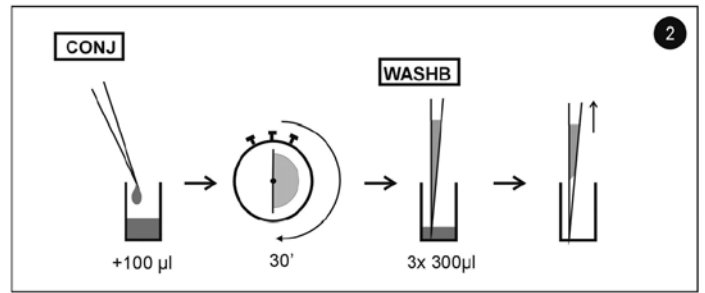
AESKULISA ENA-6Pro відкалібрований відносно контрольних сироваток від CDC (Центр Контролю та профілактики хвороб) Atlanta.

ДОДАТОК А: Схема піпетування

Ми пропонуємо піпетування калібраторів, контролів і зразків наступним чином:

Для кількісної інтерпретації використовувати калібратори, щоб побудувати стандартну криву.

Для якісної інтерпретації використовувати Cut-off калібратор.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

Antigen	for quantitative interpretation use calibrators to establish a standard curve						for qualitative interpretation use cut-off calibrator and CalA as negative control and CalD as positive control						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Cal antigen A	CalA	CalB	CalC	CalD			CalA	CC	CalD				
Cal antigen B	CalA	CalB	CalC	CalD			CalA	CC	CalD				
SS-A	C	P1	P2	P3	P4	P5	...	P1	P2	P3	P4	P5	...
SS-B	D	P1	P2	P3	P4	P5	...	P1	P2	P3	P4	P5	...
Sm	E	P1	P2	P3	P4	P5	...	P1	P2	P3	P4	P5	...
snRNP/Sm	F	P1	P2	P3	P4	P5	...	P1	P2	P3	P4	P5	...
ScI70	G	P1	P2	P3	P4	P5	...	P1	P2	P3	P4	P5	...
Jo-1	H	P1	P2	P3	P4	P5	...	P1	P2	P3	P4	P5	...

CalA: калібратор А, CalB: калібратор В, CalC: калібратор С, CalD: калібратор D

CC: Калібратор Cut-off

P1: пацієнт 1

P2: пацієнт 2

P3: пацієнт 3

Cal антиген: антиген для калібраторів

Додаток В: Процедура випробування

