

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG ДО JO-1

IgG anti Jo-1

Кат. № : JO1.CE

Дата випуску інструкції: 2020/03
Версія: 2



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

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного визначення антитіл IgG до Jo-1 в сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Пристрій JO1.CE – це імуноферментний аналіз (ІФА), призначений для кількісного визначення аутоантитіл IgG проти аутоантигенів Jo-1 у плазмі та сироватці людини.

Тільки для діагностики in vitro.

В. ВСТУП

Аутоімунність - це нездатність організму розпізнати свої складові частини як себе, що дозволяє імунну відповідь проти власних клітин і тканин. Будь-яке захворювання, яке виникає внаслідок такої аберантної імунної відповіді, називається аутоімунним захворюванням.

Ревматоїдні аутоімунні захворювання часто асоціюються з аутоантитілами до ядерних антигенів. Ми можемо розрізнити антинуклеарні антитіла (ANA) і екстраговані антинуклеарні антитіла (ENA) як Jo-1.

Анти-Jo-1 антитіла спрямовані на клітинний фермент гістидил-т-РНК-синтезази і присутній у 35% пацієнтів з поліміозитом і рідше при дерматомиозиті. Аутоантитіла до Jo-1 рідко зустрічаються при інших ревматичних захворюваннях.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті препаратом рекомбінантного антигену Jo-1. Під час 1-ї інкубації тверду фазу обробляють розведеними зразками, а анти Jo-1 IgG захоплюється, якщо є, твердою фазою.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка у 2-й інкубації виявляються зв'язаний анти Jo-1 IgG шляхом додавання антитіла до hIgG, міченого пероксидазою (HRP). Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіла до Jo-1, присутніх у зразку. IgG у зразку можна кількісно визначити за допомогою стандартної кривої, відкаліброваної в довільних одиницях на мілілітр (arBU/мл), оскільки немає міжнародного стандарту.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок x 8 розривних лунок, покритих рекомбінантною гістидил-т-РНК-синтезазою (Jo-1) людини у присутності бичачих білків. Планшети герметично закриті в пакеті з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури; повторно закрийте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4°C (°C).

2. Калібрувальна крива: CAL N° ...

6x2.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання та позначений синім кольором. Стандартна крива, отримана з позитивної плазми Jo-1 IgG людини, титрованої за внутрішнім золотим стандартом, у діапазоні: CAL1 = 0 arBU/мл (arBU/ml) // CAL2 = 12,5 arBU/мл (arBU/ml) // CAL3 = 25 arBU/мл (arBU/ml) // CAL4 = 50 arBU/мл (arBU/ml) // CAL5 = 100 arBU/мл (arBU/ml) // CAL6 = 200 arBU/мл (arBU/ml).

Містить білки людської сироватки, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер рН 6.0 +/-0.1, 0.2% Твін 20, 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 0.09% Na-азиду і 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

3. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка (ml/bottle) 20-кратного концентрованого розчину. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буферу рН 7.0+/-0.2, 0.05% Твін 20 і 0.045% ProClin 300.

4. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання та маркований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла кози до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер рН 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин сульфат як консерванти.

5. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буферний розчин з рН 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетраметилбензидину (або ТМБ) і 0.02% перекису водню (або H₂O₂).

Примітка: Зберігати в захищеному від світла місці, оскільки чутливий до сильного освітлення.

6. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M

1x15 мл/пляшка (ml/vial). Містить 0.3 M розчину H₂SO₄.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

7. Розчинник для зразка: DILSPE

2x60мл/флакон. Готовий до використання та позначений синім кольором. Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер рН 6.0 +/-0.1, 0.2% Твін 20, 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

8. Ущільнювальна фольга для планшету 2 шт.

9. Вкладиш інструкції 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (10 мкл (µl), 100 мкл (µl) та 1000 мкл (µl) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА (сухий або вологий), здатний забезпечити температуру +37 °C (°C) (допуск +/-0.5°C (°C)).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
- Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
- Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
- Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
- Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
- Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
- Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.

7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
11. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
12. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв (min).
13. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
14. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
15. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані («червоні») та явно гіперліпемічні («молочні») зразки слід утилізувати, оскільки вони можуть дати помилкові результати. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід утилізувати, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2 ° ... + 8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно виийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2.000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. (min) або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8μ для очищення зразка перед тестуванням.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не

став темно-зеленим, що вказує на дефект консервації. У такому випадку зателефонуйте в службу підтримки клієнтів Dia.Pro.

Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути на блискавку і зберігати при +2°-8°C (°C). При першому відкритті невикористані смужки стабільні, доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться з жовтого на зелений.

Калібрувальна крива:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити подвійно дистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів миття.

Примітка: після розведення, промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2..8 °C (°C).

Ферментний Кон'югат:

Готовий до використання. Добре перемішайте на вортексі перед використанням.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Якщо цей компонент потрібно перенести, використовуйте лише пластикові, можливо стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Розчинник для зразків:

Готовий до використання компонент. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні Н-фрази:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає сильне подразнення очей.

Попереджувальні Р-фрази:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

І. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне незараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.

- Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
- Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μl/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
- Час інкубації має допуск ± 5%.
- Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартними характеристиками повинні бути (a) пропускну здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до 4; (c) лінійність до 4; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
- При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі О «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за один запуск.
- Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЯ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
- Переконайтеся, що Хромоген (ТМБ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
- Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролило рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
- Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
- Встановіть ІФА інкубатор на +37°C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
- Перевірте, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.

- Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

- Розведіть зразки 1:101 у відповідних пробірках для розчину (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника для Зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте набір для калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач. Лунку А1 та В1 залишіть порожньою для бланкування.
- Потім додайте 100 мкл калібраторів у двох примірниках. Потім внесіть 100 мкл розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку.
- Інкубуйте мікропланшет **протягом 45 хв при +37°C (°C)**.

Важлива примітка: *смужки повинні бути заклеєні клейкою плівкою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест виконується вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.*

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Ферментного кон'югату в кожну лунку, за винятком А1+В1 глухих лунок, і накрийте герметиком. Переконайтеся, що цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім А1 та В1.

Важлива примітка: *Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі ферментного кон'югату. Може відбутися забруднення.*

- Інкубувати мікропланшет **протягом 45 хв при +37°C (°C)**.
- Помити мікролунок як на етапі 5.
- Внесіть піпеткою по 100 мкл (μl) суміші хромоген/субстрат у кожну лунку, включно з бланк- лунками А1 і В1. Потім інкубуйте мікропланшет **при кімнатній температурі (18-24°C (°C)) протягом 15 хвилин**.

Важлива примітка: *Не піддавайте сильному прямому освітленню. Може утворитися високий фон.*

- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти перетворить позитивний контроль і позитивні зразки з блакитного на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, на фільтрі 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи інструмент на А1 або В1, чи на обидвох.

Загальні зауваження:

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.*
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися незначне самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.*

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Калібратори	100 мкл (μl)
Зразки розведені 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	45 хв
Температура	+37 °C (°C)

Етап промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	45 хв
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМБ/Н ₂ O ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	15 хв
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

Нижче наведено приклад схеми розподілу для кількісного аналізу:

Мікропланшет												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3									
B	BLK	CAL4	S4									
C	CAL1	CAL5	S5									
D	CAL1	CAL5	S6									
E	CAL2	CAL6	S7									
F	CAL2	CAL6	S8									
G	CAL3	S1	S9									
H	CAL3	S2	S10									

Легенда: BLK = Бланк CAL(*) = Калібратор S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу є такими ж кваліфікованими. Переконайтеся, що такі дані збігаються:

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення ОЩ450 нм (nm)
CAL 1 0 arbU/мл (arbU/ml)	< 0.150 ОЩ450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації < 30%
CAL 2 12.5 arbU/мл (arbU/ml)	ОЩ450нм > ОЩ450нм CAL1 + 0.100
CAL 6 200 arbU/мл (arbU/ml)	ОЩ450нм > 0.750

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, а проведіть наступні перевірки:

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка >0.100	1. щоб розчин хромогену/субстрату не був забруднений під час аналізу
CAL1 0 arbU/мл (arbU/ml) >0.150 ОЩ450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації > 30%	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтвержені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний відповідний м'який розчин і вошер був праймований ним перед використанням; 3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного контролю замість негативного контролю); 4. що жодного забруднення негативного контролю або лунок, куди був доданий контроль, не відбулося через позитивні проби, розлив або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або кон'югатом ферменту 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
CAL2 12.5 arbU/мл (arbU/ml) ОЩ450 нм (nm) < ОЩ450нм CAL1+ 0.100	1. що процедуру проведено правильно;

	2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення калібратора.
CAL2 200 arbU/мл (arbU/ml) < 0.750 ОЩ450 нм (nm)	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення калібратора.

Якщо виникла одна з цих проблем, після перевірки повідомте керівника для подальших дій.

Важлива примітка:

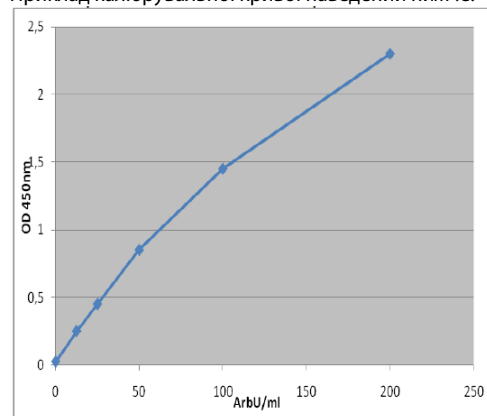
Аналіз слід виконувати, як крок зчитування, описаний у розділі М, пункт 11.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Якщо тест виявляється дійсним, скористайтеся затвердженою програмою підгонки кривої, щоб накреслити калібрувальну криву на основі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм/620-630 нм (пропонується 4-параметрична або квадратична інтерполяція).

Потім за калібрувальною кривою розраховують концентрацію антитіла до Jo-1 IgG у зразках.

Приклад калібрувальної кривої наведений нижче.



Важливе зауваження: Не використовуйте вище наведену калібрувальну криву для обчислень.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразки з концентрацією нижче 12,5 arbU/мл (arbU/ml) вважаються нормальними для антитіл до Jo-1 IgG.

Зразки з концентрацією вище 25 arbU/мл (arbU/ml) є позитивними на антитіла до Jo-1 IgG.

Зразки з концентрацією від 12,5 arbU/мл (arbU/ml) до 25 arbU/мл (arbU/ml) вважаються двозначними.

arbU/мл (arbU/ml)	Інтерпретація
≤12.5	Нормальний
12.5 < arbU/мл (arbU/ml) < 25	Граничний
≥25	Підвищений

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні діапазони нормальних і патологічних значень.

Важливі примітки:

1. Одних результатів цього тесту недостатньо для встановлення чіткого діагнозу аутоімунного захворювання. Необхідно проводити

інші діагностичні тести, особливо в поєднанні з іншими аутоантитілами. Картина різних комбінацій антитіл та їх концентрація разом із загальною клінічною картиною пацієнта є корисними діагностичними інструментами при оцінці ревматоїдних аутоімунних захворювань.

2. Позитивні результати повинні бути підтверджені щодо всього клінічного стану пацієнта.
3. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом керівника лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.
4. Коли результати тестувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінку продуктивності проводили на панелях позитивних і негативних зразків з посиланням на референсний набір з маркуванням CE.

1. Межа виявлення

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл Jo-1 IgG.

За його відсутності визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), отриманий із плазми людини з високою концентрацією Jo-1 IgG, щоб забезпечити постійну та добру чутливість пристрою. Межа виявлення розрахована як середня ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) + 5 СВ.

У таблиці нижче наведені середні значення ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm) для цього стандарту при розведенні, а потім дослідженні в аналізі.

IGS arbU/мл (arbU/ml)	Лот P1	Лот P2
200	2.512	2.308
100	1.531	1.477
50	0.935	0.880
25	0.501	0.443
12.5	0.252	0.261
0	0.018	0.081

2. Діагностична чутливість та специфічність:

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні оцінки ефективності на панелях зразків, які були класифіковані як позитивні за допомогою референсного набору із маркуванням CE.

Діагностичну чутливість досліджували щонайменше на 50 зразках, позитивних за допомогою референтного набору. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів із клінічною історією аутоімунного захворювання.

Діагностична специфічність була визначена на панелях із понад 50 негативних зразків від нормальних осіб і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, що потенційно інтерферують.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, EDTA та гепарин), так і сироватки. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були протестовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких перешкод не спостерігалось.

Тест-набір анти-Jo-1 IgG специфічний лише для аутоантитіл, спрямованих до відповідного антигену. Перехресної реактивності не спостерігалось. Оцінка ефективності показала такі значення:

Чутливість	≥98%
Специфічність	≥98%

3. Точність

Дослідження, проведене на трьох зразках різної реактивності до IgG Jo-1, досліджених у 16 повторях у трьох окремих запусках, показало значення КВ% у діапазоні 4-20% залежно від показників ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm).

4. Достовірність

Достовірність аналізу була перевірена розведенням. Будь-який «хук-ефект», недооцінка, яка могла статися при високих дозах аналіту, була виключена.

S. ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналіту.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після розмороження, можуть давати дещо помилкові результати. Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не пулованих. Діагноз аутоімунного захворювання не слід встановлювати на основі одного результату тесту. Необхідно враховувати клінічний анамнез пацієнта, його симптоматику, а також інші діагностичні дані.

Помилково-позитивність оцінюється як менше, ніж 2% від нормальної популяції.

T. ЛІТЕРАТУРА

1. Arthritis&Rheumatism, volume 56 Issue 9, Pages 3125- 3131. Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. Kerry Stone, Chester V. Oddis, Noreen Fertig, Yasuhiro Katsumata, Mary Lucas, Molly Vogt, Robyn Domsic, Dana P. Ascherman.
2. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. O M Zack Howard, Hui Fang Dong, De Yang, Nina Raben, Kanneboyina Nagaraju, Antony Rosen, Livia Casciola-Rosen, Michael Härtlein, Michael Kron, David Yang, Kwabena Yiadom, Sunita Dwivedi, Paul H Plotz, Joost J Oppenheim. J. Exp. Med Sep 2002 (Vol. 196, Issue 6, Pages 781-91).
3. Anti-Jo-1 autoantibodies and the immunopathogenesis of autoimmune myositis. F W Tsui, K A Siminovitich. Int Rev Immunol 1991 (Vol. 7, Issue 3, Pages 225-35).
4. Improved detection of anti-Jo-1 antibody, a marker for myositis, using purified histidyl-tRNA synthetase. E J Walker, K E Tymms, J Webb, P D Jeffrey. J Immunol Methods Feb 1987 (Vol. 96, Issue 2, Pages 149-56).

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила ISO 13485. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс с.р.л.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

