

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИСТОНА

2571-1, Histone

Каталог. № : 2571-1

Методика от 03-04-2006

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Твердофазовым иммуноферментный анализ гистона (ELISA/ИФА) компании «Диагностик Аутомеишн Инк.» (ДАИ) предназначен для определения и полуколичественного измерения антител к гистону в образцах человеческих сывороток. Анализ предназначен для обнаружения антител в отдельном образце сыворотки. Результаты анализа применяются как средство диагностики волчанки, вызванной лекарствами. Только для диагностического использования *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Системная аутоиммунная болезнь характеризуется наличием циркулирующих ауто-антител, направленных на широкий спектр клеточных антигенов. Системная красная волчанка (SLE), обычно упоминающаяся как волчанка, наиболее известна из этих болезней. Другие возможные болезни соединительной ткани включают смешанное заболевание соединительной ткани, синдром Шегрена, склеродермию и полимиозит/дерматомиозит. Большая часть может быть диагностирована клиническим обследованием и их антитело профилирует к различным вовлеченным антигенам, которые включают dsDNA, SM, RNP, Ro, La, Scl-70, Jo-1 и гистоны. Поэтому, иммунологические анализы на аутоантитела полезны для диагностики и прогностические оценки аутоиммунной болезни.

Гистоны - группа малых основных белков, которые образуются комплекс с ДНК. Антитела к гистону присутствуют приблизительно в 90% пациентов с волчанкой, вызванной лекарствами (DIL). Они также присутствуют приблизительно в 30% пациентов с идиопатической волчанкой. Пациенты с DIL обычно имеют антитело только к гистону, в то время как SLE пациенты обычно имеют антитела к ДНК или к ряду ENA.

Классически, антитела к аутоантигенам обнаруживаются двойной иммунодиффузией. Однако, анализ очень растянутый и имеет слабую чувствительность. Твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА) вместе с большой чувствительностью легки в использовании. Много ИФА были разработаны и утверждены для обнаружения аутоантител к различным антигенам.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Твердофазовым иммуноферментный анализ гистона (ДАИ) предназначен для определения IgG, IgM, и IgA антител к антигенам гистона. Очищенные антигены гистона фиксируются в твердой фазе микрорунки. Разбавленные анализируемые сыворотки добавляются в каждую лунку. Если присутствуют антитела, которые распознают антиген, формируются комплексы антиген-антитело. После инкубации для удаления несвязанного антитела промываются лунки. Фермент меченный анти-человеческий IgG, M и A, добавляется в каждую лунку. Если присутствует антитело, конъюгат связывается с комплексами антитело-антиген. После инкубации лунки промываются, чтобы удалить несвязанный конъюгат. В каждую лунку добавляется раствор субстрата. При наличии фермента субстрат изменяет цвет. После инкубационного периода реакция останавливается и интенсивность цвета измеряется фотометрически, проводя непрямое измерение специфического антитела в образце пациента.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микропланшет**, покрытый антигеном гистона: 96 лунок, снабжаемых рамкой для полосок и хранящихся в мешочке из фольги с высушивающим средством и индикатором влажности.
2. **Промывочный буфер (20x концентрат)**: Одна бутылка, 50 мл. Содержит буфер и Твин 80.
3. **Разбавитель сыворотки**: Одна бутылка, 30 мл. Содержит буфер, BSA и Твин 80.
4. **Конъюгат**: Одна бутылка, 15 мл. Содержит анти-человеческий IgG, IgM и IgA в буфере, конъюгированный пероксидаза хрена.

5. **Субстрат**: Одна бутылка, 15 мл. Содержит 3, 3', 5, 5' - тетраметилбензидин (ТМВ).
6. **Стоп раствор**: Одна бутылка, 15 мл. Содержит раствор H₂SO₄.
7. **Высоко положительный контроль**: Один флакон, 0,4 мл. Содержит человеческую сыворотку с антителами, которые сильно взаимодействуют с антигеном. Установленный диапазон напечатан на этикетке флакона.
8. **Отрицательный контроль**: Один флакон, 0,4 мл. Содержит человеческие сыворотки с антителами, которые не взаимодействуют с антигеном. Установленный диапазон напечатан на этикетке флакона.
9. **Низко положительный контроль**: Один флакон, 0,4 мл. Содержит человеческую сыворотку с антителами, которые слабо взаимодействуют с антигеном. Установленный диапазон напечатан на этикетке флакона.
10. **Калибратор**: Один флакон, 0,4 мл. Содержит человеческую сыворотку с антителами, которые взаимодействуют с антигеном, используемый для калибровки анализа. Поправочный коэффициент набора напечатан на этикетке флакона.

Следующие компоненты не привязаны к номеру партии набора и могут использоваться попеременно в пределах аутоиммунных наборов ИФА ДАИ: разбавитель Сыворотки тип III, раствор хромогена/субстрата тип I, промывочный буфер тип II и стоп раствор. Просьба проверять использование соответствующего типа реагента ДАИ (типа I, типа II, типа III).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

1. Все компоненты набора, которые хранятся при их рекомендуемых условиях хранения, устойчивы до даты истечения срока годности на их этикетке. Не использовать после истечения их срока годности.
2. Покрытые антигеном лунки. Неиспользованные полоски должны быть немедленно вторично запечатаны в мешочках из фольги с высушивающим средством и индикатором влажности и возвращены на хранение при 2-8 °C. Если мешочек герметично закрыт пленкой, лунки устойчивы в течение 30 дней. Если мешочек вторично запечатан термическим способом, лунки устойчивы до окончания их срока годности.
3. Все другие реагенты хранятся при 2-8 °C в их оригинальных упаковках.
4. Хранить 1X (разбавленный) промывочный буфер при комнатной температуре (21-25°C) до 5 дней, или 1 неделю между 2 – 8 °C.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Каждая донорская единица, использованная в приготовлении калибратора и контролей была протестирована одобренным FDA методом на наличие антитела к ВИЧ-1, также и поверхностному антигену вируса гепатита В, дала отрицательный результат. Поскольку не один из методов анализа не дает полной гарантии на отсутствие ВИЧ-1, вируса гепатита В или других возбудителей инфекций, с этими образцами/реагентами так же как и с образцами пациентов необходимо обращаться с соблюдением 2 уровня биобезопасности, как рекомендуется для любого потенциально инфекционного образца сыворотки или крови человека.
2. Некоторые реагенты в этом наборе содержат азид натрия в качестве консерванта. Азиды могут реагировать с оловянными или медными сточными трубами, образуя взрывчатые вещества азидов. При уничтожении реагентов промывать большим количеством воды, чтобы минимизировать нагромождения азидов.
3. Это изделие предназначено только - для **ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO**.
4. Реагенты содержат консерванты, которые могут быть ядовиты при глотании.
5. Не пипетировать ртом. Избегать контакта реагентов и образцов пациентов с кожей или слизистыми оболочками.
6. Не позволять стоп раствору вступать в контакт с кожей или глазами. При контакте немедленно смыть большим количеством воды.
7. Избегать брызгать или образования аэрозолей.
8. Не использовать сыворотки, инактивированные теплом.
9. Не смешивать и не заменять реагенты разных партий или других производителей.
10. Не разбавлять и не подмешивать реагенты набора.
11. Не загрязнять перекрестно реагенты или образцы.
12. Не использовать раствор субстрата ТМВ, если он начал превращаться в синий.
13. Многогранная стеклянная посуда должна быть вымыта и полностью ополаскиваться от всех детергентов.
14. Не изменять реагент и инкубационные температуры выше или ниже комнатной температуры (21 - 25°C).

15. Промывка важна. Неправильно промытые лунки дадут ошибочные результаты. Не позволяйте лунке высыхать между инкубациями.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови асептически венепункцией, используя приемлемую медицинскую технологию.
2. Сыворотка, содержащая видимые частицы вещества должна быть центрифугирована на низкой скорости.
3. Сыворотки могут храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20 до -70°C до шести месяцев в не размораживающейся камере. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов пациентов.
4. Избегайте использования гемолизированных, липемических или бактериологически зараженных сывороток.
5. Не инактивировать сыворотки теплом.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Промывочная бутылка, автоматизированная или полуавтоматическая система промывки микропланшета.
2. Микропипетки, включая многоканальные, способные к точному распределению объемов 10-200 мкл (менее чем 3% КВ).
3. Мерные цилиндры на 1 л.
4. Бумажные полотенца.
5. Пробирки для разбавления сыворотки.
6. Емкости для многоканальных пипеток.
7. Наконечники для пипеток.
8. Дистиллированная или деионизированная вода.
9. Таймер с точностью измерения +/- 1 сек.
10. ванночки для утилизации отходов и 0,5% гипохлорит натрия (50 мл отбеливателя в 950 мл воды).
11. Микропланшетный считыватель с одной или двойной длиной волны измерения с фильтром 450 нм. При использовании двойной длины волны настройте референтный фильтр на 600-650 нм. Прочтите руководство пользователя или свяжитесь с производителем аппарата, чтобы установить спецификации работоспособности линейности считывателя.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты перед использованием должны быть извлечены из места охлаждения и приведены к комнатной температуре (21 - 25°C). Возвратите все реагенты в холодильник сразу после использования.
2. Все образцы и контроли должны быть смешаны перед использованием.
3. Разбавить 50 мл 20X промывочного буфера до 1 л дистиллированной и/или деионизированной водой. Хорошо перемешать.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Определить число пациентов, которые нужно проанализировать. Для каждого анализа калибратор должен использоваться в двойном экземпляре. Также высоко положительный контроль, отрицательный контроль и бланк реагент (БР) должны использоваться в каждом анализе. Проверьте программное обеспечение и требования к планшету для правильных постановок калибратора / контроля.

Пример постановки:

1A	БР	2A	Пациент #2
1B	Отриц. контроль	2B	Пациент #3
1C	Калибратор	2C	Пациент #4
1D	Калибратор	2D	Пациент #5
1E	Калибратор	2E	Пациент #6
1F	Высоко полож. контроль	2F	Пациент #7
1G	Низко полож. контроль	2G	Пациент #8
1H	Пациент #1	2H	Пациент #9

2. Для каждой анализируемой сыворотки, калибратора и контроля провести разбавление сыворотки 1:21. Добавьте 10 мкл каждого образца сыворотки к 200 мкл разбавителя образца. Хорошо перемешать.
3. В отдельные лунки добавьте 100 мкл соответствующего разбавленного калибратора, контролей и сывороток пациентов. Добавьте 100 мкл разбавителя сыворотки к лунке бланк реагента. Проверьте программное обеспечение и требования к считывателю по отношению к постановке реагентов и лунки бланк реагента.
4. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25°C) 30 минут +/- 1 минута.
5. Аспирировать или вытряхнуть жидкость из всех лунок. При использовании полуавтоматического или автоматизированного промывочного оборудования добавьте в каждую лунку 250-300 мкл разбавленного промывочного буфера. Аспирировать или

вытряхнуть и перевернуть планшет верх дном, положив на бумажное полотенце, чтобы удалить всю жидкость. Повторите промывку 2 раза (в общем количестве три (3) промывки) для ручного или полуавтоматического оборудования или 4 раза (в общем количестве пять (5) промывок) для автоматизированного оборудования. После конечной промывки, впитайте содержимое планшета на бумажном полотенце, чтобы удалить всю жидкость из лунок.

- ** Важное замечание:** Относительно этапов 5 и 8. Недостаточная или чрезмерная промывка приводит к вариативности анализа и воздействует на обоснованность результатов. Поэтому, для лучших достижений результатов рекомендуется использование полуавтоматического или автоматизированного набора оборудования для подачи объема, чтобы полностью заполниться каждую лунку (250-300 мкл). Может потребоваться в общем количестве до пяти (5) промывок с автоматизированным оборудованием. Полное удаление промывочного буфера после последней промывки крайне важно для точного проведения анализа. Также, визуально убедитесь, что никакие пузырьки не остаются в лунках.
6. Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую лунку, включая лунку бланк реагента. При добавлении избегайте пузырьков, поскольку они могут выдавать ошибочные результаты.
 7. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25°C) в течении 30 минут +/- 1 минуты.
 8. Повторите промывку как описано в этапе 5.
 9. Добавить в каждую лунку 100 мкл раствора хромогена/субстрата (ТМВ), включая лунку бланк реагента при сохранении постоянного темп добавления вдоль планшета.
 10. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25°C) в течении 15 минут +/- 2 минут.
 11. Остановить реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора (1N серной кислоты) следуя способу добавления раствора хромогена/субстрата (ТМВ), включая лунку бланк реагента. Осторожно постучите планшет вдоль краев, чтобы смешать содержимое лунок. Подождать минимум 5 минут и провести считывание. Перед считыванием планшет можно держать до 1 часа после добавления стоп раствора.
 12. Образовавшийся цвет необходимо считать на планшетном считывателе ИФА, оборудованном 450 нм фильтром. При использовании двойной длины волны, установите референтный фильтр на 600 - 650 нм. Аппарат должен настраиваться в рабочем режиме. Бланк реагент должен быть меньше чем 0.150 абсорбции при 450 нм. Если бланк реагент ≥ 0.150 , процедуру необходимо повторить. Настроить считыватель на лунку бланк реагента и затем продолжайте считывание всего планшета. Уничтожьте использованные планшеты после получения результатов считываний.

ВЫЧИСЛЕНИЯ

1. Среднее значение калибратора: Вычислить среднее значение калибратора из трех определений калибратора.
2. Поправочный коэффициент: Для отслеживания повседневных колебаний в активности анализа под влиянием комнатной температуры и времени, поправочный коэффициент определен производителем для каждой партии наборов. Поправочный коэффициент напечатан на флаконе калибратора.
3. Пороговое значение ОП: Пороговое значение ОП для каждого анализа определяется умножением поправочного коэффициента на среднее значение калибратора, полученное в этапе 1.
4. Заданное значение: Вычислите заданное значение для каждого образца, разделив значение ОП образца на пороговое значение ОП, полученное в этапе 3.

Пример: ОП, полученные для калибратора = 0.38, 0.42, 0.40

Среднее значение ОП для калибратора = 0.40

ОП, полученные для сывороток пациентов = 0.60

Поправочный коэффициент = 0.50

Пороговое значение = 0.50 x от 0.40 до 0.20

Заданное значение = от 0.60/0.20 до 3.00

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Заданное значение интерпретация

≤ 0.90	отрицательный
0.91 - 1.09	сомнительный
≥ 1.10	положительный

Образцы с заданными значениями в сомнительном диапазоне должны быть повторно проанализированы. Если после этого результат остается прежним, проанализируйте повторно альтернативным методом или проанализируйте новый образец.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Калибратор и контроли должны использоваться в каждой процедуре анализа.
2. Бланк реагент должен быть < 0.15 ОП при 450 нм.
3. Среднее значение ОП для калибратора должно быть ≥ 0.30 при 450 нм.
4. Заданные значения для высокого, низкого и отрицательного контроля должны быть в их соответствующих диапазонах, напечатанных на флаконах. Если значения контролей вне пределов их соответствующих диапазонов, анализ должен считаться недействительным, и он должен быть повторен.
5. Если вышеуказанные критерии не выполнены после повторного анализа, свяжитесь с технической службой производителя.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Результаты анализа не должны интерпретироваться как диагностические. Результаты должны использоваться только как вспомогательное средство при диагностике. Результаты должны интерпретироваться вместе с клинической оценкой пациента.
2. Сыворотки от пациентов с другими аутоиммунными болезнями и от лиц в норме могут содержать аутоантитела.
3. В анализ должна использоваться только сыворотка. Необходимо избегать иктерической, липемической, гемолизированной и инaktivированной теплом сыворотки.
4. Заданные значения ≥ 10.00 должны быть зафиксированы со значением более 10.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

1. От 1-5 % явно здоровых людей могут содержать аутоантитела.
2. Антитела к гистонам присутствуют в приблизительно 90% пациентов с волчанкой. Вызванной лекарствами (DIL) и приблизительно в 30% пациентов с идиопатической волчанкой.
3. Пациенты с DIL обычно имеют антитело только к гистонам, в то время как SLE пациенты имеют антитела к ДНК или к ряду ENA.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность и специфичность

Данный набор был оценен в соотношении с коммерчески доступным набором ИФА. Таблица 1 обобщает данные:

Таблица 1

Чувствительность и специфичность набора ИФА гистона ДАИ

		Полож. ≥ 1.10	Сомнит. 0.91-1.09	Отриц. ≤ 0.90	Общая
Альтернативный набор ИФА	Полож. > 1.10	20	1	2	23
	Сомнит. 0.91-1.09	2	0	4	6
	Отриц. < 0.90	1	1	79	81
	Общая	23	2	85	110

Сыворотки, находившиеся в сомнительном диапазоне были исключены из последующих вычислений

Относ. чувствительность	= 20/22	= 90.9%
Относ. специфичность	= 79/80	= 98.8%
Относительное совпадение	= 99/102	= 97.1%

ТОЧНОСТЬ

Точность набора ИФА гистона ДАИ была определена в анализе 7 различных сывороток по 8 раз каждой в 3 различных анализах. Данные обобщены в Таблице 2 (см. в конце этой инструкции). При использовании соответствующей методики пользователь должен получить КВ(й) менее 20%.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Заданные значения гистона ДАИ были определены при последовательных двукратных разбавлениях 5 положительных сывороток. Заданные значения были сравнены с \log_2 разбавления путем стандартной линейной регрессии. Данные в Таблице 3 (см. в конце этой инструкции) указывают, что анализ полуколичественный.

ДАнные ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКТИВНОСТИ

Сыворотки, содержащие высокий уровень антител к потенциально перекрестно-реактивным антигенам анализировались набором ИФА гистона ДАИ. Данные в Таблице 4 указывают, что антитела, чередующиеся с аутоантигенами не реагируют перекрестно с клиническим набором ИФА гистона ДАИ.

Сыворотка #	Специфичность антитела	Заданное значение гистона	Интерпретация
1	SM	0.01	-
2	SM	0.06	-
3	SM	0.57	-
4	RNP	0.56	-
5	RNP	0.02	-
6	RNP	0.06	-
7	Ro	0.10	-
8	Ro	0.34	-
9	Ro	0.01	-
10	La	0.07	-
11	La	0.01	-
12	La	0.20	-
13	Sci-70	0.36	-
14	Sci-70	0.28	-
15	Sci-70	0.34	-
16	Jo-1	0.22	-
17	Jo-1	0.05	-
18	Jo-1	0.04	-
19	DsDNA	0.07	-
20	DsDNA	0.32	-
21	DsDNA	0.58	-



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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

Таблица 2
Данные точности

Сыворотка#	Анализ 1 (к-во=8)			Анализ 2 (к-во=8)			Анализ 3 (к-во=8)			Между анализами (к-во=24)		
	X	CO	KB	X	CO	KB	X	CO	KB	X	CO	KB
1	3.27	.492	15.1%	3.04	.332	10.9%	3.52	.574	16.3%	3.28	.498	15.2%
2	1.94	.305	15.7%	2.38	.330	13.9%	2.15	.222	10.3%	2.16	.332	15.4%
3	2.76	.240	8.70%	3.07	.271	8.83%	3.24	.334	10.3%	3.13	.339	11.2%
4	2.35	.388	16.5%	2.60	.347	13.3%	2.55	.389	15.3%	2.50	.375	15.0%
5	0.00	.000	0.00%	.005	0.11	220%	.010	0.19	190%	.010	.013	130%
6	0.04	.113	283%	.001	.004	400%	.026	.023	100%	.023	.066	287%

X = среднее значение гистона
CO = стандартное отклонение
KB = коэффициент вариации

Таблица 3
Линейность

Сыворотка #	Неразбавл.	1:2	1:4	1:8	1:16	r ²
2	2.50	1.20	0.60			.957
3	3.80	2.10	1.10	0.40		.961
4	2.88	2.06	1.31	0.63		.998
5	4.13	3.13	2.25	1.63	0.94	.990

r² = коэффициент определения. Линейной регрессией сравнивается заданное значение гистона с log2 разбавления.

Приложение
Преобразование международных единиц (МЕ) в мл для гистона IgG, A, M
Номер партии набора: образец

Коэффициент	МЕ	Коэффициент	МЕ
1.0	18	4.8	149
1.2	20	5.0	167
1.4	22	5.2	186
1.6	25	5.4	209
1.8	28	5.6	233
2.0	31	5.8	261
2.2	35	6.0	292
2.4	39	6.2	327
2.6	43	6.4	366
2.8	48	6.6	409
3.0	54	6.8	458
3.2	61	7.0	513
3.4	68	7.2	573
3.6	76	7.4	642
3.8	85	7.6	718
4.0	95	7.8	803
4.2	106	8.0	899
4.4	119	8.2	1005
4.6	133	8.4	1125