

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИЯДЕРНЫХ АНТИТЕЛ

5102-2, ANA Screen

Каталог. № : 5102-2
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 27-05-2016



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

Анализ	ANA Screen ELISA
Метод	Иммуносorbентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигеном планшет
Диапазон обнаружения	Качественный - положительный; отрицательный контроль и пороговое значение (cut-off)
Образец	10 мкл сыворотки
Общее время	~ 135 мин.
Срок годности	12 месяцев
Специфичность	100 %
Чувствительность	96.6 %

НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Набор ANA Screen - это тестовая система ИФА качественного скрининга, предназначенная для выявления анти-ядерных антител (АНА) в сыворотке крови человека. При проведении анализа в соответствии с инструкциями, эта тестовая система способна обнаруживать все АНА, на которые обычно проводится тестирование, например, к двухцепочечной ДНК (двухцепочечной ДНК), Jo-1, SM, Sm/RNP, SSA, SSB, и Scl-70. Анализ также способен обнаруживать демонстрирующие АНА центромеры, ядра, следы IFA. Этот набор предназначен для диагностики в лабораторных условиях.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Система анализа DAI ANA Screen ELISA разработана для определения антител класса IgG к числу общих ядерных антигенов в человеческой сыворотке. Лунки пластиковых микропланшетных стрипов сенсibilизированы с помощью антигена пассивной абсорбцией. Процедура исследования включает три шага инкубации:

1. Сыворотка для исследования (надлежаще разбавленная) инкубируется в микропланшете с привитым антигеном. Любое антиген специфическое антитело в образце связывается с иммобилизованным антигеном. Планшет промывается для удаления несвязанного антитела и другие компоненты сыворотки.
2. Козлиный анти-человеческий IgG, конъюгированный пероксидазой (γ цепь специфический) добавляется в лунки и планшет инкубируется. Конъюгат реагирует с антителом, иммобилизованным на твердой фазе в п. 1. Лунки промываются для удаления неактивного конъюгата.
3. Микролунки, содержащие иммобилизованный конъюгат пероксидазы инкубируются с раствором субстрата пероксидазы. Гидролиз субстрата пероксидазы производит изменение окраса. После определенного периода реакция останавливается и интенсивность окраса раствора измеряется фотометрически. Интенсивность окраса раствора зависит от концентрации антитела в оригинальном тестовом образце.

ЗАБОР ОБРАЗЦОВ

1. Рекомендуется проводить забор образцов в соответствии с документом NCCLS M29: "Защита лабораторных работников от инфекционных болезней".
2. Ни один из известных методов анализа не может полностью гарантировать, что образцы человеческой крови не передадут инфекции. Поэтому, все исходные материалы крови должны рассматриваться как потенциально инфекционные.
3. Может использоваться свежая или правильно замороженная сыворотка, полученная утвержденными асептическими процедурами венопункции. Антикоагулянты или консерванты не

должны добавляться. Избегайте использования гемолизованных, липемических или бактериологически зараженных сывороток.

4. Храните образцы при комнатной температуре (КТ) не более 8 часов. Если анализ не проводится в течении 8 часов, сыворотки могут храниться в пределах 2-8 °C не более 48 часов. Если анализ откладывается, храните образцы при -20 °C или ниже. Избегайте многократных циклов замораживания или размораживания. Что может привести к потере активности антител и дать ошибочные результаты.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Поставляемые материалы

Каждый набор содержит следующие компоненты в достаточном количестве для проведения анализов, количество которых указано на этикетке упаковки. **Примечание: Все взаимодействующие реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта в концентрации 0,1% (w/v): Контроли, Калибраторы и Растворитель образцов.**

1. **Планшет:** 96 лунок (12x8 полоски) с привитым инактивированным антигеном. Полоски упакованы в держатель и запечатанные с осушителем.
2. **Конъюгат:** Конъюгированный (пероксидаза хрена) козлий анти-человеческий IgG (γ специфическая цепь). Готов к использованию. Один, 15 мл флакон с белой крышкой
3. **Положительный контроль (человеческая сыворотка):** Один, 0,35 мл флакон с красной крышкой.
4. **Калибратор (человеческая сыворотка):** Один, 0,5 мл флакон с синей крышкой.
5. **Отрицательный контроль (человеческая сыворотка):** Один, 0,35 мл флакон с зеленой крышкой.
6. **Разбавитель образцов:** Одна бутылка 30 мл (зеленая крышка) содержащая Твин-20, альбумин бычьей сыворотки и фосфатно-буферный солевой раствор. Зеленый раствор, готовый к использованию.
7. **ТМВ:** один флакон 15 мл, янтарная бутылка (янтарная крышка), содержащая ТМВ. Готов к использованию. Содержит DMSO < 15% (v).
8. **Стоп раствор:** Одна бутылка 15 мл (красная крышка), содержащая 1M H₂SO₄ 0.7M HCl. Готов к использованию.
9. **Концентрат промывочного буфера (10X):** разбавьте 1 часть концентрата + 9 частей деионизированной или дистиллированной воды. Одна 100 мл бутылка (прозрачная крышка), содержащая 10x концентрированного фосфатно-буферного солевого раствора и раствор Твин-20 (голубой раствор). **Примечание: 1x раствор имеет pH 7,2 ±0,2).**

Следующие компоненты не привязаны к определенному номеру партии и могут взаимозаменяться в ИФА: ТМВ, стоп раствор и промывочный буфер.

Примечание: Набор также содержит:

1. Перечень компонентов внутри упаковки набора с указанием информации по партии.
2. Вкладыш внутри упаковки с инструкциями по использованию.

Материалы необходимые, но не поставляемые:

1. Микропланшетный считыватель ИФА со способностью считывания при длине волны 450 нм.
2. Пипетки с точностью распределения от 10 до 200 мкл.
3. Многоканальные дозаторы, способны точно распределять (50-200 мкл).
4. Емкости реагентов для многоканальных дозаторов.
5. Промывочная бутылка или система промывки микролунок.
6. Дистиллированная или деионизированная вода.
7. Мерная колба емкостью 1 литр.
8. Серологические пипетки.
9. Одноразовые наконечники для пипеток.
10. Бумажные полотенца.
11. Лабораторный таймер для контроля этапов инкубации.
12. Ванна для отходов или дезинфицирующее средство (пример, 10% бытовой отбеливатель, 0,5% гипохлорит натрия).

ОСНОВНАЯ ПРОЦЕДУРА

1. Вытащите из упаковки необходимые компоненты и приведите их к комнатной температуре (20-25 °C).
2. Определите необходимое число лунок. Ответите шесть контроль/калибратор определений (один бланк, один отрицательный контроль, три калибраторы и один положительный контроль) на анализ. Реагент бланка должен использоваться в каждом анализе. Проверьте требования по обеспечению и считыванию для правильной конфигурации контроля/калибратора. Возвратите неиспользуемые полоски в пакет с осушителем, запечатайте и храните при 2-8 °C.

Пример схемы планшета		
	1	2
A	Бланк	Пациент 3
B	Отриц. контроль	Пациент 4
C	Калибратор	и т. д.
D	Калибратор	
E	Калибратор	
F	Положит. контроль	
G	Пациент 1	
H	Пациент 2	

- Приготовьте 1:21 разбавление (т.е. 10 мкл сыворотки + 200 мкл разбавителя образца. Примечание: встряхните лунку перед использованием) отрицательного контроля, калибратора, положительного контроля и каждой сыворотки пациента.
- В отдельные лунки добавьте 100 мкл разбавленного контроля, калибратора и образца. Убедитесь, что образцы тщательно перемешаны. Используйте разные наконечники к пипеткам для каждого образца.
- Добавьте 100 мкл разбавителя образца в лунку A1 в качестве реагента бланка. Проверьте ОП и требования относительно считывателя для правильной конфигурации реагента бланка.
- Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25 °C) 60-65 минут.
- Промойте полоски 5 раз.

А. Ручная процедура промывки:

- Тщательно встряхните жидкость из лунок.
- Наполните каждую лунку моющим буфером. Убедитесь, что нет пузырей в лунках.
- Повторите первые два шага всего 5 раз.
- Встряхните промывочный раствор из лунок. Переверните планшет на бумажное полотенце и постучите тщательно для удаления оставшегося промывочного раствора. Визуально проверьте планшет, что не осталось промывочного раствора в лунках. Соберите промывочный раствор в ванну для отходов и обработайте 0,5% гипохлоритом натрия (отбеливатель) в конце дня анализа.

В. Автоматизированная процедура промывки

- Если используется автоматическая моющая система, установите объем внесения 300-350 мкл/лунку. Установите 5 циклов промывания без перерывов между промыванием. По необходимости, микропланшет можно вынуть из вошера, перевернуть на бумажное полотенце и постучать тщательно для удаления оставшегося промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую лунку, включая лунку бланка, в том самом порядке, что добавлялись образцы.
 - Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25 °C) 30-35 минут.
 - Промойте планшет, следуя процедуре в п. 7.
 - Добавьте 100 мкл ТМВ в каждую лунку, включая лунку бланка в порядке добавления образца.
 - Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25 °C) 30-35 минут.
 - Остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп раствора в каждую лунку, включая лунку бланка в порядке добавления ТМВ. Положительные образцы изменят окрас с синего на желтый. После добавления стоп раствора, постучите планшет несколько раз для тщательного перемешивания.
 - Установите микропланшетный считыватель на длину волны 450 нм и измерьте ОП каждой лунки против реагента бланка. Планшет следует считать в течении 30 минут после добавления стоп раствора.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

А. Вычисление:

1. Коэффициент коррекции

Значение предела определения ОП положительных образцов определена производителем и скорректирована на калибратор. Коэффициент коррекции (КК) дает возможность определить предел определения для положительных образцов и скорректировать ежедневную вариацию тестовых результатов. Коэффициент коррекции определяется для каждого лота компонентов набора и указан в списке компонентов.

2. Значение ОП предела определения

Для получения предела определения ОП, умножьте КК на среднюю ОП калибратора, полученного выше.

(КК x средняя ОП калибратора = предел определения ОП).

3. Коэффициент значений или коэффициенты ОП

Вычислите коэффициент значения или коэффициент ОП для каждого образца разделением его значения ОП на предел обнаружения ОП из п. 2.

Пример:

Средняя ОП калибратора	= 0,793
Коэффициент коррекции (КК)	= 0,25
Величина исключения	= 0,793 x 0,25 = 0,198
Неизвестная ОП образца	= 0,432
Коэффициент значения образца или коэффициент ОП	= 0,432/0,198 = 2,18

В. Интерпретация:

Коэффициент значений или коэффициенты ОП интерпретируется следующим образом:

Коэффициент значения или коэффициент ОП

Отрицательные образцы	≤ 0,90
Сомнительные образцы	0,91 – 1,09
Положительные образцы	≥ 1,10

Коэффициент ОП ≥ 1,10 интерпретируется как положительный к IgG ANA. Коэффициент ОП ≤ 0,90 интерпретируется как отрицательный к IgG ANA.

Образцы с коэффициентом значений в сомнительном диапазоне рассматривается как граничные к IgG ANA. Эти образцы должны анализироваться повторно. Образцы, что повторно являются сомнительными необходимо анализировать, используя такой альтернативный метод как тестовая система DAI ANA HEp-2 IFA.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Каждый раз в анализе калибратор должен использоваться трижды. Бланк, отрицательный контроль и положительный контроль должны также включаться в анализ.
- Вычислите среднее трех лунок калибраторов. Если любое значение из трех отличается более чем на 15 % от среднего, откиньте эту величину и вычислите среднее оставшихся двух лунок.
- Средняя величина ОП калибратора и значение ОП положительного и отрицательного контролей должны быть в следующих границах:

Диапазон ОП

- | | |
|------------------------|---------|
| Отрицательный контроль | ≤ 0,250 |
| Калибратор | ≥ 0,300 |
| Положительный контроль | ≥ 0,500 |
- ОП отрицательного контроля, разделенная на среднее ОП калибратора, должна быть ≤ 0,9
 - ОП положительного контроля, разделенная на среднюю ОП калибратора, должна быть ≥ 1,25
 - Если вышеуказанные условия не выполняются, тест следует повторить.
- Положительный и отрицательный контроли предназначены для мониторинга реагентов и не удостоверяют точность анализа cut-off.
 - Дополнительные контроли могут тестироваться согласно локальных, государственным правилам.
 - Следуйте NCCLS документ C24: статистический контроль качества для количественного измерения для QC практики.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- ANA ELISA тест используется в диагностических целях и они не являются сами по себе диагностическими. Тестовые результаты должны интерпретироваться вместе с клинической картиной и результатами других диагностических процедур.
- Положительный ANA может быть найден в очевидно здоровых людей. Поэтому настоятельно рекомендуется, что результаты интерпретировались в свете клинической картины пациента.
- SLE пациенты, что подвергались стероидной терапии, могут иметь отрицательные результаты.
- Множество предварительно описанных лекарств могут вызывать ANA.
- DAI ANA Screen ELISA тестовая система не идентифицирует специфический тип ANA, что присутствует в положительных образцах. Положительные образцы должны тестироваться на индивидуальные антитела, при использовании более специфических тестов, как DAI ENA Profile-6 ELISA, в комбинации с DAI dsDNA ELISA. Альтернативно, специфические аутоантитела могут быть определены при использовании разных методов, включая иммунодиффузию, western blot или мультиплексад флуоресценцию, что основывается на таких анализах как AtheNA Multi-Lyte ANA тест систему.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(См. оригинал инструкции).

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Ожидаемое значение для нормального пациента - отрицательный результат. Количество реактивов, и степень реактивности зависят от таких параметров, как тип населения, которое проходит испытания, лечения и т.д. Каждая лаборатория должна установить свои собственные ожидаемые значения, основанные на образцах, которые обычно проходят испытания.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Для диагностики *in vitro*.
2. Нормальные предостережения, описанные для лабораторных реагентов должны соблюдаться. В случае попадания в глаза, немедленно промойте водой и обратитесь к врачу. Используйте защитную одежду, перчатки и защиту для глаз / лица. Не вдыхайте испарений. Уничтожайте отходы согласно местным, федеральным, государственным правилам.
3. Лунки планшета не содержат жизнеспособных организмов, однако полоски рассматриваются как потенциально биоопасные материалы.
4. Контроли человеческой сыворотки потенциально биоопасные материалы. Обращайтесь как с потенциально инфицированными.
5. Точное следование указанному времени и температуре необходимо для точных результатов. Все реагенты необходимо привести к комнатной температуре (20-25 °C) перед началом анализа. Возвратите неиспользованные реагенты в холодильник немедленно после использования.
6. Ненадлежащее промывание может вызвать фальшиво положительные или фальшиво отрицательные результаты. Внимательно удаляйте оставшийся промывочный раствор (напр. Аспирацией или вытиранием) перед добавлением конъюгата или субстрата. Не давайте возможности высохнуть лункам между инкубациями.
7. Разбавитель образца, контроли, промывочный буфер и конъюгат содержит азид натрия при концентрации 0,1% (w/v). Азид натрия может формировать азиды металла или меди в лабораторных трубах, что может вызвать взрыв. Для предотвращения, промывайте большим количеством воды после выливания раствора, содержащего азид натрия.
8. Стоп раствор является токсичным. Вызывает ожог. Токсичный при вдыхании, при контакте с кожей. В таком случае, если Вы плохо себя чувствуете, обратитесь к врачу.
9. TMB раствор опасен. Повреждает глаза, респираторную систему и кожу.
10. Концентрат промывочного буфера вызывает раздражение глаз, респираторной системы и кожи.
11. Протрите дно планшета от остатков жидкости и/или отпечатков пальцев, что может повысить оптическую плотность.
12. Разбавление или подмешивание этих реагентов может вызвать неверные результаты.
13. Не должны использоваться реагенты других производителей или с других источников.
14. TMB раствор должен быть бесцветным, слабо желтый, слабо зеленый или слабо голубой. Загрязнение TMB конъюгатом или оксидантом может вызвать изменение окраса. Не используйте TMB, если он темно-синего цвета.
15. Не пипетируйте ртом. Избегайте контакта образцов с кожей или слизистыми.
16. Избегайте микробиологического загрязнения реагентов. Могут получиться неверные результаты.
17. Перекрестное загрязнение реагентов и/или образцов может вызвать неверные результаты.
18. Использованная посуда должна промываться от детергентов.
19. Избегайте выплескивания или образования аэрозолей.
20. Не подвергайте влиянию реагентов и/или образцов сильному свету во время хранения или инкубации.
21. Приведите полоски и держатель к комнатной температуре перед вскрытием для предотвращения конденсации.
22. Промывочный раствор необходимо забрать в контейнер для отходов. Обработайте раствор 10% домашнего отбеливателя (0,5% гипохлорид натрия). Не подвергайте влиянию испарений отбеливателя реагенты.
23. Внимание: жидкие отходы при уровне кислоты pH должны быть нейтрализованы перед добавлением раствора отбеливателя.
24. Не используйте ELISA планшет, индикатор осушителя изменил цвет с синего на красный.
25. Не давайте возможности контакту конъюгата с контейнером или инструментами, что могут быть предварительно загрязнены раствором, что использует азид натрия в качестве консерванта. Оставшееся количество азиды натрия может нарушить активность ферментативности конъюгата.

26. Не подвергайте реактивы влиянию любых других сильных испарений хлор-содержащих растворов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Храните невскрытые наборы при 2-8 °C до окончания срока пригодности, указанного на ярлыке.
2. Предварительно покрытые полоски микролунок хранить при 2-8 °C. Внешние полоски необходимо немедленно закрыть и поместить с осушителем для надлежащего хранения. Полоски стабильны 60 дней после вскрытия при необходимом хранении и пока осушитель остается голубым.
3. Конъюгат: Храните при 2-8 °C. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ.
4. Калибратор, положительный контроль и отрицательный контроль: храните при 2-8 °C.
5. TMB: храните при 2-8 °C.
6. Концентрат промывочного буфера (10x): храните при 2-25 °C. Разбавленный промывочный буфер (1x) стабильный при комнатной температуре (20-25 °C) до 7 дней или 30 дней при 2-8 °C.
7. Разбавитель образца: храните при 2-8 °C.
8. Стоп раствор: храните при 2-25 °C.



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