

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К МИТОХОНДРИАЛЬНОМУ АНТИГЕНУ ПОДТИПА M2

ORG 516, AMA-M2

Каталог. № : **ORG 516**
Количество : **96**
Производитель: **ORGENTEC GmbH, (Германия)**

Методика от **08-2012**



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 ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор является тест-системой ИФА для количественного определения антител класса IgG к митохондриальному антигену подтипа M2 в сыворотке или плазме человека. Только для профессионального использования в in-Vitro диагностике.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Высокоочищенный митохондриальный антиген подтипа M2 привит в лунках.

Антитела к привитым 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 с 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 конечный продукт желтого цвета. Интенсивность этого желтого цвета измеряется фотометрически при 450 нм. Количество окрашивания прямо пропорционально концентрации антител, присутствующих в исходном образце.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ (См. Оригинал инструкции).

СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию.	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 12.5 Ед/мл, содержащий антитела AMA-M2 в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор С 25 Ед/мл, содержащий антитела AMA-M2 в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор D 50 Ед/мл, содержащий антитела AMA-M2 в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор E 100 Ед/мл, содержащий антитела AMA-M2 в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор F 200 Ед/мл, содержащий антитела AMA-M2 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 AMA-M2 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.
Сертификат контроля качества 1 шт.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционно: 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°C до 5 дней или при -20°C 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 в темноте.
- 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. Рекомендуется использование в тот же день.

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 анализа необходимо проводить непрерывно 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.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- 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.

- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'- тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте 0,09% тем не менее не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
- Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
- Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Придерживайтесь руководств по осуществлению контроля качества в лаборатории, используйте исследования контролей и/или пулированных сывороток. Придерживайтесь существующего законодательства при работе со всеми реагентами и образцами.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление промывочного раствора

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

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием.

Приготовление образца

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. Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

- 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.
- 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.
- Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
- 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	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

P1 ... - образцы пациентов, A-F - 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.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Калибровка

Система анализа калибруется против международного эталонного препарата ВОЗ 67/183 для АМА-M2 со значением 100 МЕД/мл.

Диапазон измерения

Расчетный диапазон данного ИФА анализа составляет: 0-200 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 10 Ед/мл

Интерпретация результатов

Отрицательный: < 10 Ед/мл

Положительный: ≥ 10 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 из калибровочной кривой.

Образец	Разведение	Полученное значение, Ед/мл	Ожидаемое значение, Ед/мл	П/О, %
1	1:100	64.8	64.8	100
	1:200	35.6	32.4	110
	1:400	15.8	16.2	97
	1:800	8.3	8.1	102
	1:1600	3.6	4.1	89
2	1:100	121.2	121.2	100
	1:200	63.4	60.6	105
	1:400	29.7	30.3	98
	1:800	14.8	15.2	97
	1:1600	7.3	7.6	96

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	39.8	7.0
2	81.3	3.8
3	177.3	3.6

Между анализами		
Образец	Среднее Значение Ед/мл	CV [%]
1	40.1	6.2
2	84.6	11.8
3	180.4	3.8

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	%
Primary biliary cirrhosis (PBC)	143	139	97.2
Rheumatoid Arthritis	60	1	1.7
Normal human sera	267	18	6.7

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 516	Pos	139	19	143
	Neg	4	308	
		143	327	470

Sensitivity: 97.2 %

Specificity: 94.2 %

Overall agreement: 95.1 %

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

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



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