

НАБІР ІФА
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО
ДВОСПІРАЛЬНОЇ ДНК, IgA

3141, Aeskulisa dsDNA-A

Кат. № : 3141
Кількість : 96
Виробник : AESKU. Diagnostics,
(Німеччина)

Методика від 28-08-2007
Версія 002



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

1. Призначення

AESKULISA dsDNA-A є твердофазним імуноферментним аналізом з використанням людських рекомбінантних двоспіральних ДНК (дс) для кількісного та якісного визначення IgA антитіл проти двоспіральної ДНК в сироватці крові людини.

Антитіла анти-дсДНК в основному визнають фосфатні одиниці ДНК, таким чином, ці атоантитіла також пов'язують односпіральні ДНК (осДНК). Для забезпечення правильного кількісного визначення анти-двоспіральних ДНК антитіл антиген, що використовується, має бути вільним від забруднення з односпіральною ДНК.

Аналіз є інструментом в диференціальній діагностиці системного червоного вовчака (СЧВ).

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

Готові до використання:

Негативний Контроль	1 флакон, 1.5 мл (зелений ковпачок: безколірний розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Позитивний Контроль	1 флакон, 1.5 мл (червоний ковпачок: жовтий розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Калібратор Cut-off	1 флакон, 1.5 мл (синій ковпачок: жовтий розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Калібратори	6 флаконів, 1.5 мл кожен 0,3, 10, 30, 100, 300 Од/мл (інтенсивність кольору підвищується з концентрацією: розчини жовтого кольору). Людська сироватка (розведенна), азид натрію <0.1% (консервант)
Кон'югат	1 флакон, 15 мл IgA (червоний ковпачок: червоний розчин) Містить: Анти-імуноглобуліни людини, кон'юговані з

Субстрат ТМВ	пероксидазою хрону
Стоп Розчин	1 флакон, 15 мл (чорний ковпачок)
Мікропланшет	Містить: стабілізований ТМВ/H ₂ O ₂
	1 флакон, 15 мл (білий ковпачок: безбарвний розчин)
	Містить: 1 М соляної кислоти
	12 x 8-лункових смужок, які відокремлюються
	Покриття див. пункт 1

Необхідні матеріали, що не постачаються:

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і оптічним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Скланий 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.

Наши тести призначенні для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur.Ph. 4-e 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 призначенні 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 нормальноговикористання, притримуйтесь 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/68-86.6 °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 піддавайте 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 використовувались з іншими реагентами до цього.

6. Відбір проб, Використання та зберігання

Використовуйте переважно зібрани 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 трох 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.

Калібратор Cut-off використовувати тільки для якісного аналізу.

- Внесіть 100 мкл розведеної сироватки кожного пацієнта в призначенні лунки.
- Внесіть 100 мкл калібраторів або Cut-off калібратора і Негативного і Позитивного контролю в призначенні 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 субстрат в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F, захищенному 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. Кількісна і якісна Інтерпретація

Для кількісної інтерпретації побудувати стандартну криву, відкладвши 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/lin координат та 4-Параметрове налаштування. З OD кожного зразка зчитати відповідні концентрації антитіл, виражені в Од/мл.

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

Приклад стандартної кривої

Ми рекомендуємо паралельне піпетування калібраторів для кожного аналізу.

Калібратори IgA	OD 450/620 нм	CV % (Варіація)
0 Од/мл	0.036	2.9
3 Од/мл	0.176	2.3
10 Од/мл	0.314	2.9
30 Од/мл	0.618	2.9
100 Од/мл	1.312	0.1
300 Од/мл	2.076	0.7

Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат (Од/мл)
P 01	0.799/0.744	0.772	40.3
P 02	1.404/1.393	1.39	119.5

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

Не використовувати цей приклад для інтерпретації результатів пацієнтів!

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:	0-300 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 dsDNA-A дало аналітичну чутливість 1.0 Од/мл.

10.2 Специфічність і чутливість

Мікропланшет покритий високо очищеним **рекомбінантним людським дsДНК**. Перехресної реактивності з іншими аутоантитігнами не було виявлено. Антитіла, спрямовані на дsДНК, показують діагностичну чутливість 85% для СЧВ, що дозволяє диференціювання від інших запальніх ревматичних захворювань. Посedнання всіх трох підкласів імуноглобуліну призводить до діагностичної чутливості тесту AESKULISA дsДНК 90%. Дані були отримані з використанням AESKULISA доспіральної dsDNA-A (REF 7141).

Кореляція:

Порівняння даних по продуктивності оцінювалося з 30 сироватками на обох, AESKULISA 7141 і AESKULISA 3141. Лінійний регресійний аналіз цих двох продуктів показав, що ці два продукти є еквівалентними. Дані можуть бути отримані за запитом.

10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення. Тим не менше, через неоднорідність характеру

людських атоантитіл можуть існувати зразки, що не підлягають цьому правилу.

№ Зразка	Фактор розведення	Вимірювана концентрація (Од/мл)	Очікувана концентрація (Од/мл)	Відновлення (%)
1	1/100	42.9	43.2	99.3
	1/200	20.4	21.6	99.4
	1/400	9.3	10.8	86.1
	1/800	4.9	5.4	90.7
2	1/100	179.4	176.0	101.9
	1/200	88.4	88.0	98.2
	1/400	41.8	44.0	95.0
	1/800	19.8	22.0	90.0

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		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	> 300.0	2.1
2	138.0	2.4
3	26.4	4.7

Inter-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	463.3	2.6
2	171.6	2.3
3	58.2	4.6

10.5 Калібрування

Через відсутність міжнародного еталонного калібрування цей аналіз відкалібрований в умовних одиницях (Од/мл).

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.

for quantitative interpretation use calibrators to establish a standard curve						for qualitative interpretation use cut-off calibrator					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CalA	CalE	P1			NC	P2				
B	CalA	CalE	P1			NC	P2				
C	CalB	CalF	P2			CC	P3				
D	CalB	CalF	P2			CC	P3				
E	CalC	PC	P3			PC	...				
F	CalC	PC	P3			PC	...				
G	CalD	NC	...			P1	...				
H	CalD	NC	...			P1	...				

CalA: калібратор A, CalB: калібратор B, CalC: калібратор C, CalD: калібратор D, CalE: калібратор E, CalF: калібратор F

PC: Позитивний контроль

NC: негативний контроль

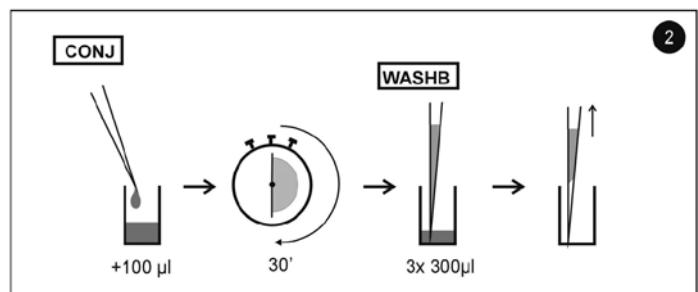
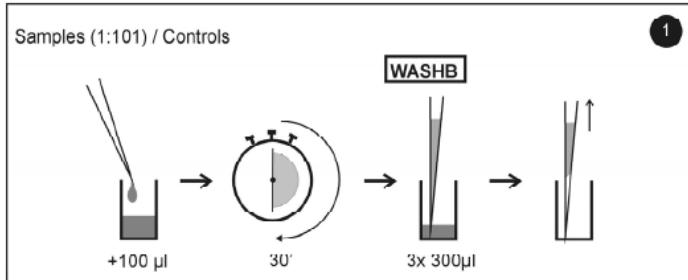
CC: Калібратор Cut-off

P1: пацієнт 1

P2: пацієнт 2

P3: пацієнт 3

Додаток В: Процедура випробування



Пояснення символів, що використовуються на маркуванні:

IVD	Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i>
REF	Каталоговий номер
LOT	Код партії
CE	СЕ маркування
	Національний знак відповідності
96	96 тестів
i	Ознайомлення з інструкціями для застосування
	Використати до
+2°C - +8°C	Температурні обмеження (2-8 °C)
	Виробник
CO-CAL	Калібратор Cut-off
CON+	Позитивний контроль
CON-	Негативний контроль
CAL	Калібратор
RC	Відновлювач
CONJ	Кон'югat
MP	Мікропланшет
PINP	Планшет
WASHB 50x	Промивний буфер
SUB	Субстрат
STOP	Стоп розчин
SB 5x	Буфер для зразків



AESKU.DIAGNOSTICS GmbH & Co.KG

Mikroforum Ring 2, 55234 Wendelsheim, Germany

Phone: +49-6734-9622-0

FAX: +49-6734-9622-2222

WWW.AESKU.COM



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

