

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ТА ЯКІСНОГО
ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ПРОТИ
ОСТРІВЦЕВИХ КЛІТИН

3604, Aeskulisa IA2-GAD65 Screen

Каталог. №: 3604

Методика від 21-12-2011

Кількість : 96

Версія 004

Виробник : AESKU. Diagnostics,

(Німеччина)



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

1. Призначення

AESKULISA IA2-GAD65 Screen є твердофазним імуноферментним аналізом з використанням злитого білка білка острівцевого антигена 2 (IA2) людини, пов'язаного з тирозин-фосфатазою, та рекомбінантної ізоформи глутамата декарбоксилази (65 кДа) (GAD65) для кількісного та якісного визначення антитіл проти острівцевих клітин в сироватці крові людини.

Аналіз є інструментом в діагностиці цукрового діабету 1 типу.

2. Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

Принцип тесту

Зразки сироватки інкубують в мікропланшетах з внесенням конкретного антигена на протязі ночі. Антитіла пацієнта, якщо вони присутні в зразку, зв'язуються з антигеном. Незв'язана фракція вимивається на наступній стадії. Після цього біотинильований IA2-GAD65 інкубують. Під час цієї стадії аутоантитіла проти IA2 та/або GAD65 формують зв'язок між антигеном, іммобілізованим на пластині, і біотином IA2-GAD65 в рідкій фазі. Незв'язаний біотин IA2-GAD65 вимивається на наступній стадії. Кількість зв'язаного біотину IA2-GAD65 потім визначається додаванням стрептавідин-пероксидази (кон'югату), який зв'язується з біотином. Незв'язаний кон'югат вимивається на наступній стадії. Додавання TMB субстрату генерує ферментативну колориметричну (синій колір) реакцію, яка зупиняється розведеною кислотою (колір змінюється на жовтий). Швидкість утворення кольору від хромогену 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: Трис, NaCl, BSA, азид натрію <0,1% (консервант)
50x Промивний буфер	1 флакон, 20 мл - 50x концентрований (білий ковпачок: зелений розчин) Містить: Трис, NaCl, Твін 20, азид натрію <0,1% (консервант)
Біотин IA2-GAD65	3 флакони, ліофілізований (білий ковпачок) Містить: біотин, кон'югований з рекомбінантним людським IA2-GAD65; бичачий сироватковий альбумін (БСА)

Готові до використання:

Буфер для відновлення	1 флакон, 20 мл (червоний ковпачок: червоний розчин) Містить: PBS, бичачий сироватковий альбумін (БСА)
Негативний контроль	1 флакон, 1 мл (зелений ковпачок: безбарвний розчин) Містить: Людська сироватка (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)
Позитивний контроль	1 флакон, 1 мл (червоний ковпачок: жовтий розчин) Містить: Людська сироватка (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)
Калібратор Cut-off	1 флакон, 1 мл (синій ковпачок: жовтий розчин) Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант)
Калібратори	6 флаконів, 1 мл кожен 0, 25, 75, 125, 250, 500 Од/мл (колір підсилюється з концентрацією: жовтий розчин)

Кон'югат	Містить: людську сироватку (розведена), азид натрію <0,1% (консервант) 1 флакон, 15 мл IgG (синій ковпачок: синій розчин) Містить: стрептавідин, кон'югований з пероксидазою хрому; бичачий сироватковий альбумін (БСА)
Субстрат TMB	1 флакон, 15 мл (чорний ковпачок) Містить: стабілізований TMB/H ₂ O ₂
Стоп Розчин	1 флакон, 15 мл (білий ковпачок: безбарвний розчин) Містить: 1 М соляної кислоти
Мікропланшет	12 x 8-лункових смужок, які відокремлюються Покриття див. пункт 1

Необхідні матеріали, що не постачаються:

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Скляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, кришка для планшета, 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. Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur. Ph. 4-е вид).

4. Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Відновлений біотин IA2-GAD65 має бути використаний в день відновлення. 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 TMB розчин. Зберігайте мікропланшети в призначеній 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 нормального використання, притримуйтеся 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 замінюйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-32 °C/68-89.6 °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 зібрані 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 трьох днів і замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

7. Процедура аналізу

7.1 Підготовчі заходи перед піпетуванням

Будь ласка, майте на увазі, що повинні бути підготовлені тільки реагенти, які будуть використовуватися в той же день!

Розвести концентровані буфери:

Розвести концентрований буфер для зразків 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

Щоб уникнути помилок, ми пропонуємо помічати ковпачки різних калібраторів.

Зразки:

Розвести зразки сироватки 1:4 буфером для зразка (1x)

Наприклад, 225 мкл буфера для зразків (1x) + 75 мкл сироватки. Добре перемішати!

Відновити і розбавити Біотин IA2-GAD65:

Відновити ліофілізований Біотин IA2-GAD65 в два етапи: По-перше, додати 1 мл буфера для відновлення в один флакон, дати постояти 5 хвилин і перемішати до тих пір, поки Біотин IA2-GAD65 повністю не розчиниться. Переконайтеся, що в ковпачку не залишилося ліофілізованого або відновленого Біотину IA2-GAD65. На другому етапі, перемістити 1 мл відновленого Біотину IA2-GAD65 до 5 мл буфера для відновлення і добре перемішати.

Один флакон відновленого Біотину IA2-GAD65 є достатнім для шести смужок. Якщо більше смужок буде використовуватися в одному тесті, два флакони ліофілізованого Біотину IA2-GAD65 повинні бути відновлені і розведені, як описано вище, а потім поєднані. Все 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. Cut-off Калібратор повинен використовуватися тільки для якісного визначення.

- Внесіть 100 мкл розведеної сироватки кожного пацієнта в призначені лунки.
- Внесіть 100 мкл калібраторів АБО Cut-off Калібратора та Негативний і Позитивний контролі в призначені лунки.
- Накрийте планшет. Інкубуйте протягом 16-20 годин при температурі 2-8 °C/35-46 °F.
- Витримайте протягом 30 хвилин при КТ.
- Промийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл Біотину IA2-GAD65 (відновленого і розбавленого) у кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Промийте 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.
- Промийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл ТМБ субстрату в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.

захищеному 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 та Якісна Інтерпретація

Для кількісної інтерпретації побудувати стандартну криву, відклавши 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	Позитивні результати
< 30 Од/мл	> 30 Од/мл

Приклад стандартної кривої

Ми рекомендуємо піпетування калібраторів паралельно у кожній постановці.

Калібратори	OD 450/620 нм	CV% (варіація)
0 Од/мл	0.148	5.6
25 Од/мл	0.276	3.2
75 Од/мл	0.499	2.9
125 Од/мл	0.768	4.7
250 Од/мл	1.496	0.9
500 Од/мл	2.627	2.1

Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат
P 01	0.499/0.463	0.481	76.2
P 02	1.494/1.496	1.495	258.4

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

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. Всі зразки з більш високим OD вважаються позитивними.

Негативний: OD пацієнта < OD Cut-off
Позитивний: OD пацієнта > OD Cut-off

9. Технічні дані

Матеріал зразка:

сироватка

Об'єм зразка:

75 мкл зразка, розведеного 1:4 в 1x буфері для зразків

Загальний час інкубації:

16-20 годин при температурі 2-8 °C/35-46 °F і 90 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F

Діапазон калібрування:

0-500 Од/мл

Аналітична чутливість:

3 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

Межа виявлення

Тестування буфера для зразків 60 разів на Aeskulisa IA2-GAD65 та 8 низько негативних зразків 8 разів дало межу виявлення 3 Од/мл.

10.2 Специфічність і Чутливість

Мікропланшет покритий злитим білком острівцевого антигена 2 (IA2) людини, пов'язаного з тирозин-фосфатазою, та рекомбінантної ізоформи глутамата декарбоксилази (65 кДа) (GAD65). Перехресної реактивності з іншими аутоантигенами не було виявлено. Діагностична специфічність Islet Cell Screen становить 100%. Діагностична чутливість до 98%.

10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення. Тим не менше, через неоднорідність характеру людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підлягають цьому правилу.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація (Од/мл)	Очікувана концентрація (Од/мл)	Відновлення (%)
1	1/4	295.89	300.00	98.63
	1/8	157.17	150.00	104.78
	1/16	77.47	75.00	103.29
2	1/32	39.64	37.50	105.71
	1/4	183.42	184.00	99.68
	1/8	96.9	92.00	105.33
	1/16	49.56	46.00	107.74
	1/32	26.05	23.00	113.26

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 (IU/ml)	CV (%)
1	17.8	17.7
2	30.47	8.4
3	72.54	5.4
4	135.77	4.6
5	217.47	2.1

Inter-Assay		
Sample No.	Mean (IU/ml)	CV (%)
1	17.8	19.3
2	30.47	9.5
3	72.54	6.1
4	135.77	5.0
5	217.47	3.1

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 А, CalB: калібратор В, CalC: калібратор С, CalD: калібратор D, CalE: калібратор Е, CalF: калібратор F

PC: Позитивний контроль

NC: Негативний контроль

CC: Калібратор Cut-off

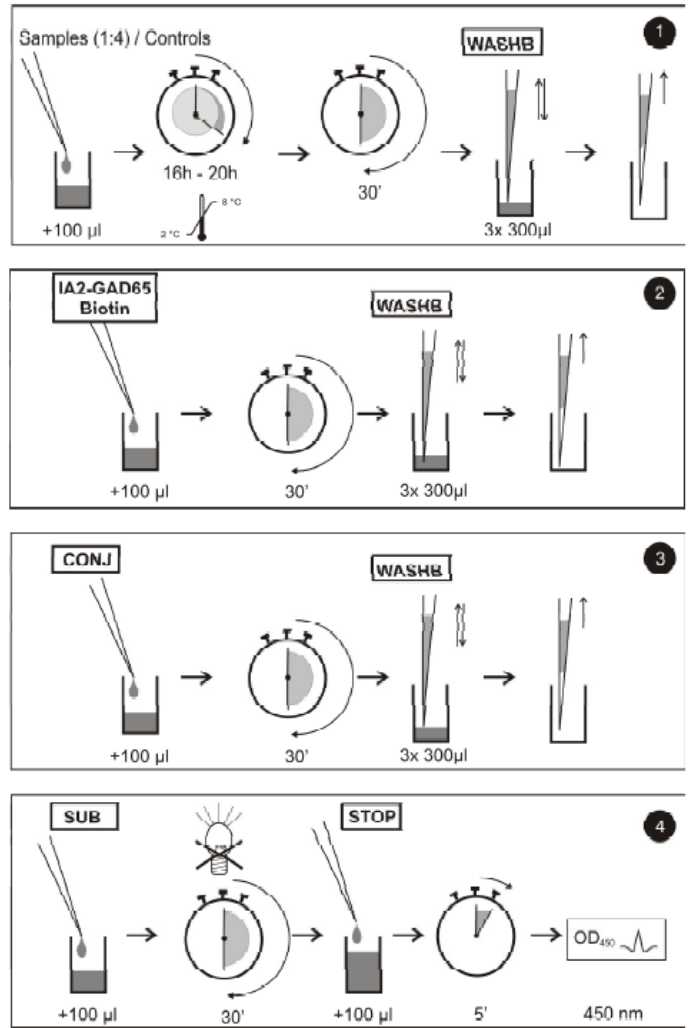
P1: пацієнт 1

P2: пацієнт 2

P3: пацієнт 3

Cal антиген: антиген для калібраторів

Додаток В: Процедура випробування



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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