

НАБІР НЕПРЯМОГО ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЯДЕРНИХ ТА/АБО ЦИТОПЛАЗМІЧНИХ АУТОАНТИТІЛ

51.100, AESKUSLIDES – ANA-HEp-2

Каталог. №: 51.100
Кількість : 120
Виробник : AESKU. Diagnostics, (Німеччина)

Методика від 28-01-2014
Версія 011



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

ANA-HEp-2

Стандартне посилання	Опис	Кількість тестів
51.100	ANA-HEp-2 (12 лунок)	120
51.101	ANA-HEp-2 (12 лунок)	120
51.100.Demo	ANA-HEp-2 (12 лунок) Демо набір	24
51.101.Demo	ANA-HEp-2 (12 лунок) Демо набір	24

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

AESKUSLIDES ANA-HEp-2 є непрямим імунофлуоресцентним аналізом для виявлення ядерних та/або цитоплазмичних аутоантитіл в сироватці крові людини.

Аналіз є інструментом для диференціальної діагностики системних ревматичних захворювань, таких як системний червоний вовчак (СЧВ), змішані захворювання сполучної тканини (МСТД), склеродермія, синдром Шегрена (SS), Поліміозит і Дерматомиозит.

2. КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

(Див. оригінал інструкції)

Характеристика Антигену: Клітини HEp-2

Перехресна реактивність: Перехресної реактивності не спостерігалось.

Виявлення антитіл засноване на принципі непрямого імунофлуоресцентного аналізу (IIFA). Сляні мікроскопічні слайди покриті частинками тканини або клітинами (HEp-2 клітини (ANA), Гранулоцитами (ANCA) або *Crithidia luciliae* (нДНК)). Якщо сироватка пацієнта містить специфічні антитіла, вони будуть зв'язуватися при першій інкубації. Після видалення незв'язаного матеріалу на стадіях промивання, зв'язані антитіла виявляються Флуоресцеїном, кон'югованим анти-людськими імуноглобулінами у другій інкубації. Специфічне флуоресцентне зафарбовування комплексу антиген-антитіло в зелений колір може бути візуалізоване за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

3. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Будь ласка, зверніться до процедури аналізу в Загальній інструкції, розділ 11, для отримання детальних інструкцій. Наступні зауваження повинні бути взяті до уваги при роботі з наборами ANA-HEp-2:

- Час контрастного фарбування: 30-90 секунд
- Рекомендований Скринінговий титр:
 - 1:80 для зразків дорослих
 - 1:40 для зразків дітей

4. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

HEp-2 являє собою епітеліальну клітину людини, культивовану з тканини пацієнта, що страждає від раку гортані. Субстрат пропонує гомогенний ріст клітин і не потребує додаткового наповнювача. Для оцінки зразків мітотичні клітини мають велике значення, так як ядерні малюнки можуть бути визначені більш точно.

Відповідний кінцевий титр – це той, в якому сироватка пацієнта демонструє просту позитивну флуоресценцію.

Оцінка завжди повинна бути виконана з позитивним і негативним контролем. Слабкі флуоресценції клітинних ядер з титрами між 1:40 (у дітей) і 1:80 (у дорослих) або невизначеність щодо клінічних результатів повинні бути перевірені за допомогою контролів. У такому випадку зразки повинні бути зібрані приблизно кожні 6 тижнів і аналізовані подібним чином.

(Див. оригінал інструкції)

5. СПЕЦИФІЧНІ РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

138 заморожених зразки були протестовані на двох лотах реагентів іншої компанії та на двох лотах AESKUSLIDES. Зразки зберігали протягом декількох років, і вони представляють пацієнтів, яких оцінювали на ревматичні захворювання. Крім того були включені двадцять зразків здорових пацієнтів. Зразки здорових пацієнтів представляли населення без відомих клінічних симптомів ревматизму. Порівняння двох наборів проводилось для демонстрації порівнянності систем ANA HEp-2 двох незалежних компаній, включаючи послідовність малюнка.

а. Таблиця 1: Довірчі інтервали комбінованих даних набору:

		Predicate		
		Positive	Negative	Total
AESKUSLIDES ANA HEp-2	Positive	116	0	116
	Negative	0	22	22
	Total	116	22	138

Позитивна узгодженість % = $116/116 = 100\%$ (95^{th} % CI: 96.8 – 100%)

Негативна узгодженість % = $22/22 = 100\%$ (95^{th} % CI: 85.1 – 100%)

b. Таблиця 2: Комбіновані дані набору Малюнку заявлений набір проти Aesku

Pattern	n	Predicate	AESKUSLIDES
Homogenous	32	32	32
Speckled	82	82	82
Nucleolar	20	20	20
Centromere	6	6	6
Peripheral	3	3	3
Nuclear Membrane	1	1	1

N = 144
Клінічні зразки представляли собою повний спектр аутоімунних захворювань, у тому числі СЧВ, склеродермія, склеродермія-CREST, Шегрена, MCTD, антифосфоліпідний синдром, ревматоїдний артрит, поліміозит/дерматомиозит, SLE, викликаний вживанням наркотиків і т.д.

5.1 Відтворюваність і точність

Три різні ПАРТІЇ AESKUSLIDES були протестовані з 15 зразками сироватки, які охоплюють повний набір малюнків. Ці зразки були розбавлені від 1:40 до 1:10240 і кожне розведення аналізували за допомогою двох незалежних читачів на всіх трьох ПАРТІЯХ. Критерієм прийнятності було відхилення +/- 1 інтенсивності флуоресценції. Критерії прийнятності були виконані для всіх зразків, всіх розведень, всіх ПАРТІЙ і всіх незалежних читачів.

Більш докладні дані можуть бути отримані за запитом.

6. ПРОТОКОЛ ІНТЕРПРЕТАЦІЇ ДАНИХ

ANA-HEP2

Дата:	Партія:
№ Слайду:	Оператор:

№ Лунки	ID	Коефіцієнт розведення	F.I.	Хромосоми (мітоз)	Нуклеоплазма	Ядерця	Цитоплазма	Антитіла	Зауваження
1.									
2.									
3.									
4.									
5.									
6.									
7.									
8.									
9.									
10.									
11.									
12.									

7. СТАНДАРТНИЙ ВМІСТ НАБОРУ

7.1 Стандарти набори

№ Набору	Опис набору	СЛАЙДИ (10x в кожному наборі)			КОН'ЮГАТ (1 x 4 мл)		ПОЗИТИВНИЙ КОНТРОЛЬ (1x 0.5 мл)	
		Посилання	Лунки	Покриті з	Посилання	Опис	Посилання	Опис
51.100	ANA-HEP-2 (12 лунок)	s51.100	12	Клітини ANA-HEP-2	C51.100	IgG Синій ковпачок: Розчин біло-синього кольору. Містить: BSA, анти-людське антитіло, мічене флуоресцеїном (FITC)	PC51.100	ANA контроль малюнку (гомогенний) Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)
51.101	ANA-HEP-2 (12 лунок)				C51.101	IgG Синій ковпачок: Розчин біло-синього кольору. Містить: BSA, анти-людське антитіло, мічене флуоресцеїном (FITC) (H+L)	PC51.101	ANA контроль малюнку (гомогенний) Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)

ПРИМІТКА: Вміст інших компонентів наборів, наприклад, Загальні реагенти (Негативний Контроль, Середовище для заливки і т.д.) вказано нижче в розділі 8 ВМІСТ ЗАГАЛЬНИХ РЕАГЕНТІВ.

7.2 DEMO НАБОРИ

Щодо змісту демонстраційних наборів зверніться до відповідного сертифікату аналізу.

8. ВМІСТ ЗАГАЛЬНИХ РЕАГЕНТІВ

с. Загальні Реагенти

Посилання	Реагент	Кількість/Об'єм		Опис	Готовність до використання
NCIFA	Негативний Контроль	1x	0.5 мл	Зелений ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людська сироватка (розведена), азид натрію <0.1% (консервант)	ТАК
*EBIFA	Еванс синій 0.2%	1x	3 мл	Білий ковпачок: розчин синього кольору. Містить: PBS, Еванс синій. Розвести Еванс синій 0.2% 1: 3000 в 1x WBIFA	НІ
MMIFA	Середовище для заливки	1x	8 мл	Затверджено для використання з HELMED® Білий ковпачок: безбарвний розчин Містить: PBS, гліцерин.	ТАК
WBIFA	Промивний Буфер (10x)	1x	100 мл	Білий ковпачок: безбарвний розчин Розвести концентрований буфер у співвідношенні 1:10 дистильованою водою (наприклад: 100 мл + 900 мл). Містить: BSA, PBS, азид натрію (консервант).	НІ

SBIFA	Буфер для зразків (1x)	1x	100 мл	Білий ковпачок: безбарвний розчин для розведення сироватки пацієнта Містить: БСА, PBS, азид натрію (консервант).	ТАК
--------------	------------------------	----	--------	---	-----

Кількість в наборі. (*) замовляються окремо.

d. Необхідні матеріали, не включені в набір

1. Вода дистильована
2. Пробірки для розведення зразка
3. мірна колба
4. Об'ємна піпетка
5. Таймер
6. Флуоресцентний мікроскоп з системою FITC, (490 нм фільтра збудження, 510 нм бар'єрний фільтр)
7. Лоток для інкубації
8. Тарілка для фарбування
9. Наконечники для піпеток
10. Покривні скла (24x60 мм)
11. Стискальна промивна пляшка

У випадку, якщо інформація про продукт, в тому числі маркування, невірна або пошкоджена, будь ласка, зверніться до виробника чи постачальника тестового набору.

9. ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Зберігати всі реагенти при 2-8 °C/35-46 °F, в захищеному від інтенсивного світла місці. Дату закінчення терміну дії кожного компонента вказано на етикетці. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зберігати всі реагенти і слайди при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини стабільні протягом принаймні 1 тижня при 2-8 °C/35-46 °F. **Реагенти та слайди повинні бути використані тільки протягом терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті.**

10. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ПРИ ВИКОРИСТАННІ

e. Дані про небезпеку для здоров'я

ЦЕЙ ПРОДУКТ ПРИЗНАЧЕНИЙ ТІЛЬКИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO. Таким чином, тільки навчений персонал і спеціально підготовлений для проведення in Vitro діагностики може виконувати аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах передбачуваного використання, орієнтуйтеся на нижче вказане для максимальної безпеки:

Рекомендації та запобіжні заходи

Цей набір містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразнюючі для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникати контакту з очима і шкірою і носити одноразові рукавички.

Весь вихідний матеріал, який використовується для деяких реагентів цього набору (наприклад, контроль) був протестований затвердженнями методами і мав негативні значення для HBsAg, Гепатиту С і ВІЛ. Проте, жоден тест не може повністю гарантувати відсутність вірусних агентів в такому матеріалі. Таким чином, поводитись з контролями і зразками пацієнтів як з такими, що здатні переносити інфекційні захворювання, і відповідно до національних вимог.

Набір містить матеріал тваринного походження (БСА, Імуноглобулін), як зазначено в таблиці вмісту реагентів, обробляти відповідно до національних вимог.

f. Загальні зауваження щодо використання

1. Не піпетувати ротом. Не курити, не їсти і не пити при роботі з набором.
2. Не змішуйте реагенти з різних партій. Це може призвести до змін в результатах.
3. Тримайте всі флакони запечатаними після використання, щоб уникнути бактеріального забруднення.
4. Завжди піпетувати всі розчини з новими стерильними наконечниками для піпеток.
5. Ніколи не піддавайте компоненти температурі вищій, ніж 37 °C/98.6 °F.
6. Ніколи не дозволяйте лункам слайда висохнути протягом всієї процедури.
7. Ніколи не заморожуйте слайди.

Кожна лабораторія повинна встановити свої власні контрольні значення з застосуванням власних методів, контролів, обладнання та популяції пацієнтів відповідно до встановлених процедур.

Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах тільки виконаного тесту, він повинен бути встановлений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень.

У випадку, якщо значення контролів не відповідають критеріям, тест є недійсним і повинен бути повторений. Наступні технічні питання повинні бути перевірені: закінчення терміну дії (дати) підготовлених реагентів, умови зберігання, піпетки, прилади, фотометр, умови інкубації і методи промивки. Якщо протестовані елементи демонструють значення будь-які відхилення або критерії перевірки не виконуються без поважної причини, будь ласка, зв'яжіться з нашим місцевим представником.

11. ЗАБІР ЗРАЗКІВ, РОБОТА З НИМИ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Підготовка зразків: використовувати переважно недавно зібрані зразки сироватки. Забір крові проводити відповідно до національних вимог. Зберіть зразки крові асептично.

Ліпемічні, жовтяничні, гемолізовані або мікробіологічно забруднені зразки можуть спричинити інтерференцію.

Сироватки з частинками повинні бути очищені низькошвидкісним центрифугуванням (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в екологічно чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації зразки сироватки слід використовувати на протязі перших 8 годин, зберігати щільно закритими при 2-8 °C/ 35-46 °F до 48 годин, або заморожувати при -20 °C/-4 °F протягом більш тривалих періодів. Уникайте повторного заморожування і відтавання.

12. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

g. Підготовка перед піпетуванням

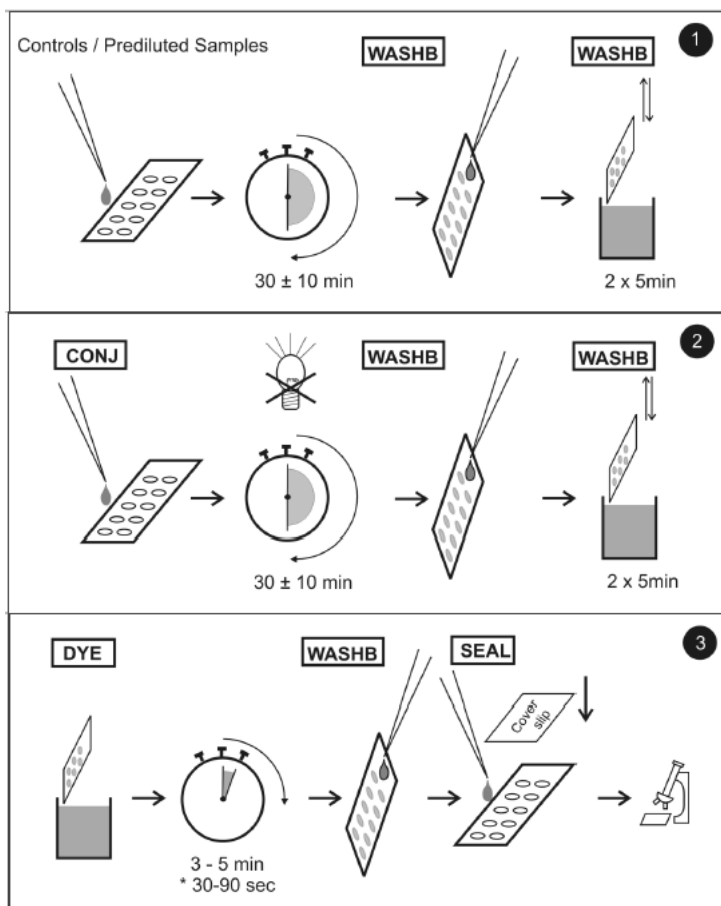
Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-26 °C/64-78.8 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої схеми інкубації для оптимального виконання тесту.

1. Підготовка Промивного Буфера: Розвести концентрований буфер 1:10 дистильованою водою.
2. Розведення зразків: Розведіть сироватки пацієнтів (для скринінгового титру див. розділ **Процедура Набору** за посиланням по продукту, який ви використовуєте) з 1x Буфер для зразків. Цими продуктами є НЕР-2, нДНК, rLKS, EMA та інші набори.
3. Контроль готові до використання.
4. Підготовка протоколів: Листи інтерпретації даних доступні в розділі **Процедура Набору** за посиланням по продукту, який ви використовуєте.

h. Процедура проведення тесту

№	Опис кроку
1.	Витягніть необхідні слайди з мішечків і позначте їх. Не торкайтеся лунок. Не дозволяйте слайдам висохнути.
2.	Підготовка лотка для інкубації: Помістіть невеликий об'єм деіонізованої або дистильованої води в лоток для інкубації і помістіть слайди на опорах в лоток для інкубації. Інкубуйте слайди 30±10 хвилин при кімнатній температурі у вологому лотку для інкубації. Використовуйте послідовні часи інкубації для кон'югату. Перша інкубація: Внесіть адекватний об'єм кожної розведеної сироватки та контролів (готових до використання) у відповідні лунки, уникаючи прямого контакту піпетки з поверхнею слайдів. Переконайтеся, що кожна лунка повністю покривається відповідною сироваткою. Важливо використовувати стільки досліджуваного матеріалу, скільки необхідно, щоб повністю покрити лунку. Але уникайте розливу між лунками, тому що це може призвести до некоректних результатів.
3.	Промивання: Після інкубації видаліть слайди з інкубаційного лотка і промийте промивальним буфером з використанням пластикової промивної пляшки. Не розбризкуйте буфер безпосередньо на лунки. ПРИМІТКА: Для запобігання перехресного забруднення нахиліть слайд спочатку до одного рядка, і ретельно промийте промивним буфером уздовж середньої лінії на слайді, дозволяючи промивному буферу збігти з нижнього краю слайда. Потім нахиліть слайд до іншого рядка, і повторіть цю процедуру, дозволяючи промивному буферу збігти з іншого краю слайда. Промийте слайд(и) 10 хвилин з промивним буфером в блюді для фарбування слайдів. Уникайте безпосереднього контакту твердих предметів з субстратом. Для отримання оптимальних результатів замініти буферний розчин один раз після 5 хвилин. Витягнути слайд(и) з блюда для фарбування слайдів і обережно видалити надлишок миючого буфера. ПРИМІТКА: Важливо, щоб лунки слайда не висихали під час процедури, так як це може призвести до пошкодження субстрату. Будь ласка, не висушуйте слайд будь-яким чином і не залишайте слайд без флуоресцентного реагенту антитіл довше, ніж кілька секунд.
4.	Друга інкубація: Після процедури промивки поверніть слайд відразу в інкубаційний лоток і покрийте кожен лунку з адекватним об'ємом FITC-кон'югату і переконайтеся, що лунка покрита повністю. Інкубуйте слайди 30±10 хвилин при кімнатній температурі в темряві.
5.	Промивання: Після інкубації видаліть слайди з інкубаційного лотка і промийте промивальним буфером з використанням пластикової промивної пляшки. Не розбризкуйте буфер безпосередньо на лунки. Промийте слайд(и) 10 хвилин з промивним буфером в блюді для фарбування слайдів. Для отримання оптимальних результатів замініти буферний розчин один раз після 5 хвилин.
6.	*Опційне контрастне забарвлення: Розведіть контрастний барвник (Еванс синій) 1:3000 в Промивальному Буфері і добре перемішати. Нахиліть контрастний барвник в блюдо для фарбування і інкубуйте слайди в ньому. Щодо часів інкубації зверніться до розділу Процедура Набору відповідно до посилання продукту. Еванс Синій охоплює неспецифічний фон флуоресценції. Процедура Набору відповідно до посилання продукту. Еванс Синій охоплює неспецифічний фон флуоресценції. Видаліть слайд(и) після інкубаційного періоду і промийте миючим буфером. Видаліть надлишки промивного буфера. Будь ласка, не висушуйте слайд будь-яким чином.
7.	Середовище для заливки: Додати достатній об'єм середовища для заливки вздовж середньої лінії кожного слайда. Обережно покладіть покривне скло в положення, уникаючи бульбашок повітря.
8.	Зчитування результатів: Зчитати результати слайдів негайно при 400-800 x загальному збільшенні з флуоресцентним мікроскопом. (490 нм фільтр збудження, 510 нм бар'єрний фільтр).

i. Робочий процес



13. ПОШУК І УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

ПОМИЛКА	МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ	РІШЕННЯ
Низька щільність клітин	<ul style="list-style-type: none"> – Лізис клітин після тривалого контакту з деіонізованою водою – Буфер розбризкано безпосередньо на субстрат в лунці 	Дотримуйтесь рекомендованої процедури промивання
Нерівномірна флуоресценція	Протеолітичні ферменти атакували субстрат	Інактивуйте сироватку
	Сироватка висохла в лунці, флуоресценція сильніша на краях	Завжди інкубуйте у вологому середовищі
	Сироватка не покриває лунку	Внесіть достатній об'єм досліджуваного матеріалу
	Перехресна реактивність між лунками	Уникайте розливання між лунками в першій інкубації
Дифузний малюнок	Маркування слайду восковим олівцем утворює плівку на слайді	Використовуйте стандартний (не восковий) олівець
	Мікроскоп неправильно відрегульований	Перевірте регулювання УФ-лампи
	Слайд інкубується в холодильнику без кришки	Покрити слайди з лаком для нігтів або парафіном
Мала чи відсутня флуоресценція	І.Ф. Мікроскоп брудний. Можливі подряпини на лінзі	Очистіть мікроскоп відповідно до інструкцій
	Кон'югат і слайди розморожені і заморожені	Зберігати кон'югат і слайди при температурі 2 -8 °C/35-46 °F.
	Контролі розведені	Ознайомтеся з інструкціями, використовуйте набори з готовими до використання контролями
	<ul style="list-style-type: none"> – Бактеріальне забруднення сироватки або кон'югату – Мікроскоп не відрегульований – Значення рН Буфера для Промивки занадто низьке (рН 7.4 ± 0.2) 	Перевірити умови
Флуоресценція фону	ФІТС-кон'югат піддається впливу світла	Зберігайте кон'югат в захищеному від світла
	<ul style="list-style-type: none"> – Неправильна промивка – Слайди висохли – Ліпемічна, гемолітична сироватка – Помилка мікроскопа 	<ul style="list-style-type: none"> – Перевірте інструкції по промиванню – Не допускайте висихання слайда – Використовуйте тільки свіжі сироватки – Перевірте правильність фільтра/об'єкта



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