

НАБІР НЕПРЯМОГО ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИ-НЕЙТРОФІЛЬНИХ ЦИТОПЛАЗМІЧНИХ АУТОАНТИТІЛ (ANCA)

54.100, AESKUSLIDES – ANCA

Каталог. №: 54.100
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.

ANCA

Стандартне посилання	Опис	Кількість тестів	Інші посилання
54.100	ANCA Етанол (12 лунок)	120	У тому числі демо посилання: xxx.Demo
54.101	ANCA Формалін (12 лунок)	120	
54.050	ANCA Етанол (6 лунок)	60	
54.051	ANCA Формалін (6 лунок)	60	

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

AESKUSLIDES ANCA є непрямим імунофлуоресцентним аналізом для виявлення анти-нейтрофільних цитоплазмичних аутоантитіл (ANCA) в сироватці крові людини.

Аналіз є інструментом для диференціальної діагностики ANCA-асоційованих васкулітів (AAV), таких як гранулематоз з поліангітом (Вегенера), мікроскопічний поліангіт і синдром Черджа-Стросса.

2. КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

(Див. оригінал інструкції)

Характеристика Антигену: нейтрофіли людини (гранулоцити), фіксовані або з етанолом або формаліном.

Перехресна реактивність: Як описано в розділі клінічне застосування, наявність ANA може дати шаблони флуоресценції, які можуть бути переплутані з P-ANCA/A-ANCA. В іншому випадку перехресної реактивності не спостерігалось.

Виявлення антитіл засноване на принципі непрямого імунофлуоресцентного аналізу (IIFA). Скляні 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 ANCA:

- Час контрастного фарбування: 30-90 секунд
- Рекомендований Скринінговий титр: 1:20

4. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

Анти-нейтрофільні цитоплазмичні антитіла (ANCA) мають важливе клінічне значення в оцінці судинних захворювань пацієнта.

Відповідний кінцевий титр – це титр, в якому сироватка пацієнта демонструє просту позитивну флуоресценцію. Слабка флуоресценція з титрами між 1:20 і 1:80 або невизначеність щодо клінічних результатів повинні бути перевірені шляхом моніторингу контролю. У такому випадку зразки повинні бути зібрані приблизно кожні 3 тижні, і аналогічно тестовані.

1:20	25 мкл сироватки	+ 475 мкл буфера для зразка
1:40	20 мкл сироватки	+ 780 мкл буфера для зразка (відповідно 1:2 розведення "1:20")
1:80	10 мкл сироватки	+ 790 мкл буфера для зразка (відповідно 1:2 розведення "1:40")
1:160	10 мкл сироватки	+ 1590 мкл буфера для зразка (відповідно 1:2 розведення "1:80")

І т.д.

Класична C-ANCA картинка показує зернисте однорідне забарвлення цитоплазми з мінімальним фарбуванням ядерної області.

P-ANCA картинка показує різко окреслене перинуклеарне фарбування (етанол-фіксовані нейтрофіли) або C-ANCA цитоплазмичний малюнок (формалін-фіксовані нейтрофіли).

5. СПЕЦИФІЧНІ РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

254 заморожених зразки були протестовані на AESKUSLIDE ANCA Етанол і AESKUSLIDES ANCA Формалін і були порівняні з реагентами виробництва іншої компанії. Зразки зберігали протягом декількох років, і вони представляють пацієнтів, яких оцінювали на васкуліт. Порівняння двох наборів було зроблено, щоб продемонструвати порівняльність двох незалежних виробників систем ANCA, включаючи послідовність малюнка.

Клінічні зразки представляли собою повний спектр аутоімунних захворювань.

5.1 Результати:

ANCA Ethanol AESKUSLIDES	predicate			
	c	p	neg	Total
c	93		2	95
p		37	2	39
neg	2		118	120
Total	95	37	122	254

Позитивна узгодженість 98.5% ((93+37/132))
 Негативна узгодженість 96.7% (118/122)
 Загальна узгодженість 97.6% ((130+118/254))

ANCA Formalin	predicate		
AESKUSLIDES	c	neg	Total
c	130	6	136
neg		118	118
Total	130	124	254

Позитивна узгодженість 100% (130/130)
 Негативна узгодженість 95.1% (118/124)
 Загальна узгодженість 97.6% ((130+118/254))

5.2 Відтворюваність і точність

Три різних ПАРТІЇ AESKUSLIDE для ANCA Етанол і ANCA Формалін кожна були протестовані з 10 зразками сироватки (4 MPO і PR3 позитивними і 2 негативними), які охоплюють повний набір малюнків. Ці зразки були розбавлені від 1:40 до 1:5120 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

ANCA

Дата:	Партія:	Фіксація
№ Слайду:	Оператор:	Етанол: Формалін:

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

7. СТАНДАРТНИЙ ВМІСТ НАБОРУ

7.1 Стандартні набори

№ Набору	Опис набору	СЛАЙДИ (10x в кожному наборі)			КОН'ЮГАТ (1x)			Позитивний контроль (1x 0.5 мл)	
		Посилання	Лунки	Покриті з	Посилання	Об'єм	Опис	Посилання	Опис
54.100	ANCA Етанол (12 лунок)	s54.100	12	нейтрофіли людини (етанол фіксація)	C54.100	4 мл	IgG Синій ковпачок: Розчин біло-синього кольору. Містить: BSA, Твін, анти-людське антитіло, мічене флуоресцеїном (FITC)	PC54.100	ANCA контроль малюнку C-ANCA Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)
								PC54.101	ANCA контроль малюнку P-ANCA Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)
54.101	ANCA Формалін (12 лунок)	s54.101	12	нейтрофіли людини (етанол фіксація)	C54.101	4 мл	IgG Синій ковпачок: Розчин біло-синього кольору. Містить: BSA, Твін, анти-людське антитіло, мічене флуоресцеїном (FITC)	PC54.100	ANCA контроль малюнку C-ANCA Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)
								PC54.101	ANCA контроль малюнку P-ANCA Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)
54.050	ANCA Етанол (6 лунок)	s54.050	6	нейтрофіли людини (етанол фіксація)	C54.050	2 мл	IgG Синій ковпачок: Розчин біло-синього кольору. Містить: BSA, Твін, анти-людське антитіло, мічене флуоресцеїном (FITC)	PC54.100	ANCA контроль малюнку C-ANCA Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)
								PC54.101	ANCA контроль малюнку P-ANCA Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)
54.051	ANCA Формалін (6 лунок)	s54.051	6	нейтрофіли людини (етанол фіксація)	C54.051	2 мл	IgG Синій ковпачок: Розчин біло-синього кольору. Містить: BSA, Твін, анти-людське антитіло, мічене	PC54.100	ANCA контроль малюнку C-ANCA Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0.1% (консервант)

						флуоресцеїном (FITC)	PC54.101	ANCA контроль малюнку P-ANCA Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведена), 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

a. Загальні Реагенти

Посилання	Реагент	Кількість/Об'єм		Опис	Готовність до використання
NCANCA	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: БСА, 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.

b. 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. Стигальна 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

a. Дані про безпеку 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 подразнючі 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.

b. 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

а. Підготовка перед піпетуванням

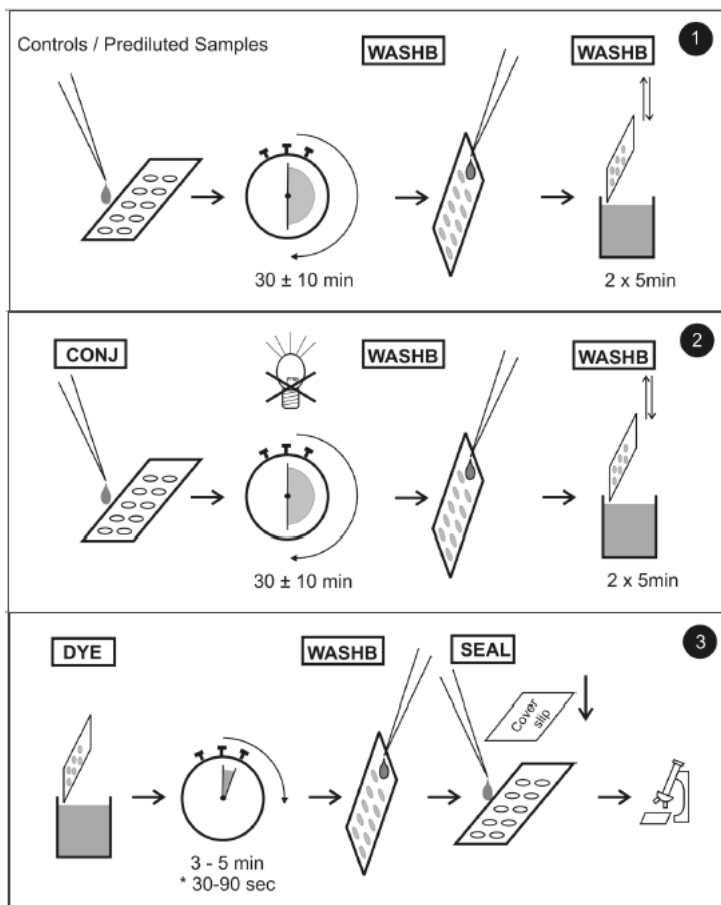
Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-26 °C/64-78.8 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої схеми інкубації для оптимального виконання тесту.

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, ЕМА 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.

б. 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. Уникати безпосереднього контакту твердих предметів з субстратом. Для отримання оптимальних результатів замінити 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 кожну 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 замінити 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. 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).

с. Робочий процес



13. ПОШУК І УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

ПОМИЛКА	МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ	РІШЕННЯ	
Низька щільність клітин	– Лізис клітин після тривалого контакту з деіонізованою водою	Дотримуйтесь рекомендованої процедури промивання	
	– Буфер розбризкано безпосередньо на субстрат в лунці		
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	
	– Бактеріальне забруднення сироватки або кон'югату	Перевірити умови	
Флуоресценція фону	– Мікроскоп не відрегульований	Зберігайте кон'югат в захищеному від світла	
	– Значення рН Буфера для Промивки занадто низьке (рН 7.4 ± 0.2)		
	– ФІТС-кон'югат піддається впливу світла		
	– Неправильна промивка		– Перевірте інструкції по промиванню
	– Слайди висохли		– Не допускайте висихання слайда
– Ліпемічна, гемолітична сироватка	– Використовуйте тільки свіжі сироватки		
– Помилка мікроскопа	– 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