

НАБІР

ДЛЯ НАПІВКІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АУТОАНТИТІЛ КЛАСУ IgG ДО ДВОСПІРАЛЬНОЇ ДНК, НУКЛЕОСОМ, SS-A (52 ТА 60 kDa), SS-B, Sm, RNP/Sm, Scl-70, Jo-1 І ЦЕНТРОМЕРА В МЕТОДОМ ІМУНОБЛОТУ НА МЕМБРАНІ

ORG 711, Nucleo-9-Line

Каталог. №: **ORG 711**

Методика від 08-2012

Кількість : 8 і 16

Виробник : **ORGENTEC GmbH,**
(Німеччина)



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

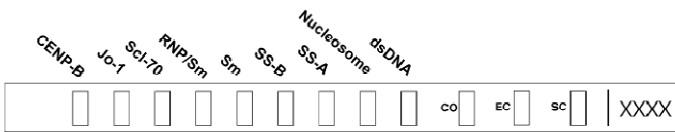
НАЗВА І ПРИЗНАЧЕННЯ ЗАСТОСУВАННЯ

Набір призначений для напівкількісного визначення аутоантитіл класу IgG до двоспіральної ДНК, нуклеосом, SS-A (52 та 60 kDa), SS-B, Sm, RNP/Sm, Scl-70, Jo-1 і Центромера В в сироватці або плазмі людини. Аналіз призначений тільки для діагностики in vitro.

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ (Див. Оригінал інструкції).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Високо очищені антигени двоспіральної ДНК, нуклеосом, SS-A (52 та 60 kDa), SS-B, Sm, RNP/Sm, Scl-70, Jo-1 і Центромера В, а також три контрольні антигени для cut-off контролю СО, Контролю ферментного кон'югату ЕС і Сироваткового контролю SC нанесені на нітроцелюлозні мембранні смужки. Аутоантитіла, присутні в сироватці або плазмі, зв'язуються з іммобілізованим антигеном. Промивання смужок видаляє незв'язані антигенні компоненти зразка. Лужна фосфатаза, кон'югована анти-людським IgG, виявляє зв'язані зразки антитіл, формуючи комплекс кон'югат/антитіло/антиген. Промивання смужок видаляє незв'язаний кон'югат. Субстрат BCIP/NBT гідролізується за допомогою зв'язаного ферментного кон'югату з утворенням нерозчинного продукту синьо-фіолетового кольору. Промивання смужок видаляє негідролізований субстрат і зупиняє реакцію. Інтенсивність кольору прямо пропорційна концентрації IgG антитіл, присутніх у вихідному зразку.



ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Всі реагенти набору призначені тільки для професійної діагностики в лабораторних умовах.
 - Бичачий сироватковий альбумін (BSA), використовуваний в компонентах, була протестований на BSE і виявився негативним.
 - Уникати контакту з субстратом BCIP/NBT.
 - Буфер для зразків і промивний буфер містять азид натрію 0,09% як консервант. Ця концентрація класифікується як безпечна.
 - Ферментний кон'югат містить 0,05% Проклін в якості консерванту. Ця концентрація класифікується як безпечна.
- Під час роботи з усіма реагентами, контролями і зразками сироватки дотримуватися існуючих правил лабораторної безпеки та належної лабораторної практики:

- Заходи першої допомоги: При попаданні на шкіру, негайно ретельно промити водою з милом. Зняти забруднений одяг і взуття і випрати їх перед використанням. Після контакту з очима ретельно промити відкриті очі проточною водою протягом не менше 10 хвилин. Зверніться до лікаря, якщо це необхідно.
- Особиста безпека, захисне спорядження і надзвичайні заходи: Дотримуватися лабораторних правил безпеки. Уникати контакту зі шкірою та очима. Не ковтати. Не піпетки ротом. Не їсти, не пити, не курити, не наносити макіяж в зонах роботи з реагентами. При

розливанні зберіть за допомогою інертного матеріалу і помістіть у відповідну ємність для утилізації відходів.

- Захист від опромінення/Засоби індивідуального захисту: Використовувати захисні рукавички з нітрілкаучука або натурального латексу.
- Користуйтеся захисними окулярами. При відповідному використанні ніяких небезпечних реакцій невідомо.
- Несприятливі умови: Так як розчин субстрату є світлочутливим, зберігайте його в темряві.
 - Для утилізації лабораторних відходів національне або регіональне законодавство повинно дотримуватися.
 - Дотримуйтесь рекомендації з забезпечення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контрольних сироваток.

ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Зберіть зразки крові, використовуючи звичайну медичну техніку забору крові, уникаючи гемолізу.
- Відділити сироватку від клітин центрифугуванням після утворення згустків.
- Слід уникати тестування гемолізованих або ліпемічних зразків, проте ні ліпемія, ні гемоліз не роблять істотного впливу на аналіз.
- Зразки можуть зберігатися при охолодженні до 2 - 8 °C до 5 дб. Для більш тривалого зберігання (до шести місяців) зразки слід заморозити до -20 °C.
- Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання зразків сироватки.
- Не рекомендується проводити тестування деактивованих нагріванням зразків сироватки.

ВМІСТ НАБОРУ

ORG 711-16	Достатньо для проведення 16 аналізів
ORG 711-08	Достатньо для проведення 8 аналізів
1x/2x 8	8 антиген покриттям нітроцелюлозних смужок з антигенним покриттям. Готові до використання. 1 попередньо розроблена калібрувальна смужка (кодується CAL) для напівкількісної оцінки. Готова до використання. Код продукту на смужці: 760
1 x 20 мл	Буфер для розведення зразків PB: жовтий; містить PBS, BSA, миючий засіб, консервант азиду натрію 0,09%.
1 x 15 мл	Ферментний кон'югат, що містить антилюдські антитіла IgG, мічені лужною фосфатазою; містить PBS, BSA, детергент, консервант Проклін 0,05%, світло-червоний. Готовий до використання.
1 x 20 мл	Буферний розчин для промивання WB, містить Tris, детергент, консервант азид натрію 0,09%; концентрат (50x)
1x/2x 13 мл	Субстрат BCIP; містить BCIP/NBT. Готовий до використання. Інкубаційний лоток
1x	Інструкція по застосуванню: ІФА Міні-CD0
1x	Сертифікат аналізу

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

- Піпетки на 10 мкл і 1000 мкл
- Дистильована або деіонізована вода
- Мірний циліндр на 1000 мл
- Лабораторний таймер
- Платформа, що коливається
- Пінцет

ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

- Зберігати набір при 2-8 °C.
- Зберігати нітроцелюлозні смужки ретельно запечатаними в оригінальній пластиковій упаковці з осушувачем.
- Увага: калібрувальна смужка дуже світлочутлива. Зберігати в темряві!
- Не піддавати реагенти впливу тепла, сонця або яскравого світла під час зберігання та використання.
- Нерозпечатаний тест-набір стабільний протягом 18 місяців з дати виробництва. Дивитися дату на зовнішніх етикетках для окремих партій.
- Розведений промивний буфер стабільний протягом принаймні 30 днів при зберіганні при температурі 2-8 °C. Ми рекомендуємо споживання в той же день.

ЗАУВАЖЕННЯ ПО ПРОВЕДЕННЮ ТЕСТУ

- Не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну їх придатності.
- Не міняйте компоненти наборів з різних лотів
- Дозвольте всім компонентами набору і зразкам досягти кімнатної температури (20-28 °C) перед використанням.
- Всі реагенти повинні бути готові до використання перед початком тестування. Для отримання найбільш надійних і відтворених результатів аналіз повинен проводитися без будь-яких змін чи зупинок між етапами.

- Будь ласка, виконуйте послідовність кроків, наведену в цій інструкції.
- Завжди використовуйте свіжоприготовані розведення зразків.
- Для уникнення перехресної контамінації, міняйте наконечники при внесенні кожного нового зразка.
- Необхідно точно дотримуватися часу всіх інкубацій
- Контрольні сироватки або пули повинні завжди аналізуватися спільно з іншими зразками, при тих же умовах, для перевірки якості виконання методики та реагентів.
- Нітроцелюлозні смужки необхідно брати в рукавичках або пінцетом.
- Переконайтеся, що на смужці під час інкубації немає бульбашок повітря. Наявність бульбашок може призвести до нерівномірного фарбування ліній і неправильної інтерпретації результатів.

ПРИГОТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ

Приготування буфера для промивок

Розбавте вміст кожного флакона з 50-кратним концентратом промивального буфера дистильованою або деіонізованою водою до кінцевого об'єму 1000 мл перед використанням.

Розчинник

Готовий до використання.

Підготовка зразків

Див розділ Процедура тесту. Ефективне розбавлення складає 1:101.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

Обережно вставте одну нітроцелюлозну смужку за допомогою пінцета в інкубаційну камеру:

- Додайте **1.0 мл буфера для зразків** на смужку у кожную камеру.
- Дозвольте системі урівноважитися протягом 5 хвилин при повільному похитуванні.
- Додайте **10 мкл сироватки пацієнта** прямо в інкубаційну камеру.
- Інкубуйте протягом **60 хвилин** в умовах повільного похитування при кімнатній температурі (20-28 °C).
- Обережно повністю видаліть розведений зразок з камери.
- Додайте 2.0 мл промивного буфера в камеру, інкубуйте протягом 5 хвилин.
- Видаліть промивний буфер повністю. Повторіть цю процедуру двічі.
- Додайте **1.0 мл ферментного кон'югату** в кожную інкубаційну камеру.
- Інкубуйте протягом **30 хвилин** в умовах повільного похитування при кімнатній температурі.
- Повністю видаліть розчин кон'югату з камери.
- Додайте 2.0 мл промивного буфера в камеру, інкубуйте протягом 5 хвилин.
- Видаліть промивний буфер повністю. Повторіть цю процедуру двічі.
- Додайте **1.0 мл субстрату** на смужку у кожную камеру.
- Інкубуйте протягом **10 хвилин** в умовах повільного похитування при кімнатній температурі.
- Видаліть Субстрат повністю.
- Додайте 1.0 мл дистильованої води в камеру, інкубуйте на протязі 5 хвилин.
- Повністю видаліть воду. Повторіть процедуру двічі.

Ретельно промокніть смужки промокальним папером. Дозволити смужкам висохнути на повітрі, перш ніж проводити оцінку з калібрувальною смужкою.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Аналіз вважається дійсним, якщо всі три контрольні лінії (**CO** Cut-off Контроль, **EC** Контроль Ферментного кон'югату і **SC** Сироватковий Контроль) показують зміну субстрату в плані синьо-фіолетових ліній! Якщо цей критерій не виконується, аналіз є недійсним і повинен бути повторений.

Примітка: Сумнівні зразки слід протестувати знову або перевірити за допомогою альтернативної процедури. Зразки від пацієнтів з діагнозом аутоімунних захворювань часто показують кілька особливостей аутоантитіл. Такі зразки можуть показати позитивну реакцію з більш ніж одною лінією антигену.

ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Інтенсивність **синьо-фіолетової лінії** в позиції нанесеного антигену прямо пропорційна концентрації IgG антитіл, присутніх у зразку.

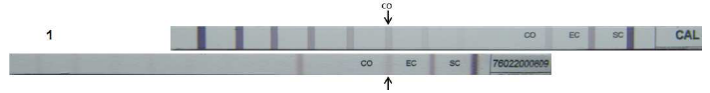
Напівкількісна оцінка смужки зі зразком:

негативний	інтенсивність лінії зразка пацієнта слабкіша за інтенсивність СО-лінії
сумнівний	інтенсивність лінії зразка пацієнта еквівалентна інтенсивності СО-лінії
слабо позитивний	інтенсивність лінії зразка пацієнта до 1 рівня сильніша за інтенсивність СО-лінії
позитивний	інтенсивність лінії зразка пацієнта до 2 рівнів сильніша за інтенсивність СО-лінії
сильно позитивний	інтенсивність лінії зразка пацієнта ≥ 3 рівні сильніша за інтенсивність СО-лінії

Інтерпретація інтенсивності синьо-фіолетових ліній:

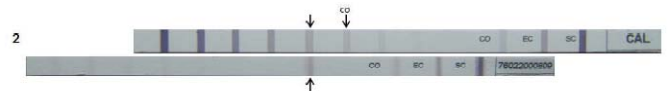
- Порівняти інтенсивність **СО-лінії смужки зразка** до інтенсивності ліній калібрувальної смужки.

Приклад:



- Порівняти інтенсивність **лінії зразка пацієнта** до інтенсивності ліній калібрувальної смужки.

Приклад: Інтерпретація інтенсивності лінії зразка пацієнта як "слабкий позитивний".



ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

Калібрування

Система аналізу калібрується проти міжнародно визнаної контрольної сироватки від CDC, Атланта США.

Діапазон вимірювання

Оцінка інтенсивності синіх ліній, описаних вище, дозволяє провести напівкількісне визначення аутоантитіл класу IgG у зразку в кількісних діапазонах:

негативний, сумнівний, слабо позитивний, позитивний, сильно позитивний.

Очікувані значення

У нормальному діапазоні дослідження із зразками від здорових донорів крові такі діапазони були встановлені в цьому аналізі.

Cut-off: граничне значення

Інтерпретація результатів

Нормальний: негативний

Підвищений: слабопозитивний, позитивний, сильно позитивний

Лінійність

Зразки пацієнтів, що містять високі рівні специфічних антитіл, серійно розводили в буфері для зразків. Активність кожного кроку розбавлення визначали з використанням калібрувальної смуги.

Лінійність				
Зразок	Розведення	Отримане	Очікуване	От/Оч
1	1:100	Сильно позит.	Сильно позит.	PASS
.	1:200	Позит.	Позит.	PASS
.	1:400	Слабо позит.	Слабо позит.	PASS
.	1:800	Сумнівний	Сумнівний	PASS
.	1:1600	Негативний	Негативний	PASS
2	1:100	Сильно позит.	Сильно позит.	PASS
.	1:200	Позит.	Позит.	PASS
.	1:400	Слабо позит.	Слабо позит.	PASS
.	1:800	Сумнівний	Сумнівний	PASS
.	1:1600	Негативний	Негативний	PASS

Чутливість

Цей аналіз імуноблотингу є напівкількісним методом аналізу. Будь-яка реактивність менше граничної вважається негативною і не можуть бути визначена кількісно далі.

Відтворюваність

Точність всередині аналізу: Коефіцієнт варіації (CV) розраховували для кожного з трьох зразків з результатів 24 визначень в одному аналізі. Результати для точності в межах аналізу наведені в таблиці нижче.

Міжсерійна точність: Коефіцієнт варіації (CV) розраховували для кожного з трьох зразків за результатами 6 визначень в 5 різних

аналізах. Результати для виконання до запуску точності наведені в таблиці нижче.

В середині аналізу			Між аналізами		
Зразок	Середнє значення	Результат	Зразок	Середнє значення	Результат
1	Негативний	PASS	1	Негативний	PASS
2	Слабкий	PASS	2	Слабкий	PASS
3	Позитивний	PASS	3	Позитивний	PASS



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

Інтерферуючі речовини

Не спостерігалось інтерференції при тестуванні зразків з гемолізом (до 1000 мг/дл), ліпемією (до 3 г/дл тригліцеридів) або підвищеним вмістом білірубину (до 40 мг/дл). Не спостерігалось будь-якого впливу при використанні антикоагулянтів. Однак, не рекомендується використовувати зразки з сильним гемолізом або ліпемією.

Результати досліджень

<u>Study population</u>	<u>n</u>	<u>n pos</u>	<u>%</u>
SLE	25	23	92.0
Sjogren's Syndrome	15	14	93.3
MCTD	10	9	90.0
Scleroderma	5	5	100.0
CREST	5	5	100.0
Disease controls (Rheumatoid)	20	1	5.0
Normal human sera	80	2	2.5

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 711	Pos	56	3	160
Nucleo-9-line	Neg	4	97	
		60	100	
Sensitivity:	93.3 %			
Specificity:	97.0 %			
Overall agreement:	95.6 %			

ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Цей аналіз призначений в якості діагностичної допомоги. Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах одного тесту, він повинен бути зроблений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень.

Також кожне рішення для терапії слід приймати індивідуально.

СХЕМА ІНКУБАЦІЇ

- 1 Вставте **блот-смужку** в інкубаційну камеру
 - Додайте **1000 мкл** буфера для розведення зразків в інкубаційну камеру.
 - Інкубуйте з перемішуванням протягом **5 хвилин**
- 2 Додайте **10 мкл** сироватки пацієнта і ресуспендуйте
 - Інкубуйте з перемішуванням протягом **60 хвилин**
 - Видаліть реакційну суміш і промийте 3 рази по **5 хвилин 2000 мкл** промивного буфера, видаліть Промивний буфер
- 3 Додайте **1000 мкл** Ферментного кон'югата на смужку
 - Інкубуйте з перемішуванням протягом **30 хвилин**
 - Видаліть реакційну суміш і промийте 3 рази по **5 хвилин 2000 мкл** промивного буфера, видаліть Промивний буфер
- 4 Додайте **1000 мкл** Субстрату на смужку
 - Інкубуйте з перемішуванням протягом **10 хвилин**
 - Видаліть реакційну суміш і промийте 3 рази по **5 хвилин 1000 мкл** дистильованої води, висушіть блот-смужки. Зчитайте результати тільки після повного висихання смужки.

