

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЕ (МРО) И/ИЛИ ПРОТЕИНАЗЕ-3 (PR-3) В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

1681-2, ANCA Screen IgG

Каталог. № : 1681-2
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 06-28-2013



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Кат.№	1681-2Z
Тест	ANCA Screen IgG ELISA
Метод	Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигеном планшет
Диапазон обнаружения	Количественный Положительный; Отрицательный и пороговое значение (cut-off)
Образец	10 мкл
Специфичность	94.90 %
Чувствительность	97.40 %
Общее время	~ 60 минут
Срок хранения	12 месяцев

**Лабораторные анализы не могут быть единственными критериями для медицинского заключения. История болезни пациента и последующие тесты должны быть приняты во внимание*

ПРИНЦИП ИФА

Настоящая система анализа разработана для обнаружения антител класса IgG к МРО и/или PR-3 в человеческих сыворотках. Пластмассовые лунки микропланшета синтезируются пассивным поглощением с антигенами ENA. Процедура анализа включает три инкубационных этапа:

1. Анализируемые сыворотки (должным образом разбавлены) инкубируются в микролуках, покрытых МРО (антигеном). Анти-МРО специфические IgG антитела в образце связываются с зафиксированным антигеном. Для удаления несвязанного антитела и других серологических компонентов промывается планшет.
2. В лунки добавляется пероксидаза, конъюгированная козлиным анти-человеческим IgG, и планшет инкубируется. Конъюгат вступит в реакцию с антителом, зафиксированным в твердой фазе на этапе 1. Для удаления не вступившего в реакцию конъюгата промываются лунки.
3. Лунки на микротитровальном планшете, содержащие зафиксированный конъюгат пероксидазы, инкубируются с раствором субстрата пероксидазы. Гидролиз субстрата пероксидазой производит изменение цвета. После некоторого времени реакция останавливается, и интенсивность цвета раствора измеряется фотометрически. Интенсивность цвета раствора зависит от концентрации антител в образце для анализа.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Рекомендуется проводить забор образцов в соответствии с NCCLS документом M29: Защита сотрудников лабораторий от инфекционных болезней.
2. Ни один из известных методов не может обеспечить полную уверенность в том, что образцы человеческой крови не способны передавать инфекцию. Поэтому, все производные крови должны считаться потенциально инфекционными.
3. В этом анализе должны использоваться только недавно собранные и должным образом сохраненные сыворотки крови, полученные одобренными асептическими процедурами венопункции. Никакие антикоагулянты или консерванты не должны добавляться. Избегайте использования

гемолизированных, липемических или бактериологически загрязненных сывороток.

4. Храните образец при комнатной температуре не более 8 часов. Если анализ не выполняется в пределах 8 часов, сыворотки могут храниться при 2-8°C не более чем 48 часов. Если ожидается задержка в анализе, храните сыворотки для анализа при -20°C или ниже. Избегайте циклов многократного замораживания / размораживания, которые могут вызывать потерю активности антител и давать ошибочные результаты.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Требуемые, но не поставляемые дополнительные материалы

- Считывающее устройство ИФА, способное к считыванию при длине волны 450 нм.
- Микропипетки, с точностью подачи 10 - 200 мкл.
- Регулируемая многоканальная пипетка (50-200 мкл) для распределения конъюгата, субстрата и стоп раствора.
- Резервуары для регентов для многоканальных пипеток.
- Промывочная бутылка или система промывки планшета.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Мерный цилиндр с делениями на 1 литр.
- Серологические пипетки.
- Одноразовые наконечники.
- Бумажные полотенца.
- Таймер для наблюдения за этапами инкубации.
- Емкость для отходов и дезинфицирующее средство (например: гипохлорид натрия 0.5 %, 10 % бытовое отбеливающее вещество).

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Каждый набор в достаточных количествах содержит следующие компоненты, необходимые для проведения количественных анализов, указанных на этикетке упаковки. Замечание: Все активные реагенты содержат азид натрия как консервант в концентрации 0.1 % (масса/объем).

Реагенты

1. **Планшет:** Двенадцать полосок 1x8, покрытых смесью ферментов Миелопероксидазы (МРО) и Протеиназы (PR3). Полоски упакованы в держателе для полосок и загерметизированы в пакете с осушителем.
2. **Конъюгат:** Конъюгированный (пероксидазой хрена) козлий анти-человеческий IgG (γ-цепь специфический). Готов к использованию. Один 15 мл флакон с белой крышкой.
3. **Положительный контроль (человеческая сыворотка):** Один 0.35 мл флакон с красной крышкой.
4. **Калибратор (человеческая сыворотка):** Один 0.5 мл флакон с синей крышкой.
5. **Отрицательный контроль (человеческая сыворотка):** Один 0.35 мл флакон с зеленой крышкой.
6. **Разбавитель образцов:** Одна 30 мл бутылка (зеленая крышка), содержащая Tween-20, BSA и PBS, pH 7.2 ± 0.2. Готов к использованию. **Примечание:** перед использованием хорошо встряхнуть. **ПРИМЕЧАНИЕ:** В присутствии сыворотки разбавитель изменяет цвет.
7. **ТМБ:** Одна 15 мл янтарная бутылка, содержащая 3,3',5,5'-Тетрамтилбензидин (ТМБ). Готов к использованию. Одержит D_{SMO} < 15% (w).
8. **Стоп раствор:** Одна бутылка 15 мл (красная крышка) 1M H₂SO₄, 0.7M HCl. Готов к использованию.
9. **Концентрат промывочного буфера (10x):** разбавить 1 часть концентрата + 9 частей деионизированной или дистиллированной воды. Одна 100 мл бутылка (прозрачная крышка), содержащая фосфат-буферизованный солевой раствор и Tween-20. 10X концентрат. Раствор синего цвета. **ПРИМЕЧАНИЕ:** 1X раствор имеет pH 7.2 ± 0.2.

Следующие компоненты не зависят от определенной партии и могут использоваться взаимозаменяемо с ИФА: ТМБ, стоп раствор, промывочный буфер.

Набор также содержит:

1. Перечень компонентов внутри упаковки набора с указаниями их партий.
2. Вкладыш с инструкциями по применению.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Хранить невскрытый набор при 2-8°C.
2. Покрытые антигеном микролуночные полоски: лишние полоски должны быть немедленно повторно запечатаны с высушивающим средством и возвращены для хранения при 2-8°C. Полоски устойчивы в течение 60 дней после того, как оболочка была открыта и должным образом вторично закрыта, и индикатор остается синим.
3. Конъюгат. Хранить при 2-8°C. НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.

4. Калибратор, положительный и отрицательный контроли: Хранить при 2-8°C.
5. ТМВ. Хранить при 2-8°C.
6. Концентрат промывочного буфера. Хранить при 2-25°C. Стабилен в течение 30 дней при 2-8°C после разбавления к 1X, или 7 дней если хранить при комнатной температуре.
7. Разбавитель. Хранить при 2-8°C.
8. Стоп раствор. Хранить при 2-25°C.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Во время каждой процедуры анализа необходимо включать Калибратор трижды. Бланк реагент, отрицательный контроль, и положительный контроль также должны быть включены в каждом анализе.
2. Вычислить среднее значение 3 лунок Калибратора. Если любое из трех значений отличается более чем на 15% от среднего, отбросить это значение и вычислить среднее двух оставшихся значений.
3. Среднее значение ОП для калибратора и значения ОП для положительных и Отрицательных контролей должны укладываться в следующие диапазоны:

	Диапазон ОП
Отрицательный Контроль	≤ 0.250
Калибратор	≥ 0.300
Положительный Контроль	≥ 0.500

- a. ОП отрицательного контроля, разделенное на среднее ОП калибратора должно быть $\leq 0,9$.
- b. ОП положительного контроля, разделенное на среднее ОП калибратора должна быть $\geq 1,25$.
- c. Если вышеуказанные условия не выполняются, испытание должно считаться недействительным и должно быть повторено.
4. Положительный и Отрицательный контроли предназначены для отслеживания существенного отклонения в работе реагента и не гарантирует точность порогового значения диапазона.
5. Дополнительные Контроли могут быть протестированы в соответствии с рекомендациями или требованиями местных, государственных и/или федеральных правил или аккредитованных организаций.
6. Обратитесь к документу NCCLS C24: Статистический Контроль Качества для Количественного Измерения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Извлеките отдельные компоненты набора, и позвольте им нагреться до комнатной температуры (20-25°C).
2. Определите требуемое количество микролунок. Проведите 6 определений контролей/калибраторов (1 бланк, 1 отриц. контроль, 3 калибраторов и 1 полож. контроль) в процедуре. Бланк реагент должен анализироваться в каждой процедуре. Для правильности настройки конфигурации контролей/калибратора проверьте ПО и требования к считывателю. Ненужные для анализа полоски необходимо положить в запечатывающийся мешочек, герметично закрыть и вернуть на хранение при 2-8°C.

ПРИМЕР СХЕМЫ ПЛАНШЕТА		
	1	2
A	Бланк	Пациент 3
B	Отриц. контроль	Пациент 4
C	Калибратор	и т.д.
D	Калибратор	
E	Калибратор	
F	Полож. контроль	
G	Пациент 1	
H	Пациент 2	

3. Приготовить 1:21 разбавление (напр.: 10 мкл сыворотки + 200 мкл разбавителя образца). **Примечание:** хорошо встряхните перед использованием) положительного и отрицательного контролей, положительного калибратора и каждой сыворотки пациента.
4. Добавьте по 100 мкл каждого разбавленного контроля, калибратора и образца. Убедитесь, что образцы должным образом перемешаны. Для каждого образца используйте отдельный наконечник.
5. Добавьте 100 мкл разбавителя образца в лунку A1 как бланк реагент. Для правильности настройки конфигурации лунки бланк реагента проверьте ПО и требования к считывателю.
6. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°C) в течении 25 ± 5 минут.
7. Промойте микролуночные полоски 5х.

A. Ручная процедура промывки

- a. Энергично встряхните жидкость из лунок.

- b. Заполните каждую лунку промывочным буфером. Удостоверитесь в отсутствии в лунках воздушных пузырьков.
- c. Повторите этап a. и b., чтобы в сумме было пять промывок.
- d. Вытряхните промывочный раствор из всех лунок. Переверните планшет на бумажное полотенце жестко постучите, чтобы удалить из лунок любой остаток промывочного раствора. Осмотрите планшет, убедившись в отсутствии остатка промывочного раствора. В конце каждого рабочего дня собирайте промывочный раствор в контейнер для отходов, и обрабатывайте гипохлоритом натрия 0.5% (10% бытовым отбеливателем).

B. Автоматизированная процедура промывки

- При использовании автоматизированной моечной установки, отрегулируйте объем распределения на 300-350 мкл/лунку. Настройте цикл промывки на 5 промывок без задержки между промывками. Извлеките микротитровальный планшет из промывателя, переверните планшет на бумажное полотенце и жестко постучите, чтобы удалить из лунок любой остаток промывочного раствора.
8. Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую лунку в том же темпе и порядке что и образцы, включая лунку бланк реагента.
 9. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25°C) в течение 25 ± 5 минут.
 10. Промойте микролуночки, следуя процедуре в п. 7.
 11. Добавьте 100 мкл ТМВ раствора субстрата в каждую лунку в том же темпе и порядке как добавлялись образцы.
 12. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°C) в течение 10-15 минут.
 13. Добавьте 50 мкл стоп раствора в каждую лунку в том же темпе и порядке как добавлялся ТМВ раствор. Положительные образцы из синего цвета станут желтыми. После добавления стоп раствора постучите по планшету несколько раз убедившись, что образцы полностью смешаны.
 14. Настройте считывающее устройство для считывания при длине волны 450 нм и измерьте оптическую плотность (ОП) каждой лунки против бланк реагента. Планшет необходимо считать в пределах 30 минут после добавления стоп раствора.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

A. Вычисления

1. Коэффициент коррекции

Значение предела обнаружения ОП для положительных образцов было определено производителем и скорректировано по отношению к калибратору. Коэффициент коррекции (КК) дает возможность определить значение предела обнаружения для положительных образцов и исправить незначительные ежедневные отклонения в результатах анализа. КК определяется для каждой партии компонентов наборов и указывается в в перечне компонентов, поставляемом в упаковке набора.

2. Значение предела обнаружения ОП

Для получения значения предела обнаружения ОП умножьте КК на среднее ОП калибратора, определенное выше.

(КК x среднее калибратора = значение предела обнаружения ОП)

3. Коэффициенты значений или коэффициенты ОП

Вычислите коэффициент значения или коэффициент ОП для каждого образца путем деления его значения ОП на предел обнаружения ОП из этапа 2.

Пример:

Среднее ОП калибратора = 0,793
 Коэффициент коррекции (КК) = 0,25
 ОП предела обнаружения = 0,793 x 0,25 = 0,198
 ОП неизвестного образца = 0,432
 Коэффициент значения образца или коэффициент ОП = 0,432/0,198 = 2,18

B. Интерпретация

Коэффициенты значений или коэффициенты ОП представлены следующим образом: изготовитель установил следующие рекомендации для интерпретации образцов пациентов:

Отрицательные образцы ≤ 0.90
 Сомнительные образцы 0.91-1.09
 Положительные образцы ≥ 1.10

1. Коэффициент ОП ≤ 0.90 не указывает на обнаруживаемые IgG антитела к миелопероксидазе или протеиназе-3.
2. Коэффициент ОП ≥ 1.10 реактивен для IgG антител к миелопероксидазе или протеиназе-3. Результаты этой системы анализа являются качественными; значения коэффициента в реактивном диапазоне не указывают на количество присутствующих антител.

3. Образцы со значениями коэффициента ОП в сомнительном диапазоне (0.91-1.09) должны анализироваться повторно. Образцы, которые остаются сомнительными после повторного анализа должны анализироваться дополнительной серологической процедурой.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностического использования *in vitro*.
2. Микролуночные полоски не содержат каких либо жизнеспособных возбудителей инфекций. Однако, полоски должны рассматриваться как потенциально инфекционные, требующие соответствующего обращения. Промывочные растворы должны собираться в емкости для утилизации и обрабатываться в конце рабочего дня 0.5 % гипохлоридом натрия (10 % бытовым отбеливающим веществом).
3. Не использовать планшет ИФА, если полоска индикатора на мешочке высушивающего средства превратилась из синего цвета в розовый.
4. Вытрите дно планшета не оставляя жидкости и /или отпечатком, которые могут изменить оптическую плотность (ОП) считываний.
5. Контрольные сыворотки, конъюгат и промывочный буфер содержат консервант, который может быть ядовит при заглатывании; тимеросал при концентрации 0.04 % (w/v). Растворитель образца содержит азид натрия в концентрации 0.1 % (w/v).
6. Азид натрия считается таким, который образует азиды свинца и меди во внутренней канализации лаборатории. Что может вызвать взрыв при ударе. Во избежание этого, тщательно промойте раковину водой после утилизации раствора с азидом натрия.
7. Разбавление или примешивание этих реактивов могут приводить к потере чувствительности.
8. Не подставляйте реагенты от наборов с различными номерами партий или от других изготовителей.
9. Каждая донорская единица, использованная в подготовке контролей, оказалась отрицательной на наличие поверхностного антигена гепатита В и антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, и вирусу гепатита С. при анализе методикой, утвержденной FDA. Поскольку никакой метод анализа не может полностью гарантировать отсутствие ВИЧ, вируса гепатита В или других возбудителей инфекций, эти образцы/реактивы, также как образцы пациентов, должны использоваться с соблюдением 2 уровня биологической опасности как рекомендуется для любой потенциально инфекционной человеческой сыворотки или образца крови.
10. Никогда не пипетируйте ртом. Избегайте контакта реагентов и образцов пациентов с кожей или слизистыми оболочками.
11. Избегайте микробиологического загрязнения реагентов. Могут быть получены неправильные результаты.
12. Перекрестное загрязнение реагентов и/или образцов может вызвать ошибочные результаты.
13. Загрязнение субстратного ТМВ раствора с конъюгатом или другими окислителями преждевременно вызовет изменение цвета раствора. Не используйте субстратный раствор, если он начал становиться синим. Чтобы избежать возможности загрязнения, обратитесь к процедуре анализа, Раздел D.1.
14. Многократная стеклянная посуда должна быть вымыта и полностью ополоскана, чтобы освободиться от всех детергентов.
15. Четкое следование определенному времени и температуре инкубаций важно для точных результатов. Все реактивы должны быть приведены к температуре 20-25°C перед началом анализа.
16. Неправильное промывание приведет к ошибочно положительным или ошибочно отрицательным результатам. Убедитесь, что в планшетах не осталось любого остатка промывочного раствора перед добавлением конъюгата или раствора субстрата. Не позволяйте лункам высыхать между инкубациями.
17. Не позволяйте стоп раствору вступать в контакт с кожей или глазами. Если контакт происходит, немедленно смойте водой.
18. Предостережение: Жидкие отходы в кислоте рН должны быть нейтрализованы перед добавлением к гипохлориду натрия (отбеливающего вещества).
19. Избегайте разбрызгивания или образования аэрозолей.
20. Не подвергайте реагенты сильному свету в течение хранения или инкубации.
21. Приводя микролуночные полоски и держатель к комнатной температуре перед вскрытием, защитный конверт защитит лунки от конденсации.
22. Не позволяйте конъюгату вступать в контакт с емкостями, которые, возможно, прежде содержали растворы, имеющие в своем составе азид натрия как консервант. Остаточные количества азид натрия могут уничтожить ферментную деятельность конъюгата.

23. Не подвергайте никакой из реагентов воздействию растворов, содержащих отбеливающее вещество. Остаточное количество отбеливающего вещества (гипохлорида натрия) может уничтожить биологическую активность многих реагентов из этого набора.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Диагноз не должен основываться только на основании результатов ИФА ANCA Screen. Результаты анализов ANCA Screen должны интерпретироваться вместе с клинической оценкой и результатами других диагностических процедур.
2. Рабочие характеристики этого набора не были установлены для липемических, гемолизированных и желтушных образцов; поэтому, эти образцы не должны анализироваться с помощью этого набора.
3. Хотя ANCA Screen обнаруживает антитела, и к МРО и PR-3, анализ не различает их. Положительные ANCA Screen образцы должны проверяться отдельными ИФА компании Diagnostic Automation, Inc., чтобы определить, какое антитело присутствует.
4. Результаты этого анализа - не диагностическое доказательство присутствия или отсутствия болезни. Иммуноподавляющая терапия не должна начинаться, основываясь на положительном результате.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com