

# НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG АНТИТІЛ ДО САМАРІУ (Sm)

## 2557-2, Sm ELISA

Каталог. №: 2557-2

Методика від 09-19-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

<b>Аналіз</b>	<b>Sm/RNP ELISA</b>
<b>Метод</b>	<b>Імуноферментний аналіз твердої фази</b>
<b>Принцип</b>	<b>ІФА - непрямий; Планшет, покритий антигеном</b>
<b>Діапазон виявлення</b>	<b>Напівкількісний - позитивний, негативний і Cut-off</b>
<b>Зразок</b>	<b>10 мкл сироватки</b>
<b>Загальний час</b>	<b>~ 60 хвилин</b>
<b>Термін придатності</b>	<b>12 місяців від дати виробництва</b>
<b>Специфічність</b>	<b>99.3 %</b>
<b>Чутливість</b>	<b>100 %</b>

### ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір DAI ІФА Sm є системою для напівкількісного аналізу на виявлення антитіл IgG до Sm в сироватці людини. Коли аналіз здійснюється відповідно до цих інструкцій, його результати можуть допомогти в діагностиці та лікуванні аутоімунних захворювань сполучної тканини. Цей набір призначений для діагностичного використання in-Vitro.

### РЕЗЮМЕ І ОПИС (Див. оригінал інструкції).

#### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Тестова система Sm DAI розроблена для визначення IgG антитіл в сироватці людини. Лунки пластикових смужок мікропланшету синтезуються пасивним поглинанням з антигенами. Процедура аналізу включає 3 інкубаційних етапи:

- Сироватки, що аналізуються (належним чином розведені), інкубуються в мікролунках, покритих антигеном. Будь-яке специфічне для антигену антитіло в зразку зв'язується з зафіксованим антигеном. Для видалення незв'язаного антитіла та інших компонентів сироватки планшет промивається.
- В лунки додається кон'югований пероксидазою козячий анти-людський IgG (специфічний γ-ланцюжок) і планшет інкубується. Кон'югат взаємодіє з антитілами, зафіксованими у твердій фазі етапу 1. Для видалення не зреагувавшего кон'югату промиваються лунки.
- Мікролунки, що містять зафіксований кон'югат пероксидази, інкубуються з розчином субстрату пероксидази. Гідроліз субстрату пероксидазою призводить до зміни кольору. Після певного періоду часу реакція зупиняється і фотометрично вимірюється інтенсивність кольору розчину. Інтенсивність кольору розчину залежить від концентрації антитіла в вихідному зразку.

#### ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Рекомендується проводити забір зразків відповідно до документу NCCLS M29: Захист співробітників лабораторій від інфекційних хвороб.
- Жоден з відомих методів не може забезпечити повну впевненість в тому, що зразки людської крові не здатні передавати інфекцію. Тому, всі похідні крові повинні вважатися потенційно інфекційними.
- У цьому аналізі повинні використовуватися тільки свіжо зібрані і належним чином збережені сироватки крові, отримані схваленими асептичними процедурами венепункції. Ніякі антикоагулянти або консерванти не повинні додаватися. Уникайте використання гемолізованих, ліпемічних або бактеріологічно забруднених сироваток.
- Зберігайте зразок при кімнатній температурі не більше 8 годин. Якщо аналіз не виконується в межах 8 годин, сироватки можуть

зберігатися при 2-8 °C не більше ніж 48 годин. Якщо очікується затримка в аналізі, зберігайте сироватки для аналізу при -20 °C або нижче. Уникайте циклів багаторазового заморожування/розморожування, які можуть викликати втрату активності антитіл і давати помилкові результати.

### МАТЕРІАЛИ І ПРИСТРОЇ

#### Матеріали, що поставляються в наборі

Кожен набір в достатніх кількостях містить наступні компоненти, необхідні для проведення кількості аналізів, зазначених на етикетці упаковки. Зауваження: всі активні реагенти містять азид натрію в якості консерванту в концентрації 0.1% (маса/обсяг).

- Планшет:** 96 лунок, що складається з дванадцяти 1x8- лункових смужок, покритих неактивованим антигеном. Смужки упаковані в штативи і герметично закриті в пакеті з осушувачем.
- Кон'югат:** кон'югований пероксидазою цапиний анти-людський IgG (специфічний γ-ланцюжок). Готовий до використання. Один 15 мл флакон з білим ковпачком.
- Позитивний контроль (людська сироватка):** один 0.35 мл флакон з червоним ковпачком .
- Калібратор (людська сироватка):** один флакон, 0.5 мл, синій ковпачок.
- Негативний контроль (людська сироватка):** один 0.35 мл флакон з зеленим ковпачком.
- Розріджувач зразка:** одна 30 мл пляшка (зелена кришка), що містить альбумін бичачої сироватки, твін-20 і фосфат-буферизований соляний розчин (pH 7.2±0.2). Готовий до використання. Примітка: перед використанням добре перемішати.
- ТМБ:** одна 15 мл бурштинова пляшка (бурштинова кришка), що містить 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання.
- Стоп розчин:** одна 15 мл пляшка (червона кришка), містить 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.7M HCl. Готовий до використання.
- Концентрат промивного буфера (10x):** розбавте 1 частину концентрату з 9 частинами деіонізованої або дистильованої води. Одна 100 мл пляшка (прозора кришка), що містить 10x концентрат фосфат-буферизованого соляного розчину і розчин твін-20 (синій розчин). Примітка: 1x розчин має pH 7.2 ± 0.2.

Наступні компоненти не залежать від номера партії набору і можуть використовуватися взаємозамінно в ІФА аналізах: ТМБ, стоп розчин і промивний буфер.

#### Зауваження: Набір також містить

- Перелік компонентів, що містить інформацію про певну партію, який знаходиться всередині упаковки набору.
- Вкладиш інструкцій із застосування.

#### Необхідні, але не надані матеріали

- Мікропланшетний зчитувач для ІФА з довжиною хвилі вимірювання 450 нм.
- Піпетки, здатні до точного розподілу 10-200 мкл.
- Багатоканальні піпетки для точного розподілу (50-200 мкл).
- Ємності для реагентів для багатоканальних піпеток.
- Промивна пляшка чи система промивання мікролунок.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Мірний циліндр на 1 л.
- Серологічні піпетки.
- Одноразові наконечники для піпеток.
- Паперові рушники.
- Лабораторний таймер для моніторингу етапів інкубації.
- Ванночка для утилізації відходів і дезінфікуючого засобу (приклад: 10% побутовий відбілювач, 0,5 % гіпохлорит натрію).

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Вийміть окремі компоненти набору з місця зберігання і дозвольте їм нагрітися до кімнатної температури (20-25 °C).
- Визначте необхідну кількість мікролунок. У кожну процедуру аналізу включити шість (6) визначень Контролю/Калібратора (1 Бланк, 1 Негативний Контроль, 3 Калібратора і 1 Позитивний Контроль). Реагент Бланк повинен тестуватися в кожному аналізі. Перевірити програмне забезпечення та зчитувальний пристрій на правильність налаштування контролю/калібраторів. Непотрібні для аналізу смужки помістити назад в герметичний мішечок і повернути на зберігання при 2-8 °C.

ПРИКЛАД НАЛАШТУВАННЯ ПЛАНШЕТА		
	1	2
<b>A</b>	Бланк	Пацієнт 3
<b>B</b>	Негативний Контроль	Пацієнт 4
<b>C</b>	Калібратор	і т.д.
<b>D</b>	Калібратор	
<b>E</b>	Калібратор	

F	Позитивний контроль	
G	Пацієнт 1	
H	Пацієнт 2	

- Підготуйте 1:21 розбавлення (наприклад, 10 мкл сироватки + 200 мкл розріджувача для зразків. ПРИМІТКА: ретельно перемішати перед використанням) Негативного Контролю, Калібратора, Позитивного Контролю і кожної сироватки пацієнта. Розріджувач для зразків змінить колір, що підтверджує перемішування зразка з розріджувачем.
- В окремі лунки додати по 100 мкл кожного розведеного Контролю, калібратора і зразка. Переконайтеся, що зразки ретельно перемішані. Використовувати нові наконечники для кожного зразка.
- Додати 100 мкл розчинника зразків у лунку A1 в якості реагенту Бланк. Перевірити програмне забезпечення та зчитувальний пристрій на правильність налаштування лунки для реагенту Бланк.
- Інкубуйте планшет при КТ (20-25 °C) протягом 25 ± 5 хвилин.
- Промити мікролункові смужки 5 разів.

#### А. Ручна Процедура промивки:

- Енергійно витрусіть рідину з лунк.
- Заповніть кожну лунку промивальним буфером. Упевніться у відсутності в лунках повітряних бульбашок.
- Повторіть етапи a. і b., щоб у загальній кількості провести 5 промивань.
- Витрусіть промивний розчин з усіх лунк. Переверніть планшет на паперовий рушник і жорстко постукайте, щоб видалити з лунк будь-який залишок розчину для промивання. Огляньте планшет, переконавшись у відсутності залишку розчину для промивання. В кінці кожного робочого дня збирайте промивний розчин в емність для відходів, і обробляйте гіпохлоритом натрію 0.5 % (10% побутовим відбілювачем).

#### В. Автоматизована Процедура промивки:

При використанні автоматизованої промивної установки, відрегулюйте об'єм розподілу на 300-350 мкл/лунку. Налаштуйте цикл промивки на 5 промивок без затримки між промивками. Вийміть мікротитрувальний планшет з промивача, переверніть планшет на паперовий рушник і жорстко постукайте, щоб видалити з лунк будь-який залишок розчину для промивання.

- Додайте по 100 мкл кон'югату в кожну лунку, включаючи лунку реагенту Бланк, в тому ж темпі і порядку як додавалися зразки.
- Інкубуйте планшет при КТ (20-25 °C) протягом 25 ± 5 хвилин.
- Промийте мікролунки, слідуючи попередній процедурі, як описано в кроці 7.
- Додайте 100 мкл розчину субстрату ТМВ в кожну лунку, включаючи лунку реагенту Бланк, в тому ж темпі і порядку, як додавалися зразки.
- Інкубуйте планшет при кімнатній температурі (20-25 °C) протягом 10-15 хвилин.
- Зупиніть реакцію додаванням 50 мкл стоп розчину в кожну лунку, включаючи лунку реагенту Бланк, в тому ж темпі і порядку, як додавався ТМВ. Позитивні зразки з синього кольору стануть жовтими. Після додавання стоп розчину постукайте по планшету кілька разів, переконавшись, що зразки повністю змішані.
- Налаштуйте зчитувальний пристрій для зчитування при довжині хвилі 450 нм і виміряйте оптичну щільність (ОЩ) кожної лунки. Планшет необхідно рахувати в межах 30 хвилин після додавання стоп розчину.

## РЕЗУЛЬТАТИ

### А. Обчислення:

#### 1. Поправочний коефіцієнт

Граничне значення ОЩ для позитивних зразків було визначено виробником і корельовано з Калібратором. Поправочний коефіцієнт (CF) дозволить вам визначити порогове значення для позитивних зразків і провести корекцію невеликого щоденного відхилення в результатах аналізу. Поправочний коефіцієнт визначається для кожної партії наборів компонентів і друкується в переліку компонентів, який розташований в коробці набору.

#### 2. Cut-off значення ОЩ

Щоб отримати граничне значення ОЩ, помножте CF на середню ОЩ калібратора, визначену вище.

(CF x середнє значення ОЩ калібратора = граничне значення ОЩ)

### 3. Значення індексу або співвідношення ОЩ

Обчислити значення індексу або співвідношення ОЩ для кожного зразка шляхом ділення його значення ОЩ на граничне значення ОЩ з кроку 2.

Середнє значення калібратора	=	0.793
Поправочний Коефіцієнт (CF)	=	0.25
Граничне значення ОЩ	=	0.793 x 0.25 = 0.198
ОЩ невідомого зразка	=	0.432
Значення Індексу зразка або Співвідношення ОЩ	=	0.432 / 0.198 = 2.18

### В. Інтерпретації:

Значення Індексу або Співвідношення ОЩ інтерпретуються як зазначено нижче:

	Значення Індексу або Співвідношення ОЩ
Негативні зразки	≤ 0.90
Сумнівні зразки	0.91 – 1.09
Позитивні зразки	≥ 1.10

Використовуйте наведені вище рекомендації при оцінці або інтерпретації зразків пацієнтів. Сумнівні зразки повинні бути повторно протестовані. Зразки, які неодноразово мають сумнівне значення, повинні бути оцінені з використанням альтернативного серологічного методу. Підвищені рівні аутоантитіл до будь-якого з шести аутоантигенів можуть вказувати на конкретне ревматичне захворювання.

**ПРИМІТКА:** При інтерпретації результату анти-Sm/RNP для визначення потенційної активності анти-RNP (тільки), слід враховувати результати анти-Sm і результати анти-Sm/RNP одночасно.

## РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 1. Порівняльне вивчення

Техніки проводили порівняльне дослідження з метою продемонструвати еквівалентність тестової системи DAI ELISA Sm/RNP з іншими комерційно доступними тест-системами IFA, використовуючи 337 зразків сироватки; 152 нормальних зразки донорів з північно-східних і південно-східних районів США, і 185 зразків хворобливого стану. Результати досліджень були узагальнені в таблицях 1 і 2 нижче:

Таблиця 1: Відносна чутливість, Зразки хворих пацієнтів

DAI IFA Реактивні	Комерційні IFA Реактивні	Суперечливі зразки	Реактивні після вирішення з невизначеністю	Чутливість
13	16	3	13	13/13=100%

Таблиця 2: Відносна специфічність, Зразки здорових пацієнтів

DAI IFA Неактивні	Комерційні IFA Реактивні	Суперечливі зразки	Неактивні після вирішення з невизначеністю	Специфічність
136	137	1	137	137/139=99.3%

### 2. Відтворюваність

Для оцінки відтворюваності тестової системи всередині аналізу та між аналізами техніки провели випробування сильно позитивного, низько позитивного і негативного зразка одинадцять разів на кожен з трьох днів. Середнє значення, стандартне відхилення і відсоток CV розраховували для кожного зразка. Результати цього дослідження показані нижче:

Таблиця 3: Відтворюваність Тестової Системи DAI ELISA Sm

Specimen	Intra-assay Reproducibility						Inter-Assay Reproducibility: All Days Combined					
	Day 1		Day 2		Day 3		Day 1		Day 2		Day 3	
	Mean	Std Dev	% CV	Mean	Std Dev	% CV	Mean	Std Dev	% CV	Mean	Std Dev	% CV
High Positive	576	71	12	690	71	10	702	29	4	656	35	5
Low Positive	460	44	9	587	57	9	567	28	5	479	34	7
Negative	12	3	N/A	8	3	N/A	7	1	N/A	9	3	N/A

### 3. Перехресна реактивність

Зразки, які є негативними до ANA HEp-2 IFA і позитивними до IgG антитіл до різних антигенів, таких як EBV-VCA, EBNA, HSV-1, HSV-2, ЦМВ, краснуха, та/або Тоху, були протестовані на потенційну перехресну реактивність за допомогою ELISA DAI Sm/RNP. Всі випробувані зразки були негативними на ELISA, що вказує на те, що перехресна реактивність малоймовірна, і, отже, не повинна впливати на отримані результати.

## ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Не ставити кінцевий діагноз тільки на підставі результатів будь-якого з тестів DAI ELISA Sm.

2. Інтерпретувати результати тесту в поєднанні з клінічною оцінкою і результатами інших діагностичних процедур.

### ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Очікуване значення для нормального пацієнта – це негативний результат. Кількість позитивних результатів і ступінь реактивності залежать від таких параметрів, як тип населення, яке проходить випробування, лікування і т.д. Кожна лабораторія повинна встановити свої очікувані значення, засновані на зразках, які зазвичай проходять випробування.

### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

1. Під час кожної процедури аналізу необхідно включати Калібратор тричі. Бланк реагент, негативний контроль, і позитивний контроль також повинні бути включені в кожному аналізі.
2. Обчислити середнє значення 3 лунок калібраторів. Якщо будь-яке з трьох значень відрізняється більше ніж на 15% від середнього, відкинути це значення і обчислити середнє двох решти значень.
3. Середнє значення ОЩ для калібратора і значення ОЩ для Позитивних і Негативних контролів повинні укладатися в наступні діапазони:

	Діапазон ОЩ
Негативний Контроль	$\leq 0.250$
Калібратор	$\geq 0.300$
Позитивний Контроль	$\geq 0.500$

- a. ОЩ Негативного контролю, розділена на середню ОЩ калібратора має бути  $\leq 0.9$ .
  - b. ОЩ Позитивного контролю, розділена на середню ОЩ Калібратора повинна бути  $\geq 1.25$ .
  - c. Якщо вищевказані умови не виконуються, випробування повинне вважатися недійсним і має бути повторено.
4. Позитивний і Негативний контролі призначені для відстеження істотного відхилення в роботі реагенту і не гарантує точність порогового значення діапазону.
  5. Додаткові Контролі можуть бути тестовані відповідно до рекомендацій або вимог місцевих, державних та/або федеральних правил або акредитованих організацій.
  6. Зверніться до документа NCCLS C24: Статистичний Контроль Якості для кількісного виміру.

### ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. Для діагностичного використання in vitro.
2. При роботі з лабораторними реагентами слід дотримуватися звичайних заходів. У разі контакту з очима, промийте негайно великою кількістю води та зверніться за медичною допомогою. Носіть відповідний захисний одяг, рукавички, і захисний засіб для очей/обличчя. Не вдихайте пар. Знищуйте відходи, дотримуючись всіх місцевих, державних та федеральних законів.
3. Лунки мікропланшетів ІФА не містять життєздатних організмів. Однак, смужки повинні розглядатися як потенційні біологічно небезпечні МАТЕРІАЛИ і відповідним чином оброблятися.
4. Контролі людської сироватки - ПОТЕНЦІЙНО БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИЙ МАТЕРІАЛ. Вихідні матеріали, від яких ці продукти були отримані, шляхом перевірки схваленими методами виявилися негативними до антигену ВІЛ -1, HBsAg і до антитіл проти вірусу гепатиту С і ВІЛ. Однак, так як ніякий метод тестування не може повністю гарантувати відсутність збудників інфекцій, з цими продуктами необхідно поводитись з дотриманням 2 рівня біобезпеки, як рекомендовано керівництвом Центру контролю за хворобами/національними інститутами охорони здоров'я «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях» при використанні будь-якого потенційно інфекційного зразка людської сироватки або крові.
5. Чітко дотримання часу і температури інкубації необхідно для точних результатів. Всім реагентам потрібно дозволити досягти кімнатної температури (20-25 °C) перед початком аналізу. Верніть невикористані реагенти в холодильник негайно після використання.
6. Неправильна промивка може викликати помилкові позитивні або помилкові негативні результати. Перед додаванням кон'югату або субстрату переконайтеся, що мінімізована кількість будь-якого залишкового промивання (наприклад, шляхом промокання або аспірації). Не дозволяйте лункам висихати між інкубаціями.
7. Розріджувач зразка, контроль, промивний буфер і кон'югат містять азид натрію в концентрації 0.1 % (w/v). Було встановлено, що азид натрію утворює свинцеві або мідні солі азотистокисневої кислоти в лабораторних водопровідних системах, що при ударі може призвести до вибуху. Щоб

уникнути цього, ретельно промивати раковину водою після утилізації розчину, що містить азид натрію.

8. Стоп розчин ТОКСИЧНИЙ. Призводить до опіків. Токсичний при вдиханні, при контакті зі шкірою і при ковтанні. При нещасному випадку або, якщо Ви почуваете себе погано, негайно зверніться за медичною допомогою.
9. ТМВ розчин НЕБЕЗПЕЧНИЙ. Дратівливий для очей, системи органів дихання та шкіри.
10. Концентрат промивного буфера - ПОДРАЗНИК. Дратівливий для очей, системи органів дихання та шкіри.
11. Витерти дно планшета, щоб не залишилося рідини і/або відбитків пальців, які можуть змінювати оптичну щільність (ОЩ) зчитування.
12. Розбавлення або домішування цих реагентів можуть викликати помилкові результати.
13. Не повинні використовуватися реагенти від інших виробників.
14. ТМВ розчин під час використання повинен бути безбарвним, світло-жовтим, світло-зеленим або світло-синім. Забруднення ТМВ кон'югатом або іншими окислювачами заподіює передчасну зміну кольору розчину. Не використовуйте ТМВ, якщо він помітно синього кольору.
15. Ніколи не піпетувати ротом. Уникати контакту реагентів і зразків пацієнтів зі шкірою та слизовими оболонками.
16. Уникати бактеріального забруднення реагентів. Можуть бути отримані неправильні результати.
17. Перехресне забруднення реактивів і/або зразків може призвести до помилкових результатів.
18. Багаторазова скляний посуд необхідно вимити і повністю виполоскати від усіх детергентів.
19. Уникати розбризкування або утворення аерозолів.
20. Не піддавати реагенти сильному впливу світла протягом зберігання або інкубації.
21. Дозволяйте мікролунковим смужкам і штативу досягти кімнатної температури до відкриття захисної оболонки, це захистить лунки від конденсації.
22. Розчин для промивання повинен бути зібраний в ємність для відходів. Обробіть перероблений розчин 10% відбілюючою речовиною (0.5% гіпохлорит натрію). Уникати впливу випаровування відбілювача на реагенти.
23. Застереження: Рідкі відходи при кислотному рН повинні бути нейтралізовані перед додаванням в розчин відбілювача.
24. Не використовувати планшет ІФА, якщо смужка індикатора на мішечку перетворилася з синього кольору в рожевий.
25. Не дозволяти кон'югату вступати в контакт з ємностями або приладами, які, можливо, перед цим містили розчин з вмістом азиду натрію в якості консерванту. Залишкові кількості азиду натрію можуть знищити ферментативну дію кон'югату.
26. Не піддавати ніякий з активних реагентів впливу розчину із вмістом відбілювача або будь-яких сильних ароматів в розчинах відбілюючих речовин. Залишкові кількості відбілюючої речовини (гіпохлорит натрію) можуть знищити біологічну дію багатьох з активних реагентів цього набору.

### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

1. Зберігати нерозкритий набір при 2-8 °C.
2. Попередньо закриті мікролункові смужки: зберігати при 2-8 °C. Зайві смужки повинні бути негайно повторно запечатані з висушуючим засобом і повернуті для відповідного зберігання. Смужки стійкі протягом 60 днів після того, як мішечок був відкритий і належним чином вдруге закрито, і індикатор залишається синім.
3. Кон'югат: Зберігати при 2-8 °C. Забороняється заморожувати.
4. Калібратор, позитивні і негативні контролі: Зберігати при 2-8 °C.
5. ТМВ: Зберігати при 2-8 °C.
6. Концентрат промивального буфера (10X): Зберігати при 2-25 °C. Розведений промивний буфер (1x) стабільний протягом 7 днів, якщо зберігати при кімнатній температурі, або 30 днів при 2-8 °C.
7. Розріджувач зразка: Зберігати при 2-8 °C.
8. Стоп розчин: Зберігати при 2-25 °C.



**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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)