

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgG ДО ЦИКЛІЧНИХ ЦІТРУЛІНОВАНИХ ПЕПТИДІВ

3175-17, Anti CCP ELISA

Каталог. №: 3175-17

Методика від 07-10-2015

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 співпадатим.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Тест	Anti CCP ELISA
Метод	Непрямий
Принцип	Кількісний
Діапазон визначення	1.12 АОд/мл
Зразок	100 мкл
Загальний час	~ 105 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців
Специфічність	79 %
Чутливість	97 %

ПРИЗНАЧЕННЯ

DAI Anti CCP (ELISA) призначений для кількісного визначення антитіл класу IgG до циклічних цитрулінованих пептидів, які присутні в сироватці або плазмі людини.

Набір призначений для лабораторного використання.

РЕЗЮМЕ І ОПИС (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Даний тест заснований на зв'язуванні антитіл, присутніх в пробі, з циклічними цитрулінованими пептидами, нанесеними на планшет. На першому етапі антитіла, присутні в калібраторах, в контролях або в попередньо розведених зразках пацієнтів, зв'язуються з внутрішньою поверхнею лунки. Після 60 хвилин інкубації мікропланшет промивається буфером для промивання, щоб видалити компоненти сироватки, які не зреагували. Потім додається розчин анти-людських IgG, кон'югованих з пероксидазою, який розпізнає антитіла класу IgG, зв'язані з іммобілізованими антигенами.

Після 30 хвилин інкубації надлишок ферментного кон'югату, який не зв'язався, видаляється за допомогою промивного буфера. У цей момент додається Розчин субстрату, що містить ТМВ-хромоген. Після 15 хвилин інкубації розвиток забарвлення зупиняється додаванням стоп-розчину. Розчин набуває жовтого кольору. Рівень забарвлення є прямо пропорційним концентрації анти-CCP антитіл IgG, присутніх у вихідному зразку.

Концентрація анти-CCP IgG антитіл у зразку розраховують за калібрувальною кривою.

МАТЕРІАЛИ ТА КОМПОНЕНТИ

Матеріали, які входять до складу набору:

- Anti-CCP IgG Стандарти (5 флаконів, 1.0 мл кожен)
 - STD1
 - STD 2
 - STD 3
 - STD 4
 - STD 5
- Контроль (1 флакон, 1.0 мл, готовий до використання)
 - Позитивний контроль
- Розчин для розведення зразків (1 флакон, 100 мл)
- Кон'югат (1 флакон, 15 мл)
 - Кон'югат анти-людського-IgG вивізі з пероксидазою хрому (HRP)
- Мікропланшет
 - (1 мікропланшет, покритий циклічними цитрулінованими пептидами).
- ТМВ Субстрат (1 флакон, 15 мл)
 - H₂O₂-ТМБ (0.26 г/л) (уникати контакту зі шкірою)
- Стоп-розчин (1 флакон, 15 мл)
 - Сірчана кислота 0.25 М (уникати контакту зі шкірою)
- 10X Концентрат Промивного Розчину (1 флакон, 100 мл)

Необхідні матеріали, що не входять до набору

- Дистильована вода.

Допоміжні матеріали та прилади

- Автоматичний диспенсер.
- Мікропланшетний зчитувач (450 нм, 620-630 нм).

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Підготовка Стандартів (S₁...S₅)

Для анти-CCP антитіл система вимірювання калібрується в Од/мл. Ці одиниці показують постійний показник 1:12 у порівнянні зі стандартним показником ВООЗ W1066 для ревматоїдного артриту. Калібратори готові до використання і мають наступні концентрації:

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
Од/мл	1	20	40	400	2000

Після відкриття калібратори є стабільними на протязі 6 місяців при 2-8 °С.

Підготовка взірця

Зразками для визначення антитіл до CCP є сироватка або плазма людини. **Всі зразки сироватки або плазми повинні бути попередньо розведені 1:100 з Розчином для розведення;** наприклад 10 мкл зразка можуть бути розведені з 990 мкл Розчину для розведення.

Провести забір венозної крові і відокремити сироватку (після утворення згустку) або плазму від клітин шляхом центрифугування.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °С до 3 днів. Для більш довгих термінів зберігання, зразки слід заморозити до -20 °С. Щоб уникнути повторного заморожування і відтавання зразки слід поділити на частки. Уникайте використання зразків з високим вмістом ліпідів або гемолізу. Контролі готові до використання.

Підготовка Промивного Розчину

Розвести вміст кожного флакона Концентрату буферного розчину для промивання (10x) дистильованою водою до кінцевого об'єму 500 мл перед використанням. Для невеликих обсягів використовувати 1:10 розведення. Розведений Промивний розчин стабільний протягом 30 днів при 2-8 °С.

У концентрованому Промивному розчині можна спостерігати присутність кристалів. У цьому випадку, перемішати при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів. Для більшої точності розбавити цілу пляшку концентрованого Розчину для промивання до 500 мл, впевнившись у тому, що кристали повністю розчинились.

Процедура

- Привести всі реагенти до кімнатної температури (22-28 °С) протягом принаймні 30 хвилин.
- Невикористані смужки помістити в пакет з фольги, який містить осушувач, і зберігати при температурі 2-8 °С.
- Щоб уникнути можливого мікробного і/або хімічного забруднення, залишки невикористаних реагентів ніколи не повертати назад в оригінальні флакони.
- Оскільки необхідно виконати визначення у двох примірниках з метою поліпшення точності результатів випробувань, підготувати дві лунки для кожної точки калібрувальної кривої (S₁-S₅), дві для кожного Контроля, дві для кожного зразка, одну для Бланка.

Реагент	Стандарт	Взірець /Контроль	Бланк
Стандарт S ₁ -S ₅	100 мкл		
Контролі		100 мкл	
Розведений Візірець		100 мкл	
Інкубувати на протязі 60 хвилин при КТ (22-28 °С). Видалити вміст кожної лунки, промити лунки 3 рази з 300 мкл розведеного Промивного розчину.			
Важливе зауваження: під час кожного етапу промивання, обережно струсіть пластину протягом 5 секунд і видаліть надлишки розчину, натиснувши перевернутим планшетом по всмоктуючому паперу.			
Автоматичне промивання: Якщо ви використовуєте автоматичне обладнання, промити лунки, принаймні 5 разів.			
Кон'югат	100 мкл	100 мкл	
Інкубувати на протязі 30 хвилин при КТ (22-28 °С). Видалити вміст кожної лунки, промити лунки 3 рази з 300 мкл розведеного Промивного розчину.			
Промивання: дотримуватись вказівок з попереднього пункту.			
Субстрат ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубувати на протязі 15 хвилин при КТ (22-28 °С) в темноті.			
Стоп Розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Обережно потрясти мікропланшет. Зчитати щільність (Е) при 450 нм в порівнянні з Бланком на протязі 5 хвилин.			

РЕЗУЛЬТАТИ

Оцінка результатів

Зразки, що мають значення ОЦ вище Стандарта 5 (2000 Од/мл), мають бути розбавлені і концентрації антитіл до ССР повинні бути розраховані з застосуванням коефіцієнта розведення.

Калібрувальна крива

Для даного аналізу методом для оцінки результатів є 4-параметрова крива з Lin-Log для оптичної щільності і концентрації відповідно. Крім того, можна використовувати наближений згладжений сплайн і координований Lin-Log метод. Тим не менше, рекомендується використовувати криву Lin-Log.

Спочатку розрахувати середню оптичну щільність калібраторів. Використовуючи міліметровий папір, відкласти середню оптичну щільність кожного калібратора проти їх концентрацій. Намалювати найбільш відповідну криву апроксимації через всі точки калібратора. Точки Калібратора також можуть бути з'єднані з прямолінійними відрізками. Концентрації невідомих зразків можуть бути оцінені по калібрувальній кривій шляхом інтерполяції.

Типові результати (тільки в якості прикладу)

Нижче в таблиці показані типові результати для анти-ССР. Ці дані повинні розглядатися як приклад і не повинні використовуватися для розрахунку результатів.

N	OD1	OD2	mean	U/mL
CAL1	0.037	0.043	0.040	1
CAL2	0.304	0.285	0.295	20
CAL3	0.514	0.551	0.533	40
CAL4	1.771	1.589	1.680	400
CAL5	2.631	2.284	2.458	2000
Patient 1	1.024	1.019	1.022	103

НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

У дослідженні нормальних значень, проведеному із зразками сироватки від здорових донорів, були отримані наступні інтервали нормальних значень.

Anti CCP (U/mL)	
Normal	< 30
Positive	≥ 30

Зверніть увагу на те, що визначення діапазону очікуваних значень "нормального" населення в даному методі залежить від багатьох факторів, таких як специфічність і чутливість методу і типу населення, яке аналізується. Таким чином, кожна лабораторія повинна розглянути діапазон, рекомендований виробником в якості загальних вказівок, і встановити свій власний діапазон очікуваних значень на основі даних по населенню, де працює лабораторія.

Позитивні результати повинні бути перевірені щодо клінічного стану пацієнта. Крім того, кожне рішення, пов'язане з терапією, повинно бути прийнято на індивідуальній основі. Кожна лабораторія повинна встановити свої власні інтервали норми і патології сироваткових анти-ССР.

Чутливість/Специфічність

Отримані результати показали 79% клінічної чутливості і 97% специфічності для діагностики ревматоїдного артриту.

Межа виявлення

Найнижча концентрація анти-ССР, яку можна відрізнити від Нульового калібратора становить 1.12 Од/мл з межею достовірності 98 %.

В межах аналізу і між аналізами

В межах аналізу

Варіативність в межах аналізу визначалась при 12 повторях двох різних сироваток із значенням в діапазоні калібрувальної кривої. Вона становить ≤ 5,5%.

Між аналізами

Варіативність між аналізами визначається шляхом реплікації вимірювань однієї контрольної сироватки з різних партій наборів і/або різних поєднань реагентів. Вона становить ≤ 6,8%.

ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти повинні бути утилізовані відповідно до місцевих правил.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Цей набір призначений для лабораторного використання відповідними фахівцями. Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах.
- Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту при роботі з реагентами.
- Дотримуйтесь рекомендацій належної лабораторної практики (GLP) для обробки продуктів крові.
- Всі компоненти людського походження, що використовуються при отриманні реагентів, були перевірені та визнані негативними на антитіла до ВІЛ-1 і 2, HBsAg і HCV. Але ніякі тести не можуть дати повної гарантії, що відсутні ВІЛ, гепатит або інші інфекційні агенти. Таким чином, з калібраторами і контролями поводитись таким же чином, як і з потенційно інфекційним матеріалом.
- Матеріали тваринного походження, що використовуються у приготуванні набору, були отримані від здорових тварин, і бичачий білок був отриманий з країн, не заражених BSE, але з цими матеріалами слід поводитись як з потенційно інфікованими.
- Деякі реагенти містять невеликі кількості азиду натрію (NaN₃), або Проклін 300_R в якості консервантів. Уникати попадання на шкіру або слизову оболонку.
- Азид натрію може бути токсичний при попаданні всередину або всмоктуванні через шкіру або очі; крім того, він може реагувати з свинцем або міддю з утворенням потенційно вибухонебезпечних азидів металів. Змити великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азиду.
- ТМБ субстрат містить подразник, який може заподіяти шкоду при вдиханні, ковтанні або всмоктуванні через шкіру. Щоб запобігти травмам, уникайте вдихання, ковтання або при контакту зі шкірою та очима.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота є отруйною і корозійною і може бути токсичною при ковтанні. Для запобігання хімічного опіку, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте впливу прямого сонячного світла, металів або окисдантів на реагент ТМБ/Н₂O₂. Не заморожувати розчин.
- Строго дотримуватися послідовності піпетування, описаній в протоколі. Продуктивність даних, представлених тут, була отримана з використанням специфічних реагентів, перерахованих в цій Інструкції з експлуатації.
- Всі реагенти слід зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C в оригінальній упаковці. Усі винятки чітко вказано. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності при зберіганні і використанні, як зазначено.
- Привести всі компоненти набору та зразки до кімнатної температури (22-28 °C) і добре перемішати перед використанням.
- Не змішувати компоненти набору з різних партій. Термін придатності, зазначений на коробці і етикетках флаконів, повинні бути дотримані. Не використовуйте компонент набору за межами їх терміну придатності.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Кон'югат призначений для забезпечення максимальної дози чутливості і може бути забруднений зовнішніми агентами, якщо не використовується належним чином: тому, рекомендується використовувати одноразові витратні матеріали (наконечники, пляшки, лотки тощо). Для розділених доз взяти точний об'єм необхідного Кон'югату і не повертати будь-які залишки продукту в оригінальну пляшку. Крім того, **для об'ємі, які подаються за допомогою автоматичних та напівавтоматичних пристроїв**, перш ніж додавати кон'югат, бажано очистити рідину з системи обробки, забезпечуючи ефективність процедури промивання, депротейнізації і дезактивації, щоб запобігти забрудненню кон'югату; **ця процедура є дуже необхідною**, коли набір використовує аналізатори, які не обладнані одноразовими наконечниками. Для цього DA1 постачає окремий реагент знезараження для чищення голок.
- При використанні автоматизованого обладнання, користувач несе відповідальність, що набір належним чином перевірений.
- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може впливати на точність аналізу та/або зростання заднього фону.
- Важливо, щоб час реакції для кожної лунки був стабільним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно займати більше десяти хвилин, щоб уникнути зміщення результатів тесту. Якщо необхідно більше 10 хвилин, слідувати тому ж порядку піпетування. Якщо використовується більш ніж один планшет, рекомендується повторити побудову калібрувальної кривої для кожного планшета.

5. Додавання розчину субстрату ТМБ субстрату провокує кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп розчину. Таким чином, субстрат ТМБ і стоп-розчин слід додати в тій же послідовності, щоб усунути будь-які відхилення часу в ході реакції.
6. Дотримуйтесь вказівок для проведення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу Контролів та/або збагачених сироваток.
7. Максимальна точність потребується для приготування та піпетування реагентів.
8. Не використовувати зразки, які заражені хвороботворними бактеріями, високо ліпемічні або гемолізовані.
9. Пляншетний рідер вимірює вертикально. Не торкатися нижньої частини лунок.



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