

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО ЕКСТРАГОВАНИХ ЯДЕРНИХ АНТИГЕНІВ

ENA Screening IgG

Кат. № : **ENAS.CE**

Дата випуску інструкції: **03-2020**
Версія: **2**



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

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного визначення антитіл IgG до екстрагованих ядерних антигенів у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного визначення аутоантитіл IgG до SSA, SSB, Sm, U1-sn RNP68/70 кДа (kDa), Scl-70, Jo-1 у плазмі і сироватці людини.

Тільки для діагностики in vitro.

B. ВСТУП

Аутоімунітет - це нездатність організму розпізнати свої складові частини як себе, що дозволяє імунну відповідь проти власних клітин і тканин. Будь-яке захворювання, яке виникає внаслідок такої аберації імунної відповіді, називається Аутоімунним Захворюванням.

Ревматоїдні аутоімунні захворювання часто асоціюються з аутоантитілами до Ядерних Антигенів. Ми можемо розрізнити Антиядерні Антитіла (ANA), пов'язані з аутоімунними системними захворюваннями, такими як SLE (системний червоний вовчак), RA (ревматоїдний артрит), склеродермія, MCDT (змішана хвороба сполучної тканини) та синдром Шегрена; і Екстраговані Антиядерні Антитіла (ENA), пов'язані з аутоімунними системними захворюваннями, такими як поліміозит, SLE, MCDT і синдром Шегрена.

Серологічне виявлення антинуклеарних антитіл (ENA), що екстрагуються, у пацієнтів з підозрою на аутоімунні захворювання є звичайною практикою в кожній імунологічній лабораторії. Коли цей перший діагностичний крок виконується з позитивними результатами, ми можемо продовжити виявлення ізоляту та кількісне визначення окремих антитіл.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті рекомбінантними антигенами SSA52&60 кДа (kDa), SSB, Sm, U1-sn RNP68/70 кДа (kDa), Scl-70, Jo-1.

Під час 1-ї інкубації твердої фази обробляють розведеними зразками, а ENA IgG, якщо вони присутні, захоплюються твердою фазою.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка у 2-й інкубації виявляються зв'язані антиядерні IgG шляхом додавання антитіла анти-IgG, міченого пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості ENA IgG, присутніх у зразку. Таким чином, наявність IgG у зразку можна визначити за допомогою граничного значення cut-off, здатного розрізнити негативні та позитивні зразки.

D. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для виконання 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 смужок x 8 відривних лунок, вкритих рекомбінантними антигенами SSA52 кДа (kDa), SSA60 кДа (kDa), SSB, U1-sn RNP68/70 кДа (kDa), Scl-70, Jo-1 та нативним антигеном Sm.

Пластини запаковуються в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4 °C (°C).

2. Негативний контроль: CONTROL -

1x2.0 мл/флакон (ml/vial). Містить сироватку людини, негативну на антитіла ENA IgG, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 10% фетальної сироватки теляти, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль кодується блідо-жовтим кольором.

3. Позитивний контроль: CONTROL +

1x2.0 мл/флакон (ml/vial). Містить сироватку людини, позитивну на антитіла ENA IgG, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 10% фетальної сироватки теляти, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль кодується зеленим кольором.

4. Концентрат промивного буфера: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка (ml/bottle) 20X концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Tween 20 та 0.045% ProClin 300.

5. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання, кодований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому козячі поліклональні антитіла до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис-буфер pH 6.8 +/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцину сульфат як консерванти.

6. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буфер, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетраметил-бензидину (або TMB) та 0.02% перекису водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.

7. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M (M)

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить розчин 0.3 M (M) H₂SO₄.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

8. Розчинник для зразків: DILSPE

2x60 мл/флакон (ml/vial). Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.2% Tween 20, 10% фетальна теляча сироватка (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка. Розчинник зразка має синій колір.

9. Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

10. Вкладиш інструкції x 1 шт.

E. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (1000, 100 і 10 мкл (µl)) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА (сухий або вологий), встановлений на +37 °C (°C) (допуск +/-0.5 °C (°C)).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
- Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

F. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
- Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.

3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не надавайте Хромоген (ТМВ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 повторних використань пристрою протягом 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не

заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.

5. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (μ), щоб очистити зразок для тестування.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва. У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2-8 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

Негативний та Позитивний контролі:

Готовий до використання компонент. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20X бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при + 2..8 °C (°C).

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімікатами, пилом або мікробами.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не надавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Розчинник зразка:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315, H319, P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні H-фрази:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні P-фрази:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В Очі: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M (M) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μ/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск +/- 5%.
5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускну здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
6. При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.
7. Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
3. Переконайтеся, що Хромоген (ТМВ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.

4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
5. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
6. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
7. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
8. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
9. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
10. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
11. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
12. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

1. Розведіть зразки 1:101 у правильно позначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте Контролі, оскільки вони готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунку А1 порожньою для операції бланкування.
3. Внесіть 100 мкл (μl) Негативного Контролю в трьох примірниках і 100 мкл (μl) Позитивного Контролю в одному примірнику. Потім внесіть 100 мкл (μl) розведених зразків у кожен правильно ідентифіковану лунку.
4. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при +37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки повинні бути заклеєні клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

5. Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ I.3).
6. Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату в кожен лунку, окрім лунки А1 і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

7. Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при +37 °C (°C)**.
8. Промийте мікролунок, як у кроці 5.
9. У кожен лунку внесіть піпеткою 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунку А1. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) в темноті протягом 15 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

10. Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить позитивний контроль та позитивні зразки з блакитного кольору на жовтий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове).

Важливі загальні зауваження:

1. Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Зразки розведені 1:101 та Контролі	100 мкл (µl)
1-а інкубація	45 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (µl)
2-а інкубація	45 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н ₂ O ₂	100 мкл (µl)
3-я інкубація	15 хвилин
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл (µl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Нижче наведено приклад схеми внесення:

Мікропланшет

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 4										
B	NC	S 5										
C	NC	S 6										
D	NC	S 7										
E	PC	S 8										
F	S 1	S 9										
G	S 2	S 10										
H	S 3	S 11										

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний Контроль PC = Позитивний Контроль S = Зразок

O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу є відповідними.

Переконайтеся, що досягнуто наступних результатів:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.050 значення OD450 нм (nm)
Негативний контроль (NC)	< 0.200 середнього значення OD450 нм (nm) після бланкування
Позитивний контроль (PC)	> 0.750 середнього значення OD450 нм (nm) після бланкування

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.050 OD450 нм (nm)	1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу
Негативний контроль > 0.200 значення OD450 нм (nm) після бланкування	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; 2. чи використовується відповідний миючий розчин, а перед використанням вошер був ним праймований; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивного контролю замість негативного);

	4. чи не відбулось забруднення негативного контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або ферментного кон'югату; 5. чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
Позитивний контроль OD450 нм (nm) < 0.750	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного контролю); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення контролю.

Якщо виникла якась із вищезазначених проблем після перевірки, повідомте про цю проблему керівнику для подальших дій.

Важлива примітка:

Аналіз слід проводити, виконуючи крок зчитування, описаний у розділі M, пункт 11.

P. РЕЗУЛЬТАТИ

Результати випробувань розраховуються за допомогою середнього значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Негативного Контролю (NC) та математичного розрахунку, щоб визначити наступну формулу граничного значення:

$$\text{Cut-off} = \text{NC} + 0.250$$

Значення, знайдене для тесту, використовується для інтерпретації результатів, як описано в наступному параграфі.

Важливе зауваження: Коли обчислення результатів здійснюється за допомогою оперативної системи автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для обчислення величини cut-off та отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) зразка та значення Cut-off (або S/Co), згідно з наступною таблицею:

S/Co	Інтерпретація
< 0.8	Негативний
0.8 - 1.1	Сумнівний
> 1.1	Позитивний

Негативний результат свідчить про те, що у пацієнта нормальне значення антитіл ENA.

Будь-якого пацієнта, який показує **неоднозначний результат**, слід повторно перевірити, дослідивши другий зразок, взятий у пацієнта з іншого забору.

Позитивний результат свідчить про підвищений рівень антитіл ENA. У цьому випадку пацієнту слід виконати специфічні тести, які можуть вказати, які саме специфічні антитіла ENA підвищені.

Нижче наведено приклад розрахунку (дані, отримані як етап читання, описаний у розділі M, пункт 11).

Важлива примітка: Не слід використовувати наведені нижче дані замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Негативний Контроль: 0.050 - 0.070 - 0.060 OD 450 нм (nm)
Середнє значення: 0.060 OD 450 нм (nm)
Менше 0.200 - Прийнято
Позитивний контроль: 2.350 OD 450 нм (nm)
Вище ніж 0.750 - Прийнято
Cut-Off = 0.060 + 0.250 = 0.310

Зразок 1: 0.070 OD 450 нм (nm)
 Зразок 2: 1.690 OD 450 нм (nm)
 Зразок 1 S/Co < 0.8 = негативний
 Зразок 2 S/Co > 1.1 = позитивний

Важливі примітки:

1. Одних результатів цього тесту недостатньо для встановлення чіткого діагнозу аутоімунного захворювання. Необхідно провести інші діагностичні тести, особливо кількісне визначення окремих антитіл. Картина різних комбінацій антитіл та їх концентрація разом із загальною клінічною картиною пацієнта є корисними діагностичними інструментами при оцінці ревматоїдних аутоімунних захворювань.
2. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
3. Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінку продуктивності проводили на панелях позитивних і негативних зразків з посиланням на референсний набір з маркуванням CE.

1. Межа виявлення

Європейське Співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту.

За його відсутності визначено Внутрішній Золотий Стандарт (або IGS), отриманий з плазми людини, яка містить усі аутоантитіла із високою концентрацією, щоб забезпечити постійну та високу чутливість пристрою.

Межа виявлення розрахована як середнє значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) лунки A1 Негативного Контролю + 5 SD.

У таблиці нижче наведені середні значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) для цього стандарту при розведенні, а потім дослідженні в аналізі.

Значення Внутрішнього Золотого Стандарту (IGS) OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm):

Розведення IGS	Лот P1	Лот P2
1:100	3.057	3.118
2X	1.792	1.802
4X	1.132	1.036
8X	0.576	0.523
16X	0.321	0.348
SD	0.007	0.008

2. Діагностична Чутливість та Специфічність

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні Оцінки Ефективності на панелях зразків, які були класифіковані як позитивні референс-набором із маркуванням CE.

Діагностичну чутливість досліджували на щонайменше 50 зразках, позитивних з референсним набором. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів із клінічною історією аутоімунного захворювання.

Діагностичну специфічність визначали на панелях щонайменше 50 негативних зразків від нормальних осіб і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, що потенційно інтерферують.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів підготовки (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки. Жодної помилкової реактивності через метод підготовки зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були аналізовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків інтерферує з виконанням тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких інтерференцій не спостерігалось.

Перехресної реакції не спостерігалось.

Оцінка Ефективності надала такі значення:

Чутливість	≥ 98 %
Специфічність	≥ 98 %

3. Точність

Негативний та позитивний контроль використовували для перевірки цього параметра шляхом тестування 12 повторень одного зразка на двох партіях продукту. Значення CV%, отримані в цьому дослідженні,

становили 4-20% залежно від значень OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm). Отримана варіабельність не призвела до неправильної класифікації зразків.

S. ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналізу.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після відтавання, можуть давати деякі помилкові результати.

Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не об'єднаних.

Діагноз аутоімунного захворювання не слід встановлювати на основі одного результату тесту. Необхідно враховувати клінічний анамнез пацієнта, його симптоматику, а також інші діагностичні дані.

Помилкова позитивність оцінюється як менше ніж 2% від нормальної популяції.

T. ЛІТЕРАТУРА

1. Int J Pathology. Dec 2007; 5(2):67-71. Pattern of anti-ENA (extractable nuclear antigens) antibodies in different clinical disorders; a clinical laboratory based study. I Siddiqui, J Farooqi, F Ghani, A Habib, DA Shariff.
2. Journal of Clinical Pathology. 2001, 54:413; doi:10.1136/jcp. It is useful to test for antibodies to extractable nuclear antigens in the presence of a negative antinuclear antibody on Hep-2 cells? KF Thomson, A Murphy, MJD Goodfield, SA Misbah.
3. Modern Medical Laboratory. Vol 31, №6, Page 495-499 (2003). Immunity. The measuring method of anti-ENA antibody. Sakai, Hiroshi.
4. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005, vol. 1050, pp. 327-339. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. P Eissfeller, M Sticherling, D Sholz, K Hennig, T Luttich.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
 Via G. Carducci n° 27
 20099 Sesto San Giovanni
 (Milano) - Italy
 Phone +39 02 27007161
 Fax +39 02 44386771
 e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс с.р.л.
 вул. Г. Кардуччі, 27
 20099 Сесто Сан Джованні
 Мілан (МІ) Італія
 тел.: +39 02 2700 7161
 факс: +39 02 44386771
 e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
 вул. Симона Петлюри, 25
 м. Івано-Франківськ, 76014
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

