НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG ДО SM

IgG anti Sm

Кат. № : ***SM.CE*** *Дата випуску інструкції:* ***2020/03***
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 кількісного визначення IgG антитіл до Sm у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ
Пристрій SM.CE – це імуноферментний аналіз (ІФА), призначений для кількісного визначення аутоантитіл IgG до аутоантигенів Sm у плазмі та сироватці людини.
Тільки для діагностики in vitro.

B. ВСТУП
Аутоімунність - 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 аберантної імунної відповіді, називається *Аутоімунним захворюванням*.
Ревматоїдні аутоімунні захворювання часто пов'язані з появою аутоантитіл проти кількох ядерних або цитоплазматичних антигенів. Ми можемо розрізняти *антиядерні антитіла (ANA),* пов'язані з аутоімунними системними захворюваннями, такими як СЧВ (системний червоний вовчак), РА (ревматоїдний артрит), склеродермія, ЗЗСТ (змішане захворювання сполучної тканини) та синдром Шегрена; і антинуклеарні антитіла, що екстрагуються (ENA), пов'язані з поліміозитом, СЧВ, ЗЗСТ і синдромом Шегрена.
Антитіла прямі до антигенів Sm (Сміта) присутні приблизно у 40% хворих на системний червоний вовчак (СЧВ) і вважаються дійсно специфічним маркером цього захворювання.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ
Мікропланшети покриті препаратом очищеного антигену Sm. Під час 1-ї інкубації тверду фазу обробляють розведеними зразками, а анти-Sm IgG захоплюють, якщо є, твердою фазою.
Після вимивання всіх інших компонентів зразка в 2-й інкубації зв'язані анти-Sm виявляються шляхом додавання антитіла до hIgG, міченого пероксидазою (HRP).
Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл IgG анти-Sm, присутніх у зразку. Оскільки немає міжнародного стандарту, IgG у зразку можна кількісно визначити за допомогою стандартної кривої, відкаліброваної в довільних одиницях на мілілітр (arbU/мл).

D. КОМПОНЕНТИ
Кожен набір містить достатню кількість реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет *MICROPLATE*
12 смужок x 8 відривних лунок, покритих Очищеним Sm Антигеном у присутності бичачих білків. Планшети запаковані у пакет з осушувачем.
Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакет з осушувачем і зберігайте при 4°C (°C).

2. Калібрувальна крива: *CAL N°…*
6x2.0 мл/флакон (ml/vial). Готова до використання та позначена синім кольором.
Стандартна крива, отримана з позитивної плазми проти Sm IgG людини, титрованої за внутрішнім золотим стандартом у діапазоні: CAL1 = 0 arbU/мл // CAL2 = 12,5 arbU/мл // CAL3 = 25 arbU/мл // CAL4 = 50 arbU/мл // CAL 5 = 100 arbU/мл // CAL6 = 200 arbU/л.
Містить білки сироватки людини, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

3. Концентрат буферу для промивання: *WASHBUF 20X*
1x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буферу pH 7.0+/-0.2 і 0.05% Твін 20 та 0.045% Proclin 300.

4. Ферментний кон'югат : *CONJ*
1 x 16 мл/флакон (ml/vial). Розчин готовий до використання та кодується червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрону поліклональні антитіла кози до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин-сульфату як консерванти.

5. Хромоген/Субстрат: *SUBS TMB*
1x16 мл/флакон (ml/vial). Містить 50 мМ (mM) цитрат-фосфатний буфер pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксид, 0.03% тетраметилбензидин (або ТМБ) і 0.02% перекис водню або H_2O_2.
Примітка: Зберігати в захищеному від світла місці, оскільки чутливі до сильного освітлення.

6. Сірчана кислота: *H_2SO_4 0.3 M*
1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить 0.3 M розчину H_2SO_4.
Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

7. Розчинник для зразка: *DILSPE*
2x60 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання та позначений синім кольором. Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратного буферу pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

8. Ущільнювальна фольга для планшета 2 шт.

9. Вкладиш інструкції 1 шт.

E. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ
1. Калібровані мікропіпетки (1000, 100 та 10 мкл (µl) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревним вугіллям, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА (сухий або вологий), здатний забезпечити температуру +37 °C (°C) (+/- 0.5 °C (°C) допустиме відхилення).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

F. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ
1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. 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 піддавайте Хромоген (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.

Перекладач Романюк Н. П.

6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не міняли місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо 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 істотну втрату активності до шести використань пристрою та до 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 публікацій 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 (min).
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 подразником. 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 важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних 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 присутні частинки, центрифугуйте при 2.000 об/хв протягом 20 хв або фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8u для очищення зразка перед тестуванням.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшети:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став зеленим, що вказує на дефект зберігання.

У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути на блискавку і зберігати при +2°..8°C (°C). Після першого відкриття невикористані смужки стабільні доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться з жовтого на зелений.

Калібрувальна крива:

Готові до використання компоненти. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Концентрат Промивного буфера:

Весь вміст концентрованого розчину необхідно розбавити 20х бідистильованою водою і обережно перемішати зверху донизу перед використанням. Під час приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів промивання.

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

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішати на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімічними речовинами, пилом або мікробами. Якщо цей компонент необхідно перенести, використовуйте тільки пластикові та, якщо можливо, 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 піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

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

Розчинник для зразка:

Готовий до використання компонент. Перед використанням обережно перемішати 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 правдивість +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.

2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубацій 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 праймувати розведеним Промивним Розчином.
   Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M NaOH).
   5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (µl/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 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) пропускна 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 O «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 подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання.
   Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за один запуск.
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. Переконайтесь, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
3. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтесь, 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 (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі усі рідкі реагенти.
7. Встановіть ІФА інкубатор на +37°C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
8. Переконайтеся, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
9. Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте 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 відповідно визначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (µl) Розчинника для зразка + 10 мкл (µl) зразка). Не розбавляйте набір для калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Розмістіть необхідну кількість Мікролунок у тримачі. Залишіть лунки A1 та B1 порожніми для бланкування.
3. Потім внесіть 100 мкл (µl) Калібраторів у двох примірниках. Потім додайте 100 мкл (µl) розведених зразків у відповідні лунки.
4. Інкубувати планшет **протягом 45 хв при +37°C (°C).**

Важлива примітка: *Смужки повинні бути заклеєні клейкою герметизуючою фольгою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.*

5. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомляється у розділі I.3.
6. Внесіть 100 мкл (µl) Ферментного кон'югату у кожну лунку, окрім A1 + B1, та накрийте герметичною плівкою. Перевірте, щоб цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, крім A1 та B1.

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

7. Інкубувати мікропланшет **протягом 45 хв при + 37°C (°C).**
8. Промити мікролунки як на етапі 5.
9. Внесіть 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунки A1 та B1. Потім інкубуйте мікропланшет **протягом 15 хвилин при кімнатній температурі (18 -24°C (°C)).**

Важлива примітка: *не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може утворитися високий фон.*

10. Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти в усі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти перетворить позитивні калібратори та позитивні зразки з синього кольору на жовтий.
11. Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, за допомогою зчитувача мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язково), бланкуючи інструмент на A1 чи на B1, або на обидвох.

Загальні важливі 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.*

Перекладач Романюк Н. П.

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Калібратори (*) Розведені зразки 1:101	100 мкл (µl) 100 мкл (µl)
1-а інкубація	**45 хв**
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. Замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (µl)
2-а інкубація	**45 хв**
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. Замочування АБО 6 циклів без замочування
TMB/H_2O_2	100 мкл (µl)
3-я інкубація	**15 хв**
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (µl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

Нижче у таблиці наведено приклад схеми видачі для кількісного аналізу:

Мікропланшет

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3									
B	BLK	CAL4	S4									
C	CAL1	CAL5	S5									
D	CAL1	CAL5	S6									
E	CAL2	CAL6	S7									
F	CAL2	CAL6	S8									
G	CAL3	S1	S9									
H	CAL3	S2	S10									

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор S = Зразок

O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації здійснюється на контролях і калібраторі щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу відповідають очікуванням.

Переконайтеся, що такі дані збігаються:

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення ОЩ 450 нм (nm)
CAL1 0 arbU/мл	< 0.150 середнє значення ОЩ 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації <30%
CAL 2 12.5 arbU/мл	ОЩ 450 нм (nm) > ОЩ450 нм (nm) CAL1+ 0.100
CAL 6 200 arbU/мл	ОЩ450 нм (nm) >1.500

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі та виконайте наступне:

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка >0.100	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
CAL1 **0 arbU/мл** >0.150 ОЩ450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації >30%	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний відповідний миючий розчин і вошер був праймований ним перед використанням; 3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного калібратора замість негативного; 4. що жодного забруднення негативного калібратора або лунок, не відбулося через позитивні зразки або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені
	позитивними зразками або ферментним кон'югатом 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
CAL 2 **12.5 arbU/мл** ОЩ 450 нм (nm) < ОЩ450 нм (nm) CAL1+ 0.100	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення калібратора.
CAL 6 **200 arbU/мл**	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо виникла будь-яка з перерахованих вище проблем, повідомте про проблему керівнику для подальших дій.

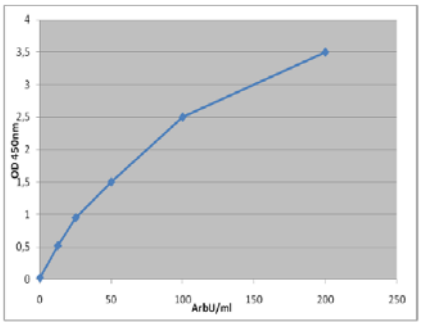
Важлива примітка:

Аналіз слід виконувати, як етап зчитування, описаний у розділі M, пункт 11.

P. РЕЗУЛЬТАТИ

Якщо тест виявляється дійсним, скористайтеся затвердженою програмою підгонки кривої, щоб накреслити калібрувальну криву на основі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm) /620-630 нм (nm) (пропонується 4-параметрична або квадратична інтерполяція). Потім за калібрувальною кривою розраховують концентрацію IgG антитіла до Sm у зразках.

Приклад калібрувальної кривої наведений нижче.



Важлива примітка:

Не використовуйте наведену вище криву для обчислень.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразки з концентрацією нижче 12.5 arbU/мл вважаються нормальними для IgG антитіл до Sm.

Зразки з концентрацією вище 25 arbU/мл є позитивними на IgG антитіла до Sm.

Зразки з концентрацією від 12.5 arbU/мл до 25 arbU/мл вважаються сумнівними.

arbU/мл	Інтерпретація
≤12.5	Нормальний
12.5 <arbU/мл <25	Сумнівний
≥25	Підвищений

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свої власні діапазони норми та патології.

Перекладач Романюк Н. П.

Важливі примітки:

1. *Одних результатів цього тесту недостатньо для встановлення чіткого діагнозу аутоімунного захворювання. Необхідно проводити інші діагностичні тести, особливо в поєднанні з іншими аутоантитілами. Картина різних комбінацій антитіл та їх концентрація разом зі всією клінічною картиною пацієнта є корисними діагностичними інструментами при оцінці ревматоїдних аутоімунних захворювань.*
2. *Позитивні результати повинні бути підтверджені щодо всього клінічного стану пацієнта.*
3. *Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.*
4. *Коли результати випробувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно 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 CE маркуванням.

1. Межа виявлення:

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення IgG антитіл до Sm.
За його відсутності визначено внутрішній Золотий стандарт (або IGS), отриманий із плазми людини з високою концентрацією Sm IgG, щоб забезпечити постійну та хорошу чутливість пристрою.
Межа виявлення розрахована як середня ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) + 5 СВ.
У таблиці нижче наведені середні значення ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) для цього стандарту при розведенні, а потім дослідженні в аналізі.

IGS arbU/мл	Лот P1	Лот P2
200	3.699	3.562
100	2.664	2.664
50	1.680	1.697
25	0.959	1.068
12.5	0.572	0.610
0	0.025	0.042

2. Діагностична чутливість та специфічність:

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні оцінки ефективності на панелях зразків, які були класифіковані як позитивні референсним набором із маркуванням CE.

Діагностичну **чутливість** досліджували щонайменше на 50 зразках, позитивних за допомогою референсного набору. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів із клінічною історією аутоімунного захворювання.

Діагностичну **специфічність** визначали на панелях із понад 50 негативних зразків від нормальних людей 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 приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватку. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалося.
Заморожені зразки також були протестовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких перешкод не спостерігалося.
Тест-набір IgG антитіла до Sm є специфічним лише для аутоантитіл, спрямованих до відповідного антигену.
Перехресної реактивності не спостерігалося.
Оцінка ефективності надала такі значення:

Чутливість:	≥ 98%
Специфічність:	≥ 98%

3. Точність:

Дослідження, проведене на трьох зразках з різною реактивністю IgG антитіл до Sm, досліджених у 16 повторах у трьох окремих запусках, показало значення КВ% в діапазоні 4-20% залежно від показників ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm).

4. Достовірність:

Достовірність аналізу була перевірена розведенням. Будь-який «хук-ефект», недооцінка, яка могла статися при високих дозах аналіту, була виключена.

S. ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналіту.
Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після розмороження, можуть давати дещо помилкові результати.
Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не пулованих.
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.

ЛІТЕРАТУРА

1. Specificity of anti-Sm antibodies by ELISA for systemic lupus erythematosus: increased sensitivity of detection using purified peptide antigens. M Field, D G Williams, P Charles, and R N Maini. Ann Rheum Dis. 1988 October; 47(10): 820–825.
2. Development of antigen-specific ELISA for circulating autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. Noritaka Oyama1,2,3, Ien Chan1, Sallie M. Neill2, Andrew P. South1, Fenella Wojnarowska4, Yoshio Kawakami3, David D'Cruz5, Kirti Mepani5, Graham J. Hughes5, Balbir S. Bhogal2, Fumio Kaneko3, Martin M. Black2 and John A. McGrath1 . J. Clin. Invest. 113(11): 1550- 1559 (2004). doi:10.1172/JCI20373
3. Anti-Sm-RNP activity in sera of patients with rheumatic and autoimmune diseases. M. Abu-Shara, M. Krup, H. Slor and Y. Shoenfeld. Clinical Rheumatology. Volume 9, number 3/September 1990.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила ISO 13485. Кожна партія проходить контроль 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 s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (MI) 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

Перекладач Романюк Н. П.