

ENA⁶ IgG

Кат. номер: ENADIV-24
BlueDiver протокол: 02

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор BlueDiver ENA⁶ IgG предназначен для определения в человеческой сыворотке IgG антител к экстрагируемым ядерным антигенам Sm, Sm/RNP, SSA/Ro 60kDa, SSB (La), Jo-1 и Scl-70 методом иммунодота.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный набор предназначен для постановки на анализаторе *BlueDiver Instrument*. Тест основан на принципе иммуноферментного анализа. Тест – стрипы состоят из мембраны, закрепленной в пластиковой рамке. В ходе анализа стрипы последовательно инкубируются в лунках картриджа с готовыми для использования реагентами. Сначала стрипы инкубируются с разведенной сывороткой пациента. Антитела, содержащиеся в сыворотке, связываются со специфичным(и) антигеном(ами) на мембране. Несвязавшиеся антитела удаляются в ходе промывки. В ходе следующей инкубации в растворе AP-конъюгата козьих анти-человеческих IgG антител ферментный конъюгат связывается с комплексом антиген-антитело. После удаления в ходе промывки несвязавшегося конъюгата, тест – стрипы инкубируются в растворе субстрата. В присутствии связанного конъюгата субстрат гидролизуется и окрашивает точки (доты) на мембране. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации антител в образце.

3. СОСТАВ НАБОРА

Аббревиатуры:

AP = щелочная фосфатаза; BCIP = 5-бromo-4-хлоро-3-индолфосфатаза; MIT = Метилизотиазолин; NaN₃ = Азид натрия; NBT = Нитросиний тетразолий; TBS = ТРИС-солевой буфер

Тест - стрипы	ТЕСТ - СТРИП	КАРТРИДЖ
<p>3 разделяемые рамки х 8 тест - стрипов; помещены в алюминиевый пакет</p> <p><u>8 дотов на каждом стрипе:</u> 1 положительный контроль (C+) 6 антигенов 1 отрицательный контроль (C-)</p>		
<p>Картридж</p> <p>24 картриджа по 7 лунок в каждом; заклеены алюминиевой фольгой</p> <p>Буфер для разведения образцов 1^{ая} позиция, 1 х 1,4 мл (желтый) содержит: H₂O • TBS • NaCl • Tween • Консервант (MIT) • Краситель • Пеногаситель</p> <p>Буфер для промывки 2^{ая}, 3^{ая}, 4^{ая} и 6^{ая} позиции, 4 х 1,4 мл (бесцветный) содержит: H₂O • TBS • NaCl • Tween • Консервант (MIT) • Пеногаситель</p> <p>Ферментный конъюгат 5^{ая} позиция, 1 х 1,4 мл (красный) содержит: H₂O • TBS • NaCl • KCl • MgCl₂ • AP-конъюгат козьих анти-человеческих IgG антител • Стабилизатор • Консервант (MIT) • Краситель • Пеногаситель</p> <p>Субстрат 7^{ая} позиция, 1 х 1,4 мл (бледно-желтый) содержит: H₂O • NaN₃ (0.05 %) • MgCl₂ • TBS • NBT • BCIP • Стабилизатор • Пеногаситель</p>		
Другие материалы	Фильтровальная бумага (для удаления излишков буфера в п. 9.1.16 протокола анализа), помещена в алюминиевый пакет вместе с тест - стрипами	
Документы	Инструкция, Сертификат анализа, Список антигенов	

4. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Анализатор *BlueDiver Instrument*

5. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Микродозаторы / Одноразовые перчатки

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Набор должен храниться при температуре от +2°C до +8°C. НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.

После вскрытия набора неиспользованные картриджи необходимо хранить при температуре 2-8°C в защищенном от света месте, желательно в оригинальной упаковке. Неиспользованные стрипы необходимо поместить обратно в алюминиевый пакет, запечатать и хранить при температуре 2-8°C желательно в оригинальной упаковке. При правильном хранении все компоненты набора стабильны до истечения указанного срока годности.

7. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для профессионального использования для диагностики *in vitro*. Постановка данного набора должна осуществляться квалифицированным персоналом. Компоненты набора содержат потенциально опасные вещества, избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. С образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально зараженными. Утилизация отходов: образцы пациентов и использованные стрипы должны утилизироваться как зараженные. Другие реагенты не требуют специальной утилизации, если этого не указано отдельно. Компания D-tek s.a. и её официальные дистрибьюторы не несут ответственности за ущерб, причиненный вследствие изменения процедур, указанных в данном руководстве.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы крови могут быть собраны в чистые пробирки или пробирки, содержащие ЭДТА, гепарин или цитрат. После отделения образцов сыворотки или плазмы можно хранить при температуре 2-8°C не более трех дней. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить до -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. После размораживания образцы всегда необходимо встряхивать.

9. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Принцип анализа:

После ручной установки тест - стрипов и картриджей, процедура инкубации и промывки происходит автоматически с помощью анализатора *BlueDiver Instrument*, который, погружая и вынимая тест - полоски из растворов, обеспечивает оптимальную процедуру промывки и инкубации. Весь анализ идет при комнатной температуре.

Описание тест - стрипов:

На **лицевой стороне** стрипов сорбированы антигены, которые выглядят как бледно-голубые точки (доты). Эта окраска является гарантией того, что все антигены корректно нанесены на мембрану. Окраска исчезает в ходе проведения анализа. Также на лицевой стороне нанесен номер тест - стрипа и двумерный штрих код для идентификации тест - стрипа после окончания анализа.



Обратная сторона тест - стрипа содержит буквенно - цифровое обозначение и штрих код для идентификации анализатором типа тест - стрипа и номера лота.



Перед началом автоматического анализа тест - стрипы должны быть вручную вставлены в специальную гребенку (см. Подготовка к анализу п. 9.1.4). В ходе данной процедуры категорически запрещено касаться мембраны пальцами. Всегда надевайте одноразовые перчатки, а для манипуляций с тест - стрипами используйте одноразовые перчатки и пластиковую рамку, в которую вставлены мембраны.

Описание картриджей: (см. рисунок на стр. 1)

Картридж состоит из 7 емкостей с готовыми для использования реагентами. Картридж герметично заклеен (емкости с реагентами разделены) алюминиевой фольгой, которую необходимо удалить перед началом анализа. После вскрытия картриджа следите за тем, чтобы реагенты не переливались из одной емкости в другую. Обратная сторона каждого картриджа содержит буквенно - цифровое обозначение и штрих код для идентификации анализатором типа картриджа и номера лота. Перед началом анализа картриджи необходимо вставить в специальный держатель для картриджей (см. Подготовка к анализу п. 9.1.10). Передняя и задняя сторона картриджа имеют 1 треугольный и два (сверху и снизу) квадратных выступа для правильной ориентации картриджа в держателе.

Соотношение СТРИПЫ/КАРТРИДЖИ

Тест - стрипы и картриджи из одного и того же набора имеют один и тот же номер лота и образуют лот - специфические пары. Не пытайтесь анализировать в одной паре тест - стрипы и картриджи из разных лотов, т.к. любые несоответствия будут опознаны анализатором *BlueDiver instrument* и анализ будет остановлен. Для анализа можно использовать пары тест - стрип/картридж из различных наборов. Однако, только наборы, имеющие одинаковый протокол анализа (время инкубации и последовательность), можно ставить вместе в одной постановке (всегда сверяйте номер протокола, указанный наверху первой страницы данной инструкции).

9.1 Подготовка к анализу

- Перед началом анализа все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (+18°C to +25°C).
- Для облегчения постановки анализа и корректного расположения тест - стрипов всегда необходимо составлять свой собственный протокол анализа (с помощью программного обеспечения Dr Dot или внешний).
- Убедитесь, что картриджи правильно закреплены в держателе.
- Убедитесь, что анализатор *BlueDiver Instrument* подключен.

Ниже приведена последовательность подготовки к работе анализатора к работе *BlueDiver Instrument*, тест - стрипов, картриджей и образцов пациентов. В случае возникновения проблем обратитесь к руководству к анализатору *BlueDiver Instrument*.

1. Включите анализатор *BlueDiver instrument* и подождите несколько секунд, пока на дисплее не появятся дата и время.
2. Введите дату и время нажатием кнопки ✓ на экране (в случае первого использования или сброса данных обратитесь к инструкции к анализатору *BlueDiver instrument*) → на экране появится надпись "Initialize?".
3. Инициализируйте анализатор нажатием кнопки ✓ на экране → держатель с зажимом для тест - стрипов будет автоматически перемещен в центральное положение (ждущий режим) → на экране появится надпись "Load strips (24)".
4. (НЕ ВВОДИТЕ КОЛИЧЕСТВО СТРИПОВ НА ДАННОМ ЭТАПЕ). Достаньте зажим из держателя, осторожно потянув его вверх, и вставьте необходимое для анализа количество тест - стрипов: держа зажим лицевой стороной с пронумерованными положениями вверх (открытое положение), вставьте тест - стрипы, также держа их лицевой стороной вверх, в соответствующие отверстия в зажиме. Установив тест - стрипы, убедитесь, что пластиковые «язычки» достигли самого верхнего положения в зажиме.

Замечания:

- Всегда начинайте установку тест - стрипов в зажим начиная с самого первого положения, не допускается наличие пустых мест между тест - стрипами.
- После установки всех тест - стрипов в зажим визуально убедитесь в правильном вертикальном, горизонтальном и боковом расположении тест - стрипов. Любые отклонения необходимо устранить, удалив тест - стрипы из зажима и вставив их снова.



We Apply Science

- Небольшим усилием установите зажим в держатель.
- Введите количество используемых для анализа тест – стрипов, используя кнопки в виде стрелок на экране.
- Подтвердите введенные данные нажатием кнопки ✓ на экране → держатель с зажимом автоматически переместится в положение готовности, установив тест – стрипы над отверстиями в держателе картриджа → на экране появится надпись **"Check alignment"**.
- Для проверки правильности взаимного расположения тест – стрипов используйте функцию "JOG": нажмите и удерживайте на экране стрелку вниз, пока нижняя часть тест – стрипов не достигнет отверстий в держателе картриджа. В случае правильного расположения тест – стрипов они не касаются контуров отверстий.
Замечание: в случае смещения (контакт тест – стрипов с держателем картриджа), пожалуйста, обратитесь к руководству к анализатору *BlueDiver Instrument*.
- Подтвердите правильность расположения тест – стрипов нажатием кнопки ✓ на экране → анализатор полностью опустит тест – стрипы в отверстия и считывает штрих коды на тест – стрипах → после полного считывания штрих кодов на экране появится надпись **"Load reagent"**.
Замечание: в случае ошибок в считывании одного или нескольких штрих кодов тест – стрипов (мигание светодиодов), пожалуйста, обратитесь к руководству к анализатору *BlueDiver Instrument*.
- Удалите алюминиевую фольгу с картриджем и установите их в держателе для картриджа под соответствующими тест – стрипами.
- Подтвердите окончание установки картриджа нажатием кнопки ✓ на экране → анализатор считывает штрих коды с картриджа и проверяет соответствие картриджа тест – стрипам → после полного считывания штрих кодов на экране появится количество верных пар тест – стрип/картридж.
Замечание: в случае ошибок в считывании одного или нескольких штрих кодов картриджа или неверных пар тест – стрип/картридж (мигание светодиодов), пожалуйста, обратитесь к руководству к анализатору *BlueDiver Instrument*.
- Подтвердите количество тест – стрипов нажатием кнопки ✓ → на экране появится номер протокола, идентифицированный по штрих кодам (**Protocol ID xx**).
- Подтвердите номер протокола нажатием кнопки ✓ → на экране появится надпись **"Please close cover"**.
- Закройте крышку анализатора и нажмите кнопку ✓ на экране → начнется выполнение первого шага процедуры анализа - предварительная промывка тест – стрипов (предобработка), тест – стрипы инкубируются во второй лунке картриджа (время инкубации – 1 минута) → после окончания на экране появится надпись **"Please open cover"**.
- Откройте крышку анализатора и нажмите кнопку ✓ на экране → горизонтальный держатель с зажимом автоматически двигается к краю анализатора и наклоняет тест – стрипы → на экране появится надпись **"Dry strips"**.
- Высушите стрипы с помощью входящей в состав набора фильтровальной полоски, осторожно промокнув тест – стрипы внизу, где находятся специальные лунки для внесения образцов.
- Подтвердите окончание предыдущей стадии, нажав кнопку ✓ → на экране появится надпись **"Apply samples"**.
- Внесите по 10 мкл образцов сыворотки/плазмы в лунки для образцов.
- Подтвердите внесение образцов, нажав кнопку ✓ → на экране появится надпись **"Please close cover"**.
- Закройте крышку анализатора и нажмите кнопку ✓ → начнется автоматическое выполнение анализа в следующей последовательности (**Protocol 02**):

9.2 Протокол анализа

Шаг	Описание	Время
01.	Тест – стрипы инкубируются в 1 ^{ой} лунке картриджа (<i>Буфер для разведения</i>). После контакта с жидкостью внесенные в лунки образцы пациентов высвобождаются и разводятся в буфере	30 мин
02.	Зажим передвигается вперед и тест – стрипы инкубируются во 2 ^{ой} лунке картриджа (<i>Буфер для промывки</i>)	2 мин
03.	Зажим передвигается вперед и тест – стрипы инкубируются в 3 ^{ей} лунке картриджа (<i>Буфер для промывки</i>)	2 мин
04.	Зажим передвигается вперед и тест – стрипы инкубируются в 6 ^{ой} лунке картриджа (<i>Буфер для промывки</i>)	2 мин
05.	Зажим передвигается назад и тест – стрипы инкубируются в 5 ^{ой} лунке картриджа (<i>Конъюгат</i>)	10 мин
06.	Зажим передвигается назад и тест – стрипы инкубируются в 4 ^{ой} лунке картриджа (<i>Буфер для промывки</i>)	2 мин
07.	Зажим передвигается назад и тест – стрипы инкубируются в 3 ^{ей} лунке картриджа (<i>Буфер для промывки</i>)	2 мин
08.	Зажим передвигается назад и тест – стрипы инкубируются во 2 ^{ой} лунке картриджа (<i>Буфер для промывки</i>)	2 мин
09.	Зажим передвигается вперед и тест – стрипы инкубируются в 7 ^{ой} лунке картриджа (<i>Субстрат</i>)	10 мин
10.	Зажим передвигается назад и тест – стрипы инкубируются в 6 ^{ой} лунке картриджа (<i>Буфер для промывки</i>)	2 мин

После окончания протокола анализа держатель с зажимом передвигается в центральное положение (ждущий режим). Анализатор издает звуковой сигнал и на экране появляется надпись **"Finished test"**.

Аккуратно промокните тест – стрипы на фильтровальной бумаге и позвольте тест – стрипам высохнуть в течение 10 минут перед интерпретацией результатов.

В случае использования BlueScan для интерпретации результатов, пожалуйста, не вынимайте тест – стрипы из зажима.

СОХРАНЕНИЕ ДАННЫХ АНАЛИЗА

Протокол анализа можно загрузить на носитель USB, нажав на соответствующую кнопку и следуя инструкциям на экране (Вставьте устройство USB → Запись на USB → Удалите устройство USB). Этот шаг не является обязательным, однако рекомендуется для регулирования и отслеживания анализов.

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Может быть выполнена визуальная оценка результатов, однако настоятельно рекомендуется использовать сканирующую систему Dr Dot для более точной полуколичественной интерпретации результатов.

10.1 Визуальная интерпретация:

- Достаньте зажим из держателя и удалите тест – стрипы.
- Поместите тест – стрипы лицевой стороной вверх на отмеченные поля шаблона для интерпретации результатов, входящий в состав набора. Он будет указывать соответствующие положения контролей и антигенов на мембране.
- Самый верхний дот (Положительный Контроль) должен быть положительным для всех пациентов.



We Apply Science

Только в том случае, если Положительный Контроль окрашен, можно утверждать, что результаты являются достоверными, а анализ проведен корректно. Если самый верхний дот неокрашен, тест является недействительным и не может быть интерпретирован в дальнейшем.

4. Сравните доты, отвечающие специфическим антигенам, с дотом Отрицательного Контроля (всегда расположен в самом низу). Интенсивность окраски дотов антигенов прямо пропорциональна титру специфических антител в образцах пациентов.

Интенсивность окраски Отрицательного Контроля может варьироваться в зависимости от характеристик образца. Если в образцах пациентов нет интерферирующих веществ, Отрицательный Контроль может быть почти бесцветен. Наоборот, интенсивно окрашенный Отрицательный Контроль говорит о высоком уровне неспецифического связывания в образце.

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ:

Образец считается положительным в том случае, если интенсивность окраски дота, отвечающего этому антигену, выше, чем интенсивность окраски Отрицательного Контроля.

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ:

Образец считается отрицательным в том случае, если интенсивность окраски дота, отвечающего этому антигену, ниже или сравнима с интенсивностью окраски Отрицательного Контроля.

10.2 Использование сканирующей системы Dr DOT

1. Достаньте зажим с тест – стрипами из держателя. Не вынимайте тест – стрипы из зажима.
2. Вставьте зажим с тест – стрипами лицевой стороной вниз в специальное место в крышке сканера BlueScan.
3. Отсканируйте тест – стрипы, используя программное обеспечение Dr DOT.

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

11.1 Воспроизводимость

Для каждого антитела были протестированы контрольные образцы сравнения в статистических повторах для расчета внутри- и межсерийных коэффициентов вариации. Интенсивность дотов лежала в пределах указанного диапазона, и стандартное отклонение было менее 10%.

11.2 Чувствительность и специфичность

Sm	Sm/RNP	SSA/Ro60kD	SSB																																																
<table border="1"> <thead> <tr><th colspan="2"></th><th>+</th><th>-</th></tr> </thead> <tbody> <tr><th>+</th><td>true positive</td><td>36</td><td>false positive 2</td></tr> <tr><th>-</th><td>false negative</td><td>0</td><td>true negative 100</td></tr> </tbody> </table>			+	-	+	true positive	36	false positive 2	-	false negative	0	true negative 100	<table border="1"> <thead> <tr><th colspan="2"></th><th>+</th><th>-</th></tr> </thead> <tbody> <tr><th>+</th><td>true positive</td><td>24</td><td>false positive 0</td></tr> <tr><th>-</th><td>false negative</td><td>0</td><td>true negative 30</td></tr> </tbody> </table>			+	-	+	true positive	24	false positive 0	-	false negative	0	true negative 30	<table border="1"> <thead> <tr><th colspan="2"></th><th>+</th><th>-</th></tr> </thead> <tbody> <tr><th>+</th><td>true positive</td><td>69</td><td>false positive 0</td></tr> <tr><th>-</th><td>false negative</td><td>1</td><td>true negative 78</td></tr> </tbody> </table>			+	-	+	true positive	69	false positive 0	-	false negative	1	true negative 78	<table border="1"> <thead> <tr><th colspan="2"></th><th>+</th><th>-</th></tr> </thead> <tbody> <tr><th>+</th><td>true positive</td><td>54</td><td>false positive 1</td></tr> <tr><th>-</th><td>false negative</td><td>0</td><td>true negative 93</td></tr> </tbody> </table>			+	-	+	true positive	54	false positive 1	-	false negative	0	true negative 93
		+	-																																																
+	true positive	36	false positive 2																																																
-	false negative	0	true negative 100																																																
		+	-																																																
+	true positive	24	false positive 0																																																
-	false negative	0	true negative 30																																																
		+	-																																																
+	true positive	69	false positive 0																																																
-	false negative	1	true negative 78																																																
		+	-																																																
+	true positive	54	false positive 1																																																
-	false negative	0	true negative 93																																																
Sensitivity 100% Specificity 98%	Sensitivity 100% Specificity 100%	Sensitivity 99% Specificity 100%	Sensitivity 100% Specificity 99%																																																
Jo-1	Scl-70																																																		
<table border="1"> <thead> <tr><th colspan="2"></th><th>+</th><th>-</th></tr> </thead> <tbody> <tr><th>+</th><td>true positive</td><td>22</td><td>false positive 0</td></tr> <tr><th>-</th><td>false negative</td><td>0</td><td>true negative 119</td></tr> </tbody> </table>			+	-	+	true positive	22	false positive 0	-	false negative	0	true negative 119	<table border="1"> <thead> <tr><th colspan="2"></th><th>+</th><th>-</th></tr> </thead> <tbody> <tr><th>+</th><td>true positive</td><td>13</td><td>false positive 0</td></tr> <tr><th>-</th><td>false negative</td><td>0</td><td>true negative 91</td></tr> </tbody> </table>			+	-	+	true positive	13	false positive 0	-	false negative	0	true negative 91																										
		+	-																																																
+	true positive	22	false positive 0																																																
-	false negative	0	true negative 119																																																
		+	-																																																
+	true positive	13	false positive 0																																																
-	false negative	0	true negative 91																																																
Sensitivity 100% Specificity 100%	Sensitivity 100% Specificity 100%																																																		

Образцы были проанализированы (подтверждение положительных или отрицательных результатов по специфическим антителам с помощью референсного метода) с использованием данного метода. Интенсивность окрашивания оценивалась с помощью программного обеспечения Dr Dot. Чувствительность и специфичность были рассчитаны с помощью ROC анализа исходя из уровней cut-off, измеренных автоматически используя программное обеспечение Dr Dot.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Клинический диагноз не должен ставиться, основываясь только на результате диагностики in vitro. Для постановки диагноза необходимо проводить полное клиническое исследование, а также лабораторные тесты, поскольку ни один метод не может исключить ложно положительных и ложно отрицательных результатов. В этой связи рекомендуется использовать метод непрямого иммунофлуоресцентного анализа, т.к. он традиционно считается золотым стандартом в диагностике аутоиммунных заболеваний.

Версия: В (03/2012)

*Набор можно заказать в
ЗАО «БиоХимМак»:
119192, г. Москва, Ломоносовский пр., д.29, стр.1
Тел. (495) 647-27-40,
E-mail: elisa@biochemmack.ru*