

ANA²⁵ Screen IgG

Кат. номер: ANA25Q-24

BlueDiver протокол: 02

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор BlueDiver Quantrix ANA²⁵ Screen IgG предназначен для обнаружения в человеческой сыворотке IgG антител к ядерным антигенам: нуклеосома, dsDNA, гистоны, Sm, RNP (68kD/A/C), Sm/RNP, SSA/Ro 60kD, SSA/Ro 52kD, SSB, Scl-70, Ku, PM-Scl 100, Mi-2, Jo-1, PL-7, PL-12, SRP, рибосомы, CENP-A/B, PCNA, sp100, gp210, рекомбинантным M2, M2/nPDC и f-актин 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 АР-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 связавшегося конъюгата субстрат гидролизует и окрашивает точки (доты) на мембране. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации антител в образце. Все полученные результаты являются количественными благодаря наличию на каждом тест – стрипе 6 точек калибровочной кривой (включая Бланк). Также на тест – стрипы нанесены различные контроли (образца, конъюгата и субстрата). Наличие данных контролей позволяет контролировать правильность выполнения анализа (от внесения образца до кинетики субстрата, а также специфичность/реакционная способность конъюгата). Для обеспечения оптимальной точности, все доты нанесены на тест – стрипы в 3 экземплярах, что позволяет рассчитывать среднее значение и доверительный интервал для каждого параметра (антигены, калибровочная кривая и контроли).

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

<p>а) Тест - стрип (3 разделяемые рамки x 8 тест - стрипов; помещены в алюминиевый пакет)</p> <p>б) Фильтровальная бумага (для удаления излишков буфера в п. 9.1.16 протокола анализа), помещена в алюминиевый пакет вместе с тест - стрипами</p>	<p>в) Картридж (24 картриджа по 7 лунок в каждом; заклеены алюминиевой фольгой)</p> <p>Буфер для разведения образцов 1^{ая} позиция, 1 x 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 x 1,4 мл (бесцветный) содержит: H₂O • TBS • NaCl • Tween • Консервант (MIT) • Пеногаситель</p> <p>Ферментный конъюгат 5^{ая} позиция, 1 x 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 x 1,4 мл (бледно-желтый) содержит: H₂O • NaN₃ (0.05 %) • MgCl₂ • TBS • NBT • BCIP • Стабилизатор • Пеногаситель</p> <p>д) Документы: Инструкция, Сертификат анализа, Список антигенов</p>
---	---

4. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Анализатор *BlueDiver Instrument*, программное обеспечение Dr DOT (версия не ниже 3.0)



We Apply Science

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 желательна в оригинальной упаковке. При правильном хранении все компоненты набора стабильны до истечения указанного срока годности.

7. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ (также необходимо изучить инструкцию к анализатору BlueDiver)

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:

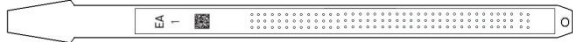
Принцип анализа:

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 фиксации 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 на верху 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)".



We Apply Science

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.

5. Небольшим усилием установите зажим в держатель.

6. Введите количество используемых для анализа тест – стрипов, используя кнопки в виде стрелок на экране.

7. Подтвердите введенные данные нажатием кнопки ✓ на экране → держатель с зажимом автоматически переместится в положение готовности, установив тест – стрипы над отверстиями в держателе картриджей → на экране появится надпись **“Check alignment”**.

8. 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 картриджей. В случае правильного расположения тест – стрипов они не касаются контуров отверстий.

Замечание: в случае смещения (контакт тест – стрипов с держателем картриджей), пожалуйста, обратитесь к руководству к анализатору *BlueDiver Instrument*.

9. Подтвердите правильность расположения тест – стрипов нажатием кнопки ✓ на экране → анализатор полностью опустит тест – стрипы в отверстия и считает 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*.

10. Удалите алюминиевую фольгу с картриджей и установите их в держателе для картриджей под соответствующими тест – стрипами.

11. Подтвердите окончание установки картриджей нажатием кнопки ✓ на экране → анализатор считывает штрих коды с картриджей и проверит соответствие картриджей 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 картриджей или неверных пар тест – стрип/картридж (мигание светодиодов), пожалуйста, обратитесь к руководству к анализатору *BlueDiver Instrument*.

12. Подтвердите количество тест – стрипов нажатием кнопки ✓ → на экране появится номер протокола, идентифицированный по штрих кодам (**Protocol ID xx**).

13. Подтвердите номер протокола нажатием кнопки ✓ → на экране появится надпись **“Please close cover”**.

14. Закройте крышку анализатора и нажмите кнопку ✓ на экране → начнется выполнения первого шага процедуры анализа – предварительная промывка тест – стрипов (предобработка), тест – стрипы инкубируются во второй лунке картриджей (время инкубации – 1 минута) → после окончания на экране появится надпись **“Please open cover”**.

15. Откройте крышку анализатора и нажмите кнопку ✓ на экране → горизонтальный держатель с зажимом автоматически движется к краю анализатора и наклоняет тест – стрипы → на экране появится надпись **“Dry strips”**.

16. Высушите стрипы с помощью входящей в состав набора фильтровальной полоски, осторожно промокнув тест – стрипы внизу, где находятся специальные лунки для внесения образцов.

17. Подтвердите окончание предыдущей стадии, нажав кнопку ✓ → на экране появится надпись **“Apply samples”**.

18. Внесите по 10 мкл образцов сыворотки/плазмы в лунки для образцов.

19. Подтвердите внесение образцов, нажав кнопку ✓ → на экране появится надпись **“Please close cover”**.

20. 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

Оценка результатов проводится с помощью сканирующей системы и программного обеспечения Dr DOT.

Замечание: Нельзя использовать систему DrDOT для постановки диагноза. Окончательный клинический диагноз должен всегда ставиться только профессиональным врачом.

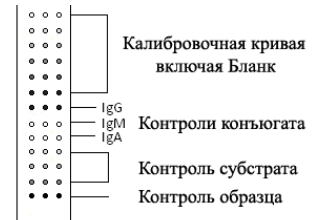
1. Достаньте зажим с тест – стрипами из держателя. Не вынимайте тест – стрипы из зажима.
2. Вставьте зажим с тест – стрипами лицевой стороной вниз в специальное место в крышке сканера BlueScan.
3. Отсканируйте тест – стрипы, используя программное обеспечение Dr DOT.

За более подробной информацией обращайтесь к руководству к программному обеспечению Dr DOT.

10.1 Контроли валидности теста:

Перед расчетом результатов программа Dr DOT автоматически проверяет правильность выполнения анализа по следующим нескольким показателям:

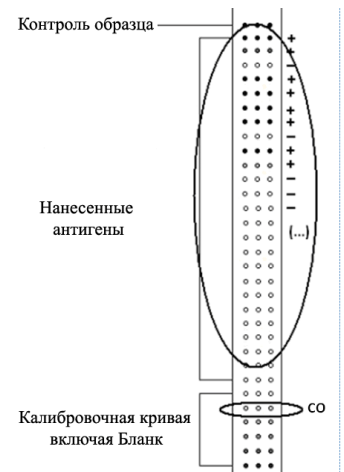
- **Калибровочная кривая (включая Бланк)** (6 линий по 3 точки, включая Бланк, расположенные в порядке увеличения интенсивности окраски сверху вниз) должна соответствовать определенному уравнению кривой.
- **Контроли образца** (2 линии по 3 точки, первая и последняя на тест - стрипе). Интенсивность окраски точек должна быть не менее определенной величины.
- **Контроли конъюгата** (3 линии по 3 точки, соответствующие IgG, IgM и IgA сверху вниз). Интенсивность окраски точек должна быть не менее определенной величины, соответствующей только специфическому для данного набора конъюгату.
- **Контроли субстрата** (3 линии по 3 точки, расположенные в порядке увеличения интенсивности окраски сверху вниз) должны соответствовать линейной регрессии.



10.2 Результаты анализа

Каждый тест – стрип содержит 6 точек калибровочной кривой: 0 (Бланк), 6, 12, 25, 50 and 100 Ед/мл; Система Dr DOT измеряет значение интенсивности каждой из трех точек, рассчитывает количественное значение в соответствие с калибровочной кривой и сравнивает с предустановленным значением cut-off. Для данного метода рекомендуемое значение **cut-off составляет 6 Ед/мл** для всех антигенов.

Внимание: Значение cut-off 6 Ед/мл соответствует интенсивности окрашивания 2-ой точки калибровочной кривой и используется по умолчанию программой Dr DOT. Тем не менее, пользователь может сам установить необходимое значение cut-off для каждого антигена в зависимости от своего собственного ROC анализа (см. инструкцию к программному обеспечению Dr DOT).



ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ:

Образец считается положительным, если значение, полученное для соответствующего антигена, **выше** значения cut-off.

В таблице результатов, полученной с помощью программы Dr DOT, система подчеркивает антигены, для которых получен положительный результат, и указывает числовое значение в скобках.

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ:

Образец считается отрицательным, если значение, полученное для соответствующего антигена, **меньше или равно** значению cut-off.

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

11.1 Воспроизводимость

Для каждого антитела были протестированы контрольные образцы сравнения в статистических повторях 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

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ:			
Значения были рассчитаны следующим образом:			
Положительные результаты			
Положительные результаты + ложно отрицательные результаты			
Антиген	Положительные результаты	Ложно отрицательные результаты	Чув-сть
Nucleosome*	36	18	67%
dsDNA	32	0	100%
Histones	31	0	100%
Sm	36	0	100%
RNP	43	0	100%
Sm/RNP	24	0	100%
SSA/Ro 60kD	69	1	99%
SSA/Ro 52kD*	-	-	-
SSB	54	0	100%
Sci-70	13	0	100%
Ku	22	0	100%
PM-Sci 100	10	0	100%
Mi-2	20	0	100%
Jo-1	22	0	100%
PL-7	3	0	100%
PL-12	3	0	100%
SRP	18	0	100%
Ribosome P0	15	0	100%
CENP-A/B	16	0	100%
PCNA	13	0	100%
sp100	22	0	100%
gp210	23	0	100%

СПЕЦИФИЧНОСТЬ:			
Значения были рассчитаны следующим образом:			
Отрицательные результаты			
Отрицательные результаты + ложно положительные результаты			
Антиген	Отрицательные результаты	Ложно положительные результаты	Чув-сть
Nucleosome*	49	1	98%
dsDNA	36	0	100%
Histones	132	0	100%
Sm	100	2	98%
RNP	93	2	98%
Sm/RNP	30	0	100%
SSA/Ro 60kD	78	0	100%
SSA/Ro 52kD*	-	-	-
SSB	93	1	99%
Sci-70	91	0	100%
Ku	50	0	100%
PM-Sci 100	24	0	100%
Mi-2	50	0	100%
Jo-1	119	0	100%
PL-7	50	0	100%
PL-12	50	0	100%
SRP	20	0	100%
Ribosome P0	24	0	100%
CENP-A/B	97	1	99%
PCNA	34	0	100%
sp100	24	0	100%
gp210	24	0	100%



We Apply Science

M2 recombinant	168	0	100%
M2/nPDC	48	3	94%
f-Actin	34	1	97%

M2 recombinant	119	2	98%
M2/nPDC	83	5	94%
f-Actin	60	1	98%

Охарактеризованные образцы Characterized samples (подтверждение положительных или отрицательных результатов по специфическим антителам с помощью референсного метода) были проанализированы с помощью данного метода. Оценка значения интенсивности проводилась с помощью программного обеспечения Dr Dot. Чувствительность и специфичность были рассчитаны с помощью ROC анализа при значении cut-off, рекомендованном производителем (6 Ед/мл). В случае неспецифичных для заболевания антигенов (таких как например SSA/Ro 52kD*) никаких значений не может быть получено.

*) Замечание: Для антигенов, отмеченных серым цветом, поскольку не существует референсного метода, для получения данных о клинической специфичности/чувствительности использовалась только популяция пациентов либо с подтвержденным диагнозом, либо контрольные пациенты.

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*