

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССОВ IgG И/ИЛИ IgM К КАРДИОЛИПИНУ, ФОСФАТИДИЛСЕРИНУ, ФОСФАТИДИЛ-ИНОЗИТОЛУ, ФОСФАТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЕ И В2-ГЛИКОПРОТЕИНУ I

ORG 529, Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM

Каталог. № : **ORG 529**
Количество : **96**
Производитель: **Orgentec (Германия)**

Методика от **08-2012**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

ОБОБЩЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM анализ компании ORGENTEC является количественным ферментным иммуноанализом (ИФА), предназначенным для скрининга наличия аутоантител класса IgG и IgM к кардиолипину, Фосфатидилсерину, фосфатидил-инозитолу, фосфатидиловой кислоте и β 2-гликопротеину I в человеческой сыворотке или плазме как средство диагностики увеличенного риска тромбоза у пациентов с системной волчанкой или связанными с ней расстройствами.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Исследование антител к фосфолипидам началось в 1906 г. с введением Вассерманом серологического теста на сифилис. В 1942 обнаружена фосфолипидная природа реактивного компонента, названного кардиолипином. К 1950 г. выяснилось, что многие люди обнаруживали положительный тест на сифилис без клинических проявлений заболевания. Данное явление биологическим ложноположительным серологическим тестом на сифилис. В группе таких пациентов была обнаружена высокая частота аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку и синдром Сьегрена.

Наличие циркулирующего антикоагулянта у пациентов с системной красной волчанкой было впервые обнаружено в 1952 г. и ассоциировано с повышенным риском парадоксального тромбоза в 1963 г. Термин «волчаночный антикоагулянт», введенный в 1972 г., не вполне корректен, так как данное вещество чаще обнаруживается у пациентов без волчанки и ассоциировано более с тромбозом, чем с аномальным кровотоком.

В последнее время выяснено, что кофактором антикардиолипиновых антител является β 2-гликопротеином I. β 2-глобулин с молекулярной массой 50 килодальтон, присутствующий в плазме в количестве 200 мкг/мл. Обнаружено, что β 2-гликопротеин I ингибирует внутренний путь образования тромбина, участвуя тем самым в регуляции свертывания крови. β 2-гликопротеин I in vivo ассоциирован с отрицательно заряженными веществами – анионными фосфолипидами, гепарином и липопротеином. Участок связывания фосфолипидов находится в пятом домене молекулы.

Термином «антитела к фосфолипидам» обозначаются суммарные антитела к отрицательно заряженным соединениям, таким как кардиолипин, волчаночный антикоагулянт, фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол и фосфатидиловая кислота. Из этих соединений кардиолипин наиболее часто используется в качестве антигена в ИФА-тестах на антитела к фосфолипидам. Некоторые антисыворотки, реагирующие с ИФА-ячейками, покрытыми кардиолипином, могут реагировать с другими отрицательно заряженными фосфолипидами, такими как фосфатидил-серин, фосфатидил-инозитол и фосфатидиловая кислота.

Некоторые исследователи полагают, что использование фосфатидил-серина вместо кардиолипина в ИФА-тестах увеличивает специфичность диагностики. Однако при исследовании сывороток пациентов с предполагаемым антифосфолипидным синдромом представляется более целесообразным совместное использование обоих этих антигенов. Комитет по науке и стандартизации Международного сообщества по тромбозам и гемостазу принял согласованные критерии, которые могут помочь в лабораторной диагностике. Эти критерии были обновлены в 2006 г.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Смесь высоко очищенных кардиолипина, фосфатидил серина, фосфатидил иноzitола, фосфатидиловой кислоты и человеческого бета-2-гликопротеина I привита к микрочайкам. Антитела к этим антигенам, если присутствуют в разбавленной сыворотке, связываются с микрочайками. Промывание микрочайек удаляет несвязанные антитела сыворотки. Анти-человеческие IgG конъюгированные пероксидазой хрена иммунологически связываются с связанными антителами пациента, формируя конъюгат-антитело-антиген комплекс. Промывание микрочайек удаляет несвязанный конъюгат. Энзимный субстрат при присутствии связанного конъюгата гидролизуется до формирования голубого окраса. Добавления кислоты останавливает реакцию, формируя желтый конечный продукт. Интенсивность этого желтого цвета измеряется фотометрически при 450 нм.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию.	1
Калибратор А 0 GPL-Ед/мл/0 MPL-Ед/мл, содержащий сывороточную/буферную матрицу (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор В 6.3 GPL-Ед/мл/6.3 MPL-Ед/мл, содержащий антитела фосфолипидов в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор С 12.5 GPL-Ед/мл/12.5 MPL-Ед/мл, содержащий антитела фосфолипидов в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор D 25 GPL-Ед/мл/25 MPL-Ед/мл, содержащий антитела фосфолипидов в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор Е 50 GPL-Ед/мл/50 MPL-Ед/мл, содержащий антитела фосфолипидов в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор F 100 GPL-Ед/мл/100 MPL-Ед/мл, содержащий антитела фосфолипидов в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Контроли (Положительный и Отрицательный), содержащие антитела фосфолипидов в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтого цвета. Готовы к использованию. Концентрация указывается в сертификате анализа.	2 флакона 1.5 мл каждый
Буфер для образцов Р, содержит PBS, BSA, моющее средство, консервант азида натрия 0,09%, желтый, концентрат (5 x).	1 флакон 15 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий античеловеческие антитела IgM, меченые пероксидазой хрена; содержит PBS, BSA, детергент, консервант Проклин. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ, бесцветный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор, содержит кислоту. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл
Инструкция по применению	1 шт.
Сертификат контроля качества	1 шт.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционно: контрольный фильтр с длиной волны 620 нм
- Программное обеспечение для ридера
- Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объемом 100 мкл
- Вortexный миксер
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Таймер
- Дистиллированная или деионизированная вода

- Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
 - Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора
- Наборы ORGENTEC ИФА являются подходящими для использования на открытых автоматизированных процессорах. Каждый анализ должен быть оценен на соответствующей автоматизированной системе. Подробная информация предоставляется по запросу.

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
2. Дайте возможность крови стечь и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
4. Образцы должны храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20°C до шести месяцев.
5. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
6. Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2 - 8 °C
2. Держать микропланшетные лунки в герметичном мешочке с осушителем.
3. реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
4. Не поддавать реагенты для анализа воздействию тепла, солнца или сильного света в течении хранения и использования.
5. Разбавленный буфер образца и промывочный буфер стабильны по крайней мере 30 дней при 2 - 8 °C. Рекомендуется использование в тот же день.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
2. Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
3. Все материалы следует привести к комнатной температуре.
4. Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
5. Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
6. Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
8. Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
9. Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
10. Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
11. Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
12. Не используйте повторно ячейки микропланшета.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте 0,09% тем не менее не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
- Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
- Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.

- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Придерживайтесь руководств по осуществлению контроля качества в лаборатории, используйте исследования контролей и/или пулированных сывороток. Придерживайтесь существующего законодательства при работе со всеми реагентами и образцами.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием.

Приготовление образца

Разбавьте образцы пациентов 1:100 буфером для образцов перед анализом. Для этого добавьте до 10 мкл образца 990 мкл буфера для образца в пробирке из полистирола. Тщательно перемешайте. Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для контролей/калибраторов и проб пациентов.

1. Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку.
Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °C).
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
2. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
3. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
4. Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Бихроматическое измерение проводите при 600-690 нм.
Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Пример пипетирования:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1	A	P1								
B	B	P2	B	P2								
C	C	P3	C	P3								
D	D	P4	D	P4								
E	E	P5	E	P5								
F	F	P6	F	P6								
G	C+	P7	C+	P7								
H	C-	P8	C-	P8								
	IgG	IgG	IgM	IgM								

P1 ... - образцы пациентов, AF - калибраторы, C +, C-- контроли

ОЦЕНКА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм для Калибраторов/Контролей и результатов контролей совпадает с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественных результатов отложить оптическую плотность каждого калибратора согласно концентрации калибратора, чтобы построить калибровочную кривую. Концентрация образцов пациентов может быть затем оценена с калибровочной кривой с помощью интерполяции.

Для данного набора рекомендуется 4-параметрический с линейно-логарифмическими координатами метод для оптической плотности и концентрации.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Калибровка

Калибровка проводится с использованием международно признанной контрольной сыворотки от EN Харрис, Луисвилл и IRP 97/656 (IgG) и HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM).

Диапазон измерения

Расчетный диапазон данного ИФА анализа составляет:
IgG: 0-100 GPL-Ед/мл IgM: 0-100 MPL-Ед/мл

Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение Cut-off
IgG: 10 GPL-Ед/мл IgM: 10 MPL-Ед/мл

Интерпретация результатов

Отрицательный: IgG < 10 GPL-Ед/мл IgM < 10 MPL-Ед/мл
Положительный: ≥ 10 GPL-Ед/мл ≥ 10 MPL-Ед/мл

Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образца, чтобы продемонстрировать динамический диапазон анализа. Активность для каждого разведения была рассчитана из калибровочной кривой.

Образец	Разведение	Полученное значение GPL/MPL-Ед/мл	Ожидаемое значение GPL/MPL-Ед/мл	П/О, %
IgG 1	1:100	98.0	98.4	100
	1:200	49.6	49.2	101
	1:400	24.3	24.6	99
	1:800	12.0	12.3	98
	1:1600	5.8	6.2	94
IgG 2	1:100	92.4	92.4	100
	1:200	45.9	46.2	99
	1:400	22.7	23.1	98
	1:800	11.4	11.6	99
	1:1600	5.4	5.8	94
IgM 1	1:100	92.7	92.7	100
	1:200	45.7	46.4	99
	1:400	22.8	23.2	98
	1:800	11.2	11.6	97
	1:1600	5.4	5.8	93
IgM 2	1:100	72.4	74.2	100
	1:200	36.5	37.1	98
	1:400	18.7	18.6	101
	1:800	8.9	9.3	96
	1:1600	4.4	4.6	95

Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила:
IgG: 0.5 GPL-Ед/мл IgM: 0-5 MPL-Ед/мл

Воспроизводимость

Внутри тестовая точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов из результатов 24 определений в одном анализе. Результаты для точности в пределах анализа приведены в таблице ниже.
Межсерийная точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов по результатам 6 определений в 5 различных анализах. Результаты для выполнения к запуску точности приведены в таблице ниже.

Внутри анализа IgG		
Образец	Среднее Значение GPL-Ед/мл	CV [%]
1	13.5	3.0
2	30.1	2.8
3	70.5	4.1

Между анализами IgG		
Образец	Среднее Значение GPL-Ед/мл	CV [%]
1	14.0	5.6
2	32.1	6.4
3	68.9	5.7

Внутри анализа IgM		
Образец	Среднее Значение MPL-Ед/мл	CV [%]
1	15.0	2.8
2	28.7	3.4
3	72.4	3.1

Между анализами IgM		
Образец	Среднее Значение MPL-Ед/мл	CV [%]
1	14.7	4.7
2	29.2	6.0
3	74.0	6.2

Перекрестно реагирующие вещества

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Результаты исследований

Study population	n	Pos IgG	%	Pos IgM	%
Primary APS	8	7	87.5	6	75.0
Secondary APS	65	60	92.3	33	50.8
Normal human sera	150	4	2.7	5	3.3

ORG 529	Pos IgG	Clinical Diagnosis		73	150	223	Sensitivity: 91.8 %	Specificity: 97.3 %	Overall agreement: 95.5 %
		Pos	Neg						
		67	4						
		6	146						

ORG 529	Pos IgM	Clinical Diagnosis		73	150	223	Sensitivity: 53.4 %	Specificity: 96.7 %	Overall agreement: 82.5 %
		Pos	Neg						
		39	5						
		34	145						

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Этот анализ предназначен в качестве диагностической помощи. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах одного теста, он должен быть сделан врачом после всех оценки всех клинических и лабораторных исследований.

Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально.

Выше указанные патологические и нормальные диапазоны для антител в образцах пациента следует рассматривать только в качестве рекомендаций. Каждая лаборатория должна установить свои собственные нормы, в соответствии с ISO 15189 или другие действующие правила лаборатории.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- Добавить **100 мкл** калибратор, контроль или образец пациента
→ Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
→ Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
- Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
→ Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
- Добавить **100 мкл** раствора субстрата
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- Добавить **100 мкл** стоп раствора
→ Выдержать **5 минут**
→ Считать при 450 нм



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com