



Набор ИФА для обнаружения и полуколичественного определения антител класса IgA к β 2-гликопротеину 1 (β 2GP1)

Кат. № : 1494-11
Количество тестов: 96
Производитель : DAI (США)

Методика от 25-07-2008

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Этап	Комнатная температура (20-25°C)	Объем	Время инкубации
1	Разбавление образца 1:101 = 5 мкл / 500 мкл		
2	Промывочный буфер (3 раза)	350 мкл	
3	Разбавленные образцы, контроли и калибраторы	100 мкл	30 мин.
4	Промывочный буфер (3 раза)	350 мкл	
5	Ферментный конъюгат	100 мкл	30 мин.
6	Промывочный буфер (3 раза)	350 мкл	
7	Хромогенный субстрат ТМБ	100 мкл	30 мин.
8	Стоп раствор	100 мкл	
9	Считывание при ОП 450 нм		

НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) компании "Диагностик Аутомейшн Инкорпорейтед" (ДАИ) предназначен для обнаружения и полуколичественного определения антител класса IgA к β 2GP1 в сыворотке или плазме человека. Результаты анализа должны использоваться как средство диагностики относящихся к аутоиммунным болезням определенных тромбических нарушений, анти-фосфолипидного синдрома, системной красной волчанки (SLE) или связанных с ней нарушений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Аутоантитела к кардиолипину (ACA) описаны при разных аутоиммунных болезнях. Наличие антител анти-кардиолипина при системной красной волчанке можно отнести к развитию тромбоцитопении. В гинекологии они считаются причиной внутриутробной смерти или повторного преждевременного прекращения беременности.

Кроме того, антитела к кардиолипину были обнаружены при некоторых нетромботических неврологических расстройствах подобно цереброваскулярному недостатку, мозговой ишемии или хорее и при инфаркте миокарда. Недавние исследования показали, что для антител антикардиолипина требуется серологический кофактор 50кДа, чтобы закрепить кардиолипин, нанесенный на пластмассовые планшеты. Кофактор был идентифицирован как β -2 гликопротеин 1, также названный как алипопротеин Н. β 2GP1 известен как *in vitro* ингибитор коагуляции внутрисосудистой крови проводящего пути, АДФ-зависимой агрегации и активности протромбиназы активированных тромбоцитов. Стало очевидно что антитело к кардиолипину от пациентов с анти-фосфолипидным (APS) напоминает модифицированную структуру β 2GP1, а не кардиолипин. Нативный β 2GP1 или эпитоп структурно определяется и кардиолипином и β 2GP1.

Галли и другие и Виард и другие сообщили, что антитело к анти-кардиолипину, выработанное вследствие SLE и APS было направлено на молекулу β 2GP1, нанесенную на полистироловые лунки. Коике и Мацура окончательно продемонстрировали, что β 2GP1 действительно является антигеном с которым связываются антитела к кардиолипину многих пациентов, и более того, показали, что фосфолипид служит только для связи β 2GP1 с твердой фазой. Аутоантитела β 2GP1 обнаруживаются в иммуноглобулине классов IgG, IgM и IgA. Определение IgM антител – ценный указатель в диагностике начала аутоиммунной болезни, принимая во внимание, что IgG и-или IgA антитела будут обнаружены в последующих стадиях проявленных аутоиммунных нарушений. IgA антитела часто ассоциируются с IgG антителами. Считается, что определение IgA антител имеет большую обоснованность при тромбозе и потере плода. Признаки для определения анти- β 2GP1 антител: SLE, тромбоз, тромбоцитопения, мозговая ишемия, хорея, эпилепсия, преждевременное прекращение беременности и внутриматочная смерть.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенные антигены β 2GP1 нанесены на поверхность микролунок. В лунки добавляются разбавленные сыворотка или плазма пациента и калибраторы. Присутствующие специфические антитела β 2GP1 связываются с антигенами. При промывке удаляются все несвязанные материалы. После добавления ферментного конъюгата он связывается комплексом антитело-антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется и добавляется хромогенный субстрат ТМБ. Каталитическая реакция ферментного конъюгата останавливается в определенное время. Интенсивность развившегося цвета прямо пропорциональна количеству IgA специфических антител в образце. Результаты считываются микролуночным считывателем и параллельно сравнивается с калибраторами.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8 °C.
2. Храните микролуночки в хорошо запечатанном пакете с осушителем. Рекомендуется до 4 недель использовать все лунки после первого вскрытия мешочка.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не подвергайте реагенты набора воздействию тепла, солнца или сильного света во время хранения или использования.

СБОР И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Соберите образцы крови и отделите сыворотку.
2. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C до 7 дней. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшет: состоящий из лунок, покрытых антигеном β 2GP1. 12 x 8 лунок.
2. Абсорбентный раствор: черная крышка, 50 мл бутылка.
3. Промывочный концентрат 10x, 100 мл бутылка.
4. Хромогенный субстрат ТМБ, янтарная бутылка, 15 мл бутылка.
5. Ферментный конъюгат, раствор красного цвета, 12 мл бутылка.
6. Набор калибраторов (предварительно разбавленные 1:101): 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200 SAU, 1,5 мл флакон.
7. Набор контролей (предварительно разбавленные 1:101): Отрицательный и положительный контроли. Диапазоны указаны на каждой этикетке, 1,5 мл флакон.
8. Стоп-раствор: 1,5 N соляная/серная кислота, 12 мл бутылка.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. **Потенциальные биологические опасные материалы:** Калибраторы и контроли 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 мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
2. Не пипетируйте ртом. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.
3. Компоненты набора предназначены для использования как единое целое. Не смешивайте компоненты разных партий.
4. Некоторые компоненты набора содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Он способен образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с медью или свинцом. При использовании реагентов, содержащих азид натрия необходимо наличие большого количества воды. Азид натрия может быть токсичен при попадании внутрь организма. В концентрациях, присутствующих в реагентах, он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, мы настоятельно рекомендуем следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами.
5. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином), стоп-раствором, ферментным конъюгатом. При попадании на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Приготовьте 1x промывочного буфера. Приготовьте промывочный буфер добавлением дистиллированной или неионизированной воды к 10x промывочному концентрату, чтобы получить в конце объем в 1 л.
2. Приведите все образцы и реагенты набора к комнатной температуре (20-25°C) и легко перемешайте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Разбавление образца 1:101 100 / 100 / 100

1. Поместите в держатель достаточное количество покрытых полосок.

Предварительно промойте покрытые лунки – повторите промывку 3 раза промывочным буфером.

2. Проведите разведение анализируемых образцов 1:101 путем добавления 5 мкл образца к 500 мкл разбавитель образца. Хорошо перемешайте.

Не разбавляйте 1:101 предварительно разбавленные калибраторы и контроли.

3. Распределите 100 мкл разбавленных сывороток и предварительно разбавленных калибраторов и контролей в соответствующие лунки. Постучите по держателе, чтобы удалить воздушные пузырьки из жидкости и хорошо перемешайте. Инкубируйте в течении 30 минут при комнатной температуре.

4. Удалите жидкость из всех лунок. Повторите промывку 3 используя промывочный буфер.

5. Распределите 100 мкл ферментного конъюгата к каждую лунку и инкубируйте в течении 30 минут при комнатной температуре.

6. Удалить ферментный конъюгат из всех лунок. Повторите промывку 3 используя промывочный буфер.

7. Распределите 100 мкл хромогенного субстрата ТМВ в каждую лунку и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.

8. Для остановки реакции добавьте 100 мкл стоп-раствора.

Перед считыванием удостоверитесь, что в каждой лунке нет воздушных пузырьков.

9. Считайте оптическую плотность микролуночным считывателем при 450 нм.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Создать калибровочную кривую, составляя график ОП 450 нм на оси Y против значений концентраций калибраторов SAU. Значения на оси X на клетчатой или линейно-логарифмической бумаге.

2. Используя значения ОП каждого образца, определите концентрацию из калибровочной кривой.

3. Типичный пример:

Набор калибраторов	β_2 GP1 IgG (SAU)	ОП 450 нм		ОП 450 нм средн.	СО	КВ %
К-тор 1	6.3	0.089	0.085	0.087	0.003	3.251
К-тор 2	12.5	0.180	0.184	0.182	0.003	1.554
К-тор 3	25	0.319	0.315	0.317	0.003	0.892
К-тор 4	50	0.573	0.589	0.581	0.011	1.947
К-тор 5	100	1.130	1.160	1.145	0.021	1.853
К-тор 6	200	2.175	2.261	2.218	0.061	2.742

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Отрицательный контроль и положительный контроль должны проводиться с каждой партией анализируемых образцов и концентрации должны быть в пределах диапазона, указанного на этикетке.

2. Значение ОП 0 калибратора SAU должно быть ниже 0.150 и значение ОП 200 калибратора SAU должно быть более 0.750.

Из образцов человеческой сыворотки можно приготовить дополнительные контроли и хранить при -20°C .

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормы, основанный на своих собственных методах, контролях, оборудовании и населении согласно своим собственным установленным процедур. Рекомендуется следующий диапазон:

Отрицательный: < 20 SAU

Низко положительный: 20 ~ 40 SAU

Умеренно положительный: 40 ~ 70 SAU

Высоко положительный: > 70 SAU

Положительный результат позволяет полагать о определенной тромболитическом нарушении аутоиммунного происхождения. Отрицательный результат указывает на отсутствие β_2 GP1 IgG антител или уровней ниже предела чувствительности анализа.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Диагноз не может быть сделан на основании только одних результатов β_2 GP1. Эти результаты должны использоваться в сочетании с информацией клинической оценки и другой диагностической процедуры.

2. Клиническое значение β_2 GP1 антител в болезнях, отличающихся от SLE - в настоящее время исследуются.

3. При обнаружении отрицательных анти- β_2 GP1 титров в присутствии клинических показаний, проводится анализ на антикоагулянт волчанки, анти-кардиолипин или другой дополнительный анализ.

4. Следует ожидать, что некоторые образцы могут быть анти-кардиолипин положительными. При том что анти- β_2 GP1 отрицательный. Анти- β_2 GP1 анализ - более определенный маркер тромботического риска. Анализ на антикардиолипин может привести к ошибочно положительным результатам вследствие перекрестной реактивности двоспиральной ДНК или некоторыми антителами инфекционных болезней.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность, специфичность и точность:

С помощью данного анализа (X значения) и референтного ELISA набора (Y значения) было проанализировано 75 образцов 2GP1. Уравнение корреляции составляет:

$$Y = 0.9221 X + 0.5522 R^2 = 0.9375 \text{ (к-во} = 75)$$

		Референтный ELISA набор (1)		
		N	P	Общее
ДАИ ELISA β_2 GP1 IgA	N	32 (D)	1 (B)	33
	P	3 (C)	39 (A)	42
	B	35	40	75

$$\text{Чувствительность} = A / (A+B) = 39 / (39 + 1) = 98 \%$$

$$\text{Специфичность} = D / (C+D) = 32 / (3 + 32) = 91 \%$$

$$\text{Точность} = (A+D) / (A+B+C+D) = (39 + 32) / (39 + 1 + 3 + 32) = 71 / 75 = 95 \%$$

Второй референтный ELISA набор (2) использовался для анализа 3 образцов, референтный ELISA набор (1) для анализа отрицательного и ELISA набор ДАИ использовался для анализа положительного результата. Все результаты оказались положительными для 3 образцов. Образцы, анализируемые с помощью референтного ELISA (1) на положительный результат и отрицательный с помощью ELISA набора ДАИ останутся с положительным результатом при анализе с помощью референтного ELISA набора (2).

Точность:

Статистические данные для КВ, среднего значения и СО были рассчитаны для каждого из трех образцов из результатов 8 определений в пределах одной процедуры. Точность между процедурами была рассчитана из результата 8 определений в 8 разных процедурах.

Внутри процедуры	К-во	Среднее (SAU)	СО	%, КВ
Сыворотка А	8	14,9	0,35	2,38
Сыворотка В	8	30,8	1,39	4,52
Сыворотка С	8	58,9	0,99	1,68
Между процедурами	К-во	Среднее (SAU)	СО	%, КВ
Сыворотка А	8	15,6	0,38	2,4
Сыворотка В	8	31,2	1,42	4,55
Сыворотка С	8	59,3	1,05	1,77

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ И ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Анализ ДАИ β_2 GP1 IgA не вступает в перекрестную реакцию с со следующими положительными образцами, проверенными на: краснуху, токсоплазмоз, Н. Руби, корь, паротит, корь, вирус Варицелла-Зостер, РФ, герпеса простого вирус.

ЛИТЕРАТУРА:

(См. в оригинале инструкции на стр. 6).

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
а/я 742
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775 612
E-mail: info@diameb.com