НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ТА ЯКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ IgG ТА/АБО IgM АНТИТІЛ ПРОТИ КАРДІОЛІПІНУ

3244, Aeskulisa Cardiolipin-GM

Каталог. №: ***3244*** *Методика від* ***28-08-2007***
Кількість : ***96*** *Версія* ***002***
Виробник : ***AESKU. Diagnostics, (Німеччина)***

Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1 Призначення

AESKULISA Cardiolipin-GM є твердофазним імуноферментним аналізом з використанням високо очищеного кардіоліпіну плюс нативного β2-глікопротеїну I ***людини*** для кількісного та якісного визначення IgG та/або IgM антитіл проти кардіоліпіну в сироватці крові людини. Антитіла анти-кардіоліпіну в основному розпізнають специфічні епітопи на комплексі, який складається з кардіоліпіну та β2-глікопротеїну I, які виявляються тільки при взаємодії β2-глікопротеїну I з кардіоліпіном.

Аналіз є допомогою в діагностиці і оцінці ризику тромбозу у пацієнтів з системним червоним вовчаком.

2. Клінічне застосування і принцип аналізу *(Див. оригінал інструкції).*

Принцип тесту

Зразки сироватки, розбавлені 1:101, інкубують в Мікропланшетах з внесенням конкретного антигена. Антитіла пацієнта, якщо вони присутні в зразку, зв'язуються з антигеном. Незв'язана фракція вимивається на наступній стадії. Потім анти-людські імуноглобуліни, кон'юговані з Пероксидазою хрону (кон'югат), інкубують і відбувається реакція з комплексом антиген-антитіло в зразках в Мікропланшетах. Незв'язаний кон'югат вимивається на наступній стадії. Додавання TMB субстрату генерує ферментативну колориметричну (синій колір) реакцію, яка зупиняється розведеною кислотою (колір змінюється на жовтий). Швидкість утворення кольору від хромогену є функцією кількості кон'югату, пов'язаного з комплексом антиген-антитіло, і вона пропорційна початковій концентрації відповідних антитіл у зразку пацієнта.

3. Комплект поставки

Мають бути відновлені:

5x Буфер для зразків	1 флакон, 20 мл - 5x концентрований (білий ковпачок: жовтий розчин) Містить: Tpic, NaCl, BSA, азид натрію <0,1% (консервант)
50x Промивний буфер	1 флакон, 20 мл - 50x концентрований (білий ковпачок: зелений розчин) Містить: Tpic, NaCl, Твін 20, азид натрію <0,1% (консервант)

Готові до використання:

Негативний Контроль	1 флакон, 1.5 мл (зелений ковпачок: безколірний розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Позитивний Контроль	1 флакон, 1.5 мл (червоний ковпачок: жовтий розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Калібратор Cut-off	1 флакон 1.5 мл (синій ковпачок: жовтий розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Калібратори	6 флаконів,1.5 мл кожен 0, 8, 17, 35, 70, 140 GPL/мл або MPL/мл (інтенсивність кольору підвищується з концентрацією: розчини жовтого кольору). Людська сироватка (розведена), азид натрію < 0.1% (консервант)
Кон'югати	1 флакон, 15 мл IgG (синій ковпачок: синій розчин) 1 флакон, 15 мл IgM (зелений ковпачок: зелений розчин) Містить: Анти-імуноглобуліни людини, кон'юговані з пероксидазою хрону
Субстрат TMБ	1 флакон, 15 мл (чорний ковпачок) Містить: стабілізований TMB/H_2O_2
Стоп Розчин	1 флакон, 15 мл (білий ковпачок: безбарвний розчин) Містить: 1 М соляної кислоти
Мікропланшет	12 x 8-лункових смужок, які відокремлюються Покриття див. пункт 1

Необхідні матеріали, що не постачаються:

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Скляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, піпетки прецизійні (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) або регульована мультипіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір.

Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur. Ph. 4-е вид).

4. Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і Мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини стабільні протягом 1 місяця при температурі 4 °C, як мінімум. ***Реагенти і Мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на TMB розчин. Зберігайте Мікропланшети в призначеній для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте.***

5. Заходи безпеки використання

5.1 Небезпека для здоров'я

Цей продукт призначений тільки ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO. Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормального використання, притримуйтесь наступних заходів для максимальної безпеки:

Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички.

УВАГА! Калібратори, Контролі та Буфери містять азид натрію (NaN_3) як консервант. NaN_3 може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN3 може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні, змити з великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів. Будь ласка, зверніться до процедур дезактивації, як це викладено CDC або до інших місцевих/національних керівних принципів.

Не паліть, не їжте і не пийте при роботі з набором.

Не піпетувати ротом.

Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад) був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог.

5.2 Загальні зауваження щодо використання

Не змішуйте і не замінюйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-32 °C/68-89.6 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

Інкубація: Ми рекомендуємо проводити тест при 30 °C/86 °F для автоматизованих систем.

Ніколи не піддавайте компоненти більш високій температурі, ніж 37 °C/98.6 °F.

Завжди проводити піпетування розчину субстрату тільки з новими наконечниками. Захищати цей реагент від світла. Ніколи не піпетувати кон'югат з наконечниками, які використовувались з іншими реагентами до цього.

Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах тільки проведеного тесту, але має бути зроблений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень.

Діагноз повинен бути перевірений з використанням різних методів діагностики.

6. Відбір проб, Використання та зберігання
Використовуйте переважно зібрані нещодавно зразки сироватки. Забір крові повинен проводитись відповідно до державних вимог.
Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Сироватка з частками повинна бути очищена центрифугуванням з низькою швидкістю (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати відразу, зберігати щільно закритими при температурі 2-8 °C/35-46 °F до трьох днів і замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

7. Процедура аналізу

7.1 Підготовчі заходи перед піпетуванням
Розвести концентровані реагенти:
Розвести концентрований буфер для взірців 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).
Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

Зразки:
Розвести зразки сироватки 1:101 буфером для зразка (1x)
Наприклад, 1000 мкл буфера для зразків (1x) + 10 мкл сироватки. Добре перемішати!

Промивання:
Підготувати 20 мл розведеного промивного буфера (1x) на 8 лунок або 200 мл на 96 лунок
Наприклад, 4 мл концентрату плюс 196 мл дистильованої води.

Автоматизоване промивання:
Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

Ручне промивання:
Видалити рідини з лунок перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку, почекати 20 секунд. Повторити всю процедуру ще два рази.

Мікропланшети:
Розрахуйте кількість лунок, необхідних для випробування. Видалити зайві лунки з рами, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, (2-8 °C/35-46 °F).

7.2 Проведення тестування

Схема піпетування: див. Додаток A, процедура випробування: див. Додаток B
Ми рекомендуємо піпетування зразків і калібраторів у двох примірниках. Калібратор Cut-off використовувати тільки для якісного аналізу.

ПРИМІТКА: Якщо IgG і IgM визначаються паралельно, калібратори, контролі і зразки аналізувати по два рази, для кожного підкласу окремо.

- Внесіть 100 мкл розведеної сироватки кожного пацієнта в призначені лунки.
- Внесіть 100 мкл калібраторів або Cut-off калібратора і Негативного та позитивного контролів в призначені лунки.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл кон'югату в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл ТМБ субстрат в кожну лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F, захищеному від інтенсивного світла.
- Внесіть 100 мкл стоп розчину в кожну лунку, використовуючи той же порядок, як при піпетуванні субстрату.
- Інкубуйте 5 хвилин мінімум.
- Агітувати пластину ретельно протягом 5 сек.
- Зчитати абсорбцію при 450 нм (опційно 450/620 нм) протягом 30 хвилин.

8. Кількісна і Якісна Інтерпретація
Для **кількісної інтерпретації** побудувати стандартну криву, відклавши **оптичну щільність (OD) кожного калібратора (вісь У)** по відношенню до відповідних значень концентрації в **GPL/мл** або **MPL/мл (вісь Х).** Для досягнення найкращих результатів ми рекомендуємо використання log/lin координат та 4-Параметрове налаштування. З OD кожного зразка зчитати відповідні концентрації антитіл, виражені в **GPL/мл** або **MPL/мл**.

Нормальний діапазон	Сумнівний діапазон	Позитивні результати
< 12 **GPL/мл**	12-18 **GPL/мл**	> 18 **GPL/мл**
< 12 MPL/мл	12-**18 MPL/мл**	> 18 **MPL/мл**

Приклад стандартної кривої
Ми рекомендуємо паралельне піпетування калібраторів для кожного аналізу.

Калібратори IgG/M	*OD 450/620 нм*	*CV % (Варіація)*
0 GPL/мл	0.066	3.2
8 GPL/мл	0.162	0.4
17 GPL/мл	0.291	1.7
35 GPL/мл	0.597	1.3
70 GPL/мл	1.101	2.9
140 GPL/мл	2.039	0.4

Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат (GPL/мл)
P 01	0.772/0.752	0.762	48.8
P 02	1.058/1.038	1.048	82.9

Дані, характерні для конкретного лоту, знаходяться в листі контролю якості. Медичні лабораторії можуть проводити свій Контроль Якості використовуючи власні контролі і/або внутрішній пул сироваток, як це передбачено нормами ЄС.
Не використовувати цей приклад для інтерпретації результатів пацієнтів!

Кожна лабораторія повинна встановити свої межі нормальних значень, ґрунтуючись на власних методах, контролях, обладнанні і популяції пацієнтів у відповідності зі своїми встановленими процедурами.

Для **якісної інтерпретації** зчитати оптичну щільність Cut-off калібратора і зразків пацієнтів. Порівняти OD пацієнта з OD Cut-off калібратора. Для якісної інтерпретації ми рекомендуємо розглядати сироватки в діапазоні 20% навколо порогового значення, як двозначні. Всі зразки з більш високим OD вважаються позитивними, зразки з більш низькими OD вважаються негативними.

Негативний: $OD_{\text{пацієнта}} < 0.8 \times OD_{\text{Cut-off}}$
Сумнівний: $0.8 \times OD_{\text{Cut-off}} \leq OD_{\text{пацієнта}} \leq 1.2 \times OD_{\text{Cut-off}}$
Позитивний: $OD_{\text{пацієнта}} > 1.2 \times OD_{\text{Cut-off}}$

9. Технічні дані

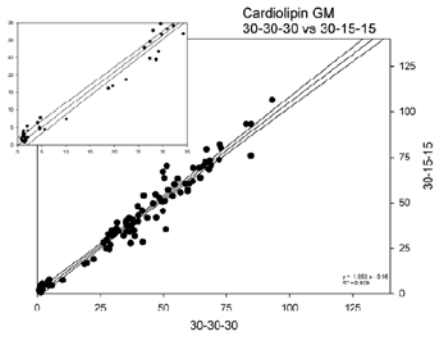
Матеріал зразка:	сироватка
Об'єм зразка:	10 мкл зразка, розведеного 1:101 в 1x буфері для зразків
Загальний час інкубації:	90 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F
Діапазон калібрування:	0-140 GPL/мл або MPL/мл
Аналітична чутливість:	1.0 GPL/мл або MPL/мл
Зберігання:	при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони
Кількість визначень:	96 тестів

10. Дані продуктивності

10.1 Аналітична Чутливість
Тестування буфера для зразків 30 разів на *Cardiolipin-GM (REF7244)* дало аналітичну чутливість 1.0 GPL/мл або MPL/мл.

10.2 Специфічність і чутливість
Мікропланшет покритий **високо очищеним кардіоліпіном і нативним β2-глікопротеїном І людини.** Перехресної реактивності з іншими аутоантигенами не спостерігалось. Антитіла кардіоліпіну виявляються у до 70% пацієнтів з СЧВ. Дані були отримані з набором *AESKULISA Cardiolipin-GM (REF7244).*

Кореляція:
Порівнянність даних про продуктивність оцінювалася з 97 сироватками на обох, AESKULISA 7244 і AESKULISA 3244. Лінійний регресійний аналіз цих двох продуктів показав, що ці два продукти є еквівалентними. 33 з цих сироваток близькі до cut-off.



10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення. Тим не менше, через неоднорідність характеру людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підлягають цьому правилу.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація (GPL/мл)	Очікувана концентрація (GPL/мл)	Відновлення (%)
1	1/100	63.1	68.0	93.0
	1/200	33.7	34.0	99.1
	1/400	15.9	17.0	93.5
	1/800	9.0	8.5	105.9
2	1/100	138.6	141.8	97.7
	1/200	70.1	70.9	98.9
	1/400	33.2	35.5	93.5
	1/800	17.9	17.7	101.1

10.4 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на трьох відібраних зразках сироватки, щоб представити діапазон в порівнянні зі стандартною кривою.

Intra-Assay		
Sample No.	Mean (GPL/ml)	CV (%)
1	586.2	1.5
2	67.4	3.4
3	34.5	7.6

Inter-Assay		
Sample No.	Mean (GPL/ml)	CV (%)
1	499.8	0.9
2	68.9	1.7
3	40.7	4.6

10.5 Калібрування

Через відсутність референтних матеріалів BOO3, *AESKULISA* **Кардіоліпін-GM** калібрується проти контрольних сироваток N.E. Харріс, Луїсвілл. Результати виражені в GPL/мл для IgG, так і в MPL/мл для IgM. Крім того, AESKULISA Кардіоліпін-GM стандартизований за допомогою HCAL Саппоро-стандартів для IgG і EY2C9 для IgM.

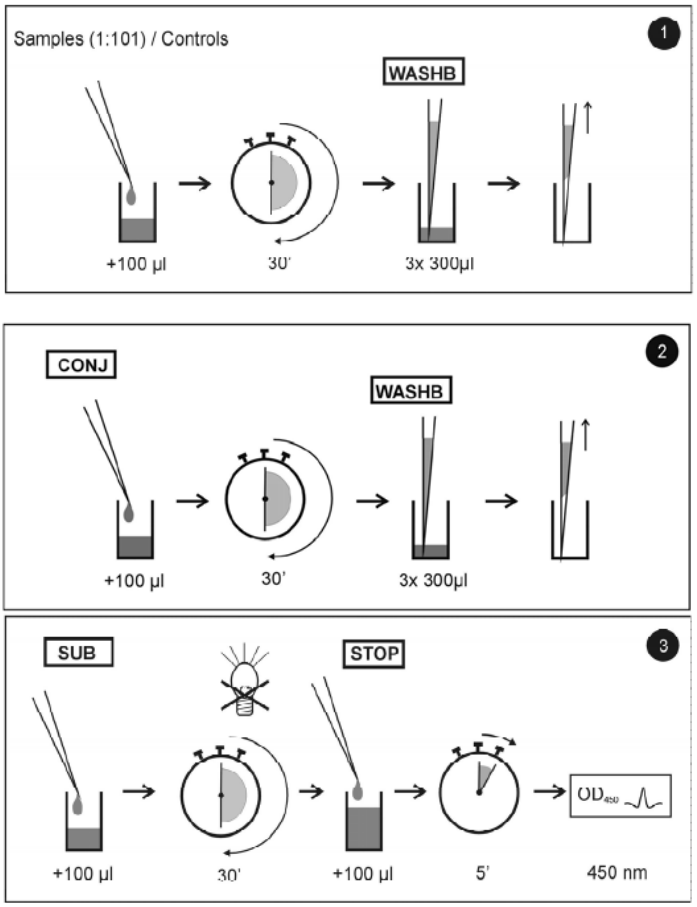
ДОДАТОК А: Схема піпетування

Ми пропонуємо піпетування калібраторів, контролів і зразків наступним чином:
Для **кількісної інтерпретації** використовувати калібратори, щоб побудувати стандартну криву.
Для **якісної інтерпретації** використовувати Cut-off калібратор.

	for **quantitative interpretation** use calibrators to establish a standard curve						for **qualitative interpretation** use cut-off calibrator					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CalA	CalE	P1				NC	P2				
B	CalA	CalE	P1				NC	P2				
C	CalB	CalF	P2				CC	P3				
D	CalB	CalF	P2				CC	P3				
E	CalC	PC	P3				PC	...				
F	CalC	PC	P3				PC	...				
G	CalD	NC	...				P1	...				
H	CalD	NC	...				P1	...				

CalA: калібратор A, CalB: калібратор B, CalC: калібратор C, CalD: калібратор D, CalE: калібратор E, CalF: калібратор F
PC: Позитивний контроль
NC: негативний контроль
CC: Калібратор Cut-off
P1: пацієнт 1
P2: пацієнт 2
P3: пацієнт 3

Додаток B: Процедура випробування



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»