

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgG ТА IgM ДО $\beta$ 2-ГЛІКОПРОТЕЇНУ I, КАРДІОЛІПІНУ, ФОСФАТИДИЛСЕРИНУ, ФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛУ, ФОСФАТИДИЛОВОЇ КИСЛОТИ

### ORG 555, ThromboCombo IgG/IgM

Каталог. №: **ORG 555**

Методика від **08-2012**

Кількість : **96**

Виробник : **ORGENTEC GmbH,**  
(Німеччина)



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

### ПРИЗНАЧЕННЯ

Даний набір є тест-системою ІФА для одночасного кількісного визначення антитіл класу IgG та IgM до  $\beta$ 2-глікопротеїну I, кардіоліпину, Фосфатидилсерину, Фосфатидилінозитолу, Фосфатидилової кислоти в сироватці або плазмі людини. Призначається тільки для використання в in-Vitro діагностиці.

**КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ** (Див. Оригінал інструкції).

### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Високо очищені кардіоліпін, фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидилова кислота і людський бета-2-глікопротеїн I нанесені в окремі рядки мікролуноквого планшета. Антитіла до цих антигенів, якщо присутні в розведеному зразку пацієнта, зв'язуються з відповідним антигеном. Промивання мікролунок видаляє неспецифічні компоненти плазми або сироватки. Анти-людські антитіла, кон'юговані пероксидазою хрому, імунологічно зв'язуються з пов'язаними антитілами пацієнта, формуючи кон'югат-антитіло-антиген комплекс. Промивання мікролунок видаляє незв'язаний кон'югат. Ензимний субстрат в присутності пов'язаного кон'югату гідролізується до формування блакитного забарвлення. Додавання кислоти зупиняє реакцію, формуючи кінцевий продукт жовтого кольору. Інтенсивність цього жовтого кольору вимірюється фотометрично при 450 нм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації антитіл, що присутні в оригіналі зразка.

### ВМІСТ НАБОРУ

Мікропланшет, що складається з 12 смужок по 8 лунок кожна. Готовий до використання.	1
Калібратор А 0 Од/мл, що містить сироваткову/буферну матрицю (PBS, BSA, миючий засіб, NaN3 0,09%), жовтий. Готовий до використання.	1 x 1.5 мл
Калібратор В 6.3 Од/мл, що містить антитіла Фосфоліпідів в сироватковій/буферній матриці (PBS, BSA, миючий засіб, NaN3 0,09%), жовтий. Готовий до використання.	1 x 1.5 мл
Калібратор С 12.5 Од/мл, що містить антитіла Фосфоліпідів в сироватковій/буферній матриці (PBS, BSA, миючий засіб, NaN3 0,09%), жовтий. Готовий до використання.	1 x 1.5 мл
Калібратор D 25 Од/мл, що містить антитіла Фосфоліпідів в сироватковій/буферній матриці (PBS, BSA, миючий засіб, NaN3 0,09%), жовтий. Готовий до використання.	1 x 1.5 мл
Калібратор Е 50 Од/мл, що містить антитіла Фосфоліпідів в сироватковій/буферній матриці (PBS, BSA, миючий засіб, NaN3 0,09%), жовтий. Готовий до використання.	1 x 1.5 мл
Калібратор F 100 Од/мл, що містить антитіла Фосфоліпідів в сироватковій/буферній матриці (PBS, BSA, миючий засіб, NaN3 0,09%), жовтий. Готовий до використання.	1 x 1.5 мл
Буфер для зразків Р; містить PBS, BSA, миючий засіб, консервант азиду натрію 0,09%, жовтий, концентрат (5 x). Ферментний кон'югат, що містить антилюдські антитіла IgG, мічені пероксидазою хрому; містить PBS, BSA, детергент, консервант Проклін 0.05%, світло-червоний. Готовий до використання.	1 флакон 15 мл
Ферментний кон'югат, що містить антилюдські антитіла IgM, мічені пероксидазою хрому; містить PBS, BSA, детергент, консервант Проклін 0.05%, світло-червоний. Готовий до використання.	1 флакон 15 мл
Розчин субстрату ТМБ, містить 3,3', 5,5'-Тетраметилбензидин, безбарвний. Готовий до використання.	1 флакон 15 мл

Стоп-розчин, містить кислоту. Готовий до використання.	1 флакон 15 мл
Буферний розчин для промивання, містить Tris, детергент, консервант азид натрію 0.09%; концентрат (50x)	1 флакон 20 мл
Інструкція по застосуванню	1 шт.
Сертифікат контролю якості	1 шт.

### НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

- Мікропланшетний рідер з довжиною хвилі 450 нм; опційно: контрольний фільтр з довжиною хвилі 620 нм
  - Програмне забезпечення для рідера
  - Багатоканальний диспенсер або піпетка для багаторазового дозування об'ємом 100 мкл
  - Вортексний міксер
  - Піпетки на 10, 100 і 1000 мкл
  - Таймер
  - Дистильована або деіонізована вода
  - Мірні циліндри на 100 і 1000 мл
  - Пластиковий контейнер для зберігання розчину для промивання
- Набори Orgentec ІФА підходять для використання на відкритих автоматизованих процесорах. Кожен аналіз має бути оцінений на відповідній автоматизованій системі. Детальна інформація надається за запитом.

### ЗБІР, ЗБЕРІГАННЯ І РОБОТА ЗІ ЗРАЗКАМИ

- Зберіть зразки цільної крові, використовуючи прийнятну медичну технологію, уникаючи гемолізу.
- Дайте можливість крові згуститися і відокремте сироватку центрифугуванням.
- Сироватка повинна бути чистою і негемолізованою. Необхідно уникати гемолітичної або ліпемічної сироватки.
- Зразки повинні зберігатися при 2-8 °С до 5 днів або при -20 °С до шести місяців.
- Уникайте повторного заморожування і розморожування зразків. Це може призвести до втрати активності аутоантителами.
- Не рекомендовано тестування інактивованої теплою сироватки.

### ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

- Зберігати набір при 2 - 8 °С
- Тримати мікропланшетні лунки в герметичному мішечку з осушувачем.
- Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності набору.
- Не піддавати реагенти для аналізу впливу тепла, сонця або сильного світла в перебігу зберігання та використання.
- Розведений буфер зразка та промивний буфер стабільні принаймні 30 днів при 2-8 °С. Рекомендується використання в той же день.

### ПРОЦЕДУРНІ ЗАУВАЖЕННЯ

- Не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну придатності.
- Не міняйте компоненти набору між різними лотами.
- Всі матеріали слід привести до кімнатної температури.
- Всі реагенти перед початком аналізу повинні бути готові до роботи. Після початку аналізу необхідно проводити безперервно для отримання надійних і точних результатів.
- Проводьте всі кроки аналізу в зазначеному порядку.
- Завжди використовуйте свіжу розбавлену сироватку.
- Піпетувати всі реагенти та зразки на дно лунок.
- Для запобігання забруднення мінуйте наконечники між зразками та різними контролями набору.
- Дуже важливо промивати лунки ретельно і видаляти повністю всю рідину для отримання оптимальних результатів.
- Всі кроки інкубації повинні проводитися на протязі визначеного часу.
- Контрольна сироватка повинна аналізуватися як невідома для перевірки реагентів та аналізу.
- Не використовуйте повторно лунки мікропланшетів.

### ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Всі реагенти набору призначені тільки для діагностики in vitro.
- Не змішуйте компоненти наборів з різних лотів.
- Компоненти набору містять матеріали людського походження, які протестовані методами, схваленими FDA, на відсутність антитіл до гепатиту В і ВІЛ. Однак, жоден метод не може гарантувати, що продукти людського походження не інфіковані. Отже, з реагентами та зразками сироватки слід поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.
- Уникайте контакту з ТМБ (3,3', 5,5' - Тетраметилбензидином). Якщо ТМБ потрапив на шкіру, ретельно вимийте водою з милом.
- Стоп розчин містить кислоту. Якщо розчин потрапив на шкіру, ретельно промийте водою і зверніться до лікаря.

- Деякі компоненти набору (напр., Контролі, буфер зразків і буферний миючий розчин) містять азид натрію в якості консерванту. Азид натрію є високо токсичним і реактивним в чистій формі. При концентрації в продукті 0,09% проте не небезпечний. Всупереч класифікації як безпечний, ми настійно рекомендуємо використовувати звичайні правила безпеки.
- Деякі набори містять Проклін 300 в якості консерванту. При знищенні реагентів, що містять Проклін 300, промийте великою кількістю води для розбавлення компонентів до нижче активного рівня.
- Використовуйте рукавички при роботі із зразками і реагентами і ретельно мийте руки після роботи.
- Не піпетувати ротом.
- Не їжте, не пийте, не куріть і не застосовуйте косметику у місцях роботи із зразками або реагентами набору.
- Не допускайте контакту між буферним розчином перекису і легко окислювальними матеріалами: підвищена температура може викликати спонтанний спалах.
- Дотримуйтеся настанов щодо здійснення контролю якості в лабораторії, використовуйте дослідження контролів та/або насичених сироваток. Дотримуйтеся існуючого законодавства при роботі з усіма реагентами та зразками.

## ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### Приготування розчину для промивання

Розбавте вміст флакона з 50-кратним концентратом промивального буфера дистильованою або деіонізованою водою до кінцевого об'єму 1000 мл перед використанням.

### Приготування буфера для зразків

Розбавте вміст флакона з 5-кратним концентратом буфера зразків дистильованою або деіонізованою водою до кінцевого об'єму 100 мл перед використанням.

### Приготування зразка

Розбавте зразки пацієнтів 1:100 буфером для зразків перед аналізом. Для цього додайте до 10 мкл зразка 990 мкл буфера для зразка в пробірці з полістиролу. Ретельно перемішайте.

Примітка: Калібратори/Контролі готові до використання, їх не потрібно розбавляти.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Приготуйте достатню кількість смужок для контролів/калібраторів і проб пацієнтів.

- Додайте **100 мкл** калібраторів, контролів і розведених зразків пацієнтів в кожну лунку.  
Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі (20-28 °C).  
Видаліть вміст лунок і тричі промийте **300 мкл** промивного розчину.
- Додайте **100 мкл** розчину ферментного кон'югата в кожну лунку.  
Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі.  
Видаліть вміст лунок і тричі промийте **300 мкл** промивного розчину.
- Додайте **100 мкл** субстрату ТМБ в кожну лунку.  
Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі.
- Додайте **100 мкл** стоп розчину в кожну лунку і витримайте **5 хвилин** при КТ.  
Зчитайте оптичну щільність при 450 нм і розрахуйте результати. Біхроматичне вимірювання проводьте при 600-690 нм.  
Забарвлення, яке розвинулося, залишається стабільним протягом 30 хвилин. Зчитайте оптичну щільність за цей час.

Приклад піпетування:

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

Антигени, нанесені в рядках:  
Референсний  $\beta$ 2-глікопротеїн I  
Кардіоліпін +  $\beta$ 2-GPI  
Фосфатидилсерин +  $\beta$ 2-GPI  
Фосфатидилінозитол +  $\beta$ 2-GPI  
Фосфатидилова кислота +  $\beta$ 2-GPI  
Mix C+D+E+F+ $\beta$ 2-GPI  
Mix C+D+E+F+ $\beta$ 2-GPI

P1 ... - зразки пацієнтів, A-F - калібратори,

## ОЦІНКА

Даний тест вважається дійсним тільки в разі, якщо ОЩ при 450 нм для калібраторів/контролів і результатів контролів збігається з відповідним діапазоном, зазначеним у Сертифікаті контролю якості, що додається до набору. Якщо який-небудь із зазначених критеріїв

не відповідає, результати мають бути визнані недійсними і тестування має бути повторено.

## РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для кількісних результатів відкласти оптичну щільність кожного калібратора відповідно до концентрації калібратора, щоб побудувати калібрувальну криву. Концентрація зразків пацієнтів може бути потім оцінена з калібрувальної кривої за допомогою інтерполяції.

Для даного набору рекомендується 4-параметричний з лінійно-логіфічними координатами метод для оптичної щільності і концентрації.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

### Калібрування

Ця система аналізу відкалібрована у відносних умовних одиницях. Калібрування пов'язано з міжнародно визнаною контрольною сироваткою від EN Харріс, Луїсвілл і IRP 97/656 (IgG) і HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM).

### Діапазон вимірювання

Розрахунковий діапазон даного ІФА аналізу становить:  
IgG: 0-100 Од/мл IgM: 0-100 Од/мл

### Очікувані значення

У нормальному діапазоні дослідження із зразками від здорових донорів крові наступні діапазони були встановлені з цим аналізом ІФА: Граничне значення Cut-off

IgG: 10 Од/мл IgM: 10 Од/мл

### Інтерпретація результатів

Негативний: IgG: < 10 Од/мл IgM: < 10 Од/мл  
Позитивний: IgG:  $\geq$  10 Од/мл IgM:  $\geq$  10 Од/мл

### Лінійність

Три зразки пацієнтів, що містять високі рівні специфічних антитіл, серійно розводили в буфері для зразка, щоб продемонструвати динамічний діапазон аналізу. Активність для кожного розведення була розрахована за допомогою калібрувальної кривої.

Зразок	Розведення	Отримане значення Од/мл	Очікуване значення Од/мл	O/O, %
(B) $\beta$ 2-глікопротеїн I	1:100	61.4	61.4	100
.	1:200	30.2	30.7	98
.	1:400	14.9	15.4	97
(C) Кардіоліпін	1:100	63.5	63.5	100
.	1:200	30.5	31.8	96
.	1:400	16.1	15.9	101
(D) Фосфатидилсерин	1:100	62.4	62.4	100
.	1:200	30.7	31.2	98
.	1:400	15.2	15.6	97
(E) Фосфатидилінозитол	1:100	59.4	59.4	100
.	1:200	28.7	29.7	97
.	1:400	13.9	14.9	93
(F) Фосфатидилова кислота	1:100	60.9	60.9	100
.	1:200	28.4	30.5	93
.	1:400	14.0	15.2	92
(G) суміш - $\beta$ 2GPLI	1:100	65.9	65.9	100
.	1:200	31.9	33.0	97
.	1:400	15.7	16.5	95
(H) суміш + $\beta$ 2GPLI	1:100	42.3	42.3	100
.	1:200	19.8	21.2	93
.	1:400	9.2	10.6	87

### Межа виявлення

Функціональна чутливість складала:

IgG: 1 Од/мл IgM: 1 Од/мл

### Відтворюваність

Точність в межах тесту: Коефіцієнт варіації (CV) розраховували для кожного з трьох зразків з результатів 24 визначень в одному аналізі. Результати для точності в межах аналізу наведені в таблиці нижче. Міжсерійна точність: Коефіцієнт варіації (CV) розраховували для кожного з трьох зразків за результатами 6 визначень в 5 різних аналізах. Результати для виконання до запуску точності наведені в таблиці нижче.



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

В середині аналізу IgG		
Зразок	Середнє значення Од/мл	CV [%]
IgG (B)	13.9	1.9
IgG (C)	14.2	2.5
IgG (D)	15.0	2.9
IgG (E)	12.4	3.4
IgG (F)	10.5	4.6
IgG (G)	16.4	6.2
IgG (H)	6.7	5.7

Між аналізами IgG		
Зразок	Середнє значення Од/мл	CV [%]
IgG (B)	15.8	2.0
IgG (C)	18.2	3.3
IgG (D)	16.1	3.4
IgG (E)	15.3	4.1
IgG (F)	16.3	5.0
IgG (G)	19.4	4.5
IgG (H)	7.2	3.9

В середині аналізу IgM		
Зразок	Середнє значення Од/мл	CV [%]
IgM (B)	15.2	3.1
IgM (C)	16.8	4.6
IgM (D)	14.8	5.2

Між аналізами IgM		
Зразок	Середнє значення Од/мл	CV [%]
IgM (B)	12.4	2.7
IgM (C)	13.9	4.1
IgM (D)	15.2	4.5

### Інтерферуючі речовини

Не спостерігалось інтерференції при тестуванні зразків з гемолізом (до 1000 мг/дл), ліпемією (до 3 г/дл тригліцеридів) або підвищеним вмістом білірубину (до 40 мг/дл). Не спостерігалось будь-якого впливу при використанні антикоагулянтів. Однак, не рекомендується використовувати зразки з сильним гемолізом або ліпемією.

### Результати досліджень

Study population	n	Pos IgG	%	Pos IgM	%
Primary APS	8	7	87.5	5	62.5
Secondary APS	65	58	89.2	32	49.2
Blood donors	150	4	2.7	5	3.3

ORG 555 IgG	Clinical Diagnosis		Pos	Neg	223
	Pos	Neg			
Pos	65	4	73	150	223
Neg	8	146			

Sensitivity: 89.0 %  
Specificity: 97.3 %  
Overall agreement: 94.6 %

ORG 555 IgM	Clinical Diagnosis		Pos	Neg	223
	Pos	Neg			
Pos	37	5	42	181	223
Neg	36	145			

Sensitivity: 50.7 %  
Specificity: 96.7 %  
Overall agreement: 81.6 %

### ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Цей аналіз призначений в якості діагностичної допомоги. Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах одного тесту, він повинен бути зроблений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень.

Також кожне рішення для терапії слід приймати індивідуально. Вище зазначені патологічні і нормальні діапазони для антитіл в зразках пацієнта слід розглядати тільки як рекомендації. Кожна лабораторія повинна встановити свої власні норми, відповідно до ISO 15189 або інші діючі правила лабораторії.

### СХЕМА ІНКУБАЦІЇ

- 1 Піпетувати **100 мкл** калібратора, контролю або взірця пацієнта  
→ Інкубувати **30 хвилин** при кімнатній температурі  
→ Видалити вміст лунок і **тричі** промити з **300 мкл** промивного розчину
- 2 Додати **100 мкл** ферментного кон'югата  
→ Інкубувати **15 хвилин** при кімнатній температурі  
→ Видалити вміст лунок і **тричі** промити з **300 мкл** промивного розчину
- 3 Піпетувати **100 мкл** розчину Субстрату  
→ Інкубувати **15 хвилин** при кімнатній температурі
- 4 Додати **100 мкл** Стоп розчину  
→ Витримати **5 хвилин**  
→ Зчитати результат при **450 нм**

