

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG, IgA, IgM К КАРДИОЛИПИНУ

1490-1, Cardioliplin IgG, M, A

Каталог. № : 1490-1
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 29-05-2008



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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Кардиолипин является ферментным иммуноанализом, в котором применяется высокоочищенный кардиолипин и нативный человеческий β 2-гликопротеин для обоюдно полуколичественного и качественного определения IgG, IgM и IgA антител к кардиолипину в человеческой сыворотке. Антитела анти-кардиолипина в основном распознают специфические эпитопы комплекса. Состоящего из кардиолипина и β 2-гликопротеина I, которые выражены только в случае взаимодействия β 2-гликопротеина I с кардиолипином. Данный анализ является средством в диагностике системной красной волчанки (SLE), первичного и вторичного антифосфолипидного синдрома (APS), и должен использоваться в сочетании с другими серологическими исследованиями и клиническими результатами.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы сыворотки, разведенные 1:101 инкубируются в микропланшетах, покрытых специфическим антигеном. Антитела пациентов, при наличии в образце, связываются с антигеном, несвязанная фракция вымывается в следующем этапе. После этого анти-человеческие иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена (конъюгатом) инкубируются и взаимодействуют с комплексом антиген-антитело образцов в микропланшете. Несвязанный конъюгат вымывается в последующем этапе. Добавление ТМВ-субстрата образует ферментную, колориметрическую (синего цвета) реакцию, которая останавливается разведенной кислотой (цвет становится желтым). Интенсивность образования цвета от хромогена является свойством количества конъюгата, связанного с комплексом антиген-антитело. что пропорционально начальной концентрации соответствующих антител в образце пациента.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Используйте предпочтительно недавно собранные образцы сыворотки, при сборе крови необходимо учитывать местные требования. Не используйте желтушные, липемические, гемолитические или бактериально загрязненные образцы. сыворотки с частицами необходимо очистить центрифугированием низкой скорости (<1000 x g). образцы крови необходимо собрать в чистые, сухие и пустые пробирки. После сепарации образцы сыворотки необходимо использовать немедленно, хранить плотно закрытыми при 2-8°C до трех дней или в замороженном виде при -20°C в течении более длительного времени.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Предназначены для перерастворения:

- **5x буфер образца:** 1 фл., 20 мл – концентрированный 5x (белый колпачок: желтый раствор). Содержит: Tris, NaCl, BSA, азид натрия < 0.1% и тимеросал 0,01% (консервант).
- **50x промывочный буфер:** 1 фл., 20 мл – концентрированный 5x (белый колпачок: зеленый раствор). Содержит: Tris, NaCl, Tween, азид натрия < 0.1% и тимеросал 0,01% (консервант).

Готовые к использованию:

- **Отрицательный контроль:** 1 фл., 1,5 мл (зеленый колпачок: желтый раствор). Содержит: сыворотку человека (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант).
- **Положительный контроль:** 1 фл., 1,5 мл (красный колпачок: желтый раствор). Содержит: сыворотку человека (разведенная), азид натрия < 0.1% (консервант).

- **Cut-off контроль:** 1 фл., 1,5 мл (синий колпачок: желтый раствор). Содержит: сыворотку человека (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант).
- **Калибраторы:** 6 фл., 1,5 мл каждый – 0, 3, 10, 30, 100, 300 Ед/мл (интенсивность цвета увеличивается с концентрацией: желтые растворы). Содержит: сыворотку человека (разведенную), азид натрия < 0.1% (консервант).
- **Конъюгат:** 1 фл., 15 мл IgA/G/M (белый колпачок: красный раствор). Содержит: анти-человеческие иммуноглобулины. Конъюгированные пероксидазой хрена и тимеросалом 0.01% (консервант).
- **ТМВ субстрат:** 1 фл., 15 мл (черный колпачок). Содержит: стабилизированный ТМВ/H₂O₂.
- **Стоп раствор:** 1 фл., 15 мл (белый колпачок: бесцветный раствор). Содержит: стабилизированный ТМВ/H₂O₂.
- **Микротитровальный планшет:** 12x8 луночный полосок с делимыми микролунами.

Необходимые, но не поставляемые материалы:

1. Микропланшетный считыватель с фильтром считывания 450 нм и дополнительно с референтным фильтром на 620 нм (600-690).
2. Стеклопосуда, тестовые пробирки.
3. Вихревой смеситель, точные пипетки (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) или многоканальная пипетка.
4. Устройство промывки микропланшета (многоканальная пипетка или автоматизированная система), промокательная бумага.
5. Анализ создан для применения в нем очищенной воды.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Храните все реагенты и микропланшет при 2-8°C в их оригинальных емкостях. После подготовки рерастворенные растворы стабильны в течении 1 месяца по крайней мере при 2-8°C. **Реагенты и микропланшет следует использовать только в течении срока годности, указанного на каждом компоненте. Избегайте прямого попадания света на ТМВ раствор. Храните микропланшеты в определенном пакете из фольги с осушителем и герметично закрытым.**

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Информация по охране здоровья
ДАННОЕ ИЗДЕЛИЕ ПРЕДНАЗНАЧЕНО ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO. Поэтому, только специально подготовленный и проинструктированный персонал по методике проведения in vitro диагностики может использовать этот набор. Хотя это изделие не считается особенно токсичным или опасным в условиях обычного использования следует соблюдать предельную осторожность.

ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- Не смешивайте и не заменяйте реагенты или микропланшеты разных номеров партий. Это может привести к вариативности в результатах.
- Перед использованием приведите все компоненты к комнатной температуре (20-26°C). Хорошо перемешайте и следуйте рекомендованной схеме инкубации для оптимальной эффективности анализа.
- Никогда не подвергайте компоненты к температуре более 37°C.
- Всегда пипетируйте раствор субстрата только новыми наконечниками. Защищайте этот реагент от света.
- Никогда не пипетируйте конъюгат наконечниками, перед тем использованными с другими реагентами.
- Определенный клинический диагноз не должен основываться только на результатах проведенного анализа. Но должен быть сделан врачом после оценки всех клинических и лабораторных результатов.
- Диагноз должен быть проверен с применением разных диагностических и медицинских методик если пациент заболел инфекционными болезнями в результате лечения.

ПРИМЕНЯЕМЫЕ МЕТОДЫ

Подготовка к пипетированию:

Разбавьте концентрированные реагенты:
Разбавьте концентрированный буфер образца 1:5 дистиллированной водой (напр., 20 мл + 80 мл).
Разбавьте концентрированный промывочный буфер 1:50 дистиллированной водой (напр., 20 мл + 980 мл).

Образцы:

Разбавьте образцы сыворотки 1:101 буфером образца (1x)
Напр., 1000 мкл буфера образца (1x) + 10 мкл сыворотки. Хорошо перемешать!

Промывка:

Подготовьте 20 мл разбавленного промывочного буфера на 8 лунок или 200 мл для 96 лунок.

Напр., 4 мл концентрата + 196 мл дистиллированной воды.

Автоматическая промывка:

Учитывайте увеличение расхода при запуске аппарата и мертвый объем автоматизированной пипетки.

Ручная промывка:

Удалите жидкость из лунок, перевернув планшет. Энергично стукните рамкой с лунками по чистой промокательной бумаге. Раскапайте 300 мкл разбавленного промывочного буфера в каждую лунку, подождите 20 секунд. Еще дважды повторите процедуру целиком.

Микропланшеты:

Подсчитайте количество лунок, необходимых для анализа. Удалите неиспользуемые лунки из рамки, положите в пластиковый пакет для хранения вместе с осушителем, герметично закройте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Схему пипетирования см. в Приложении А, схему процедуры см. в Приложении В.

- Пипетируйте 100 мкл каждой разбавленной сыворотки пациента в нужные лунки.
- Пипетируйте 100 мкл калибраторов ИЛИ порогового, отрицательного и положительного контролей в нужные лунки.
- Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20-26°C).
- Промойте 3x 300 мкл промывочного буфера (разбавленного 1:50).
- Пипетируйте в каждую лунку по 100 мкл конъюгата.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре (20-26°C).
- Промойте 3x 300 мкл промывочного буфера (разбавленного 1:50).
- Пипетируйте в каждую лунку по 100 мкл ТМВ.
- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре (20-26°C).
- Пипетируйте в каждую лунку по 100 мкл стоп раствора в том же порядке что и субстрат.
- Инкубируйте минимум 5 минут.
- Встряхивайте планшет осторожно в течении 5 сек.
- Считайте абсорбцию при 450 нм (на выбор при 450/620 нм) в течении 30 минут.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Полуколичественная и качественная интерпретация

Для **полуколичественной интерпретации** постройте стандартную кривую путем выведения **оптической плотности (ОП)** каждого **калибратора** (ось Y) против соответствующий значений концентрации в Ед/мл (ось X). Для достижения лучших результатов рекомендуем использование лог/линейных координат и 4-параметровочного шаблона. Из ОП каждого образца считайте соответственные концентрации антител, указанные в Ед/мл.

Диапазон нормы	Положительные результаты
≤ 20 Ед/мл	> 20 Ед/мл

Пример калибровочной кривой

Мы рекомендуем пипетировать калибраторы попарно в каждой процедуре.

Калибраторы IgA/G/M	ОП 450/620 нм	КВ %
0 Ед/мл	0,056	2,5
3 Ед/мл	0,144	1,5
10 Ед/мл	0,311	2,4
30 Ед/мл	0,623	3,2
100 Ед/мл	1,228	3,1
300 Ед/мл	2,091	0,9

Пример вычисления

Пациент	Репликат	Среднее (ОП)	Результат (Ед/мл)
P 01	1,357/1,334	1,346	116,2
P 02	0,790/0,781	0,785	45,7

За данными определенной партии набора см. вкладыш контроля качества. Медицинские лаборатории могут проводить свой контроль качества с использованием собственных контролей и/или внутренних объединенных сывороток, сто предусмотрено правилами ЕС. **Не использовать данный пример для интерпретации результатов пациентом!**

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормы. Основываясь на своих методиках, контролях, оборудовании

и группе пациентов, исходя из своих собственных утвержденных процедур.

Для **качественной интерпретации** считайте оптическую плотность порогового контроля и образцов пациентов. Сравните ОП пациентов с ОП порогового контроля. Все образцы, указывающие более высокие значения чем пороговое, считаются положительными.

Отрицательный:	ОП пациента < ОП порогового значения
Положительный:	ОП пациента > ОП порогового значения

Технические данные	
Материал образца:	сыворотка
Объем образца:	10 мкл образца, разбавленного 1:101 1x буфером образца
Общее время инкубации:	60 минут при КТ (20-26°C)
Диапазон калибровки:	0-300 Ед/мл
Аналитическая чувствительность:	1,0 Ед/мл
Хранение:	при (2-8°C) только в оригинальных флаконах
Количество определений:	96 анализов

ПРИЛОЖЕНИЕ А:

Схема пипетирования

Рекомендуется пипетировать калибраторы, контроли и образцы следующим образом:

Для **полуколичественной интерпретации (semi-quantitative interpretation)** используйте калибраторы, чтобы вывести калибровочную кривую.

Для **качественной интерпретации (qualitative interpretation)** используйте пороговый контроль.

(Схемы распределения реагентов для полуколичественной и качественной интерпретации см. в оригинале инструкции на стр. 6).



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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