

## Набор ИФА для определения антител класса IgM к КАРДИОЛИПИНУ

Каталог. № :1492Z  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 12-05-2008

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

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Этап	(комнатная темп. 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, калибратор и контроли	100 мкл	30 минут
4	Промывочный буфер (3 раза)	350 мкл	
5	Ферментный конъюгат	100 мкл	30 минут
6	Промывочный буфер (3 раза)	350 мкл	
7	Хромогенный субстрат ТМВ	100 мкл	30 минут
8	Стоп раствор	100 мкл	
9	Считывание ОП при 450 нм		

### НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ИФА кардиолипина IgM компании «Диагностик Аутомейшн» предназначен для обнаружения и полуколичественного определения антител класса IgM к кардиолипину в человеческой сыворотке или плазме. Анализ предназначен для определения IgM антител в единичном образце. Результаты данного анализа должны использоваться как средства диагностики анти-фосфолипидного синдрома в пациентов с аутоиммунной болезнью.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Аутоантитела к кардиолипину (ACA) часто обнаруживаются в пациентах с системной волчанкой (SLE). Их также находят в пациентах с другими аутоиммунными болезнями, также как и в некоторых людях без очевидных предыдущих предрасполагающих болезней. Было установлено, что повышенные уровни ACA в значительной степени связаны с наличием и венозного и артериального тромбоза, тромбоцитопении и рецидивной потери плода. Вместе с ACA или противосвертывающим средством волчанки антифосфолипидный синдром используется для описания пациентов, которые имеют эти клинические проявления.

ACA обнаруживаются в иммуноглобулине классов IgG, IgM и IgA. Определение IgM антител - ценный указатель в диагностике начала аутоиммунной болезни, в то время как IgG антитела обнаруживаются на прогрессивных стадиях проявленных аутоиммунных нарушений. ACA IgG хороший указатель соотношения с клиническим состоянием пациента при тромбозе, тромбоцитопении, потери плода и некоторых неврологических нарушениях. ACA IgA часто связан с IgG антителами. ACA IgA считаются имеющими большее соответствие при тромбозе и потери плода.

Анализ различных изоформ ACA с помощью ИФА помогает в диагностике анти-фосфолипидного синдрома в пациентах с волчанкой и связанными с ней нарушениями.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенные антигены кардиолипина нанесены на поверхность микролунок. Разбавленная сыворотка или плазма пациента и калибраторы вносятся в лунки. Специфические для антикардиолипина IgG антитела, если присутствуют, связываются с антигенами. Все несвязанные материалы вымываются. После добавления ферментного конъюгата он связывается с комплексом антигена- антитела. Избыточный ферментный конъюгат смывается, и добавляется хромогенный субстрат ТМВ. В определенное время каталитическая реакция ферментного конъюгата останавливается. Интенсивность образовавшегося цвета пропорциональна количеству IgM специфических антител в образце. Результаты считываются на микролуночном считывателе сравниваются с калибраторами.

### ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8°C.
2. После вскрытия мешочка остальные лунки необходимо немедленно герметично закрыть в мешочке с высушивающими средствами. Рекомендуется использовать лунки в течении 30 дней.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
4. Не поддавать реагенты анализа влиянию 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 2-8°C до 7 дней или в замороженном виде до 6 месяцев. Избегать повторного размораживания и размораживания образца сыворотки.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- |   |                |
|---|----------------|
| 1. Микролуночные полоски: Лунки, покрытые антигеном кардиолипина.                   | 12 x 8 лунок   |
| 2. Абсорбирующий раствор: черная крышка   | 60 мл/бутылка  |
| 3. Промывочный концентрат 10x.  | 100 мл/бутылка |
| 4. Хромогенный раствор ТМВ: янтарная бутылка.                                       | 15 мл/бутылка  |
| 5. Ферментный конъюгат: раствор красного цвета.                                     | 12 мл/бутылка  |
| 6. Исходный раствор   | 160 мкл/флакон |
| 7. Набор контролей: Отриц. и полож. контроли. Диапазоны указаны на каждой этикетке. | 160 мкл/флакон |
| 8. Стоп раствор: 1,5 N раствор кислоты.   | 12 мл/бутылка  |

### ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Потенциально биологически опасные материалы: Калибраторы и контроли, содержащие компоненты человеческого происхождения, были протестированы одобренным FDA реагентами и оказались неактивными к поверхностному антигену вируса гепатита В, также к ВИЧ антителу. Однако, поскольку не существует никакой метода, дающего полную уверенность в отсутствии ВИЧ, вируса гепатита В или других возбудителей инфекций, с этими реагентами необходимо обращаться с соблюдением 2 уровня биобезопасности.
2. Не пипетировать ртом. Не курить, не принимать пищу и не пить в помещениях где используются образцы или реагенты набора.
3. Компоненты данного набора предназначены для применения как целостной единицы. Нельзя перемешивать компоненты из разных партий.
4. Данное изделие содержит компоненты, содержащие азид натрия. Азид натрия может реагировать с оловянными или медными сточными трубами, образуя взрывчатые азиды металлов. При уничтожении промыть большим количеством воды.
5. Чтобы предотвратить травму и химические ожоги, избегайте контакта с кожей и глазами или вдыхания и глотания следующих реактивов: ферментного конъюгата, хромогенного субстрата ТМВ и стоп раствора.

### ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Приготовить промывочный буфер 1x. Приготовить промывочный буфер путем добавления дистиллированной или деионизированной воды к промывочному концентрату 10x до конечного объема 1 л.
2. Привести все образцы и реагенты набора к комнатной температуре (20-25°C) и осторожно перемешать.
3. Подготовка калибровочной кривой. Рекомендуется использовать набор калибраторов в пределах 24 часов. Для калибратора А (100 MPL) добавьте 10 мкл исходного калибратора к 1 мл абсорбирующего раствора. Приготовьте калибраторы В, С, D и E серийным разбавлением 500 мкл калибратора А с равным объемом абсорбирующего раствора 50, 25, 12.5 и 6.3 MPL.

Калибратор	Добавить		к абсорбирующему раствору	MPL
A	Исходный калибратор	10 мкл	1000 мкл	100
B	Калибратор А	500	500	50
C	Калибратор В	500	500	25
D	Калибратор С	500	500	12.5
E	Калибратор D	500	500	6.3

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите желаемое количество покрытых полосок в держатель. Предварительно промойте покрытые лунки – повторите промывку 3 раза промывочным буфером.

2. Поведите разбавления образцов и набора контролей 1:101, добавив 5 мкл образца к 500 мкл абсорбирующего раствора. Хорошо перемешать.
3. Внесите в соответствующие лунки по 100 мкл разбавленных образцов, набора калибраторов и контролей. Постучите по держателю, чтобы удалить воздушные пузырьки из жидкости и хорошо перемешать. Инкубировать в течении 30 минут при комнатной температуре.
4. Удалить жидкость из всех лунок. С помощью промывочного буфера повторить промывку 3 раза.
5. Внесите по 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
6. Удалить ферментный конъюгат из всех лунок. С помощью промывочного буфера повторить промывку 3 раза.
7. Внесите 100 мкл хромогенного субстрата ТМВ в каждую лунку и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
8. Добавить 100 мкл стоп раствора, чтобы остановить реакцию.

**Перед считыванием убедитесь в отсутствии воздушных пузырьков в каждой лунке**

9. Считайте ОП микролуночным считывателем при 450 нм.

#### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Создайте калибровочную кривую построением ОП при 450 нм на оси ординат против концентрации значений калибратора MPL на оси абсцисс на миллиметровке или логарифмическом графике.
2. Используя значения ОП каждого образца, определите концентрацию из калибровочной кривой.

3. Типичный пример:

Набор калибраторов	Кардио-липина IgM (MPL)	ОП при 450 нм		Средн. ОП при 450	СО	КВ %
Калибратор E	6.3	0.122	0.134	0.128	0.008	6.629
Калибратор D	12.5	0.275	0.259	0.267	0.011	4.237
Калибратор C	25	0.443	0.485	0.464	0.030	6.401
Калибратор B	50	0.949	0.926	0.938	0.016	1.735
Калибратор A	100	1.565	1.559	1.562	0.004	0.272

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Отрицательный и положительный контроль необходимо использовать в каждой партии анализируемых образцов и концентрация должны быть в пределах диапазона, указанного на их этикетках.
2. Значение ОП бланка должно быть ниже 0.150 и значение ОП калибратора 100 MPL должно быть более 0,750. Из образцов человеческой сыворотки можно изготавливать дополнительные контроли и хранить при -20°C.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отрицательный:	< 15 MPL
Низко положительный:	15 - 25 MPL
Умеренно положительный:	26 - 79 MPL
Высоко положительный:	> 80 MPL

#### ОЖИДАЕМОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Большинство пациентов с повторным тромбозом или потерей плода при анти-фосфолипидном синдроме имеют IgG изотип с уровнем более чем 40 GPL. Реже встречаются пациенты с анти-фосфолипидным синдромом, которые в дополнение к IgG могут иметь IgM или только IgM антитела. Повышенные уровни АСА случайно, хотя нечасто, наблюдаются у здоровых людей. Однако, несколько аутоиммунных и инфекционных болезней могут приводить к переходному или хроническому увеличению АСА. Повышенные уровни АСА были зафиксированы в растворимых печеночных антигенах (SLA), ревматоидном артрите, туберкулезе, синдроме Бехсета и других заболеваниях. Диапазон значений АСА в норме может изменяться в зависимости от совокупности.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Как и в других серологических анализах, результаты этих анализов должны применяться вместе с информацией, располагаемой от клинической оценки и других диагностических процедур.
2. Хотя АСА ассоциируется с некоторыми проявлениями системной волчанки, клиническое значение АСА при системной волчанке и других болезнях остается неизученным.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Чувствительность, специфичность и точность:

С помощью данного набора и другого имеющегося в продаже набора ИФА были проанализированы 78 образцов.

ИФА	Референтный ИФА			
	Отриц.	Полож.	Общее	
кардиолипина IgM	Отриц.	40 (D)	2 (B)	42
	Полож.	2 (C)	34 (A)	36
«Диагностик Аутомейшн»	Общее	42	36	78

Относительная чувствительность =  $A / (A+B) = 34 / (34+2) = 94 \%$

Относительная специфичность =  $D / (C+D) = 40 / (2+40) = 95 \%$

Совпадение =  $(A+D) / (A+B+C+D) = (34+40) / (34+2+2+40) = 74 / 78 = 95 \%$

##### Перекрестная реактивность:

Для определения перекрестной реактивности данного набора с другими IgM антителами было проведено исследование. Не было обнаружено перекрестной реактивности против IgM положительных образцов краснухи, CMV, HSV, EBV-VCA, токсоплазмы, Chlamydia trachomatis, лихорадки и ревматоидного фактора IgM.

##### Точность:

Среднее значение, СО, и % КВ были рассчитаны в пределах и между анализами:

В пределах анализа	К-во	Среднее значение MPL	СО	% КВ
Сыворотка 1	8	25.3	3.16	12.5
Сыворотка 2	8	55.8	6.3	11.3
Сыворотка 3	8	87.1	6.9	7.9
Между анализами	К-во	Среднее значение MPL	СО	% КВ
Сыворотка 1	8	26.9	1.39	13.4
Сыворотка 2	8	54.6	6.4	11.8
Сыворотка 3	8	89.8	9.2	10.2

#### Литература:

(См. в оригинале инструкции).