

НАБОР ИФА
ДЛЯ СКРИНИНГА АНТИТЕЛ КЛАССА IgG И IgM К КАРДИОЛИПИНУ, ФОСФАТИДИЛСЕРИНУ, ФОСФАТИДИЛИНОЗИТУ, ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТЕ И β 2-ГЛИКОПРОТЕИНУ I

2560-6, Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM ELISA

Каталог. № : 2560-6
 Количество : 96
 Производитель: DAI (США)

Методика от 09-25-2013



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

Анализ	Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM ELISA
Метод	Твердофазный иммуноферментный анализ
Принцип	Непрямой; Планшет, покрытый антигеном
Диапазон обнаружения	0-100 мк/мл IgG и IgM
Образец	10 мкл сыворотки
Общее время	~60 минут
Срок годности	12 месяцев от даты производства
Специфичность	Исследования не проводились
Чувствительность	0.5 Ед/мл

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор DAI Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM является количественным ферментным иммуноанализом (ИФА), предназначенным для скрининга антител класса IgG и IgM к Кардиолипину, Фосфатидилсерину, Фосфатидилинозиту, Фосфатидной кислоте и Бета2-гликопротеину I в сыворотке или плазме человека в качестве помощи в диагностике повышенного риска тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) или подобными расстройствами.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Смесь высокоочищенных кардиолипина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидной кислоты и человеческого β 2-гликопротеина I нанесена в лунки. Антитела к этим антигенам, если они присутствуют в разбавленной сыворотке или плазме, связываются с соответствующими антигенами. Промывание микролунок удаляет неспецифические компоненты сыворотки и плазмы. Анти-человеческие IgG или IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), иммунологически выявляют связанные антитела пациента с формированием комплекса конъюгат/антитело/антиген. Промывание микролунок удаляет несвязанный конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизует с образованием синей окраски. Добавление кислоты останавливает реакцию с образованием конечного продукта желтого цвета. Интенсивность этого желтого цвета фотометрически измеряется при 450 нм.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Провести забор образцов цельной крови с использованием принятых в медицине методов, чтобы избежать гемолиза.
2. Позволить крови свернуться и отделить сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть прозрачной и без гемолиза. Избегать загрязнения гемолизом или липемией, хотя это не влияет на результаты анализа.
4. Образцы можно хранить при температуре 2-8 °C в течение пяти дней или при температуре -20 °C до шести месяцев.
5. Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов. Это может привести к потере активности.
6. Тестирование инактивированной нагреванием сыворотки не рекомендуется.

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

Поставляемые в наборе материалы

1. **Планшет:** 96 лунок, состоящий из двенадцати 1 x 8-луночных полосок, покрытых смесью высокоочищенных кардиолипина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидной

кислоты и человеческого β 2-гликопротеина I. Готов к использованию.

2. **Стандарт:** 6 флаконов, 1,5 мл каждый. Комбинированные анти-фосфолипидные калибраторы в сывороточно-буферной матрице (PBS, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (вес/вес)), содержащие IgG: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; 100 GPL Ед/мл и IgM: 0; 6.3; 12.5; 25; 50; 100 MPL Ед/мл. Готов к использованию.
3. **Контроль:** 2 флакона по 1,5 мл каждый. Анти-фосфолипидные контроли в сывороточно-буферной матрице (PBS, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (вес/вес)). Положительный (1) и Отрицательный (2); Соответствующие концентрации см. КК. Готов к использованию.
4. **Буфер для разведения образцов:** 1 флакон, 20 мл (Трис, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (вес/вес)), желтый, концентрат (5x).
5. **Ферментный конъюгат IgG:** 1 флакон, 15 мл (PBS, Проклин 300 < 0,5% (объем/объем)), (светло-красный), содержащий поликлональные анти-IgG человека, помеченный пероксидазой хрена. Готов к использованию.
6. **Ферментный конъюгат IgM:** 1 флакон, 15 мл (PBS, Проклин 300 < 0,5% (объем/объем)), (светло-красный), содержащий поликлональные анти-IgM человека, помеченный пероксидазой хрена. Готов к использованию.
7. **Раствор Субстрата ТМБ:** 1 флакон, 15 мл раствора субстрата. Готов к использованию.
8. **Стоп-раствор:** 1 флакон, 15 мл (1 M соляной кислоты). Готов к использованию.
9. **Промывочный раствор:** 1 флакон, 20 мл (PBS, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (объем/объем)), концентрат (50x).

Требуемые, но не поставляемые материалы

1. Микропланшетный считыватель для ИФА с длиной волны измерения 450 нм.
2. Многоканальный диспенсер или повторяемые пипетки на 100 мкл.
3. Вортекс.
4. Пипетки на 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл.
5. Лабораторный таймер.
6. Программное обеспечение.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Дистиллированная или деионизированная вода
2. Мерный цилиндр на 100 и 1000 мл
3. Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРОЦЕДУРЫ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.
2. Не смешивайте компоненты набора из разных партий.
3. Все материалы должны быть комнатной температуры (20-28 °C).
4. Приготовьте все реагенты и образцы до начала тестирования. После запуска Тест должен проводиться без перерыва, чтобы получить самые надежные и последовательные результаты.
5. Выполнять шаги анализа только в указанном порядке.
6. Всегда использовать свежие разведения образца.
7. Пипетировать все реагенты и образцы в нижнюю часть лунки.
8. Чтобы избежать переноса загрязнений, менять наконечники для образцов и контролей.
9. Важно тщательно вымыть лунки и удалить последние капли промывочного буфера для достижения наилучших результатов.
10. Все шаги инкубации должны проводиться с одинаковыми временными промежутками.
11. Контрольные сыворотки следует регулярно анализировать как неизвестные для проверки производительности реагентов и анализа.
12. Запрещается повторно использовать стрипы.

Для всех контролей соответствующие концентрации приведены на этикетке каждого флакона. Для использования этих концентраций калибровочная кривая должна быть построена, чтобы считать результаты пациента полуколичественно.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Подготовка Буфера для разведения образцов

Развести содержимое каждого флакона концентрата буфера для образцов (5x) дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните в холодильнике: стабилен при 2-8 °C в течение не менее 30 дней после получения или до окончания срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление промывочного раствора

Развести содержимое каждого флакона концентрата буферного промывочного раствора (50x) дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

Храните в холодильнике: стабильный при 2-8 °С в течение не менее 30 дней после приготовления или до окончания срока годности, указанного на этикетке.

Подготовка образцов

Развести все образцы пациентов **1:100** Буфером для разведения образцов перед использованием.

Таким образом, смешать 10 мкл образца с 990 мкл Буфера для разведения образцов в полистироловой пробирке. Хорошо перемешать.

Контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Подготовьте достаточное количество стрипов для размещения контроля и разведенных образцов пациента.
2. Для определения одного класса аутоантител пипетировать 100 мкл Калибраторов, Контролей и разведенных образцов пациента в лунки.
Для определения обоих IgG и IgM аутоантител стандартов, контролей и образцов пациентов пипетирование провести в два этапа.

	1	2	3	4	5	6		
A	SA	SE	P1	P5				
B	SA	SE	P1	P5				
C	SB	SF	P2	P..			SA - SF:	standards A to F
D	SB	SF	P2	P..			P1, P2...	patient sample 1, 2 ...
E	SC	C1	P3				C1:	positive control
F	SC	C1	P3				C2:	negative control
G	SD	C2	P4					
H	SD	C2	P4					

3. Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °С).
4. Удалить содержимое лунок и промыть 3 раза по 300 мкл промывочного раствора.
5. Внести 100 мкл ферментного конъюгата (Анти-человеческий-IgG или анти-человеческий-IgM) в каждую лунку.
6. Инкубировать в течение 15 минут при комнатной температуре.
7. Удалить содержимое лунок и промыть 3 раза по 300 мкл промывочного раствора.
8. Внести 100 мкл раствора субстрата ТМБ в каждую лунку.
9. Инкубировать в течение 15 минут при комнатной температуре.
10. Добавить 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
11. Читать оптическую плотность при 450 нм и рассчитать результаты. Рекомендуется бихроматическое измерение с контрольной длиной волны 600 - 690 нм.

Разработанная Окраска стабильна в течение по крайней мере 30 минут. Читать оптические плотности за это время.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Контроль качества

Этот тест является действительным только, если оптическая плотность при 450 нм для Положительного Контроля (1) и Отрицательного Контроля (2), а также для Стандартов А и F соответствует диапазону, указанному в сертификате контроля качества, который прилагается к каждой упаковке теста! Если любой из этих критериев не выполняется, результаты анализа считаются не действительными и тест следует повторить.

Подсчет результатов

Для Антифосфолипидного Скринингового теста подходит метод 4-параметрового построения с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

Рекомендуемое Линейно-Логарифмическое построение

Сначала рассчитать среднее значение оптической плотности для каждой лунки калибратора. Использовать Lin-log миллиметровую бумагу и отложить среднюю оптическую плотность каждого калибратора против концентрации. Нарисуйте наиболее подходящую кривую аппроксимации через все точки калибратора. Точки Калибратора также могут быть связаны с прямолинейными отрезками. Концентрация неизвестных образцов затем может быть оценена по калибровочной кривой путем интерполяции.

Пример расчета

Ниже приведены типичные результаты для Антифосфолипидного Скрининга. Эти данные предназначены только для иллюстрации и не должны использоваться для вычисления результатов из другой партии.

anti-PL	No	Position	OD 1	OD2	Mean	Conc. 1	Conc. 2	Mean	decl.Con.	CV %
IgG	ST A	A 1/B 1	0,0 51	0,04 9	0,050	0,3	0,1	0,2	0,0	3
IgG	ST B	C 1/D 1	0,1 63	0,16 0	0,161	6,4	6,3	6,3	6,3	1
IgG	ST C	E 1/F 1	0,3 10	0,27 3	0,291	12,8	11,2	12,0	12,5	9
IgG	ST D	G 1/H 1	0,6 03	0,63 0	0,616	25	26	26	25	3
IgG	ST E	A 2/B 2	1,1 22	1,05 4	1,088	51	47	49	50	4
IgG	STF	C 2/D 2	1,7 42	1,78 7	1,765	98	103	101	100	2
IgM	ST A	A 7/B 7	0,0 22	0,02 1	0,022	0,2	0,1	0,2	0,0	3
IgM	ST B	C 7/D 7	0,2 11	0,20 5	0,208	6,1	6,0	6,1	6,3	2
IgM	ST C	E 7/F 7	0,4 65	0,46 2	0,464	13,0	12,9	13,0	12,5	0
IgM	ST D	G 7/H 7	0,7 88	0,67 9	0,633	23	26	24	25	8
IgM	ST E	A 8/B 8	1,4 11	1,38 2	1,397	52	50	51	50	1
IgM	STF	C 8/D 8	1,8 68	1,85 2	1,860	101	98	99	100	1

В нормальном диапазоне исследования с образцами сыворотки от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с использованием данного теста:

Anti-Phospholipid-Ab

	IgG [GPL U/ml]	IgM [MPL U/ml]
normal:	< 10	< 10
elevated:	≥ 10	≥ 10

Положительные результаты должны быть проверены относительно всей клинической картины пациента. Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные нормальные и патологические диапазоны антифосфолипидных антител.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Этот набор предназначен только для исследовательских целей. Не для использования в диагностических процедурах.
 2. Не смешивать компоненты набора из разных партий.
 3. Исходные материалы, от которых эти продукты были получены, путем проверки одобренными методами оказались отрицательными к антигену ВИЧ-1, HBsAg и к антителам против вируса гепатита С и ВИЧ. Однако, так как никакой метод тестирования не может полностью гарантировать отсутствия возбудителей инфекций, с этими продуктами необходимо обращаться как с потенциально инфекционными.
 4. Избегать контакта с ТМБ (3, 3', 5, 5'-тетраметил-бензидин). Если ТМБ вступает в контакт с кожей, тщательно промыть водой с мылом.
 5. Избегайте контакта со стоп-раствором, который является кислотой. Если он вступает в контакт с кожей, тщательно промыть водой и обратиться к врачу.
 6. Некоторые компоненты набора (например, Контроли, Буфер для разведения образцов и буферизированный Раствор для промывания) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия (NaN₃) является высокотоксичным и реактивным в чистом виде. При концентрации продукта (0,09 %) не опасен. Несмотря на классификацию как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использование разумной лабораторной практики.
 7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, промойте канализацию с большим количеством воды, чтобы разбавить компоненты ниже их активных уровней.
 8. Использовать одноразовые перчатки при работе с реагентами и тщательно мыть руки после окончания работы.
 9. Не пипетировать ртом.
 10. Не есть, не пить, не курить или наносить макияж в местах работы с образцами или реагентами.
 11. Избегать контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляющимися материалами; экстремальные температуры могут инициировать самовозгорание.
- Придерживаться инструкций для обеспечения контроля качества в медицинских лабораториях, Используя контроли и/или пулированные сыворотки. Во время использования всех реагентов набора, контроля и образцов сыворотки соблюдать существующие правовые нормы.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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