

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ СКРИНИНГА АНТИТЕЛ КЛАССА IgG И IgM К КАРДИОЛИПИНУ, ФОСФАТИДИЛСЕРИНУ, ФОСФАТИДИЛИНОЗИТУ, ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТЕ И $\beta$ 2-ГЛИКОПРОТЕИНУ I

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

Каталог. № : 2560-6

Методика от 09-25-2013

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



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  $\beta$ 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  $\beta$ 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]
<b>normal:</b>	< 10	< 10
<b>elevated:</b>	≥ 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 (NaN<sub>3</sub>) 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  
е-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)