

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНЫХ АНТИТЕЛ К КАРДИОЛИПИНУ КЛАССОВ IgG, IgM И IgA

515S, Anti-Cardioliipin Screen

Каталог. № : **ORG 515S**

Методика от **03-2012**

Количество : **96**

Производитель: **Orgentec (Германия)**



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

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Антифосфолипидный синдром является аутоиммунным заболеванием, характеризующимся тромбофильным синдромом и акушерскими осложнениями. Комитет по науке и стандартизации Международного сообщества по тромбозам и гемостазу принял консенсусные критерии, которые используются в лабораторной диагностике. Эти критерии были обновлены в 2006. Соответственно критериям, тромбофилические пациенты должны обследоваться на выявление волчаночного антикоагулянта и на антифосфолипидные антитела методом ELISA на выявление антикардиолипидных антител.

Их присутствие у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) ассоциируется с развитием тромбозов и тромбоцитопений, в гинекологии они являются причиной внутриутробной гибели плода или привычного выкидыша. Антикардиолипидные антитела также обнаруживаются при нетромботических неврологических расстройствах - таких как цереброваскулярная недостаточность, ишемия мозга, хорей и инфаркт миокарда.

Антитела к кардиолипину могут относиться к классам IgG, IgM и IgA. Обнаружение антител класса IgM является индикатором начинающихся аутоиммунных заболеваний, в то время как антитела класса IgG обнаруживаются при обострении и прогрессировании ранее манифестировавших аутоиммунных процессов.

Количественное определение антикардиолипидных антител, особенно IgG, является высокоспецифичным индикатором эффективности проводимой терапии.

Показания для исследования антител к кардиолипину:

- Системная красная волчанка - Хорей
- Тромбозы - Эпилепсия
- Тромбоцитопения - Внутриматочная гибель плода
- Ишемия мозга -Привычное невынашивание беременности

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Ячейки планшета покрыты высокоочищенным кардиолипином. Антитела к кардиолипину требуют в качестве кофактора β_2 -гликопротеин I, поэтому ячейки насыщены высокоочищенным человеческим β_2 -гликопротеином I. Эта новая процедура сорбции антител в лунках микропланшета гарантирует воспроизводимые результаты независимо от концентрации эндогенного b2GPI.

В ходе анализа происходят связывание присутствующих аутоантител, образование сэндвичевого комплекса и ферментная цветная реакция:

Контроли и предварительно разбавленные пробы сыворотки пациентов вносятся в микроячейки. Любые присутствующие антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигенами. После 30-минутной инкубации ячейки промываются, при этом промывочный раствор удаляет несвязавшиеся компоненты сыворотки.

Смешанный раствор конъюгатов античеловеческого анти-IgG, анти-IgA и анти-IgM с пероксидазой хрена добавляется в ячейки для определения аутоантител, связанных с иммобилизованными антигенами. После 15-минутной инкубации избыток ферментного конъюгата удаляется промывочным раствором.

Раствор хромогенного субстрата, содержащий ТМБ, добавляется в ячейки. В течение 15-минутной инкубации цвет раствора становится голубым. Развитие окраски останавливается добавлением 1M соляной кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый.

Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG /IgM/IgA-антител, присутствующих в образце.

Необходимо считать оптическую плотность при 450 нм. Рекомендуется бихроматический режим с фильтром сравнения 600 - 690 нм.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.
3. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C в их оригинальной упаковке.
4. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов. Необходимо контролировать сроки годности, проставленные на этикетках коробок и флаконов. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
5. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры перед использованием и хорошо перемешайте их.
6. В процессе обращения с компонентами набора, контролями и образцами крови соблюдайте принятые правила. При обращении с потенциально инфекционно опасными материалами должны выполняться следующие предосторожности:
 - в помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить
 - не отбирайте образцы ртом
 - при обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
7. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами крови следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
8. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
9. Стоп-раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
10. Некоторые компоненты содержат азид натрия как консервант. Азид натрия в чистом виде является высокотоксичным и высокореактивным, но при концентрации в продукте (0,09%) не является опасным. Тем не менее, соблюдайте правила хорошей лабораторной практики.
11. Некоторые компоненты содержат Проклин 300 как консервант. При утилизации компонентов, содержащих Проклин 300 предварительно разведите их большим количеством воды до концентраций ниже активных.
12. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным бычьим кардиолипином и насыщенным β_2 -гликопротеином I. Готов к использованию.	1
Контроли антител к кардиолипину классов G, M, A в основе сыворотки/буфера (PBS, BSA, Na ₂ S ₂ O ₃ <0.1% (w/w)) Отрицательный Контроль (A) 3.3, Е/мл Cut-Off Контроль (B) 10, Е/мл Положительный Контроль (C), 30 Е/мл Сильно положительный Контроль (D), 90 Е/мл. Готов к использованию.	4 флакона 1,5 мл каждый
Буфер образцов, желтый, концентрат (5x)	1 флакон 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий смесь поликлональных кроличьих античеловеческих IgG, IgM, IgA антител, меченых пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор (1M соляная кислота). Готова к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить при 2 - 8°C.
2. Держать лунки запечатанными в сухом пакете с влагопоглотителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности на упаковке.
4. Не подвергать реагенты теста воздействию тепла, солнечного света или сильного света в процессе хранения и использования.
5. Разбавленный буфер образца и промывочный буфер стабильны по крайней мере 30 дней в процессе хранения при 2 - 8°C.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование:

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
 - Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объема 100 мкл
 - Вортекс
 - Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
 - программное обеспечение для ридера
- ### Приготовление реагентов:
- дистиллированная вода
 - мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
 - пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
2. Дайте возможность крови стечь и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
4. Образцы должны храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20°C до шести месяцев.
5. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантител.
6. Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
2. Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
3. Все материалы следует привести к комнатной температуре.
4. Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализа необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
5. Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
6. Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.
8. Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
9. Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
10. Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
11. Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
12. Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей, на этикетках флаконов указаны соответствующие концентрации. Используя эти концентрации, может быть вычислена калибровочная кривая для полуколичественного считывания результатов пациента.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней или до конца срока годности.

Приготовление промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление образца

Разбавьте образцы пациентов 1:100 буфером для образцов перед анализом. Для этого добавьте до 10 мкл образца 990 мкл буфера для образца в пробирке из полистирола. Тщательно перемешайте. Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки контролей (К) и предварительно разбавленных проб пациентов (Р) в дублях.
2. Для определения суммарных антител классов А, М, G добавьте в ячейки по **100 мкл** соответствующих контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки. Контрольные образцы полностью готовы и не нуждаются в разведении.

	1	2	3	4	5	6
a	KA	P1	P5			
b	KA	P1	P5			
c	KB	P2	P..			
d	KB	P2	P..			
e	KC	P3				
f	KC	P3				
g	KD	P4				
h	KD	P4				

3. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалите содержимое ячеек и **трижды** промойте **300 мкл** промывочного раствора.
5. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
6. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое ячеек и **трижды** промойте **300 мкл** промывочного раствора.
8. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.
9. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
10. Добавьте **100 мкл** стоп-раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при **450 нм** и рассчитайте результаты.

Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 мин.

Считайте оптическую плотность за это время.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Данный тест пригоден, если ОП при 450 нм для негативного (А), cut-off (В), положительного (С) и высокоположительного (D) контролей соответствует диапазонам, указанным в сертификате контроля качества, что поставляется вместе с набором. Если критерии не соответствуют, результаты не пригодны, и тест необходимо повторить.

Качественная оценка

Для расчета результатов данного теста рекомендуется непосредственное сравнение оптической плотности образца каждого пациента с оптической плотностью контролей. Образцы с оптической плотностью выше, чем оптическая плотность контроля cut-off, считаются положительными.

Отрицательный: ОП пациента < ОП cut-off контроля

Положительный: ОП пациента > ОП cut-off контроля

Сильно положительный ≥ сильноположительного контроля

Количественное определение ELISA

Для количественного расчета результатов теста могут быть использованы концентрации и результаты измерения ОП контролей, которые используются для построения калибровочной кривой (рекомендуемая кривая - 4-параметрическая в полулогарифмических координатах). Концентрации неизвестных образцов рассчитываются по калибровочной кривой.

Интерпретация результатов

При исследовании нормального диапазона образцов сыворотки здоровых доноров. Были обнаружены следующие диапазоны при проведении анализов с анти-кардиолипином:

Исследование анти-кардиолипина

Cut-off: 10 Е/мл

При положительном результате в скрининговом тесте дальнейшее типирование аутоантител к кардиолипину должно проводиться с использованием наборов для количественного определения антител классов IgG, IgM и IgA.

Данный набор определяет сумму аутоантител всех трех классов (IgG, IgM и IgA). Образцы пациентов, содержащие 2 или 3 класса аутоантител к кардиолипину в низких концентрациях могут быть положительными в данном скрининговом тесте благодаря суммирующему эффекту. Такие образцы могут оказаться отрицательными при исследовании на отдельные классы аутоантител (IgG, IgM и IgA).

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность

Сыворотки содержащие антитела к кардиолипину классов IgG, IgM и IgA были разведены буфером для образцов и проанализированы с использованием данного набора.

Антитела	Образец	Разведение	Наблюдаемое [Ед/мл]	Ожидаемое [Ед/мл]	Н/О
Скрининг	1	1:200	47.7		
		1:400	24.0	23.9	100%
		1:800	11.5	11.9	97%
		1:1600	6.0	6.0	100%
		1:3200	2.7	3.0	90%
Скрининг	2	1:100	138.0		
		1:200	69.7	69.0	101%
		1:400	33.5	34.5	97%
		1:800	15.9	17.3	92%
		1:1600	7.8	8.6	91%
		1:3200	4.1	4.3	95%

Точность

Статистика была посчитана для четырех образцов по результатам 22 определений в одном круге анализов для точности внутри серии. Для определения точности между сериями были рассчитаны результаты 5 различных серий анализов с 6 определениями каждого:

Внутри анализа		
Образец №	Среднее [МЕ /мл]	CV [%]
1	4.49	13.3
2	14.8	5.2
3	42.1	4.1
4	70.2	6.6

Между анализами		
Образец №	Среднее [МЕ /мл]	CV [%]
1	5.8	12.4
2	15.8	8.1
3	43.7	4.7
4	75.9	2.5

Специфичность

Микропланшет покрыт высокоочищенными человеческим кардиолипином и высокоочищенным человеческим β_2 -гликопротеином I. Специальная технология нанесения антигенов в ячейки гарантирует нативную иммуногенную структуру кардиолипина после иммобилизации на твердой фазе. Данный набор специфичен для аутоантител к кардиолипину или к комплексу кардиолипина с β_2 -гликопротеином I.

Перекрестных реакций с антителами к ДНК и сифилис-специфичными антителами не отмечено.

Калибровка

Тест-система прокалибрована по международно признанному стандарту сыворотки от E.N.Harris, Louisville, США, поскольку не существует другого международного стандарта.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Не все пациенты Hashimoto's Throiditis являются положительными на аутоантитела против Tg.

Данный набор является диагностическим. Определение клинического диагноза не должно основываться на результатах одного теста и должно учитывать все данные клинических и лабораторных исследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не влияет гемолизированная (до 1000 мг/дл), липемическая (до 3 г/дл триглицеридов) сыворотка или сыворотка, содержащая билирубин (до 40 мг/дл). Не было обнаружено влияние при использовании антикоагулянтов. Но рекомендуется не использовать сильно гемолизированную или липемическую сыворотку.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- 1 Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей или образца пациентов
→ Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
→ Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 2 Добавить **100 мкл** ферментного конъюгата
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
→ Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 3 Пипетировать **100 мкл** раствора Субстрата
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- 4 Добавить **100 мкл** Стоп раствора
→ Выдержать **5 минут**
→ Считать результат при **450 нм**



ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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