

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG И IgM К БЕТА-2- ГЛИКОПРОТЕИНУ I

ORG 521, Anti-beta-2-Glycoprotein I IgG/IgM

Каталог. № : **ORG 521**
Количество : **96**
Производитель: **Orgentec (Германия)**

Методика от **08-2012**



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

НАЗНАЧЕНИЕ

Анти-бета-2-Гликопротеин I IgG/IgM является тест-системой ИФА для количественного измерения аутоантител класса IgG и IgM к бета-2-Гликопротеину I в сыворотке или плазме человека. Предназначается только для использования в in-Vitro диагностике.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Высокоочищенный бета-2-Гликопротеин I привит в лунках. Антитела к привитым антигенам, если они присутствуют в разбавленной пробе пациента, связываются с соответствующим антигеном. Промывание лунок удаляет несвязанные неспецифические компоненты сыворотки и плазмы. Анти-человеческие антитела, конъюгированные с Пероксидазой хрена (HRP), иммунологически обнаруживают связанные антитела пациента, формируя комплекс конъюгат-антитело-антиген. Промывание лунок удаляет несвязанный конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизует с образованием синей окраски. Добавление кислоты останавливает реакцию, образуя конечный продукт желтого цвета. Интенсивность этого желтого цвета измеряется фотометрически при 450 нм. Количество окрашивания прямо пропорционально концентрации антител, присутствующих в исходном образце.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ (См. Оригинал инструкции).

СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию.	1
Калибратор А 0 Ед/мл, содержащий сывороточную/буферную матрицу (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор В 6.3 Ед/мл, содержащий антитела Бета-2-Гликопротеина I в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор С 12.5 Ед/мл, содержащий антитела Бета-2-Гликопротеина I в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор D 25 Ед/мл, содержащий антитела Бета-2-Гликопротеина I в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор E 50 Ед/мл, содержащий антитела Бета-2-Гликопротеина I в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор F 100 Ед/мл, содержащий антитела Бета-2-Гликопротеина I в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Контроли (Положительный и Отрицательный), содержащие антитела Бета-2-Гликопротеина I в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтого цвета. Готовы к использованию. Концентрация указывается в сертификате анализа.	2 флакона 1.5 мл каждый
Буфер для образцов Р; содержит PBS, BSA, моющее средство, консервант азида натрия 0,09%, желтый, концентрат (5 х).	1 флакон 15 мл
Ферментный конъюгат, содержащий античеловеческие антитела IgG, меченые пероксидазой хрена; содержит PBS, BSA, детергент, консервант Проклин 0,05%, светло-красный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Ферментный конъюгат, содержащий античеловеческие антитела	

IgV, меченые пероксидазой хрена; содержит PBS, BSA, детергент, консервант Проклин 0,05%, светло-красный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ, содержит 3,3', 5,5'-Тетраметилбензидин. Бесцветный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор, содержит кислоту. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, содержит Tris, детергент, консервант азид натрия 0,09%; концентрат (50х)	1 флакон 20 мл
Инструкция по применению	1 шт.
Сертификат контроля качества	1 шт.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционно: контрольный фильтр с длиной волны 620 нм
 - Программное обеспечение для ридера
 - Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объемом 100 мкл
 - Вortexный миксер
 - Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
 - Таймер
 - Дистиллированная или деионизированная вода
 - Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
 - Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора
- Наборы ORGENTEC ИФА являются подходящими для использования на открытых автоматизированных процессорах. Каждый анализ должен быть оценен на соответствующей автоматизированной системе. Подробная информация предоставляется по запросу.

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

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

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить набор при 2 - 8 °C в темноте.
- Держать микропланшетные лунки в герметичном мешочке с осушителем.
- Реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
- Не поддавать реагенты для анализа воздействию тепла, солнца или сильного света в течении хранения и использования.
- Разбавленный буфер образца и промывочный буфер стабильны по крайней мере 30 дней при 2 - 8 °C. Рекомендуется использование в тот же день.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- 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 сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп раствор содержит кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте 0,09% тем не менее не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
- Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
- Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Придерживайтесь руководств по осуществлению контроля качества в лаборатории, используйте исследования контролей и/или пулированных сывороток. Придерживайтесь существующего законодательства при работе со всеми реагентами и образцами.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием.

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. Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для контролей/калибраторов и проб пациентов.

1. Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку.
Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °C).
Удалите содержимое ячеек и **трижды** промойте **300 мкл** промывочного раствора.
2. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
Удалите содержимое ячеек и **трижды** промойте **300 мкл** промывочного раствора.
3. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
4. Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.
Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Бихроматическое измерение проводите при 600-690 нм.
Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

Пример пипетирования:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1	A	P1								
B	B	P2	B	P2								
C	C	P3	C	P3								
D	D	P4	D	P4								
E	E	P5	E	P5								
F	F	P6	F	P6								
G	C+	P7	C+	P7								
H	C-	P8	C-	P8								
	IgG	IgG	IgM	IgM								

P1 ... - образцы пациентов, A-F - калибраторы, C +, C-- контроли

ОЦЕНКА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм для Калибраторов/Контролей и результатов контролей совпадает с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественных результатов отложить оптическую плотность каждого калибратора согласно концентрации калибратора, чтобы построить калибровочную кривую. Концентрация образцов пациентов может быть затем оценена с калибровочной кривой с помощью интерполяции.

Для данного набора рекомендуется 4-параметрический с линейно-логарифмическими координатами метод для оптической плотности и концентрации.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Калибровка

Это система анализа откалибрована в относительных условных единицах. Калибровка связана с международно признанной контрольной сывороткой от EN Харрис, Луисвилл и IRP 97/656 (IgG) и NCAL (IgG)/EY2C9 (IgM).

Диапазон измерения

Расчетный диапазон данного ИФА анализа составляет:

IgG: 0-100 Ед/мл IgM: 0-100 Ед/мл

Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение Cut-off

IgG: 8 Ед/мл IgM: 8 Ед/мл

Интерпретация результатов

Отрицательный: IgG < 5 Ед/мл IgM < 5 Ед/мл
 Граничный: 5-8 Ед/мл 5-8 Ед/мл
 Положительный: > 8 Ед/мл > 8 Ед/мл

Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образца, чтобы продемонстрировать динамический диапазон анализа. Активность для каждого разведения была рассчитана из калибровочной кривой.

Образец	Разведение	Полученное значение, Ед/мл	Ожидаемое значение, Ед/мл	П/О, %
IgG 1	1:100	100.0	100.0	100
	1:200	49.8	50.0	100
	1:400	25.5	25.0	102
	1:800	13.1	12.5	105
IgG 2	1:1600	6.9	6.3	110
	1:100	80.9	80.9	100
	1:200	42.0	40.5	104
	1:400	21.1	20.2	104
IgM 1	1:800	10.7	10.1	106
	1:1600	5.6	5.1	110
	1:100	97.6	97.6	100
	1:200	49.0	48.8	100
IgM 2	1:400	23.2	24.4	95
	1:800	13.4	12.2	110
	1:1600	6.4	6.1	105
	1:100	70.3	70.3	100
IgM 2	1:200	33.5	35.2	95
	1:400	18.6	17.6	106
	1:800	10.1	8.8	115
	1:1600	4.9	4.4	111

Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила:
IgG: 0.5 Ед/мл IgM: 0.5 Ед/мл



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

Воспроизводимость

Внутри тестовая точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов из результатов 24 определений в одном анализе. Результаты для точности в пределах анализа приведены в таблице ниже.

Межсерийная точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов по результатам 6 определений в 5 различных анализах. Результаты для выполнения к запуску точности приведены в таблице ниже.

Внутри анализа IgG		
Образец	Среднее Значение Ед/мл	CV [%]
1	13.4	5.0
2	24.3	2.1
3	88.0	2.8

Между анализами IgG		
Образец	Среднее Значение Ед/мл	CV [%]
1	11.0	7.4
2	29.5	7.9
3	94.9	2.6

Внутри анализа IgM		
Образец	Среднее Значение Ед/мл	CV [%]
1	14.7	3.8
2	30.0	2.1
3	67.9	2.1

Между анализами IgM		
Образец	Среднее Значение Ед/мл	CV [%]
1	15.7	6.3
2	32.6	4.1
3	82.9	4.3

Перекрестно реагирующие вещества

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Результаты исследований

Study population	n	Pos IgG	%	Pos IgM	%
Primary APS	8	6	75.0	4	50.0
Secondary APS	85	68	80.2	27	41.5
Normal human sera	150	2	1.3	3	2.0

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 521	Pos	62	2	73
	IgG Neg	11	118	
		73	150	223
Sensitivity:		84.9 %		
Specificity:		98.7 %		
Overall agreement:		94.2 %		

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 521	Pos	31	3	34
	IgM Neg	42	147	
		73	150	223
Sensitivity:		42.5 %		
Specificity:		96.0 %		
Overall agreement:		76.8 %		

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Этот анализ предназначен в качестве диагностической помощи. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах одного теста, он должен быть сделан врачом после всех оценки всех клинических и лабораторных исследований. Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально.

Выше указанные патологические и нормальные диапазоны для антител в образцах пациента следует рассматривать только в качестве рекомендаций. Каждая лаборатория должна установить свои собственные нормы, в соответствии с ISO 15189 или другие действующие правила лаборатории.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

1. Добавить **100 мкл** калибратор, контроль или образец пациента
→ Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
→ Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
2. Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
→ Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
3. Добавить **100 мкл** раствора субстрата
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
4. Добавить **100 мкл** стоп раствора
→ Выдержать **5 минут**
→ Считать при 450 нм