

**НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ КЛАССОВ IgG, IgM И IgA К β_2 -
ГЛИКОПРОТЕИНУ I
В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ИЛИ
ПЛАЗМЕ**

ORG 521S, Anti-beta-2-Glycoprotein I Screen

Каталог. № : **ORG 521S**

Методика от **08-2012**

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.

НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

Anti-beta-2-Glycoprotein I Screen набор предназначен для полуколичественного определения антител классов IgG, IgM и IgA к β_2 -гликопротеину I методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке и плазме человека. Анализ предназначен только для диагностики *in vitro* и должен использоваться только в целях выявления повышенного риска развития тромбоза у пациентов с системной красной волчанкой (SLE) или с подобными заболеваниями.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он разработан для полуколичественного определения суммы аутоантител классов IgG, IgA и IgM к β_2 -гликопротеину I. Плашка может быть разделена на 12 стрипов по 8 ячеек каждый или может быть использована сразу 96 определений. Каждая ячейка может быть отделена от стрипа ("break-away"). В ходе анализа проходят связывание присутствующих аутоантител, образование сэндвичевого комплекса и ферментная цветная реакция в следующих фазах реакции. Контроли и предварительные 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. Раствор конъюгата анти-человеческого-IgG, анти-человеческого-IgM и анти-человеческого-IgA 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 в образце. Требуется считать оптическую плотность при 450 нм.

ОБОБЩЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Антитела к β_2 -гликопротеину I ассоциированы с заболеваниями антифосфолипидного синдрома, такими как тромбоз, тромбоцитопения или потеря плода при системной красной волчанке.

β_2 -гликопротеин I (аполипротеин Н) представляет собой β_2 -глобулин с молекулярной массой 50 килодальтон, присутствующий в плазме в количестве 200 мкг/мл. Обнаружено, что β_2 -гликопротеин I ингибирует внутренний путь образования тромбина, участвуя тем самым в регуляции свертывания крови. β_2 -гликопротеин I *in vivo* ассоциирован с отрицательно заряженными веществами - анионными фосфолипидами, гепарином и липопротеинами. Участок связывания фосфолипидов находится в пятом домене молекулы.

В последнее время выяснено, что β_2 -гликопротеин I является кофактором антикардиолипидных антител. Ряд исследований подтверждает его роль в связывании антител к кардиолипину с иммобилизованным кардиолипином. Детальное исследование природы комплекса кардиолипин- β_2 -гликопротеин I выявило, что эпитопы в пятом домене молекулы β_2 -гликопротеина I являются мишенью для "антикардиолипидных антител" - даже в отсутствие

отрицательно заряженных фосфолипидов. Таким образом, β_2 -гликопротеин I не только является необходимым компонентом для связывания антикардиолипидных антител; он сам является для них первичным антигеном.

Исследование сывороток крови пациентов с антифосфолипидным синдромом на наличие антител к кардиолипину и β_2 -гликопротеину I обнаружило высокую положительную корреляцию между этими параметрами

Аутоантитела к β_2 -гликопротеину I описаны при различных аутоиммунных заболеваниях. Их наличие может быть связано с развитием артериального и венозного тромбоза, венозной тромбоэмболии, тромбоцитопении и потери плода.

Антитела к β_2 -гликопротеину I 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 заболеваний. Титры антител к β_2 -гликопротеину I класса IgG хорошо коррелируют с клиническим состоянием пациентов с тромбозом, тромбоэмболией и повторной потерей плода, тогда как антитела класса IgM сильно ассоциированы с тромбозом и тромбоцитопенией.

Показаниями для определения антител к β_2 -гликопротеину I являются:

- ⇒ Системная красная волчанка
- ⇒ Артериальный и венозный тромбоз
- ⇒ Венозная тромбоэмболия
- ⇒ Тромбоцитопения
- ⇒ Потеря плода

СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

- Делимый микропланшет, состоящий из 12 полосок по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным человеческим β_2 -гликопротеином - 1.
- Контроли антител к β_2 -гликопротеину I IgG/IgM/IgA в фосфатно-белковой основе - 4 флакона по 1,5 мл каждый, содержащие:
 - а) Отрицательный контроль (А) - 3,3 Ед/мл
 - б) cut-off контроль (В) - 10Ед/мл
 - в) Положительный контроль (С) - 30Ед/мл
 - Сильно положительный контроль (D) - 90 Ед/мл
- Буфер для образцов, желтый **концентрат (5x)** - 1 флакон 20 мл.
- Раствор ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие-IgG-IgG, IgM-IgG и IgA-IgG антитела, меченые пероксидазой хрена - 1 флакон 15 мл.
- Раствор субстрата ТМБ - 1 флакон 15 мл. Готов к использованию.
- Стоп раствор (1M соляная кислота) - 1 флакон 15 мл. Готов к использованию.
- Промывочный раствор, **концентрат (50x)** - 1 флакон 20 мл.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование:

- Микропланшетный считыватель способен проводить измерения конечной точки при 450 нм.
- Многоканальный распределитель или многоцветная пипетка на 100 мкл.
- Вихревой миксер.
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл.
- Дистиллированная вода.
- Программное обеспечение.
- Дистиллированная или неионизированная вода.
- Градуированная колба на 100 и 1000 мл.
- Пластмассовый контейнер для хранения промывочного раствора.

СБОР ОБРАЗЦОВ, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Для определения антител к β_2 -гликопротеину I в сыворотке или плазме предпочтителен матрикс образца.

Все пробы сыворотки и плазмы должны быть разбавлены 1:100 буфером для образцов. Следовательно, 10 мкл образца могут быть разбавлены 1000 мкл буфера.

Пациентам не следует воздерживаться от приема пищи, никаких специальных приготовлений не требуется. Соберите кровь обычной венопункцией в вакуумконтейнеры и отделите сыворотку или плазму от клеток центрифугированием после образования сгустков.

Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °С по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С. Для предотвращения повторных циклов заморозки-оттаивания следует приготовить аликвоты образцов.

Ни билирубин, ни гемолиз не оказывает существенного влияния на анализ.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °С.
2. держать микролунки планшета в герметичном сухом мешке с осушителями.
3. реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
4. Не подвергать реагенты теплу, солнцу или сильному свету в течении хранения или использования.
5. Разбавленный буфер для образцов и промывочный буфер стабильны по крайней мере 30 дней если хранить при 2-8 °С.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28 °С) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Наносите все образцы на дно лунок
8. Для избежания переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
9. Для достижения наилучших результатов необходима тщательная промывка. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
10. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
11. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.
12. Не используйте повторно стрипы микропланшета.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора переназначены 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 пулы сыворотки.
3. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в их оригинальной упаковке.
4. Не смешивайте 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 сыворотки соблюдайте официальные 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 сыворотки 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. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление промывочного раствора

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

Приготовление буфера для образцов

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

Приготовление образцов

Перед анализом разбавьте все образцы пациентов 1:100 буфером для образцов. Затем в полистирольной пробирке смешайте 10 мкл образца с 990 мкл буфера для образцов. Хорошо перемешайте. Примечание: Контроли готовы к использованию и не нуждаются в разбавлении.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество модулей микропланшета для постановки контролей и предварительно разбавленных проб пациентов.

1. Внесите **100 мкл** контролей и предварительно разбавленных образцов пациентом в дубликаты во все лунки. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °С). 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 инкубируйте 5 минут при комнатной температуре. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с контрольным диапазоном 600-690 нм. Развившаяся окраска стабильна в течение **30 минут**. Считайте оптическую плотность за это время.

	1	2	3	4	5	6
A	CA	P1	P..			
B	CA	P1	P..			
C	CB	P2				
D	CB	P2				
E	CC	P3				
F	CC	P3				
G	CD	P4				
H	CD	P4				

ОЦЕНКА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм для Отрицательного контроля (A), cut-off контроля (B), Положительного контроля (C) и сильно Положительного контроля (D) 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.

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественного вычисления результатов пациентов концентрация контролей может быть использована для создания калибровочной кривой. Концентрация неизвестных показателей может быть вычислена с помощью этой калибровочной кривой.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Калибровка

Калибровка была проведена относительно признанной международным стандартом сыворотке E.N. Harris, Louisville. Эта сыворотка положительна по антителам к β_2 -гликопротеину I.

Диапазон измерения

Диапазон составляет 0- 90 Ед/мл

Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение 10 Ед/мл

Интерпретация результатов

Отрицательный: < 10 Ед / мл

Положительный: ≥ 10 Ед / мл

Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образца, чтобы продемонстрировать динамический диапазон анализа и верхний/нижний предел линейности. Активность для каждого разведения рассчитывали по калибровочной кривой с использованием 4-параметрического-Fit с линейно-логарифмической системой координат.

Sample	Dilution	Observed U/ml	Expected U/ml	O/E [%]
1	1:100	70.5	70.5	100
-	1:200	34.8	35.3	99
-	1:400	18.0	17.6	102
-	1:800	9.1	8.8	103
-	1:1600	4.5	4.4	102
2	1:100	89.2	89.2	100
-	1:200	44.9	44.6	101
-	1:400	22.1	22.3	99
-	1:800	10.9	11.2	97
-	1:1600	5.7	5.6	102

Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила: 0.5 Ед/мл.

Воспроизводимость

Внутри тестовая точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов из результатов 24 определений в один проход. 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 трассах. Результаты для выполнения к запуску точности приведены в таблице ниже.

Intra-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	9.0	9.1
2	23.1	6.4
3	52.6	4.1
4	88.5	3.9

Inter-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	9.5	5.0
2	24.2	5.2
3	51.6	2.6
4	90.1	2.5

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	n Pos	%
Primary APS	8	7	87.5
Secondary APS	65	62	95.4
Normal human sera	150	4	2.7

Clinical Diagnosis			
		Pos	Neg
ORG 521S	Pos	69	4
	Neg	4	146
		73	150
		223	

Sensitivity: 94.5 %
Specificity: 97.3 %
Overall agreement: 96.4 %

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Анти- β -2-гликопротеин I Screen ELISA может быть использован в диагностических целях. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

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



ОФИЦИАЛЬНЫЙ 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