



## Набор для определения КАРДИОЛИПИНА IgG, A, M

Cardiolipin IgG,A,M EIA KIT

**Кат. №** : 101-1490  
**Количество** : 96  
**Производитель** : DAI (USA)

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для обнаружения и качественного определения IgG, IgA и IgM антител к кардиолипину в сыворотке человека. Анализ используется для определения антител в одном образце сыворотки. Результаты используются в целях диагностики анти-фосфолипидного синдрома в пациентов с аутоиммунным заболеванием. Только для диагностики *in vitro*.

### ВВЕДЕНИЕ

В пациентов с системной эритоматозной волчанкой (SLE), антитела к кардиолипину (отрицательно заряженный фосфолипид) ассоциируется с артериальным и венозным тромбозом, тромбоцитопенией и повторяющейся потерей плода. Пациенты с анти-кардиолипиновым синдромом имеют один из вышеуказанных синдромов и имеют антитела к кардиолипину и/или положительный тест на волчаночный антикоагулянт. Присутствующие антитела к кардиолипину могут быть IgG, IgM, IgA изотипы. Тестирование к различным изотипам антител к кардиолипину используются для диагностики анти-фосфолипидного синдрома в пациентов с SLE или заболеваниями типа волчанки. Известно несколько иммуноферментных анализов и используются для определения антител к кардиолипину.

### ПРИНЦИП МЕТОДА.

Данный тест является энзимно-связанным иммуносорбентным анализом для определения IgG, IgM и IgA антител к антигенам кардиолипина. Очищенные антигены кардиолипина добавлены к твердой фазе микроячеек анализа. Разбавленная сыворотка теста добавляется в каждую ячейку. Если присутствуют антитела, которые распознают антиген, формируется комплекс антиген – антитело. После инкубации ячейки промываются для удаления несвязанного антитела. Ферментом меченные анти-человеческие IgG, IgM и IgA добавляются в каждую ячейку. Если присутствует антитело, конъюгат связывается к антиген-антитело комплексу. После инкубации ячейки промываются для удаления несвязанного конъюгата. Добавляется в каждую ячейку субстрат раствор. Если присутствует энзим, субстрат изменяет окрас. После периода инкубации, реакция

останавливается и измеряется интенсивность окраса, что приводит не прямое измерение специфического антитела в образце пациента.

### РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Планшетка** с привитым антигеном кардиолипина: 96 ячеек, поставляется с держателем стрипов и хранится в фольговом пакете с осушителем и картой индикатора влажности.
- Моющий буфер** (20x концентрат): 1 бут., 50 мл. Содержит буфер и твин 80.
- Разбавитель образца:** 1 бут., 30 мл. Содержит буфер, BSA и твин 80.
- Конъюгат:** 1бут., 15 мл. Содержит пероксидазой хрена, конъюгированные анти-человеческие IgG, IgM и IgA в буфере.
- Хромоген/Субстрат раствор:** 1бут., 15 мл. Содержит TMB.
- Стоп раствор:** 1 бут., 15 мл. Содержит раствор  $H_2SO_4$ .
- Высоко положительный контроль:** 1 фл., 0,4 мл., человеческая сыворотка, содержащая 0,1% азида натрия и 0,01% pen/strep, содержит антитела, что сильно реактивные с антигеном. Установленный диапазон указан на флаконе.
- Отрицательный контроль:** 1 фл., 0,4 мл. Человеческая сыворотка, содержащая 0,1% азида натрия и 0,01% pen/strep с антителами, что не реактивные к антигену. Установленный диапазон указан на флаконе.
- Низко положительный контроль:** 1 фл., 0,4 мл. Человеческая сыворотка, содержащая 0,1% азида натрия и 0,01% pen/strep с антителами, что слабо реактивные с антигеном. Установленный диапазон указан на флаконе.
- Калибратор:** 1 фл., 0,4 мл. Человеческая сыворотка, содержащая 0,1% азида натрия и 0,01% pen/strep с антителами, что реактивные с антигеном, используется для калибровки анализа. Специфический для набора фактор коррекции указан на флаконе.

**СЛЕДУЮЩИЕ КОМПОНЕНТЫ ЕСТЬ  
ВЗАИМОЗАМЕНЯЕМЫЕ МЕЖДУ НАБОРАМИ  
КАРДИОЛИПИНА: РАЗБАВИТЕЛЬ СЫВОРОТКИ,  
МОЮЩИЙ БУФЕР И РАСТВОР  
ХРОМОГЕН/СУБСТРАТА.**

### ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все компоненты набора при хранении их при необходимых условиях стабильны до окончания срока пригодности. Не используйте после окончания срока пригодности.
- Невыскранный микропланшет необходимо хранить при 2-8<sup>0</sup>C. Неиспользованные стрипы необходимо немедленно поместить в запечатанный пакет с осушителем и индикатором влаги и хранить при 2-8<sup>0</sup>C. Если пакет запечатан пленкой, ячейки стабильны 30 дней. Если пакет запечатан тепловой пленкой ячейки стабильны до окончания срока пригодности.
- Все другие реагенты необходимо хранить при 2-8<sup>0</sup>C в их упаковке.
- Храните 1X (разбавленный) моющий буфер при комнатной температуре (21-25<sup>0</sup>C) до 5 дней или 1 неделю при 2-8<sup>0</sup>C.

**ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ**

- Обращайтесь с реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
- Некоторые реагенты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид может реагировать со свинцом и медью и формировать взрывоопасные вещества. При попадании, промойте большим количеством воды.
- Только для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.
- Реагенты содержат консерванты, которые могут быть токсичными.
- Не пипетируйте ртом. Избегайте контакта реагентов и образцов пациентов с кожей и слизистыми.
- Избегайте контакта со стоп раствором. При попадании на кожу, промойте водой.
- Не допускайте пролива реагентов и образования аэрозолей.
- Не используйте инактивированную теплотой сыворотку.
- Не смешивайте компоненты разных лотов и изготовителей.
- Не разбавляйте и не подмешивайте реагенты.
- Не допускайте перекрестного загрязнения реагентов и образцов.
- Не используйте TMB субстрат раствор, если он принимает синий окрас.
- Многократно используемая посуда должна тщательно промываться от остатков.
- Не изменяйте температуру реагентов и инкубации выше или ниже комнатной температуры (21-25°C).
- Промывание очень важно. Недостаточно промытые ячейки дадут неверные результаты. Не допускайте высушивание ячеек между инкубацией.

**СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ**

1. Образцы следует собрать асептической венепункцией и приготовить сыворотку, используя приемлемую технику.
2. Сыворотка, содержащая видимые частицы, может центрифугироваться при низкой скорости.
3. Сыворотка может храниться до 5 дней при 2-8°C. Если анализ будет проводиться позже, храните образцы замороженными при -20 - -70°C. Избегайте многократных циклов замораживания / размораживания.
4. Не используйте гемолизированную, липемическую или загрязненную бактериями сыворотку.
5. Не нагревайте инактивированную сыворотку.

**НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

1. Бутылка для промывания, полуавтоматическое или автоматическое устройство для промывания.
2. Микропипетки, включая многоканальные, способностью точного распределения объема 10-200 мкл (КВ меньше чем 3%).
3. Градуированный цилиндр (1 л).
4. Бумажное полотенце.
5. Тестовые пробирки для разбавления сыворотки.
6. Резервуар реагента для многоканальных пипеток.
7. Наконечники для пипеток.
8. Неионизированная или дистиллированная вода (dH<sub>2</sub>O) CAP тип 1 или эквивалент.
9. Таймер с точностью измерения +/- 1 секунда.

10. Резервуар для уничтожения и дезинфекции и 0,5% гипохлорид натрия (50 мл отбеливателя в 950 мл H<sub>2</sub>O)..
11. Микропланшетный ридер с одной или двойной длиной волны при фильтре 450 нм. Если используется двойная длина волны, установите фильтр 600-650 нм. Установите линейную спецификацию ридера согласно руководству по эксплуатации.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ**

1. Все реагенты следует вынуть из рефрижератора и привести к комнатной температуре перед использованием (21-25°C). Поместите все реагенты в рефрижератор после использования.
2. Все образцы и контроли следует перемешать перед использованием.
3. Разбавьте 50 мл 20X моющего буфера тип I к 1 л дистиллированной или /и неионизированной водой. Перемешайте хорошо.

**ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

1. Определите число пациентов, что будут анализироваться. Для каждого анализа калибратор должен анализироваться в дубликате. А также отрицательный контроль, высоко положительный и низко положительный контроль, реагент бланка (RB) необходимо использовать в каждом анализе. Проверьте требования обеспечения и ридера для правильной конфигурации для контролей /калибратора.

Пример конфигурации:

1A	RB	2A	Пациент 2
1B	NC	2B	Пациент 3
1C	Cal	2C	Пациент 4
1D	Cal	2D	Пациент 5
1E	Cal	2E	Пациент 6
1F	HPC	2F	Пациент 7
1G	LPC	2G	Пациент 8
1H	Пациент 1	2H	Пациент 9

2. Разбавьте тестовую сыворотку, калибратор, контроль 1:21 (напр., 10 мкл + 200 мкл) в разбавителе сыворотки. Тщательно перемешайте.
3. В ячейки внести 100 мкл предварительно разбавленных образцов, используя многоканальную пипетку. Забирайте и вылейте каждый образец по крайней мере 3 раза для должного смешивания образцов перед внесением в реакционный планшет. Используйте чистые пипетки для каждого образца. Добавьте 100 разбавителя сыворотки в ячейку для бланка.
4. Инкубировать каждую ячейку при комнатной температуре (21-25°C) **30 минут +/- 1 минута**.
5. Промыть реакционный планшет три раза 1х моющим буфером. Вытряхните содержимое из ячеек. С помощью бутылки для промывания, автоматической или полуавтоматической системы для промывания, наполните каждую ячейку 250-300 мкл моющего буфера, осторожно, что б не было пузырей. Вытряхните моющий буфер из ячеек. Повторите промывание еще два раза. Всего до 5 промываний необходимо при использовании автоматического оборудования. После последнего промывания, удалите моющий буфер, постукиванием по бумажному полотенцу. Моющий

буфер можно собрать в резервуар и обработать 0,5% гипохлоридом натрия (отбеливатель) в конце дня.

6. Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую ячейку, включая ячейку реагента бланка.
7. Инкубируйте каждую ячейку  $30 \pm 1$  минута при комнатной температуре ( $21-25^{\circ}\text{C}$ ).
8. Повторите промывание как описано в шаге 6.
9. Добавьте 100 мкл раствора хромоген / субстрата в каждую ячейку, включая ячейку реагента бланка.
10. Инкубируйте  $15 \pm 2$  минуты при комнатной температуре ( $21-25^{\circ}\text{C}$ ).
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора, придерживаясь того же порядка, что и при добавлении хромоген / субстрата, включая ячейку реагента бланка. Легко постучите по внешней стороне планшета для смешивания всех компонентов ячеек. Подождите минимум 5 минут и считайте. Считывать можно на протяжении одного часа после добавления стоп раствора.
12. Окрас, что развился, необходимо считать ELISA планшетным ридером при 450 нм. Если используется двойная волна, установите фильтр при 600-650 нм. Измерьте оптическую плотность против реагента бланка. Планшет следует считать в течении 30 минут после завершения анализа.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Калибратор и контроли должны использоваться при каждом тесте.
2. Реагент бланка должен быть  $\leq 0,15$  ОП при 450 нм.
3. Средняя ОП для калибратора должна быть  $\geq 0,30$  при 450 нм.
4. Значение индекса для высоко положительного, низко положительного и отрицательного контроля должны быть в своих соответствующих границах, указанных на флаконах. Если значения контролей не соответствуют диапазону, тест необходимо повторить.

Если данные критерии не выполняются при повторении теста, обратитесь к производителю.

#### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Среднее значение калибратора – вычислите среднее значение для калибраторов для трех определений. Если одно из трех значений калибратора отличается более, чем на 15% от среднего, откиньте значений и вычислите среднее оставшихся двух.
2. Фактор коррекции – для вычисления между дневного колебания активности анализа согласно комнатной температуре и времени, фактор коррекции вычисляется для каждой серии набора. Фактор коррекции напечатан на флаконе калибратора.
3. Значение ОП величины исключения – значение ОП величины исключения для каждого анализа определяется умножением фактора коррекции на среднее значение калибратора, полученного в шаге 1.
4. Величина индекса – вычислите значение индекса для каждого образца делением значения ОП образца на значение ОП величины исключения, что получен в шаге 3.

Пример: ОП полученная для калибратора = 0,38,  
0,42, 0,40  
Средняя ОП для калибратора = 0,40

ОП для сыворотки пациента = 0,60

Фактор коррекции = 0,50

Значение ОП величины исключения =  
=  $0,50 * 0,40 = 0,20$

Значение индекса =  $0,60 / 0,20 = 3,00$

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

<u>Значение индекса</u>	<u>Интерпретация</u>
$\leq 0,90$	Отрицательный
0,91-1,09	Сомнительный
$\geq 1,10$	Положительный

Образцы при сомнительном результате следует повторно анализировать. Если и дальше получено сомнительный результат, анализируйте альтернативным тестом или используйте новый образец.

#### ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

1. Результаты не должны интерпретироваться как диагностические. Результаты должны использоваться в целях диагноза. Результаты должны интерпретироваться согласно клинической картине пациента в целом.
2. Сыворотка пациентов при других аутоиммунных заболеваниях (12%) и нормальных индивидов (2%) может содержать антитела к кардиолипину.
3. Много пациентов с сифилисом имеют антитела к кардиолипину.
4. Антитела к кардиолипину могут присутствовать при острой бактериальной инфекции.
5. Необходимо использовать только образцы сыворотки. Образцы сыворотки сильно липемические, гемолизированные или мутные не должны использоваться в этом тесте.
6. Анализ оценен для линейности при разбавлении до значения индекса 4,99. Сыворотка со значениями выше 4,99 должны описываться как  $>4,99$ .
7. Образцы со значением индекса в сомнительных границах необходимо повторно тестировать. Если остается сомнительным, тестируйте альтернативным методом или используйте новый образец.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

1. 2-10% очевидно здоровых индивидов могут содержать антитела к кардиолипину.
2. Приблизительно 44% пациентов с SLE имеют антитела к кардиолипину.
3. 50-75% SLE пациентов с антителами кардиолипина имеют один или несколько эпизодов тромбоза, тромбоцитопении или потери плода.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

##### Чувствительность и специфичность

DAI ELISA набор оценялся относительно коммерческого ELISA набора. В таблице 1 суммированы все данные

**Таблица 1.**  
**Чувствительность и специфичность DAI**  
**Mitochondria ELISA набор**

Альтернативный ELISA набор	DAI ELISA набор				
		Полож. ≥1,10	Сомнит. 0,91-1,09	Отриц. ≤ 0,90	Всего
	Полож ≥ 1,0	35	0	0	35
	Отриц. <0,90	2	1	128	131
	Всего	37	1	128	166

Сыворотка при сомнительном диапазоне была исключена из следующего вычисления:

Относительная чувствительность = 35/35 = 100%  
Относительная специфичность = 128/130 = 98,5%  
Относительное согласование = 163/165 = 98,8%

#### Точность

Сем разных сывороток тестировались семь раз каждая в три разные дни. Данные этого изучения представлены в таблице 2. При надлежащей технике пользователь должен получить КВ меньше, чем 20%.

Таблица 2. Данные точности

#### Анализ 1 (n=8)

Сыворотка	X	CO	КВ, %
1	2,73	0,335	12,27
2	1,99	0,238	11,96
3	1,87	0,157	8,40
4	2,38	0,272	11,43
5	1,16	0,110	9,48
6	0,09	0,024	26,67
7	0,31	0,051	16,45

#### Анализ 2 (n=8)

Сыворотка	X	CO	КВ, %
1	2,55	0,341	13,37
2	1,89	0,161	8,52
3	1,84	0,153	8,32
4	2,27	0,318	14,01
5	1,18	0,081	6,86
6	0,14	0,025	17,86
7	0,34	0,051	15,00

#### Анализ 3 (n=8)

Сыворотка	X	CO	КВ, %
1	3,17	0,418	13,19
2	2,25	0,423	18,80
3	1,94	0,216	11,13
4	2,77	0,397	14,33
5	1,29	0,117	9,07
6	0,17	0,044	25,88
7	0,39	0,070	17,95

#### Между тестовая точность (n=24)

Сыворотка	X	CO	КВ, %
1	2,81	0,441	15,69
2	2,04	0,322	15,78
3	1,88	0,175	9,31
4	2,47	0,386	15,63
5	1,21	0,116	9,59
6	0,15	0,034	22,67
7	0,35	0,065	18,57

X – средний ISR

CO – стандартное отклонение  
КВ – коэффициент вариации

#### Линейность

Значение индекса DAI Mitochondria был определен для серии двукратных разбавлений 5 положительных сывороток. Значение индекса сравнивалось с  $\log_2$  разбавления стандартной линейной регрессии.

Таблица 3.  
Линейность

Сыворотка	Чистый	1:2	1:4	1:8
1	2,45	1,55	0,71	
2	3,10	1,66	0,92	
3	4,37	2,68	1,71	0,89
4	2,37	1,15	0,54	
5	4,99	2,87	1,80	1,00
1:16	$r^2$			
	0,999			
	0,983			
	0,985			
	0,982			
0,51	0,962			

$r^2$  – коэффициент определения.

#### Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: (0342) 775 122 , факс: (0342) 775612  
e-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)