



## Набор ИФА для обнаружения и полуколичественного определения антител класса IgG к $\beta$ 2- гликопротеину 1 ( $\beta$ 2GP1)

Кат. № : 1495-11  
Количество тестов: 96  
Производитель : DAI (США)

Методика от 25-02-2011

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Анализ	Beta-2 Glycoprotein 1 IgG ELISA
Метод	Ферментно-связанный иммуносорбентный
Принцип	Непрямой ИФА, планшет, покрытый антигеном
Диапазон обнаружения	6,3-200 SGU
Образец	5 мкл
Специфичность	92%
Чувствительность	91%
Общее время	~ 90 мин.
Срок годности	12 мес.

### НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) компании "Диагностик Аутомейшн Инкорпорейтед" (ДАИ) предназначен для обнаружения и полуколичественного определения антител класса IgG к  $\beta$ 2GP1 в сыворотке или плазме человека. Результаты анализа должны использоваться как вспомогательное средство в диагностике относящихся к аутоиммунным болезням определенных тромбических нарушений, анти-фосфолипидного синдрома, системной красной волчанки (SLE) или связанных с ней нарушений.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Аутоантитела к кардиолипину (ACA) описаны при разных аутоиммунных болезнях. Наличие антител анти-кардиолипина при системной красной волчанке можно отнести к развитию тромбоцитопении. В гинекологии они считаются причиной внутриутробной смерти или повторного преждевременного прекращения беременности. Кроме того, антитела к кардиолипину были обнаружены при некоторых нетромботических неврологических расстройствах подобно цереброваскулярному недостатку, мозговой ишемии или хореи и при инфаркте миокарда. Недавние исследования показали, что для антител антикардиолипина требуется серологический кофактор 50кДа, чтобы закрепить кардиолипин, нанесенный на пластмассовые планшеты. Кофактор был идентифицирован как  $\beta$ -2 гликопротеин 1, также названный как алипопротеин Н.  $\beta$ 2GP1 известен как in vitro ингибитор коагуляции внутрисосудистой крови проводящего пути, ADP-зависимой агрегации и активности протромбиназы активированных тромбоцитов.

Стало очевидно что антитело к кардиолипину от пациентов с анти-фосфолипидным (APS) напоминает модифицированную структуру  $\beta$ 2GP1, а не кардиолипин. Нативный  $\beta$ 2GP1 или эпитоп структурно определяется и кардиолипином и  $\beta$ 2GP1.

Галли и другие и Виард и другие сообщили, что антитело к анти-кардиолипину, выработанное вследствие SLE и APS было направлено на молекулу  $\beta$ 2GP1, нанесенную на полистироловые лунки. Коике и Мацуура окончательно продемонстрировали, что  $\beta$ 2GP1 действительно является антигеном с которым связываются антитела к кардиолипину многих пациентов, и более того, показали, что фосфолипид служит только для связи  $\beta$ 2GP1 с твердой фазой.

Аутоантитела  $\beta$ 2GP1 обнаруживаются в иммуноглобулине классов IgG, IgM и IgA. Определение IgM антител – ценный указатель в диагностике начала аутоиммунной болезни, принимая во внимание, что IgG и-или IgA антитела будут обнаружены в последующих стадиях проявленных аутоиммунных нарушений. IgA антитела часто ассоциируются с IgG антителами. Считается, что определение IgA антител имеет большую обоснованность при тромбозе и потере плода. Признаки для определения анти-  $\beta$ 2GP1 антител: SLE, тромбоз, тромбоцитопения, мозговая ишемия, хорея, эпилепсия,

преждевременное прекращение беременности и внутриматочная смерть.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенные антигены  $\beta$ 2GP1 нанесены на поверхность микролунок. В лунки добавляются разбавленные сыворотка или плазма пациента и калибраторы. Присутствующие специфические антитела  $\beta$ 2GP1 связываются с антигенами. При промывке удаляются все несвязанные материалы. После добавления ферментного конъюгата он связывается комплексом антитело-антиген. Избыток ферментного конъюгата удаляется и добавляется хромогенный субстрат ТМВ. Каталитическая реакция ферментного конъюгата останавливается в определенное время. Интенсивность развившегося цвета прямо пропорциональна количеству IgG специфических антител в образце. Результаты считываются микролуночным считывателем и параллельно сравниваются с калибраторами.

### ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °C.
2. Храните микролуночки в хорошо запечатанном пакете с осушителем. Рекомендуются до 4 недель использовать все лунки после первого вскрытия мешочка.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не подвергайте реагенты набора воздействию тепла, солнца или сильного света во время хранения или использования.

### СБОР И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Соберите образцы крови и отделите сыворотку.
2. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C до 7 дней. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов сыворотки.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшет: состоящий из лунок, покрытых антигеном  $\beta$ 2GP1. 12 x 8 лунок.
2. Разбавитель образца: раствор желтого цвета, 50 мл бутылка.
3. Промывочный концентрат 20x, 50 мл бутылка.
4. Хромогенный субстрат ТМВ, янтарная бутылка, 12 мл бутылка.
5. Ферментный конъюгат, раствор красного цвета, 12 мл бутылка.
6. Набор калибраторов (предварительно разбавленные 1:101): 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200 SGU, 1,0 мл флакон.
7. Набор контролей (предварительно разбавленные 1:101): Отрицательный и положительный контроли. Диапазоны указаны на каждой этикетке, 1,0 мл флакон.
8. Стоп-раствор: 1,5 N соляная/серная кислота, 12 мл бутылка.

### ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. **Потенциальные биологические опасные материалы:** Калибраторы и контроли 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 мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
2. Не пипетируйте ртом. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.
3. Компоненты набора предназначены для использования как единое целое. Не смешивайте компоненты разных партий.
4. Некоторые компоненты набора содержат азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ) в качестве консерванта. Он способен образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с медью или свинцом. При выбрасывании смойте большим количеством воды.
5. Для предотвращения травм и химических ожогов, избегайте контакта ТМВ, стоп-раствора, ферментного конъюгата с кожей и глазами, а также не вдыхайте и не глотайте их.

### ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Приготовьте 1x промывочного буфера. Приготовьте промывочный буфер добавлением дистиллированной или неионизированной воды к 10x промывочному концентрату, чтобы получить в конце объем в 1 л.
2. Приведите все образцы и реагенты набора к комнатной температуре (20-25°C) и легко перемешайте.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Разбавление образца 1:101 100 / 100 / 100  
30 / 30 / 30 КТ

1. Поместите в держатель достаточное количество покрытых полосок.

**Предварительно промойте** покрытые лунки – повторите промывку 3 раза промывочным буфером.

2. Проведите разведение анализируемых образцов 1:101 путем добавления 5 мкл образца к 500 мкл разбавителя образца. Хорошо перемешайте.

**Не разбавляйте 1:101 предварительно разбавленные калибраторы и контроли.**

3. Распределите 100 мкл разбавленных сывороток и предварительно разбавленных калибраторов и контролей в соответствующие лунки. Постучите по держателю, чтобы удалить воздушные пузырьки из жидкости и хорошо перемешайте. Инкубируйте в течении 30 минут при комнатной температуре.

4. Удалите жидкость из всех лунок. Повторите промывку 3 раза используя промывочный буфер.

5. Распределите 100 мкл ферментного конъюгата к каждую лунку и инкубируйте в течении 30 минут при комнатной температуре.

6. Удалите ферментный конъюгат из всех лунок. Повторите промывку 3 раза используя промывочный буфер.

7. Распределите 100 мкл хромогенного субстрата ТМВ в каждую лунку и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.

8. Для остановки реакции добавьте 100 мкл стоп-раствора.

**Перед считыванием удостоверитесь, что в каждой лунке нет воздушных пузырьков.**

9. Считайте оптическую плотность микролуночным считывателем при 450 нм.

### РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Создать калибровочную кривую, составляя график ОП 450 нм на оси Y против значений концентраций калибраторов SGU на оси X на клетчатой или линейно-логарифмической бумаге.

2. Используя значения ОП каждого образца, определите концентрацию из калибровочной кривой.

3. Типичный пример:

Набор калибраторов	$\beta_2$ GP1 IgG (SGU)	ОП 450 нм		ОП 450 нм средн.	СО	КВ %
		0.138	0.130			
К-тор 1	6.3	0.138	0.130	0.134	0.006	4.222
К-тор 2	12.5	0.275	0.259	0.267	0.011	4.237
К-тор 3	25	0.443	0.485	0.464	0.030	6.401
К-тор 4	50	0.949	0.926	0.938	0.016	1.735
К-тор 5	100	1.565	1.559	1.562	0.004	0.272
К-тор 6	200	2.102	2.016	2.059	0.061	2.953

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Отрицательный контроль и положительный контроль должны проводиться с каждой партией анализируемых образцов и концентрации должны быть в пределах диапазона, указанного на этикетке.

2. Значение ОП 0 калибратора SGU должно быть ниже 0.150 и значение ОП 200 калибратора SGU должно быть более 0.750.

**Из образцов человеческой сыворотки можно приготовить дополнительные контроли и хранить при -20° С.**

### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормы, основанный на своих собственных методах, контролях, оборудовании и населении согласно своим собственным установленным процедур. Рекомендуется следующий диапазон:

Отрицательный: < 20 SGU

Низко положительный: 20 ~ 40 SGU

Умеренно положительный: 40 ~ 70 SGU

Высоко положительный: > 70 SGU

Положительный результат позволяет полагать о определенной тромболитическом нарушении аутоиммунного происхождения. Отрицательный результат указывает на отсутствие  $\beta_2$ GP1 IgG антител или уровней ниже предела чувствительности анализа.

### ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Диагноз не может быть сделан на основании только одних результатов  $\beta_2$ GP1. Эти результаты должны использоваться в сочетании с информацией клинической оценки и другой диагностической процедуры.

2. Клиническое значение  $\beta_2$ GP1 антител в болезнях, отличающихся от SLE - в настоящее время исследуются.

3. При обнаружении отрицательных анти- $\beta_2$ GP1 титров в присутствии клинических показаний, проводится анализ на антикоагулянт волчанки, анти-кардиолипин или другой дополнительный анализ.

4. Следует ожидать, что некоторые образцы могут быть анти-кардиолипин положительными. При том что анти-  $\beta_2$ GP1 отрицательный. Анти- $\beta_2$ GP1 анализ - более определенный маркер тромботического риска. Анализ на антикардиолипин может привести к ошибочно положительным результатам вследствие перекрестной реактивности двоспиральной ДНК или некоторыми антителами инфекционных болезней.

### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### Чувствительность:

Нижний предел чувствительности для  $\beta_2$ GP1 IgG антител был определен при 1 SGU, который соответствует ОП, то есть двум стандартным отклонениям от средней ОП в 20 определениях нулевой концентрации анти- $\beta_2$ GP1 IgG антител.

#### Параллелизм:

В эксперименте на разбавления разбавлялись и анализировались сыворотки с тремя различными концентрациями IgG:

Образец	Разбавление	Полученное (SGU)	Ожидаемое (SGU)	%, Восстановление
1	1:100	80		
	1:200	36	40	90
	1:400	17	20	85
	1:800	8.5	10	85
2	1:100	120		
	1:200	50	60	83
	1:400	27	30	90
	1:800	12	15	80
3	1:100	206		
	1:200	130	103	126
	1:400	60	52	115
	1:800	27	26	103

**Относительная чувствительность, специфичность и соответствие:**

#### Сравнение с контрольным $\beta_2$ GP1 IgG набором

С помощью ДАИ ELISA набора  $\beta_2$ GP1 IgG (X значения) и референтного ELISA набора (1) (Y значения) было проанализировано 75 образцов  $\beta_2$ GP1 IgG. Уравнение корреляции составляет:

$$Y = 1.0327 X + 1.0057 R^2 = 0.9815 \text{ (к-во} = 75)$$

	Референтный ELISA набор (1)			
	N	P	Общее	
ДАИ ELISA набор $\beta_2$ GP1 IgG	N	49 (D)	2 (B)	51
	P	4 (C)	20 (A)	24
	Общее	53	22	75

**Относительная чувствительность =  $A / (A+B) = 20 / (20 + 2) = 91 \%$**

**Относительная специфичность =  $D / (C+D) = 49 / (4 + 49) = 92 \%$**

**Совпадение =  $(A+D) / (A+B+C+D) = (20 + 49) / (20 + 2 + 4 + 49) = 69 / 75 = 92 \%$ .**

Из 4 образцов, проанализированных референтным ELISA набором (1) на отрицательный результат и ДАИ ELISA набором на положительный результат, все 4 образца продемонстрировали положительные результаты во втором референтном ELISA анализе (2).

#### Сравнение с референтным $\beta_2$ GP1 IgG набором

С помощью ДАИ ELISA набора  $\beta_2$ GP1 IgG (X значения) и референтного набора на кардиолипин (2) (Y значения) было проанализировано 77 образцов. Уравнение корреляции составляет:

$$Y = 1.092 X + 3.43339 \quad R^2 = 0.7954 \quad (\text{к-во} = 77)$$

	Референтный ELISA набор (1)			
	N	P	Общее	
ДАИ ELISA набор $\beta_2$ GP1 IgG	N	24 (D)	27 (B)	51
	P	2 (C)	24 (A)	26
	Общее	26	51	77

Относительная чувствительность =  $A / (A+B) = 24 / (24 + 27) = 47\%$

Относительная специфичность =  $D / (C+D) = 24 / (2 + 24) = 92\%$

Совпадение =  $(A+D) / (A+B+C+D) = (24 + 24) / 77 = 62\%$ .

Относительная чувствительность  $\beta_2$ GP1 IgG оказывается более низкой по сравнению с IgG анти-кардиолипином. Она ожидается, потому что кардиолипин как антиген определяет антитела к  $\beta_2$ GP1 IgG, фосфолипиду, а также к инфекционным антигенам, (большинство их оказались положительными к сифилису).

**Ожидаемое значение:**

145 образцов сыворотки, полученные от здоровых, бессимптомных доноров были проверены анализом ДАИ- $\beta_2$  GP1 IgG. Среднее SGU = 4, CO = 3.

**Точность:**

Статистические данные для КВ, среднего и CO были рассчитаны для каждого из трех образцов из результатов 8 определений в пределах одной процедуры. Точность между процедурами была рассчитана из результата 8 определений в 8 разных процедурах.

Внутри процедуры	К-во	Среднее (SGU)	CO	%, КВ
Сыворотка А	8	16,3	1,17	7,17
Сыворотка В	8	33,8	1,25	3,68
Сыворотка С	8	67,1	4,55	6,78
Между процедурами	К-во	Среднее (SGU)	CO	%, КВ
Сыворотка А	8	16,5	1,39	7,94
Сыворотка В	8	35,9	2,17	6,04
Сыворотка С	8	69,4	2,83	4,07

**ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ И ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ**

Анализ ДАИ  $\beta_2$ GP1 IgG не вступает в перекрестную реакцию со следующими IgG положительными образцами, проверенными на: токсоплазмоз, краснуху, ЦМВ, ВПГ, Chlamydia trachomatis, тропическую лихорадку, паротит, корь, вирус Варицелла-Зостер, вирус Эпштейна-Барра, Н. pylori, РФ и анти-ядерные антитела.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Тел/факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)