



**Набор ИФА
для обнаружения и полуколичественного
определения антител класса IgM к β -
гликопротеину 1 (β 2GP1)**

Кат. № : 1496-11
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 IgM
Метод	Ферментно-связанный иммуносорбентный
Принцип	Непрямой ИФА, планшет, покрытый антигеном
Диапазон обнаружения	3,13-100 SMU
Образец	5 мкл
Специфичность	85,4%
Чувствительность	92,6%
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 IgM к β 2GP1 в сыворотке или плазме человека. Результаты анализа должны использоваться как средство диагностики 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 β -2 гликопротеин 1, также названный как алипопротеин Н. β 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 β 2GP1, а не кардиолипин. Нативный β 2GP1 или эпитоп структурно определяется и кардиолипином и β 2GP1.

Галли и другие и Виард и другие сообщили, что антитело к анти-кардиолипину, выработанное вследствие SLE и APS было направлено на молекулу β 2GP1, нанесенную на полистироловые лунки. Коике и Мацуура окончательно продемонстрировали, что β 2GP1 действительно является антигеном с которым связываются антитела к кардиолипину многих пациентов, и более того, показали, что фосфолипид служит только для связи β 2GP1 с твердой фазой. Аутоантитела β 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- β 2GP1 антител: SLE, тромбоз, тромбоцитопения, мозговая ишемия, хорея, эпилепсия, преждевременное прекращение беременности и внутриматочная смерть.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенные антигены β 2GP1 нанесены на поверхность микролунок. В лунки добавляются разбавленные сыворотка или плазма пациента и калибраторы. Присутствующие специфические антитела β 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 IgM специфических антител в образце. Результаты считываются микролуночным считывателем и параллельно сравнивается с калибраторами.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °С.
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 °С до 7 дней. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°С. Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшет: состоящий из лунок, покрытых антигеном β 2GP1. 12 x 8 лунок.
2. Абсорбентный раствор: черная крышка, 60 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. 100 SMU, 160 мкл флакон.
7. Набор контролей: Отрицательный и положительный контроли. Диапазоны указаны на каждой этикетке, 160 мкл 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 (NaN_3) в качестве консерванта. Он способен образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с медью или свинцом. При использовании реагентов, содержащих азид натрия необходимо наличие большого количества воды. Азид натрия может быть токсичен при попадании внутрь организма. В концентрациях, присутствующих в реагентах, он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, мы настоятельно рекомендуем следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами.
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 20x промывочному концентрату, чтобы получить в конце объем в 1 л.
2. Приведите все образцы и реагенты набора к комнатной температуре (20-25°С) и легко перемешайте.
3. Подготовка калибровочной кривой. Рекомендуются использовать набор калибраторов в течении 24 часов. Для калибратора А (100

SMU) добавить 10 мкл основы калибратора к 1 мл раствора абсорбента. Приготовьте калибраторы В, С, D, Е и F путем последовательного разбавления 500 мкл калибратора А равным объемом раствора абсорбента.

Калибратор	Добавить	к абсорбентному раствору	SMU
А	Исходный калибратор	10 мкл 1000 µl	100
В	Калибратор А	500	50
С	Калибратор В	500	25
Д	Калибратор С	500	12.5
Е	Калибратор D	500	6.25
Ф	Калибратор Е	500	3.13

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите в держатель достаточное количество покрытых полосок.

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

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

3. Распределите 100 мкл разбавленных сывороток и набора калибраторов и контролей в соответствующие лунки. Постучите по держателе, 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. Удалить 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 SMU. Значения 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	β ₂ GP1 IgM (SMU)	ОП 450 нм		СО	КВ %
К-тор F	3.13	0.060	0.073	0.067	13.823
К-тор E	6.25	0.135	0.135	0.000	0.000
К-тор D	12.5	0.255	0.254	0.001	0.278
К-тор C	25	0.494	0.496	0.001	0.286
К-тор B	50	0.961	0.931	0.021	2.242
К-тор A	100	1.700	1.606	0.066	4.021

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 бланка (раствора абсорбента) должна быть ниже 0.150 и значение ОП 100 калибратора SMU 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 процедурам. Рекомендуется следующий диапазон:

Отрицательный: < 15 SMU

Низко положительный: 15 ~ 30 SMU

Умеренно положительный: 30 ~ 70 SMU

Высоко положительный: > 70 SMU

Положительный результат позволяет полагать о определенной тромболитическом нарушении аутоиммунного происхождения. Отрицательный результат указывает на отсутствие β₂GP1 IgM антител или уровней ниже предела чувствительности анализа.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Диагноз не может быть сделан на основании только одних результатов β₂GP1. Эти результаты должны использоваться в сочетании с информацией клинической оценки и другой диагностической процедуры.

2. При выком титре анти-β₂GP1 IgG в присутствии высокого титра РФ IgM в определенном образце, существует вероятность получения ошибочного IgM результата.

3. Клиническое значение β₂GP1 антител в болезнях, отличающихся от SLE в настоящее время исследуются.

4. При обнаружении отрицательных анти-β₂GP1 титров в присутствии клинических показаний, проводится анализ на антикоагулянт волчанки, анти-кардиолипин или другой дополнительный анализ.

5. Следует ожидать, что некоторые образцы могут быть анти-кардиолипин положительными, при том что анти-β₂GP1 отрицательным. Анти-β₂GP1 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, специфичность и точность:

С помощью данного анализа (X значения) и референтного ELISA набора (Y значения) было проанализировано 75 образцов 2GP1. Уравнение корреляции составляет:

$$Y = 0.6327 X + 13.242 \quad R^2 = 0.9056 \text{ (к-во} = 75)$$

Среди 19 образцов, анализируемых референтным ELISA набором (1) как положительные и ДАИ ELISA набором как отрицательные, 12 образцов анализировались как отрицательные вторым референтным ELISA набором (2). Среди 5 образцов, анализируемых референтным ELISA набором (1) как отрицательные и ДАИ ELISA набором как положительные, 3 образца анализировались как положительные вторым референтным ELISA набором (2).

После согласования в итоге получены результаты:

		Референтный ELISA набор		
		N	P	Общее
ДАИ ELISA β ₂ GP1 IgM	N	25 (D)	7 (B)	32
	P	2 (C)	41 (A)	43
	B	27	48	75

Чувствительность = A / (A+B) = 41 (39 + 7) = 85,4 %.

Специфичность = D / (C+D) = 25 (2+ 25) = 92,6 %.

Точность = (A+D) / (A+B+C+D) = (41 + 25) / (41 + 7 + 2 + 25) = 66 / 75 = 88 %.

Точность:

Статистические данные по КВ, среднего значения и СО 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.

В процедуре	К-во	Среднее (SMU)	СО	%, КВ
Сыворотка А	8	23,38	1,30	5,57
Сыворотка В	8	40,25	1,98	4,92
Сыворотка С	8	80,38	0,74	0,93
Между процедурами	К-во	Среднее (SMU)	СО	%, КВ
Сыворотка А	8	22,50	1,52	6,75
Сыворотка В	8	41,32	2,13	5,15

Сыворотка С	8	81,63	1,25	1,50
-------------	---	-------	------	------

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ И ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

1. Высокий титр анти-β₂GP1 IgG и IgA не уменьшает чувствительность анализа к анти- β₂GP1 IgM.
2. При выком титре анти- β₂GP1 IgG в присутствии высокого титра РФ IgM в определенном образце, существует вероятность получения ошибочного положительного результата.
3. Анализ ДАИ β₂GP1 IgM не вступает в перекрестную реакцию со следующими IgM положительными образцами, проверенными на: токсоплазмоз, краснуху, ЦМВ, Chlamydia trachomatis, тропическую лихорадку, паротит, корь, вирус Эпштейна-Барра. Н. Pylori и РФ.

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
www.diameb.ua