

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ТА ЯКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ IgG ТА/АБО IgM АНТИТІЛ ПРОТИ ПРОТРОМБІНУ

### 3229, Aeskulisa Prothrombin-GM

Каталог. №: 3229

Методика від 28-08-2007

Кількість : 96

Версія 002

Виробник : AESKU. Diagnostics,  
(Німеччина)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

#### 1 Призначення

**AESKULISA Prothrombin-GM** є твердофазним імуноферментним аналізом з використанням нативного людського протромбіну (Фактор II) для кількісного та якісного виявлення IgG та/або IgM антитіл проти протромбіну в сироватці крові людини.

Аналіз є допомогою в діагностиці антифосфоліпідного синдрому APS.

#### 2. Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

##### Принцип тесту

Зразки сироватки, розбавлені 1:101, інкубують в Мікропланшетах з внесенням конкретного антигена. Антитіла пацієнта, якщо вони присутні в зразку, зв'язуються з антигеном. Незв'язана фракція вимивається на наступній стадії. Потім анти-людські імуноглобуліни, кон'юговані з Пероксидазою хрому (кон'югат), інкубують і відбувається реакція з комплексом антиген-антитіло в зразках в Мікропланшетах. Незв'язаний кон'югат вимивається на наступній стадії. Додавання ТМВ субстрату генерує ферментативну колориметричну (синій колір) реакцію, яка зупиняється розведеною кислотою (колір змінюється на жовтий). Швидкість утворення кольору від хромогену є функцією кількості кон'югату, пов'язаного з комплексом антиген-антитіло, і вона пропорційна початковій концентрації відповідних антитіл у зразку пацієнта.

#### 3. Комплект поставки

##### Мають бути відновлені:

5x Буфер для зразків	1 флакон, 20 мл - 5x концентрований (білий ковпачок: жовтий розчин) Містить: Тріс, NaCl, BSA, азид натрію <0,1% (консервант)
50x Промивний буфер	1 флакон, 20 мл - 50x концентрований (білий ковпачок: зелений розчин) Містить: Тріс, NaCl, Твін 20, азид натрію <0,1% (консервант)

##### Готові до використання:

Негативний Контроль	1 флакон, 1,5 мл (зелений ковпачок: безколірний розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Позитивний Контроль	1 флакон, 1,5 мл (червоний ковпачок: жовтий розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Калібратор Cut-off	1 флакон, 1,5 мл (синій ковпачок: жовтий розчин) Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію <0,1% (консервант)
Калібратори	6 флаконів, 1,5 мл кожен 0, 3, 10, 30, 100, 300 Од/мл (інтенсивність кольору підвищується з концентрацією: розчини жовтого кольору). Людська сироватка (розведена), азид натрію < 0.1% (консервант)
Кон'югати	1 флакон, 15 мл IgG (синій ковпачок: синій розчин) 1 флакон, 15 мл IgM (зелений ковпачок: зелений розчин) Містить: Анти-імуноглобуліни людини, кон'юговані з пероксидазою хрому
Субстрат ТМВ	1 флакон, 15 мл (чорний ковпачок)

Стоп Розчин

Містить: стабілізований ТМВ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

1 флакон, 15 мл (білий ковпачок: безбарвний розчин)

Містить: 1 М соляної кислоти

Мікропланшет

12 x 8-лункових смужок, які відокремлюються  
Покриття див. пункт 1

#### Необхідні матеріали, що не постачаються:

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Сляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, піпетки прецизійні (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) або регульована мультипіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір.

Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопії США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопії (Eur. Ph. 4-е вид).

#### 4. Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і Мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини стабільні протягом 1 місяця при температурі 4 °C, як мінімум. **Реагенти і Мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на ТМВ розчин. Зберігайте Мікропланшети в призначений для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте.**

#### 5. Заходи безпеки використання

##### 5.1 Небезпека для здоров'я

**Цей продукт призначений тільки ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO.** Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормального використання, притримуйтесь наступних заходів для максимальної безпеки:

##### Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички.

**УВАГА!** Калібратори, Контролі та Буфери містять азид натрію (NaN<sub>3</sub>) як консервант. NaN<sub>3</sub> може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN<sub>3</sub> може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні, змити з великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів. Будь ласка, зверніться до процедур дезактивації, як це викладено CDC або до інших місцевих/національних керівних принципів.

Не паліть, не їжте і не пийте при роботі з набором.

Не піпетувати ротом.

Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад) був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог.

##### 5.2 Загальні зауваження щодо використання

Не змішуйте і не замінюйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-32 °C/68-89.6 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

**Інкубація: Ми рекомендуємо проводити тест при 30 °C/86 °F для автоматизованих систем.**

Ніколи не надавайте компоненти більш високій температурі, ніж 37 °C/98.6 °F.

Завжди проводити піпетування розчину субстрату тільки з новими наконечниками. Захищати цей реагент від світла. Ніколи не піпетувати кон'югат з наконечниками, які використовувались з іншими реагентами до цього.

**Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах тільки проведеного тесту, але має бути зроблений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень. Діагноз повинен бути перевіреним з використанням різних методів діагностики.**

##### 6. Відбір проб, Використання та зберігання

Використовуйте переважно зібрані нещодавно зразки сироватки. Забір крові повинен проводитись відповідно до державних вимог.

Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Сироватка з частками повинна бути очищена центрифугуванням з низькою швидкістю (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати відразу, зберігати щільно закритими при температурі 2-8 °C/35-46 °F до трьох днів і замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

## 7. Процедура аналізу

### 7.1 Підготовчі заходи перед піпетуванням

Розвести концентровані реагенти:

Розвести концентрований буфер для взірців 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

### Зразки:

Розвести зразки сироватки 1:101 буфером для зразка (1x)

Наприклад, 1000 мкл буфера для зразків (1x) + 10 мкл сироватки. Добре перемішати!

### Промивання:

Підготувати 20 мл розведеного промивного буфера (1x) на 8 лунок або 200 мл на 96 лунок

Наприклад, 4 мл концентрату плюс 196 мл дистильованої води.

### Автоматизоване промивання:

Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

### Ручне промивання:

Видалити рідини з лунок перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожен лунку, почекати 20 секунд. Повторити всю процедуру ще два рази.

### Мікропланшети:

Розрахуйте кількість лунок, необхідних для випробування. Видалити зайві лунки з рами, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, (2-8 °C/35-46 °F).

## 7.2 Проведення тестування

**Схема піпетування:** див. Додаток А, процедура випробування: див. Додаток В  
Ми рекомендуємо піпетування зразків і калібраторів у двох примірниках.  
Калібратор Cut-off використовувати тільки для якісного аналізу.

**ПРИМІТКА:** Якщо IgG і IgM визначаються паралельно, калібратори, контролі і зразки аналізувати по два рази, для кожного підкласу окремо.

- Внесіть 100 мкл розведеної сироватки кожного пацієнта в призначені лунки.
- Внесіть 100 мкл калібраторів або Cut-off калібратора і Негативного і Позитивного контролю в призначені лунки.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл кон'югату в кожен лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.
- Вимийте 3x з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).
- Внесіть 100 мкл ТМБ субстрат в кожен лунку.
- Витримайте протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F, захищеному від інтенсивного світла.
- Внесіть 100 мкл стоп розчину в кожен лунку, використовуючи той же порядок, як при піпетуванні субстрату.
- Інкубуйте 5 хвилин мінімум.
- Агітувати пластину ретельно протягом 5 сек.
- Зчитати абсорбцію при 450 нм (опційно 450/620 нм) протягом 30 хвилин.

## 8. Кількісна і Якісна Інтерпретація

Для **кількісної інтерпретації** побудувати стандартну криву, відклавши **оптичну щільність (OD) кожного калібратора (вісь У)** по відношенню до відповідних значень концентрації в **Од/мл (вісь Х)**. Для досягнення найкращих результатів ми рекомендуємо використання log/lin координат та 4-Параметрове налаштування. З OD кожного зразка зчитати відповідні концентрації антитіл, виражені в **Од/мл**.

Нормальний діапазон	Сумнівний діапазон	Позитивні результати
< 12 Од/мл	12-18 Од/мл	> 18 Од/мл

## Приклад стандартної кривої

Ми рекомендуємо паралельне піпетування калібраторів для кожного аналізу.

Калібратори IgG	OD 450/620 нм	CV % (Варіація)
0 Од/мл	0.014	2.9
3 Од/мл	0.138	1.0
10 Од/мл	0.283	1.5
30 Од/мл	0.620	2.3
100 Од/мл	1.314	0.9
300 Од/мл	2.070	1.2

## Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат (Од/мл)
P 01	0.547/0.555	0.551	24.3
P 02	1.638/1.641	1.640	167.4

Дані, характерні для конкретного лоту, знаходяться в листі контролю якості. Медичні лабораторії можуть проводити свій Контроль Якості використовуючи власні контролі і/або внутрішній пул сироваток, як це передбачено нормами ЄС.

**Не використовувати цей приклад для інтерпретації результатів пацієнтів!**

Кожна лабораторія повинна встановити свої межі нормальних значень, ґрунтуючись на власних методах, контролях, обладнанні і популяції пацієнтів у відповідності зі своїми встановленими процедурами.

Для **якісної інтерпретації** зчитати оптичну щільність Cut-off калібратора і зразків пацієнтів. Порівняти OD пацієнта з OD Cut-off калібратора. Для якісної інтерпретації ми рекомендуємо розглядати сироватки в діапазоні 20% навколо порогового значення, як двозначні. Всі зразки з більш високим OD вважаються позитивними, зразки з більш низькими OD вважаються негативними.

### Негативний:

OD пацієнта < 0.8 x OD Cut-off

### Сумнівний:

0.8 x OD Cut-off ≤ OD пацієнта ≤ 1.2 x OD Cut-off

### Позитивний:

OD пацієнта > 1.2 x OD Cut-off

## 9. Технічні дані

### Матеріал зразка:

сироватка

### Об'єм зразка:

10 мкл зразка, розведеного 1:101 в 1x буфері для зразків

### Загальний час інкубації:

90 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F

### Діапазон калібрування:

0-300 Од/мл

### Аналітична чутливість:

1.0 Од/мл

### Зберігання:

при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони

### Кількість визначень:

96 тестів

## 10. Дані продуктивності

### 10.1 Аналітична Чутливість

Тестування буфера для зразків 30 разів на *Prothrombin-GM* дало аналітичну чутливість 1.0 Од/мл.

### 10.2 Специфічність і чутливість

Мікропланшет покритий **нативним людським протромбіном**. Перехресної реактивності з іншими аутоантигенами не спостерігалось. До 50% вагітних жінок з АФС страждають від втрати плоду. *AESKULISA Протромбін* визначає 84% з них.

### 10.3 Лінійність

Обрані сироватки тестувались з цим набором і було встановлено лінійність розведення. Тим не менше, через неоднорідність характеру людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підлягають цьому правилу.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація (Од/мл)	Очікувана концентрація (Од/мл)	Відновлення (%)
1	1/100	239.0	244.0	98.0
	1/200	120.0	122.0	98.4
	1/400	59.0	61.0	96.7
	1/800	29.4	30.5	96.4
2	1/100	172.0	178.0	96.6
	1/200	85.0	89.0	95.6
	1/400	42.0	44.5	94.3

	1/800	20.3	22.3	91.0
--	-------	------	------	------

#### 10.4 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на трьох відібраних зразках сироватки, щоб представити діапазон в порівнянні зі стандартною кривою.

Intra-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	256.0	1.2
2	138.0	3.4
3	64.0	3.3

Inter-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	239.0	1.4
2	155.0	3.3
3	58.0	3.2

#### 10.5 Калібрування

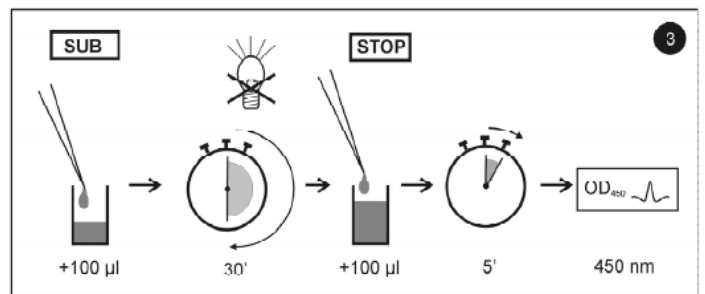
Через відсутність міжнародного еталонного калібрування цей аналіз відкалібрований в Од/мл.

#### ДОДАТОК А: Схема піпетування

Ми пропонуємо піпетування калібраторів, контролів і зразків наступним чином:

Для кількісної інтерпретації використовувати калібратори, щоб побудувати стандартну криву.

Для якісної інтерпретації використовувати Cut-off калібратор.



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

	for quantitative interpretation use calibrators to establish a standard curve						for qualitative interpretation use cut-off calibrator					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CalA	CalE	P1				NC	P2				
B	CalA	CalE	P1				NC	P2				
C	CalB	CalF	P2				CC	P3				
D	CalB	CalF	P2				CC	P3				
E	CalC	PC	P3				PC	...				
F	CalC	PC	P3				PC	...				
G	CalD	NC	...				P1	...				
H	CalD	NC	...				P1	...				

CalA: калібратор А, CalB: калібратор В, CalC: калібратор С, CalD: калібратор D, CalE: калібратор Е, CalF: калібратор F

PC: Позитивний контроль

NC: негативний контроль

CC: Калібратор Cut-off

P1: пацієнт 1

P2: пацієнт 2

P3: пацієнт 3

#### Додаток В: Процедура випробування

