



ИФА

для количественного определения антител к кардиолипину, фосфатидил серину, фосфатидил инозитолу и фосфатидиловой кислоте (IgG и/или IgM)

Каталог. № : EIA-3591
 Количество : 96
 Производитель: DRG (Германия)

Методика от 10-2009
 Версия 4.0

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

1. НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор является количественным ИФА для скрининга антител класса IgG и/или IgM к кардиолипину, фосфатидил серину, фосфатидил инозитолу, фосфатидиловой кислоте и β 2-гликопротеину I в в сыворотке или плазме как средство диагностики увеличения риска тромбоза в пациентов с системной красной волчанкой или аналогичными расстройствами.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный набор (IgG/IgM) представляет собой иммуносорбентный анализ с ферментной меткой (ELISA). Он предназначен для количественного определения IgG или IgM аутоантител к фосфолипидам.

Микротитровальная панель покрыта отрицательно заряженными фосфолипидами: кардиолипин, фосфатидил серин, фосфатидил инозитол и фосфатидиловая кислота. Антифосфолипидные антитела требуют участия β 2-гликопротеина I в качестве вспомогательного фактора для связывания, поэтому планшета покрыта им. Планшет делится на 12 модулей из 8 лунок каждый или может использоваться полностью на 96 лунок.

Каждая лунка может быть отделена от модуля.

Связывание антител, формирование комплекса «сэндвич» и ферментная цветовая реакция проходят три фазы:

Фаза 1: Калибраторы, контроли и предварительно разведенные образцы пациентов пипетируются в лунки. Антитела связываются на внутренней поверхности лунки. После 30 минут инкубации планшета промывается буфером для удаления неактивных компонентов сыворотки.

Фаза 2: Анти-человеческий-IgG (или анти-человеческий-IgM) раствор конъюгата пероксидазы хрена пипетируется в лунки для распознавания IgG аутоантител (или IgM аутоантител), связанных с иммобилизованными антигенами. После 15 минут инкубации лишний конъюгат, который не связался, вымывается буфером.

Фаза 3: Хромогенный субстрат-раствор, содержащий ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) раскапывается в лунки. Во время 15 минут инкубации цвет раствора меняется на голубой. Развитие цвета останавливается добавлением 1 М соляной кислоты в качестве стоп-раствора. Цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность цвета прямо пропорциональна концентрации IgG или IgM антител в данном образце соответственно.

Для считывания оптической плотности используется спектрофотометр с фильтром 450 нм.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики in vitro.

Необходимо строго придерживаться этапов и порядка пипетирования, приведенных в данной инструкции. Рекомендуется проведение контроля качества.

Все реагенты хранить при 2 - 8 °C в оригинальной упаковке.

Не использовать реагенты из наборов с разными номерами лотов. Не использовать компоненты набора после даты срока годности, указанной на упаковке и флаконах.

Перед использованием довести компоненты до комнатной температуры и аккуратно смешать.

При обращении с компонентами набора необходимо принимать следующие меры предосторожности:

- запрещается есть, пить и курить в помещениях, где находятся реагенты и образцы
- не пипетировать реагенты ртом
- использовать одноразовые перчатки, после проведения анализа тщательно мыть руки.

Компоненты набора, содержащие продукты человеческого происхождения были протестированы и признаны не содержащими поверхностный антиген гепатита В и антитела ВИЧ. Однако, не существует признанных методов, гарантирующих, что продукты человеческой крови не инфицированы. Все реагенты, содержащие продукты человеческого происхождения и образцы пациентов должны рассматриваться как потенциально инфицированные.

Избегать контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). При попадании ТМБ на кожу тщательно промыть водой с мылом.

Стоп-раствор содержит соляную кислоту. При попадании на кожу тщательно промыть водой и обратиться к врачу.

5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Объем упаковки – 96 определений, 1 шт

Микротитрационный планшет из 12 стрипов по 8 лунок каждый, покрытый очищенными фосфолипидами: кардиолипин, фосфатидил серин, фосфатидил инозитол, фосфатидиловая кислота, насыщенная человеческим β -гликопротеином I. Готовый к использованию.

6 флаконов, 1,5 мл каждый

Калибраторы IgG и IgM антифосфолипидные в основе сыворотки/буфера, содержащие антитела в PBS/BSA матрице:

IgG: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 GPL Ед/мл и

IgM: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 MPL Ед/мл

Готовые к использованию.

2 флакона, 1,5 мл каждый

Контроли в основе сыворотки/буфера. Положительный(1) и отрицательный(2), соответствующие концентрации см. флакон лист контроля качества. Готовые к использованию.

1 флакон, 20 мл

Буфер образца, желтый, концентрат(5x).

1 флакон, 15 мл

Раствор ферментного конъюгата (светло красный), кроличий анти-h-IgG-IgG, с пероксидазой хрена. Готовый к использованию.

1 флакон, 15 мл

Раствор ферментного конъюгата (светло красный), кроличий анти-h-IgM-IgG, с пероксидазой хрена. Готовый к использованию.

1 флакон, 15 мл

ТМБ субстрат раствор. Готовый к использованию.

1 флакон, 15 мл

Стоп-раствор (1 М соляная кислота). Готовый к использованию.

1 флакон, 20 мл

Промывочный раствор, концентрат (50x).

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °C.

2. Держать лунки микропланшетов в герметичной мешочке с влагопоглотителем.

3. Реагенты стабильны до истечения срока набора.

4. Не подвергать реагенты воздействию тепла, солнца или яркого света в процессе хранения и использования.
5. Разбавленный буфер образца и промывочный буфер устойчивы, по крайней мере 30 дней если хранить при температуре 2-8°C.

7. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Спектрофотометр 450 нм
- Многоканальный дозатор или пипетка на 100 мкл.
- Вортекс
- Пипетки на 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- ПО для обработки данных.

Подготовка реагентов

- дистиллированная или деионизированная вода
- мерная колба на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

8. ЗАБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Собирайте образцы крови с использованием приемлемых медицинских методов, чтобы избежать гемолиза.
2. Позволить крови свернуться и отделить сыворотку центрифугированием.
3. Испытуемая сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Загрязнения гемолизом или липемией лучше избегать, но это не влияет на результаты анализа.
4. Образцы можно хранить в холодильнике при температуре 2-8 ° C до 5 дней и хранить при температуре -20°C до 6 месяцев.

9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после истечения их срока годности.
 2. Не заменяйте компоненты набора из разных серий.
 3. Все материалы должны быть комнатной температуры (20-28°C).
 4. Подготовьте все реагенты и образцы перед началом анализа. Если анализ начат, он должен быть выполнен без перерыва, чтобы получить наиболее надежные и устойчивые результаты.
 5. Выполнять этапы анализа только в указанном порядке.
 6. Всегда используйте свежее разведенные образцы.
 7. Раскапать все реагенты и образцы на дно лунки.
 8. Для того чтобы избежать переноса загрязнений, заменять наконечники между образцами и контролями различных наборов.
 9. Очень важно мыть тщательно лунки и удалять последние капельки промывочным буфером для достижения наилучшего результата.
 10. Все этапы инкубации должны быть четко определены во времени.
 11. Контрольные сыворотки или их объединения следует постоянно анализировать как неизвестные, чтобы проверять эффективность реагентов и анализа.
 12. Не использовать повторно микропланшеты.
- Для всех контролей соответствующие концентрации приведены на этикетках флаконов. С помощью этих концентраций можно рассчитать калибровочную кривую, чтобы определить результаты пациента полуколичественно.

10. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовка буфера для образцов

Развести содержимое каждого флакона концентрата буфера (5x) дистиллированной или деионизированной водой до общего объема 100 мл перед использованием. Хранить в холодильнике: стабильны при 2 - 8 °C до 30 дней после приготовления или до даты срока годности, указанной на флаконе.

Подготовка промывочного буферного раствора

Развести содержимое каждого флакона концентрата промывочного буферного раствора (50x) дистиллированной или деионизированной водой до общего объема 1000 мл перед использованием. Хранить в холодильнике: стабилен при 2 - 8 °C до 30 дней или до даты срока годности, указанной на флаконе.

Подготовка образцов

Разбавить перед анализом все образцы пациентов 1:100 буфером образцов.

Поэтому в полистироловой пробирке смешать 10 мкл образца с 990 мкл буфера образца. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию и не должны быть разбавлены.

11. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Подготовить необходимое количество стрипов для пипетирования калибраторов, контролей и предварительно разведенных образцов пациентов в дублях.
2. Для определения аутоантител одного класса **раскапать 100 мкл калибраторов, контролей и образцов** в лунки. Для определения IgG и IgM аутоантител калибраторы, контроли и образцы необходимо раскапывать дважды.

	1	2	3	4	5	6
A	SA	SE	P1	P5		
B	SA	SE	P1	P5		
C	SB	SF	P2	P..		
D	SB	SF	P2	P..		
E	SC	C1	P3			
F	SC	C1	P3			
G	SD	C2	P4			
H	SD	C2	P4			

SA - SF: стандарты A - F
 P1, P2... образцы пациента 1, 2 ...
 C1: положительный контроль
 C2: отрицательный контроль

3. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (20 - 28 °C).
 4. Удалить содержимое лунок и промыть **3 раза 300 мкл промывочного раствора**.
 5. Раскапать **100 мкл раствора ферментного конъюгата** в каждую лунку.
 6. Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
 7. Удалить содержимое лунок и промыть **3 раза 300 мкл промывочного раствора**.
 8. Раскапать **100 мкл субстрат-раствора ТМБ** в каждую лунку.
 9. Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
 10. Добавить **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку и оставить на 5 минут.
 11. Считать оптическую плотность **450 нм** и подсчитать результаты.
- Развившийся цвет стабилен в течение 30 минут. Необходимо считать оптическую плотность за это время.**

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1 Контроль качества

Этот анализ только действителен если оптическая плотность при 450 нм для положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2), а также для стандарта A и F соответствует указанному диапазону по контролю качества в сертификате, который прилагается к каждому набору анализа! Если любой из этих критериев не выполняется, то результаты являются недействительными и исследование необходимо повторить.

12.2 Подсчет результатов

Для настоящего набора используется 4-параметровая функция с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации в используемом методе обработки данных.

Рекомендуемое графопостроение линейно-логарифмическое

Сначала необходимо подсчитать средние значения оптической плотности для каждого калибратора. С использованием линейно-логарифмической бумаги отметить эти значения против соответствующей концентрации. Построить стандартную кривую. Вычислить неизвестные концентрации по стандартной кривой путем интерполяции.

Пример подсчета результатов

Следующие данные приведены только в качестве иллюстрации и не могут быть использованы для вычисления неизвестных.

anti-PL	No	Position	OD 1	OD 2	Mean	Conc. 1	Conc. 2	Mean	decl.	Conc.	CV %
IgG	STA	A 1/B 1	0.051	0.049	0.050	0.3	0.1	0.2	0.0	3	
IgG	STB	C 1/D 1	0.163	0.160	0.161	6.4	6.3	6.3	6.3	1	
IgG	STC	E 1/F 1	0.310	0.273	0.291	12.8	11.2	12.0	12.5	9	
IgG	STD	G 1/H 1	0.603	0.630	0.616	25	26	26	25	3	
IgG	STE	A 2/B 2	1.122	1.054	1.088	51	47	49	50	4	
IgG	STF	C 2/D 2	1.742	1.787	1.765	98	103	101	100	2	
IgM	STA	A 7/B 7	0.022	0.021	0.022	0.2	0.1	0.2	0.0	3	
IgM	STB	C 7/D 7	0.211	0.205	0.208	6.1	6.0	6.1	6.3	2	
IgM	STC	E 7/F 7	0.465	0.462	0.464	13.0	12.9	13.0	12.5	0	
IgM	STD	G 7/H 7	0.788	0.879	0.833	23	26	24	25	8	
IgM	STE	A 8/B 8	1.411	1.382	1.397	52	50	51	50	1	
IgM	STF	C 8/D 8	1.868	1.852	1.860	101	98	99	100	1	

anti-PL = антитела к фосфолипидам

Position = лунка

OD = оптическая плотность

Mean = средние значения

Conc. = концентрация

CV = коэффициент вариации

STA...F = стандарт A...F

12.3 Интерпретация результатов

При изучении образцов сыворотки здоровых доноров для данного набора определены следующие значения:

Антитела к фосфолипидам

	IgG [GPL E/мл]	IgM [MPL E/мл]
норма:	< 10	< 10
повышенные:	≥ 10	≥ 10

Положительный результат должен быть проверен в соответствии с полной клинической картиной. Решение по применению терапии должно приниматься индивидуально. Каждой лаборатории рекомендуется установить свои диапазоны нормальных и патологических значений.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА**13.1 Параллелизм**

В исследованиях на разведение сывороток концентрации IgG- и IgM-антител разводились буфером для образцов и тестировались на данном наборе. Набор показывает линейность на всем диапазоне измерений.

13.2 Чувствительность

Минимальный определяемый уровень для данного анализа составляет 0,5 Е/мл.

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